



HAL
open science

Impact de la contribution maternelle du gène *auts2a* sur le neurodéveloppement et le comportement de la descendance chez *Oryzias latipes*

Antoine Clement

► To cite this version:

Antoine Clement. Impact de la contribution maternelle du gène *auts2a* sur le neurodéveloppement et le comportement de la descendance chez *Oryzias latipes*. Biologie cellulaire. Université de Rennes, 2023. Français. NNT : 2023URENB014 . tel-04356489

HAL Id: tel-04356489

<https://theses.hal.science/tel-04356489v1>

Submitted on 20 Dec 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES

ECOLE DOCTORALE N° 637

Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : *BIOLOGIE CELLULAIRE, BIOLOGIE DU DEVELOPPEMENT*

Par

Antoine Emile CLEMENT

Impact de la contribution maternelle du gène *auts2a* sur le neurodéveloppement et le comportement de la descendance chez *Oryzias latipes*

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 30 Mars 2023

Unité de recherche : INRAE UR 1037 – Laboratoire de Physiologie et Génomique des Poissons (LPGP)

Rapporteurs avant soutenance :

Sylvie RETAUX
Xavier COUSIN

Directrice de recherche – UMR 9197 CNRS – Institut NeuroPsi
Chargé de recherche – UMR 9190 MARBEC – INRAE

Composition du Jury :

Président :

Luc PAILLARD

Professeur des universités – Université de Rennes 1 – UMR 6290 CNRS – Institut de Génétique et Développement de Rennes (IGDR)

Examineurs :

Sylvie RETAUX
Xavier COUSIN
Valérie DUPE

Directrice de recherche – UMR 9197 CNRS – Institut NeuroPsi
Chargé de recherche – UMR 9190 MARBEC – INRAE
Chargée de recherche – UMR 6290 CNRS – Institut de Génétique et Développement de Rennes (IGDR)

Marianne LATINUS

Chargée de recherche – U1253 INSERM – Ibrain, Psychiatrie Neuro-fonctionnelle

Dir. de thèse :

Julien BOBE

Directeur de recherche – UR 1037 INRAE – Laboratoire de Physiologie et Génomique des Poissons (LPGP)

Invitée :

Violaine COLSON

Ingénieur de recherche - UR 1037 INRAE – Laboratoire de Physiologie et Génomique des Poissons (LPGP)

Remerciements

Dans un premier temps, j'aimerais remercier les membres du jury qui ont généreusement accepté d'évaluer mon travail de thèse, Sylvie RETAUX, Valérie DUPE, Marianne LATINUS, Xavier COUSIN et Luc PAILLARD.

Beaucoup de personnes ont contribué à la réussite de ce travail et à la personne que je suis aujourd'hui, je tiens donc à vous remercier sincèrement à travers ces quelques lignes.

Je ne peux que commencer par toi Julien, merci tout d'abord de m'avoir donné la chance de travailler sur ce sujet passionnant ce 11 juillet 2019. Merci de m'avoir accordé ta confiance du premier au dernier jour, de m'avoir transmis tes connaissances, d'avoir écouté mes avis et mes arguments. Ta manière de gérer tes étudiants fut un modèle d'inspiration pour moi. Je te remercie également d'avoir été si compréhensif et bienveillant lorsque ce drame m'a frappé, je ne sais pas si j'aurai pu continuer sans ton soutien dans ces moments difficiles. Je pense que le plus important dans un travail de thèse est la relation entre l'encadrant et l'étudiant, et si j'en suis là aujourd'hui c'est que tu as parfaitement accompli ta mission. Mille merci.

Violaine, ma co-encadrante de thèse, merci pour ton écoute et tout le savoir que tu as pu me transmettre dans un domaine que je ne connaissais pas du tout. J'ai énormément apprécié cette thématique de travail et le temps passé avec toi. Merci également d'avoir écouté mes états d'âme par moment, cela m'a fait beaucoup de bien.

J'aimerais également remercier l'équipe des animaliers sans qui notre travail serait impossible. Merci de m'avoir privatisé votre salle de quarantaine initiale ! Merci à Guillaume et Cécile d'avoir pris soin de mes petits protégés au cours de ces trois années. Merci à Pierre-Lô et Guillaume (oui encore) pour avoir conçu toutes les installations permettant de réaliser mes manipes de comportement et pour nos diverses discussions qui me donnaient toujours le sourire. Un grand Merci à Amélie également, toujours arrangeante et bienveillante. Je garderai en mémoire nos discussions au détour d'un aquarium ou d'une cigarette et te souhaite le meilleur pour ton nouveau projet.

Je remercie également toutes les personnes qui ont contribué à ce projet, de près ou de loin. Thao, merci de m'avoir formé aux manipes et d'avoir confirmé que je n'avais pas rater l'extraction d'ARN de mes premiers prélèvements ! Merci à Alexandra pour ses sublimes protocoles (sans rire ce sont les meilleurs) et pour les moments partagés à la paillasse pendant que les centrés tournaient. Merci aux bio informaticiens, Aurélien, Jérôme et Cervin, qui étaient toujours prêt à m'aider. Merci à Thomas de m'avoir aidé dans l'analyse des dernières manipes de comportement. Merci à Amaury pour les parties de ping-pong endiablées et les conversations partagées, qu'elles soient scientifiques ou personnelles.

J'aimerais également remercier toute l'équipe du secrétariat, Patricia, Emilie, Nathalie, Guylène et Agnès pour votre aide dans la paperasse (c'est incroyable ce qu'il y en a ...), les commandes et votre travail en général. Mention spéciale pour Patricia qui est un peu notre maman à tous ici !

Merci également à toutes les autres personnes du laboratoire que je n'ai pas la place de citer ici, avec qui j'ai pu partager de jolis moments et qui ont contribué à cette atmosphère de travail agréable. Je repars d'ici en sachant que les bretons sont très gentils et bienveillants, et c'est grâce à vous toutes et tous.

Merci également à la grande bande d'étudiants du laboratoire, en particulier les doctorants. Manon, merci d'avoir été présente tout au long de cette thèse et pour toutes ces crises de rires. Un grand merci également pour t'être occupée des serpents et des chats quand j'ai dû m'absenter, tu es la meilleur pet sitter qui soit ! Aude, merci pour toutes nos discussions, de m'avoir écouté et soutenu dans ces moments difficiles. Merci aussi pour ton innocence et ta naïveté qui me font relativiser la mienne ! Constance, merci d'avoir été la stagiaire que tu as été, pour ton soutien et ton aide à chaque fois que j'en avais besoin. Ta bonne humeur et ta force d'esprit font du bien. Je te souhaite tout le meilleur pour ta thèse sur ce projet qui semble très intéressant ! Maxime, merci pour ton humour quotidien et bon courage pour la dernière ligne droite ! Merci également aux anciens doctorants Boudjema et mon coloc de bureau Emilien, vous m'avez manqué pour la fin de cette thèse ! Merci à Lucas, Simon, Morgane, Sarah, Aline et Valentine pour ces bons moments passés ensemble.

J'aimerais évidemment remercier mon cercle très proche, des gens qui pour la plupart m'ont vu naître et m'ont appris la vie. Merci à Fanny, James, Fafa à lunettes, Pierrot, Sylvie pour avoir toujours été là pour moi.

Un grand merci également à Caro et Fafa, je ne pouvais pas espérer de meilleurs beaux-parents !

Un immense merci à Magali et Frédéric (c'est étrange de vous nommer par vos prénoms) pour les parents géniaux que vous avez été durant mon enfance et pour les parents tout aussi géniaux que vous êtes aujourd'hui. Je n'aurais jamais réussi à faire tout ça sans vous. Vous m'avez transmis votre ambition, votre résilience, vos valeurs, votre amour, votre humour et votre confiance et je pense sincèrement que toutes ces choses étaient nécessaires à ma réussite, qui est également en grande partie la vôtre. Vous avez tout donné pour vos enfants et pouvez être fiers des parents que vous êtes. Vous ferez de merveilleux grands parents.

Enfin, merci infiniment à toi Manon pour être ma petite amie depuis 8 ans. Merci de me supporter et de m'apporter autant au quotidien. Merci d'avoir toujours cru en moi, de m'avoir soutenu, de t'être adaptée à mon parcours et de m'aider à devenir quelqu'un de meilleur jour après jour. Merci d'être ma meilleure amie, ma complice, mon équipière, mon pilier. Je n'aurais pas pu réussir tout ça sans toi à mes côtés. Pour finir, je ne pourrai jamais assez te remercier de porter notre enfant qui verra le jour dans quelques semaines, ce qui sera sans aucun doute, le plus beau cadeau qui soit. J'ai hâte que nous commençons cette nouvelle aventure tous les trois.

Je te dédie ce travail à toi mon petit frère, Charles,
qui me manque toujours un peu plus chaque jour.

SOMMAIRE

SOMMAIRE.....	1
LISTE DES ABREVIATIONS.....	5
INTRODUCTION GENERALE.....	7
INTRODUCTION.....	9
I- Gène <i>AUTS2</i>	11
I.1- Généralités.....	11
I.1.1- Découverte et histoire du gène.....	11
I.1.2- Syndrome <i>AUTS2</i>	12
I.1.2.a- Troubles du spectre autistique.....	14
I.1.2.b- Autres neuropathologies associées au gène <i>AUTS2</i>	16
I.2- Caractéristiques du gène	17
I.2.1- Caractéristiques génomiques	17
I.2.2- Rôles et actions du gène.....	20
I.2.2.a- Dans le noyau : un régulateur de la transcription	21
I.2.2.b- Dans le cytoplasme : un rôle dans la mise en place du cytosquelette.....	25
I.3- Modèles animaux mutants	26
I.3.1- Le poisson zèbre	26
I.3.2- La souris	27
I.4- Gènes de la famille <i>AUTS2</i>	28
II- Développement embryonnaire	31
II.1- Stades clés du développement embryonnaire chez les vertébrés.....	31
II.1.1- La fécondation	31
II.1.2- La segmentation	32
II.1.3- La gastrulation	33
II.1.3.a- L'épibolie.....	33
II.1.3.b- L'internalisation	35
II.1.3.c- La convergence et l'extension	35
II.1.4- La neurulation.....	36
II.1.5- La délimitation et l'organogenèse	39

II.2- Les facteurs maternels.....	39
II.2.1- La dégradation des ARNm	40
II.2.1.a- Les protéines de liaison à l'ARN.....	40
II.2.1.b- Les petits ARN non codants.....	40
II.2.1.c- Modifications des ARNm maternels	41
II.2.1.d- Les codons "optimaux"	41
II.2.2- L'activation du génome zygotique.....	43
II.2.2.a- Activation de la ZGA par dilution des répresseurs transcriptionnels	44
II.2.2.b- Activation de la ZGA via des activateurs transcriptionnels	45
II.2.3- Impact de l'expression des facteurs maternels dans le développement du système nerveux	46
II.2.3.a- La formation des axes chez l'embryon	46
II.2.3.b- Exemples de modèles mettant en lumière le contrôle du neurodéveloppement par les facteurs maternels	50
II.3- Expression maternelle du gène <i>auts2a</i>	53
III- Le médaka (<i>Oryzias latipes</i>): un modèle adapté	55
III.1- Généralités.....	55
III.2- Le comportement du médaka	56
III.3- Le choix du médaka dans le projet <i>auts2a</i>	58
RESULTATS	59
Chapitre1 Déroulement de la thèse	61
A- Exposition de médakas à un stress thermique.....	61
B- Créations de lignées génétiquement modifiées pour le gène <i>auts2a</i>	62
B.1- Lignée délétée en partie C-terminale.....	63
B.1.1- Lignée Δ 4032	63
B.2- Lignées délétées en région N-terminale	65
B.2.1- Lignée 2 Δ	65
B.2.2- Lignée Δ 338K	67
Chapitre 2 Evolution du gène AUTS2 chez les vertébrés.....	68
A- Objectif du travail de recherche	68
B- Article	70

C- En conclusion	94
Chapitre 3 Impact de l'absence de la contribution maternelle d' <i>auts2a</i>	95
A- Objectif du travail de recherche	95
B- Article	97
C- Résultats supplémentaires et discussion.....	131
C.1- Lignées mutantes.....	131
C.2- Conséquences de l'invalidation d' <i>auts2a</i> maternel au cours du développement embryonnaire	133
C.2.1- Stade une cellule	133
C.2.2- Stade de late neurula.....	136
C.2.3- Stade de formation du cerveau embryonnaire	141
C.2.4- Enrichissement chromosomique.....	141
C.3- Phénotypes macroscopiques observés	145
C.3.1- Au cours du développement embryonnaire	145
C.3.2- Chez l'individu adulte	145
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	151
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	155

LISTE DES ABREVIATIONS

aa: acide(s) aminé(s)
ARN : Acide Ribonucléique
ARNm: ARN messenger
ARNt: ARN de transfert
CNV: Copy Number Variation
C-ter: Carboxy terminale
EVL: Cellules enveloppantes
FGF/Fgf: Fibroblast Growth Factor
GEFs: Guanine nucleotide Exchange Factors
hpf: heure post-fécondation
kb: kilobase
KD: Knock Down
KO: Knock Out
MEC : Matrice Extracellulaire
miRNA: micro ARN
MZT: Maternal to Zygotic Transition
NLS : Nuclear localization signal
N-ter : Amino terminale
pb: paire de base
RBP : RNA-Binding protein
SAT : Site Alternatif de Transcription
SNC : Système Nerveux Central
SNP : Single Nucleotide Polymorphism
TALEN: Transcription Activator-Like Effector Nuclease
TSA : Troubles du Spectre Autistique
YVL : Syncytium nucléaire Vitellin
ZGA : Zygote Genome Activation

INTRODUCTION GENERALE

Ces dernières années, l'intérêt porté à l'effet intergénérationnel des facteurs maternels n'a cessé de croître, et plus particulièrement la façon dont l'expression des gènes pendant la formation des gamètes est capable de déclencher des effets à long terme. Les facteurs maternels comprennent de nombreux acteurs moléculaires tel que les acides ribonucléiques (ARN), les protéines, les hormones, les marques épigénétiques (de méthylation par exemple) ou encore les modifications d'histones. Tout au long de l'ovogenèse ces facteurs maternels sont accumulés et régulés dans l'ovocyte.

Au cours de cette thèse, je me suis donc intéressé à la contribution de l'expression maternelle d'un gène connu comme un régulateur du développement du système nerveux qui est associé à des neuropathologies tel que des troubles du spectre autistique, la schizophrénie ou encore un retard mental : le gène *AUTS2*. Ce gène de très grande taille et au nombre de différents transcrits élevé, joue de nombreux rôles durant le développement embryonnaire, que ce soit en amont ou en aval de l'activation du génome zygotique. Il est exprimé dans le noyau, où il joue un rôle de régulateur (activateur ou inhibiteur) de la transcription de gènes du système nerveux central (SNC), et dans le cytoplasme où il permet le développement et l'organisation des neurones.

Ce projet est né suite à la découverte d'une dérégulation importante du gène *auts2a* (orthologue du gène *AUTS2* chez les poissons) dans les ovocytes matures (gamètes) issus de truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) exposées à un stress thermique lors de l'ovogenèse. Les descendants de ces femelles présentaient des dommages cognitifs à long terme, ce qui interroge sur l'impact et sur les mécanismes de l'expression maternelle de ce gène.

Avec pour objectif de caractériser l'impact de l'absence la contribution maternelle d'*auts2a* chez la descendance, nous avons donc généré différentes lignées de médaka (*Oryzias latipes*) délétées de certaines régions du gène par la technique de CRISPR/Cas9 afin de répondre à ces questions dans une espèce à temps de génération court.

INTRODUCTION

I- Gène *AUTS2*

I.1- Généralités

I.1.1- Découverte et histoire du gène

Le gène *AUTS2* a été identifié pour la première fois en 1997 dans une banque de transcrits exprimés dans le cerveau humain (Ishikawa 1997), mais ce n'est qu'au début du 21^{ème} siècle que des premiers phénotypes ont pu être reliés à des anomalies du gène. En 2002, chez des jumeaux, homozygotes pour une translocation t(7 ;20) (q11.2 ;p11.2), qui présentaient tous deux une forme sévère d'autisme (Sultana et al. 2002). C'est suite à cette découverte que ce gène a été nommé *AUTS2*, pour « Autism susceptibility candidate two ». En 2007, trois translocations différentes ont été observées chez trois patients présentant un retard mental qui se caractérise par un score de QI inférieur à 70 ainsi qu'un déficit de comportement observé dès l'enfance (Kalscheuer et al. 2007).

Au cours des années, des anomalies d'*AUTS2*, tels que des single nucleotide polymorphism (SNP) ou des copy number variations (CNV), ont été reliées à d'autres neuropathologies tels que la schizophrénie, la microcéphalie, l'épilepsie ou encore la paralysie (Mefford et al. 2010; B. Zhang et al. 2014). Toutes ces neuropathologies liées aux anomalies du gène *AUTS2*, ainsi que sa conservation au cours de l'évolution humaine, laissent penser que ce gène est nécessaire au bon développement neurologique, ce qui en fait un gène de neurodéveloppement important et nécessaire à l'obtention d'un phénotype normal (Amarillo et al. 2014; Nir Oksenberg et al. 2013). De plus, des anomalies de type SNP dans le gène *AUTS2* ont également été corrélées à des sensibilités de dépendances à l'alcool et à l'héroïne accrues (Y.-H. Chen et al. 2013; G. Schumann et al. 2011).

I.1.2- Syndrome AUTS2

La perturbation du gène *AUTS2* est à l'origine d'une forme syndromique de déficience intellectuelle connue sous le nom de « syndrome AUTS2 ». Ce syndrome se caractérise par un phénotype variable selon les individus, composé d'un retard global de développement et/ou d'une déficience intellectuelle. Ces caractéristiques sont généralement associées à une microcéphalie, une hypotonie, une taille réduite ainsi qu'à une dysmorphie faciale reconnaissable. Cette grande variabilité inter individus et inter familles a conduit à la création d'un score de sévérité du syndrome AUTS2 (Beunders et al. 2013; 2016). Ce score est basé sur 32 caractéristiques observées avec une fréquence de plus de 10% dans la première cohorte de patients décrits avec des défauts d'AUTS2. Il comprend des critères tels que la croissance, les troubles neurologiques et neurodéveloppementaux, les types de dysmorphisme, les anomalies du squelette et les malformations congénitales. La somme des caractéristiques observées permet de calculer un score qui caractérise un syndrome plus ou moins sévère (Beunders et al. 2013) (Tableau 1).

Au total, 66 patients atteints du syndrome AUTS2 ont été référencés. 97% d'entre eux présentaient un retard global de développement et/ou une déficience intellectuelle, 65% présentaient une microcéphalie, 62% présentaient un trouble de l'hyperactivité, 60% présentaient des difficultés à s'alimenter et 56% des patients présentaient des troubles du spectre autistiques (TSA). Les autres traits phénotypiques ont été observés dans moins de 50% des cas (Sanchez-Jimeno et al. 2021).

Caractéristiques cliniques	Exemple d'un cas	Fréquence dans la littérature
Général		
Age lors du diagnostic	10 ans et 7 mois	
Genre	F	
Mutation <i>De novo</i>	1	
Croissance et nourissage		
Poids de naissance faible	-	18,2% (10/55)
Petite taille	1	44,1% (26/59)
Microcéphalie	1	64,9% (37/57)
Difficultés à se nourrir	1	60,0% (33/55)
Caractéristiques neurodéveloppementales		
Retard mental et/ou retard de développement	1	97,0% (64/66)
Trouble du spectre autistique	1	55,4% (31/56)
Sensibilité aux sons	1	32,5% (13/40)
Hyperactivité et/ou trouble de l'attention	1	60,7% (17/28)
Troubles neurologiques		
Hypotonie généralisée	1	38,3% (23/60)
Structure anormale du cerveau	-	23,9% (11/46)
Paralysie cérébrale et/ou spasticité	-	35,1% (20/55)
Dysmorphie		
Sourcils arqués	1	35,1% (13/37)
Hypertélorisme	-	37,8% (14/37)
Proptose	-	18,9% (7/37)
Fente palpébrale courte	-	24,3% (9/37)
Fente palpébrale ascendante	-	13,5% (5/37)
Ptosis	1	29,7% (11/37)
Pli épicanthique	-	21,6% (8/37)
Strabisme	-	24,3% (9/37)
Pointe nasale allongée	1	18,9% (7/37)
Narines antéversées	-	18,9% (7/37)
Arcade nasale profonde et/ou large	-	32,4% (12/37)
Philtrum court et/ou retourné	-	29,7% (11/37)
Micrognathie et rétrognathie	-	30,6% (11/36)
Oreilles basses	-	30,6% (11/36)
Fosse d'oreille	-	13,9% (5/36)
Bouche étroite	-	43,2% (16/37)
Anomalies squelettiques		
Cyphose et/ou scoliose	-	21,3% (10/47)
Arthrogrypose et/ou plis palmaires peu profonds	-	21,4% (6/28)
tendons du talon serrés	-	16,7% (2/12)
Malformations congénitales		
Hernie ombilicale et/ou inguinale	-	10,2% (6/59)
Foramen ovale patenté	-	6,9% (2/29)
ASS	11	

Tab 1 : Tableau de score de sévérité du Syndrome AUTS2 définit par Beunders et al., 2013. Données issues de l'article de [Sanchez-Jimeno., 2021.](#)

I.1.2.a- Troubles du spectre autistique

L'autisme est un syndrome complexe caractérisé par un large éventail de symptômes, c'est pourquoi on parle plutôt de troubles du spectre autistique (TSA). Ces troubles se définissent par des désordres neurologiques et développementaux qui affectent la manière d'interagir, de communiquer et d'apprendre des individus. On estime aujourd'hui que la prévalence du TSA est d'une naissance pour 160 ([World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2019](#)).

Ces TSA résultent d'altérations génétiques, épigénétiques ou environnementales à des stades précoces du développement du cerveau et de l'organisation neuronale ([Lord et al. 2018](#)). Une étude menée sur plus de 2 millions d'enfants nés entre 1982 et 2006 en Suède a montré que les TSA avaient une héritabilité d'environ 50% ([Sandin et al. 2014](#)).

Différentes hypothèses ont été posées pour justifier ce manque d'héritabilité des TSA tel que l'existence de variants faiblement ou non caractérisés, de pénétrance incomplète, de facteurs épigénétiques ou encore d'interaction génotype/environnement. En effet, il a été montré que les patients atteints de TSA avaient 3 à 5 fois plus de CNV *de novo* que les autres membres de la famille et des sujets contrôles non atteints ([Pinto et al. 2010](#)). Les CNV peuvent modifier l'expression des gènes et leur pénétrance. Il a également été démontré que les facteurs épigénétiques tels que la méthylation de l'ADN, la modification des histones ou encore les micro ARN (miRNAs) pouvaient jouer un rôle important dans des prédispositions autistiques ([Gropman et Batshaw 2010](#); [Hicks et Middleton 2016](#)). Les causes de phénotypes autistiques sont donc nombreuses et variées, ce qui complique la compréhension de ces pathologies. Ici nous allons nous intéresser à la transmission maternelle d'un gène clef : le gène *AUTS2*.

Différentes altérations moléculaires du gène *AUTS2* ont été corrélés à des phénotypes de TSA :

Les CNV (copy number variation)

Un CNV est défini comme un segment d'ADN dont le nombre de copies est différent de celui trouvé dans le génome de référence. Ces CNV peuvent résulter de variations structurelles au sein du génome, notamment de délétions, de duplications, d'insertions ou de translocations et inversions déséquilibrées qui peuvent mener à une perte ou un gain de segments génomiques (Shaikh 2017). Ils peuvent être transmis par un des deux parents, ou apparaître dans le génome de l'embryon, dans ce cas on parle de CNV *de novo*. Si la modification de la séquence provoque un changement du cadre de lecture avec apparition d'un codon stop prématuré, il n'y aura pas de production protéique ou la production d'une protéine tronquée. Si la modification de la séquence ne modifie pas le cadre de lecture de l'unité ribosomale, la protéine produite sera déléetée des acides aminés correspondant à la séquence déléetée. Ces modifications peuvent rendre la protéine inactive ou modifier sa fonction originelle.

Ils peuvent être placés dans deux catégories basées sur la longueur de la séquence affectée. La première catégorie inclut les polymorphismes du nombre de copies qui sont communs dans la population à une fréquence d'environ 1%. La plupart d'entre eux ont une taille inférieure à 10 kilobases (kb). La seconde catégorie comprend les variants relativement rares plus long que les polymorphismes du nombre de copie, leur taille allant de centaines de milliers de paires de bases (pb) à plus d'un million. Ils sont également appelés microdélétions ou microduplications. Ces variants structurels et rares ont été observés de manière disproportionnée chez des patients présentant un retard mental, un retard de développement ou un TSA (de Vries et al. 2005; Sebat et al. 2007).

Plusieurs CNV du gène *AUTS2* ont pu être décrits, notamment dans sa partie 5'. Des duplications transmises par la mère des individus, d'une région intronique comprenant l'exon 5 de 140 kb et de 179 kb ont été observé chez des individus présentant un TSA (Ben-David et al. 2011; Nagamani et al. 2013). Une duplication de 455 kb, également transmise par la mère, comprenant l'exon 1, une grande partie de l'intron 1 ainsi que les régions en amont a été caractérisée chez un individu présentant un TSA. Les chercheurs ne sachant pas si le CNV est placé en tandem, est inversé ou

sur un autre locus génomique, il est donc difficile de prédire si le cadre de lecture est perturbé (Egger et al. 2014).

Les Translocations chromosomiques équilibrées

L'identification du gène *AUTS2* a été permise par la caractérisation d'une translocation réciproque homozygote t(7;20) (q11.2;p11.2) chez des vrais jumeaux atteints d'une forme sévère d'autisme (Sultana et al. 2002). Cette translocation avait déjà été décrite chez un individu présentant un TSA (de la Barra et al. 1986).

Chez la souris, une translocation réciproque (T(5G2;8A1)) avec un point de rupture situé entre le gène *Auts2* et son gène voisin *Galnt17* (N-acetylgalactosaminyltransferase) dérégule l'expression de ces deux gènes, avec une expression d'uniquement certains isoformes d'*Auts2*. Le phénotype associé correspond aux phénotypes liés à *AUTS2* chez l'humain avec une taille réduite, une structure cranio faciale anormale, des capacités de mémorisation et d'apprentissage modifiées. Des anomalies dans les cellules de Purkinje (de nombre, de forme et de différenciation) et dans les neurones de l'hippocampe ont également été décrites comme associées aux TSA (Weisner et al. 2019).

I.1.2.b- Autres neuropathologies associées au gène *AUTS2*

Schizophrénie

La schizophrénie est un trouble psychiatrique grave qui déforme les pensées, les mouvements, l'expression des émotions, la perception de la réalité et perturbe les relations avec les autres. Sa prévalence est estimée à 0,32% dans le monde entier (World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2022). En 2014, une équipe chinoise a montré qu'un SNP (rs6943555) dans le gène *AUTS2*, déjà associé au TSA, à un risque accru de suicide et de dépendance à l'héroïne, était fortement associé à la schizophrénie chez les femmes chinoises, et que le génotype AA présent dans 8.3% des individus de la cohorte était associé à une légère augmentation du risque de schizophrénie (Zhang et al. 2014). Une seconde étude portant sur le même SNP a été réalisée dans

la population Turque et a montré une corrélation entre ce variant et la schizophrénie, chez les hommes cette fois-ci ([Ozsoy et al. 2020](#)).

Epilepsie

L'épilepsie se caractérise par une prédisposition durable à générer des crises d'épilepsie spontanées et à de nombreuses conséquences neurobiologiques, cognitives et psychosociales. Cette pathologie survient chez 7% des patients atteints du syndrome AUTS2 ([Sanchez-Jimeno et al. 2021](#)).

Hypotonie

L'hypotonie généralisée se caractérise par une diminution pathologique du tonus postural comprenant au moins les extrémités, le tronc et le cou. Les sites pathologiques possibles chez le nouveau-né sont le cerveau, le tronc cérébral, la colonne cervicale, le cervelet, les moto neurones de la colonne vertébrale, les nerfs ou encore les muscles. 40% des patients présentant un syndrome AUTS2 montre une hypotonie généralisée ([Sanchez-Jimeno et al. 2021](#)).

I.2- Caractéristiques du gène

I.2.1- Caractéristiques génomiques

Le gène *AUTS2* est un très grand gène de 1 195 032 pb situé sur le chromosome humain 7q11.22 (UCSD Genome Browser, hg38). Il est composé de 19 exons, les 6 premiers sont séparés par de larges régions introniques (allant de 16 à 301 kb) du côté 5' tandis que les 13 restants sont compactés et séparés par de courtes régions introniques (allant de 1 à 3 kb) du côté 3' ([Oksenberg et al. 2014](#)). La taille totale du transcrit code pour une protéine de 1259 acides aminés (aa) chez l'homme et pour une protéine de 1261 aa chez la souris, cependant de nombreux isoformes sont générés par des sites alternatifs de transcription (SAT) et des épissages alternatifs. Dans le cerveau humain, un isoforme court correspondant à la partie 3' généré par un SAT présent dans l'exon 9 a été identifié ([Beunders et al. 2013](#)). D'autres variants obtenus par épissage alternatif

des exons 10 et 12 ont également été décrits chez l'humain ([Monderer-Rothkoff et al. 2019](#)). Dans le cerveau murin, deux isoformes courtes correspondant à la partie 3' ont été détectées en plus de l'isoforme longue par des techniques de 5' rapid amplification of cDNA ends (5' RACE) et de western blot. La première de ces isoformes courtes débute sa transcription dans l'exon 8, pour une taille de la protéine de 786 aa, et la seconde débute dans l'exon 9 pour une taille de la protéine de 711 aa ([Kei Hori et al. 2014](#)). De plus, selon ENSEMBL, il existerait 34 variants d'AUTS2 chez l'homme (ENSG00000158321) (dont 16 seraient codants) et 17 variants d'Auts2 chez la souris (ENSMUSG00000029673) (dont 7 seraient codants), qui ne comprennent pas l'isoforme de 711 aa détectée chez la souris.

La protéine AUTS2 canonique est composée de 2 domaines riche en proline PR1 (aa 287 à 470) et PR2 (aa 545 à 646) qui lui permettraient d'interagir avec d'autres protéines ([Williamson 1994](#)). Trois motifs de signal de localisation nucléaire (NLS) sont présents dans la partie amino terminale de la protéine (N-ter) et sont donc absents dans les isoformes courts de la partie carboxy terminale (C-ter) ([Figure 1](#)). Ces motifs d'une dizaine d'acides aminés sont reconnus par des importines qui vont assurer le transport de la protéine jusqu'au noyau ([Dingwall, Sharnick, et Laskey 1982](#)). Bien qu'il n'y ait pas de séquence NLS dans la partie 3' du gène, la présence de l'isoforme court d'AUTS2 dans le noyau est prédite à 70% (NucPred).

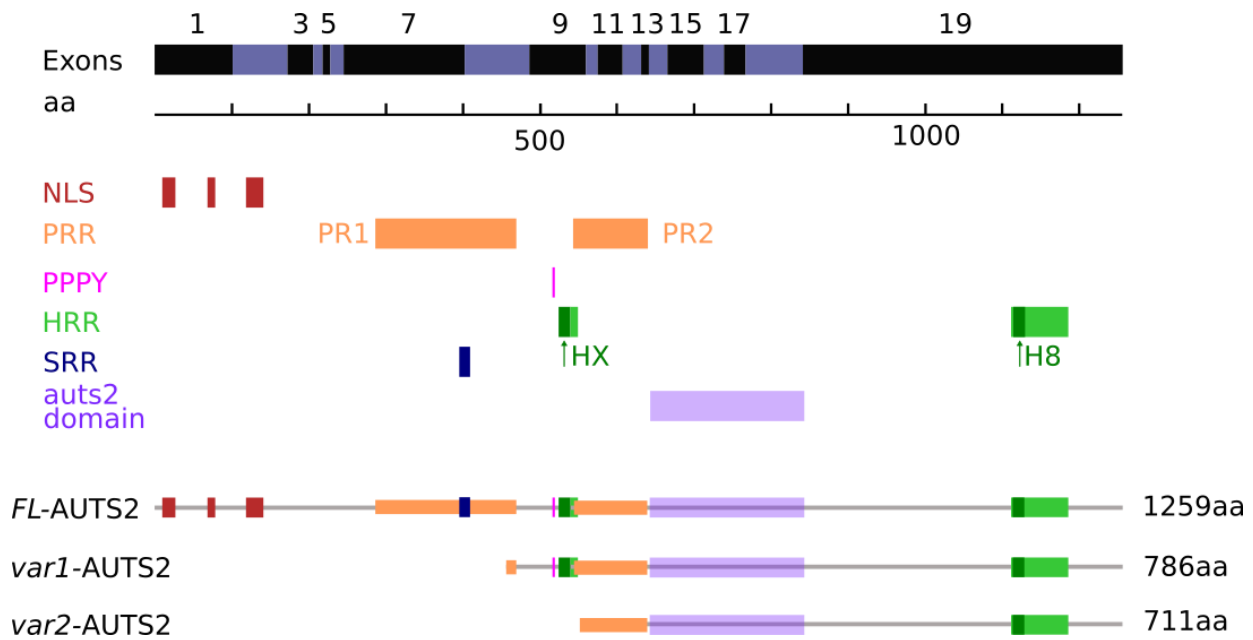


Figure 1 : ARN *AUTS2* et ses différents isoformes protéiques. HRR = Histidine rich region, HX = répétition de motif HQ et HT, H8 = motif contenant 8 histidines successives, NLS = Nuclear localization signal, PPPY = motif PY, PRR = Proline rich region, SRR = Serine rich region, FL-AUTS2 = Full length AUTS2, var1 et var2-AUTS2 = isoformes courts.

La protéine AUTS2 possède également deux régions de répétition d’histidines, une première qui est un motif répété de HQ et HT (aa 525 à 542) quand la seconde comporte 8 histidines successives (aa 1125 à 1133). Ces motifs sont retrouvés chez de nombreux facteurs de transcription et de régulateurs d’expression géniques. Ils se trouvent dans certaines protéines nucléaires ayant une fonction de ciblage des protéines vers des compartiments subnucléaires, tels que l’inter-chromatine (Salichs et al. 2009; Spector et Lamond 2011). Une délétion hétérozygote de 21 bases codants pour les aa 535 à 542 a également été décrite chez un enfant de 9 ans présentant un retard mental, une absence de communication, une dysmorphie faciale et un épisode d’épilepsie (Palumbo et al. 2021). Enfin, il a été montré que cette répétition du motif HX était nécessaire pour le recrutement de P300 par la protéine AUTS2 (Liu et al. 2021).

Un motif de type pro-tyr (PPPY) est également prédit (aa 516 à 519) et pourrait permettre une interaction avec des domaines WW présents sur des facteurs de transcription (Yagi et al. 1999). Ce motif interagit également avec les ubiquitines ligases E3 de la famille *Nedd4* utiles à la

protéolyse, ainsi qu'avec des protéines de transduction de signal (Hatstat et al. 2021; Lin et al. 2019).

D'autres motifs protéiques sont prédit tel que des sites de phosphorylation des protéines kinase (13-16, 77-80, S202, T411, 832-835, S1198,S1233, 1235-1238) et des domaines de fixation de type SH3 (P72, P73, P467, P468, P471, P638, P806, P1234) (Sellers, Robertson, et Tassabehji 2020). Leurs fonctions n'ont pour le moment pas été décrites.

Enfin, une région de 144 aa (645-789) allant de l'exon 13 à 18, appelé « AUTS2 family domain » est présente dans la partie C-terminale de la protéine. En effet, AUTS2 fait partie d'une famille de gènes tripartite, qui comprend en plus d'AUTS2 les protéines FBRS et FBRSL1. Les fonctions de ces gènes n'ont pour l'heure pas été caractérisées bien que des mutations du gène FBRSL1 ont pu être corrélées à diverses neuropathologies (Cf partie I.4).

I.2.2- Rôles et actions du gène

Dans la cellule, la protéine AUTS2 est présente à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau. Dans le cytoplasme, au cours du développement embryonnaire, AUTS2 est impliqué dans l'allongement des axones et des dendrites au cours de la différenciation neuronale puis dans la migration neuronale. AUTS2 favorise également l'organisation du cytosquelette d'actine et la formation de lamellipodes par la voie de signalisation AUTS2-RAC1. Dans le noyau, AUTS2 joue un rôle de facteur de transcription en composant un complexe multiprotéique (PRC1.3/1.5-AUTS2) qui régule l'état de répression de gènes du SNC. Ici, nous allons nous intéresser à ses différents rôles et aux mécanismes moléculaires associés.

I.2.2.a- Dans le noyau : un régulateur de la transcription

Un rôle de facteur de transcription

La première fonction d'AUTS2 comme facteur de transcription a été déterminée par ses interactions avec des régulateurs de la transcription et par sa distribution dans la chromatine ouverte active. Des travaux ont montré par des techniques de purification par affinité en tandem et de spectrophotométrie de masse qu'il existait un complexe PRC1 non canonique contenant la protéine AUTS2 qu'ils ont nommé PRC1.3/1.5-AUTS2 (Gao et al. 2012). Ce complexe est composé des protéines PCGF3 ou PCGF5, RING1, RYBP ou YAF2 et d'AUTS2 (Figure 2). Les complexes PRC1 canoniques (PRC1.2, PRC1.4) catalysent la mono-ubiquitination de la lysine 119 de l'histone H2A par la protéine RING1, ce qui a pour effet la répression de la transcription de gènes. La présence d'AUTS2 dans le complexe PRC1.3/1.5 médie l'activation et la répression de la transcription de gènes du SNC par le recrutement des protéines P300 et CK2. En effet AUTS2 recrute le co-activateur P300, une acetyl-transférase, qui va permettre l'acétylation des histones et donc l'activation de la transcription de gènes. AUTS2 recrute également la protéine CK2 (caséine kinase II), une protéine kinase qui va permettre la phosphorylation de la serine 168 de RING1B. Cette phosphorylation inhibe l'ubiquitination de la lysine 119 de l'histone H2A et donc, inhibe la répression de la transcription de gènes (Gao et al. 2014). AUTS2 a donc un double rôle indirect d'activateur et de répresseur de la transcription (Figure 2). C'est suite à cette découverte que le nom du gène a été changé en « Activator of transcription and developmental regulator ».

Il a ensuite été démontré qu'une protéine supplémentaire, WDR68, était présente dans le complexe PRC1.3/1.5-AUTS2, avec une interaction directe à AUTS2. Bien que sa fonction n'ait pas été étudiée, elle est essentielle pour l'activation de la transcription par le complexe. En effet, l'abolition de l'expression de la protéine WDR68 dans des cellules souches embryonnaires de souris a conduit à des défauts dans la différenciation neuronale (Wang et al. 2018).

Plus récemment, la même équipe de recherche a montré que des mutations dans le motif HX de la protéine AUTS2 altéraient les interactions entre AUTS2 et P300. L'absence d'AUTS2 ou des mutations dans son domaine HX sont également à l'origine d'une mauvaise régulation d'un sous-

ensemble de gènes du développement et d'une limitation dans la différenciation des motoneurons dans des cellules souches embryonnaires de souris (Liu et al. 2021). Ils ont également mis en évidence une interaction du complexe PRC1.3/1.5 avec la protéine NRF1, un facteur de transcription régulant la croissance cellulaire, la biosynthèse et la biogenèse de l'ADN mitochondrial (Scarpulla 2011), par l'intermédiaire d'AUTS2. Des recherches complémentaires devront être effectuées pour comprendre le rôle exact de NRF1 dans ce complexe multiprotéique mais les données préliminaires indiquent qu'il fonctionne de manière coordonnée avec AUTS2 dans la régulation du cerveau (Liu et al. 2021).

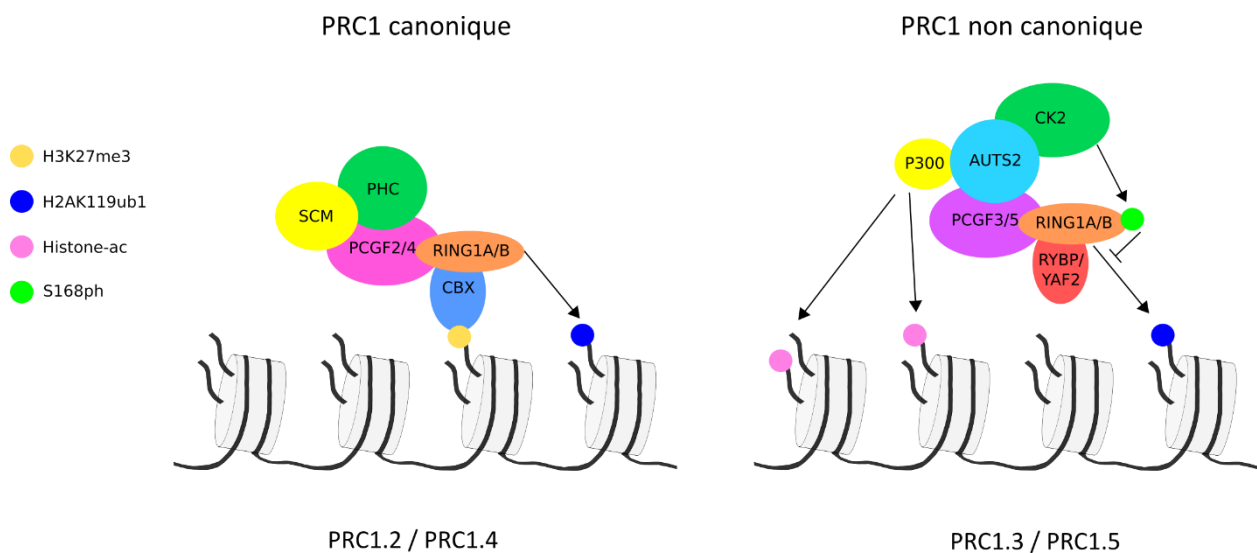


Figure 2 : Fonctionnement des complexes PRC1 canoniques et non canoniques.

Sagiv Shifman et son équipe ont mis en évidence par un test de crible double hybride que PCGF3 et PCGF5 interagissaient seulement avec l'isoforme AUTS2 long, qui correspond à la protéine canonique. Leurs résultats suggèrent que la partie C-terminale de la protéine, commune à l'isoforme court et à l'isoforme long, serait responsable de l'activation de la transcription. À l'inverse, la partie N-terminale de la protéine, uniquement présente dans l'isoforme long, permettrait la répression de la transcription (Monderer-Rothkoff et al. 2019). Ces résultats concordent avec les travaux de l'équipe de Danny Reinberg qui démontraient que la protéine P300 ne pouvait pas être recrutée par la partie N-terminale d'AUTS2 (Gao et al. 2014). De plus,

les gènes co-exprimés avec *AUTS2* dans le cerveau en développement sont enrichies en modifications de la chromatine, ce qui valide définitivement le modèle proposé par Gao et al.

L'équipe de Shifman a également mis en évidence qu'il y avait un changement d'isoforme exprimé lors de la différenciation neuronale. L'isoforme long qui est exprimé dans les cellules indifférenciés est remplacé par un isoforme court pendant la différenciation neuronale. Cette expression est contrôlée par un promoteur alternatif (Monderer-Rothkoff et al. 2019). Enfin, ils ont également démontré que *AUTS2* est important dans la régulation du timing et de la vitesse de la différenciation neuronale. En effet, la surexpression du transcrit long entraîne une augmentation de l'expression des marqueurs de pluripotence et un retard de la différenciation neuronale, ce qui est cohérent avec le manque d'expression du transcrit long lors de la différenciation neuronale. De plus, ils ont montré que la présence unique d'un transcrit court contenant la partie spécifique à l'isoforme long menait à une différenciation neuronale précoce. Leurs résultats suggèrent que la microcéphalie observée chez la majorité des patients présentant des mutations d'*AUTS2* pourrait être due à une accélération de la différenciation des neurones (par absence de la protéine longue sauvage), ce qui produirait des déficiences dans les cellules progénitrices à des stades plus tardif de la neurogenèse (Monderer-Rothkoff et al. 2019).

Métabolisme de l'ARN

Une autre fonction nucléaire d'*AUTS2* serait de réguler le métabolisme de l'ARN par association avec des protéines de liaison à l'ARN et potentiellement avec l'ARN directement. Les protéines de liaison à l'ARN (RBP pour RNA-binding protein) sont des protéines qui, comme leur nom l'indique, se lient à l'ARN simple ou double brin. Elles assurent différents mécanismes tels que l'épissage alternatif et la polyadénylation des ARN pré-messagers, la stabilité et le transport des ARNm ou encore leur traduction.

Une immunoprécipitation de la protéine *AUTS2* du cortex murin en développement couplée à de la spectrophotométrie de masse a montré qu'*AUTS2* interagissait avec de multiples RBP. Parmi les 20 protéines pour lesquelles la confiance d'association était la plus élevée, 8 (40%) d'entre

elles correspondaient à des RBP. Ces 8 protéines étaient des protéines d'échafaudage impliquées dans le traitement de l'ARN (NONO et SFPQ), des facteurs d'épissage (SRSF3, SRSF7 et TRA2 β), des hélicases (DDX5 et DDX17) et une protéine de liaison à l'ADN/ARN de la famille TET/FET (FUS). A noter que parmi les 12 autres protéines de cette liste, certaines correspondaient à des répresseurs de la chromatine (n=5), des histones (n=4) et à un activateur de la chromatine (n=1), ce qui étaye un peu plus le lien entre AUTS2 et la régulation chromatinienne. Le crible double hybride de l'équipe de Sagiv Shifman évoqué précédemment, a également montré une interaction d'AUTS2 (FL et SL) avec la protéine d'épissage SF3B1 (Monderer-Rothkoff et al. 2019). Des chercheurs américains ont également montré par une immunoprécipitation couplée à un séquençage d'ARN que la protéine AUTS2 liait et régulaient l'ARN *Ep300* qui code pour la protéine P300 (Castanza et al. 2021).

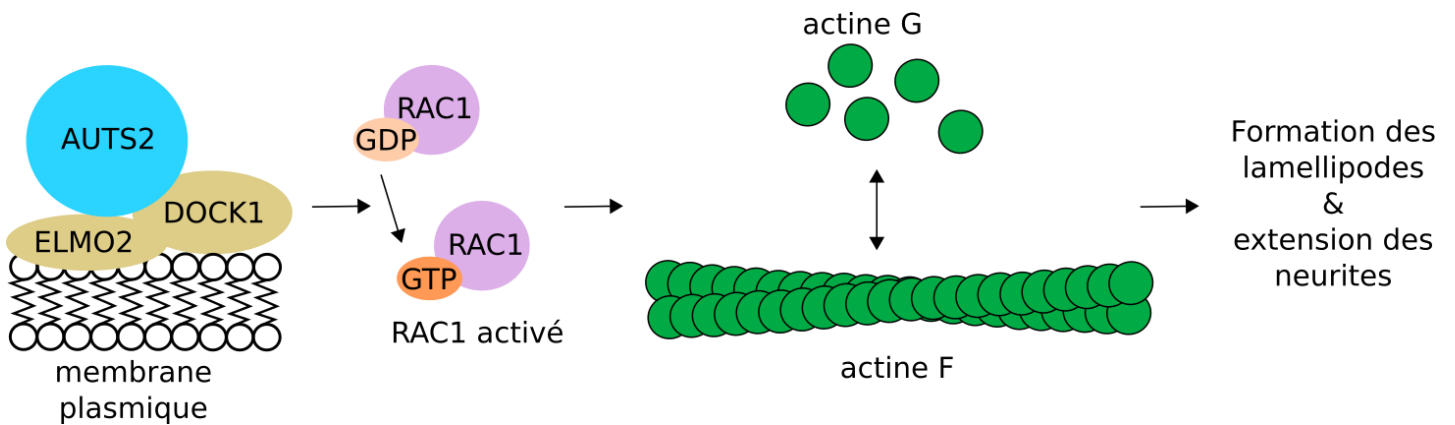


Figure 3 : Régulation du cytosquelette par la voie AUTS2/RAC1

I.2.2.b- Dans le cytoplasme : un rôle dans la mise en place du cytosquelette

La protéine AUTS2 (uniquement la forme longue : FL-AUTS2) a également été localisée dans le cytoplasme et dans le corps cellulaire de neurones (neurites) (Kei Hori et al. 2014). Dans le cytoplasme AUTS2 interagit avec des protéines de type GEFs (Guanine nucleotide exchange factors) tel que P-Rex1 et le complexe Dock1/Elmo2. Ces GEFs activent RAC1 pendant le développement neuronal, une protéine G qui médie l'organisation du cytosquelette. Pour vérifier l'activation indirecte de RAC1 par AUTS2, ces chercheurs ont fusionné une séquence d'exportation nucléaire sur la forme longue d'AUTS2 (NES-FL-AUTS2) qui n'est détectée que dans le cytoplasme des cellules. Ils ont ensuite comparé le nombre de lamellipodes dans les cellules transfectés avec ce NES-FL-AUTS2, AUTS2 sauvage, ou différentes mutations d'AUTS2. Ils ont mis en évidence que la proportion de lamellipodes était significativement plus faible pour les mutations touchant le domaine PR1 par rapport à FL-AUTS2, et significativement plus importante pour les cellules ayant NES-FL-AUTS2 par rapport à celles ayant FL-AUTS2. Ce qui indique que la fonction cytoplasmique de AUTS2 est médiée par le domaine PR1 et que AUTS2 cytoplasmique est impliqué dans la migration des neurones corticaux. De plus, l'extension des neurites perturbée dans des souris AUTS2^{mut} a été rétablie par la présence de RAC1 WT, ce qui suggère que la voie de signalisation AUTS2-RAC1 est impliquée dans la neuritogenèse (Figure 3).

Ils ont également montré que AUTS2 agissait comme un facteur inhibiteur de la signalisation de CDC42 qui joue un rôle dans l'extension et la formation de filopodes dendritiques (Kei Hori et al. 2014). Cependant le rôle physiologique d'AUTS2 dans cette voie de signalisation reste à déterminer.

I.3- Modèles animaux mutants

Suite à l'identification de la protéine AUTS2 et de son importance dans l'étiologie des diverses pathologies liées au syndrome AUTS2, des travaux ont été développés à l'aide de modèles cellulaires et animaux. Outre l'utilisation de la souris, des travaux ont été très vite réalisés chez le poisson zèbre (ou zebrafish, *Danio rerio*) qui reste un modèle très utilisé à des fins de recherche biomédicale.

I.3.1- Le poisson zèbre

Les premiers travaux de recherche visant à comprendre les fonctions d'AUTS2 dans le neurodéveloppement ont été conduits chez le poisson zèbre (Beunders et al. 2013; Nir Oksenberg et Ahituv 2013). Les modèles morpholinos (knock down (KD) du transcrit *auts2a* au stade 1 cellule) présentaient des phénotypes semblables à ceux observés chez les patients humains atteints du syndrome AUTS2, 3 jours après l'éclosion : une microcéphalie, une micrognathie (mâchoire réduite) et une rétrognathie (mâchoire inférieure en arrière). A l'échelle cellulaire, une réduction de la neurogenèse et du nombre de motoneurones ainsi qu'une augmentation de l'apoptose ont pu être observées chez les poissons zèbres KD (Beunders et al. 2013; Nir Oksenberg et Ahituv 2013).

Un autre modèle de poisson zèbre invalidé a été généré plus récemment par la technique de TALEN (Transcription activator-like effector nuclease). Les chercheurs ont injecté des embryons au stade 1 cellule avec des ARN cibles ciblant l'exon 8 et ont retenu une délétion de 11 nucléotides induisant une modification du cadre de lecture et un arrêt prématuré de la traduction de l'ARNm juste en aval du motif PR1 (Cf 1B). Bien que les individus mutants ne présentaient pas de différence de taille par rapport aux individus sauvages, la taille des cellules de Mauthner étaient réduite avec un volume du soma et une longueur des dendrites significativement plus faibles (Jha et al. 2021). La cellule de Mauthner est présente chez les poissons pour lesquels la coordination musculaire doit être rapide pour pouvoir fuir. Cette cellule est un interneurone primaire situé dans le cerveau postérieur qui forme des synapses excitatrices reliant les

motoneurones primaires qui vont permettre la conduction du message d'échappement (R. C. Eaton, Lee, et Foreman 2001). L'impact de cette réduction de taille de la cellule de Mauthner sur le comportement d'échappement des poissons a ensuite été mesuré et a montré une perte de fiabilité des réponses de fuite chez le poisson zèbre. L'hypoexcitabilité des cellules de Mauthner des individus mutants a ensuite été confirmée (Jha et al. 2021).

Ces travaux démontrent l'importance du gène *auts2a* dans le neurodéveloppement global du poisson zèbre bien que la présence d'un gène paralogue *auts2b* chez cette espèce puisse compliquer l'analyse des résultats.

I.3.2- La souris

De nombreux modèles de souris mutées pour différentes parties du gène *Auts2* ont été produits. Comme chez l'homme, le gène *Auts2* murin comporte 19 exons avec un premier exon codant et un site alternatif de transcription présent dans l'exon 9 permettant la production d'une isoforme courte de la partie C-terminale de la protéine. Les souris possèdent également un autre site alternatif de transcription présent dans l'exon 7 permettant l'obtention d'une isoforme C-terminale un peu plus longue (Kei Hori et al. 2014). Chez des souris dépourvus de l'exon 7 (*Auts2*^{del7/del7} Nes-Cre), avec une induction de la mutation dans le système nerveux par le système d'induction cre-lox, les individus mutants présentaient un poids normal à la naissance mais grandissaient plus lentement que les individus sauvages par la suite et présentaient des dysfonctionnements comportementaux tel qu'une diminution des vocalisations ultrasoniques (Gao et al. 2014). Dans un autre modèle de souris délété de l'exon 8 (*Auts2*^{del8/del8}), les individus homozygotes sont tous morts au court de la gestation. Cependant, les cerveaux de ces individus ne présentaient aucune anomalie macroscopique ou histologique (Kei Hori et al. 2014). L'augmentation de l'expression protéique de l'isoforme C-terminale a néanmoins été observée dans le cortex cérébral de ces souris. L'augmentation de la taille des épines dendritiques, sites de réception des signaux synaptiques, a également été constatée (Kei Hori et al. 2020). Chez des souris mutées hétérozygotes (*Auts2*^{neo/+}) présentant une expression des longues et courtes

isoformes réduite de moitié, une diminution du comportement exploratoire a pu être observée (Kei Hori et al. 2015). Ce même phénotype comportemental ainsi que des diminutions des interactions sociales et de la peur chez les individus a été décrit chez des souris hétérozygotes *Auts2*^{del8/+} (Kei Hori et al. 2020). Un autre modèle murin muté a été proposé par la même équipe. Ce dernier consistait à déléter de manière homozygote l'exon 8 dans l'aire cérébrale dérivée du rhombomère 1 comprenant le cervelet au stade de formation du tube neurale (E9.5). Ce modèle a permis de mettre en évidence une malformation et une taille réduite du cervelet ainsi qu'une diminution du nombre de cellules de Purkinje (cervelet) et de neurones dopaminergiques (cerveau médian) (Yamashiro et al. 2020). Enfin, un dernier modèle murin ciblant l'exon 15 d'*Auts2* au cours de la formation du cerveau a été proposé (Castanza et al. 2021). La délétion de cet exon empêcherait la production des isoformes longues et courtes du gène. Comme pour la délétion de l'exon 8, cette délétion à l'état homozygote est létale pour l'embryon. Les individus hétérozygotes ont survécu mais présentaient des anomalies de fonction et de structure du cortex cérébral incluant une hypoplasie du gyrus denté, une structure située au niveau de l'hippocampe qui est impliquée dans les fonctions d'apprentissage et de mémoire. L'électroencéphalogramme qui en résulte montre une activité anormale suite à une stimulation auditive (Castanza et al. 2021).

Les mutations d'*Auts2* dans les modèles murins ont permis la mise en évidence d'un grand nombre de modifications moléculaires, structurales et comportementales, rendant encore plus important l'enjeu de la compréhension des nombreux mécanismes de ce gène.

I.4- Gènes de la famille AUTS2

Le gène *AUTS2* fait partie d'une famille de gènes appelée « AUTS2 family » qui comprend la fibrosine (FBRS) et la fibrosine semblable (FBRSL1). Il s'agit d'une famille de gènes ohnologues, c'est-à-dire provenant initialement de la duplication d'un ancêtre commun des vertébrés au cours de la seconde duplication de génome (2R-WGD) qui serait survenue il y a environ 470 millions d'années (Sellers, Robertson, et Tassabehji 2020). Chez certains téléostéens comme le

poisson zèbre (*Danio rerio*), cette famille de gène comprend même 4 gènes, avec en plus des deux fibrosines, les paralogues *auts2a* et *auts2b* (Igor Kondrychyn, Robra, et Thirumalai 2017). Une analyse d'expression réalisée chez le poisson zèbre a montré qu'*auts2*, *fbrs* et *fbrsl1* présentent des profils d'expression neuronaux spatio-temporels et isoformes spécifiques différents au cours du développement embryonnaire et chez le juvénile (Igor Kondrychyn, Robra, et Thirumalai 2017), ce qui suggère des rôles distincts pour chacun des paralogues.

Cependant des études d'interaction protéiques réalisées par l'équipe de Danny Reinberg ont montré que les PCGF3 et PCGF5 interagissaient à la fois avec AUTS2, FBRS et FBRSL1 (Gao et al. 2014). Il en est de même pour les sous unités de la caséine kinase 2 (CK2) CSNK2A2 et CSNK2B. Ces interactions laissent penser que les paralogues de la famille AUTS2 pourraient avoir des fonctions en partie similaires. Il a également été démontré que AUTS2 et FBRS formaient un complexe, ce qui n'est pas le cas pour AUTS2 et FBRSL1 (Gao et al. 2014).

Une analyse phylogénétique suggère que AUTS2 est plus proche de FBRSL1 que de FBRS, c'est-à-dire que FBRSL1 et AUTS2 partagent un ancêtre commun plus récent. Cette hypothèse est soutenue par l'identité des séquences protéiques, plus forte pour FBRSL1 et AUTS2 que pour FBRS et AUTS2 (Sellers, Robertson, et Tassabehji 2020) (Tableau 2).

Protéine	Nombre d'espèces	AUTS2	FBRSL1	FBRS
AUTS2	33	75%	42,13%	32,23%
FBRSL1	20		66%	29,10%
FBRS	19			53%

Tableau 2 : Moyennes des valeurs globales d'identité de séquence. Le nombre d'espèces correspond au nombre de séquences orthologues utilisées pour l'alignement. Données provenant de (Sellers, Robertson, et Tassabehji 2020).

Silke Pauli et son équipe ont répertorié 3 patients avec des mutations de *FBRSL1* touchant la partie N-terminale de FBRSL1. Tous les individus présentaient des malformations, des insuffisances respiratoires, des difficultés à se nourrir, des problèmes de croissance, de la

microcéphalie, un retard de développement et d'autres symptômes communs aux syndromes observés dans le cas du syndrome AUTS2 (Ufartes et al. 2020). Afin de mieux caractériser le rôle de FBRSL1 au cours du développement, ils ont généré des xénopes (*Xenopus laevis*) *Fbrsl1* KD. Cette perte de fonction de *Fbrsl1* entraîne des anomalies crâniofaciales et une perturbation de la croissance des nerfs crâniens et des neurones chez les embryons. Contrairement à *Aut2*, ils ont été en mesure de corriger les anomalies crâniofaciales avec l'isoforme N-terminal courte de FBRSL1 (Ufartes et al. 2020).

Enfin, FBRSL1 aurait une activité de liaison à l'ARN et pourrait comme AUTS2, réguler le métabolisme de l'ARN au cours du développement (Baltz et al. 2012).

II- Développement embryonnaire

L'embryogenèse est le processus de formation d'un organisme pluricellulaire, qu'il soit végétal ou animal, de la cellule œuf (zygote) issue de la rencontre de gamètes mâles et femelles à un être vivant autonome. Depuis l'apparition des animaux bilatériens (sous-règne : Bilateria) il y a environ 800 millions d'année, les grands stades de développement sont partagés par toutes les espèces, ce qui en fait un processus très conservé. Ce développement se décompose de cette manière : fécondation, segmentation, gastrulation, neurulation, délimitation et organogenèse. Ces étapes sont étroitement régulées par des cascades de signalisation d'expression de gènes. Ces différences de niveau d'expression sont régulées dès la fécondation de l'ovocyte par le génome maternel, puis par le génome zygotique une fois que ce dernier est activé.

Dans cette partie, nous allons développer les étapes clés de l'embryogenèse chez les vertébrés et plus particulièrement chez les poissons, expliquer la mise en place de l'expression des gènes par les différents génomes et s'intéresser au rôle d'*AUTS2* au cours du développement.

II.1- Stades clés du développement embryonnaire chez les vertébrés

II.1.1- La fécondation

Chez les bilatériens, la fécondation est issue d'un mode de reproduction sexué ou asexué qui consiste en un processus permettant la fusion d'un gamète mâle (spermatozoïde) et d'un gamète femelle (ovocyte) en une cellule unique diploïde appelé zygote. La fécondation peut être de deux types : externe ou interne. Lors d'une fécondation interne (reptiles, oiseaux, mammifères), les gamètes mâles sont émis dans les voies génitales femelles où ils vont rencontrer les ovocytes suite à un accouplement. Lors d'une fécondation externe (poissons osseux et amphibiens), les gamètes sont émis dans le milieu extérieur où ils pourront se rencontrer pour fusionner, il n'y a pas d'accouplement. Le spermatozoïde entre dans l'ovocyte par une ouverture sur le pôle apical

du chorion, le micropyle. L'orientation de l'ovocyte mature est déjà déterminée (clivage méroblastique), au pôle animal on trouve le noyau de l'ovocyte arrêté en métaphase II de la méiose et un pôle végétal contenant du cytoplasme (ooplasme) et du vitellus (Hasley et al. 2017). La fixation du spermatozoïde déclenche une vague transitoire d'augmentation du calcium libre cytoplasmique déclenché par la disparition des alvéoles corticales situées à proximité du micropyle à la surface de l'ovocyte pour se terminer au pôle végétal. Suite à l'exocytose des alvéoles corticales dans l'espace étroit entre le chorion et le vitellus, le chorion s'amincit et se durcit en se séparant du vitellus pour former un large espace périvitellin. Une seconde vague transitoire de la couche cytoplasmique corticale suit la vague d'exocytose provoquant l'accumulation du cytoplasme cortical au pôle animal pour former une couche cytoplasmique épaisse. Au centre de cette masse cytoplasmique, les pronucléi mâles et femelles fusionnent, permettant la reprise de la méiose puis une première mitose, formant un noyau zygotique (Iwamatsu 2004).

II.1.2- La segmentation

L'étape de segmentation commence par une phase rapide de prolifération cellulaire. Chez le médaka, la première division cellulaire survient environ une heure après l'activation de l'œuf et est suivie par 9 divisions cellulaires espacées d'environ 35 minutes (Figure 4). Après 10 divisions, l'embryon compte environ 1000 cellules. Au cours des divisions, le nombre de cellules augmente mais pas la taille, ce qui entraîne une diminution de la taille des cellules, appelées blastomères, on parle alors du stade blastula. Jusque-là, les cellules se divisaient de manière synchrone.

A partir de la 10^{ème} division cellulaire la transition mid-blastuléenne se met en place et s'accompagne de l'activation progressive du génome zygotique. Elle se caractérise par un cycle de division cellulaire plus long, une perte de la division synchrone, une activation majeure de la transcription des gènes du génome zygotique et par l'apparition de la mobilité cellulaire (Kane et Kimmel 1993).

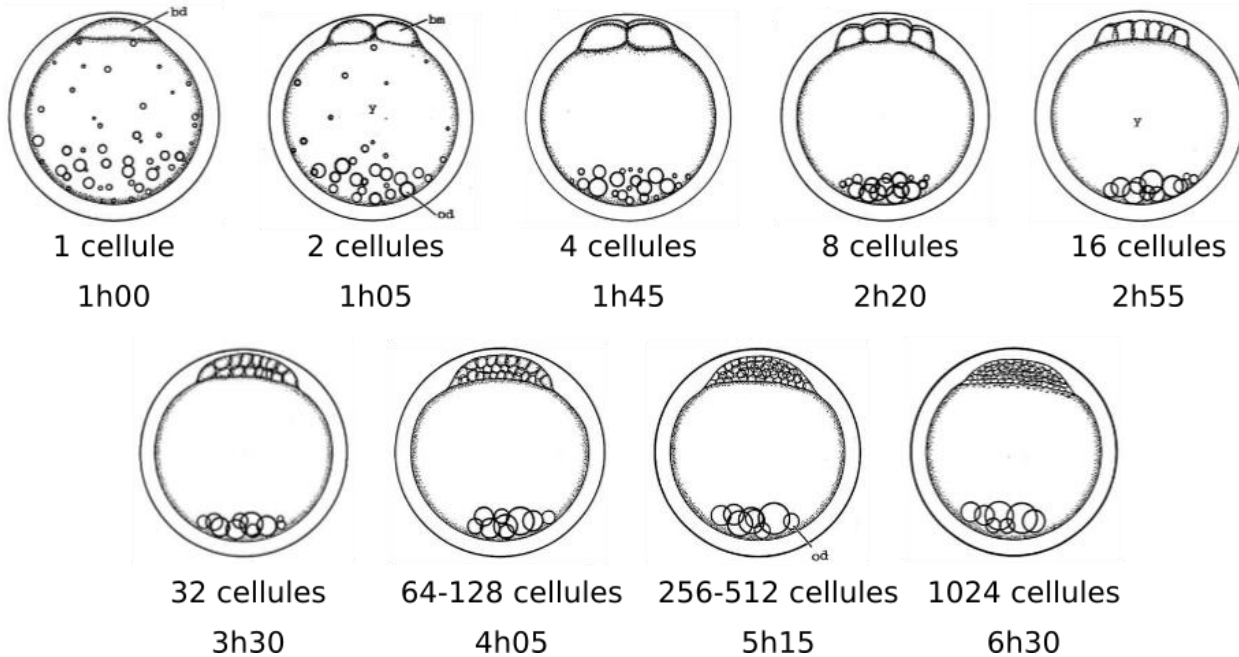


Figure 4 : Etapes de la segmentation chez le médaka. Le pôle animal est situé en haut. *bd* = *blastodisc*, *bm* = *blastomère*, *y* = *blanc*, *od* = *gouttelette lipidique*. Schéma adapté de [Iwamatsu 2004](#).

II.1.3- La gastrulation

La gastrulation est l'événement au cours duquel les feuilletts embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme) et la symétrie bilatérale de l'embryon sont établis (axes dorso-ventral et gauche-droite). Ce processus implique des mouvements cellulaires complexes et finement régulés pour former ce qui sera le corps de l'individu ainsi qu'une régulation génique dans le temps et l'espace pour définir les différentes lignées cellulaires. La gastrulation est composée de 4 phases conservées au cours de l'évolution qui se chevauchent dans le temps : l'épibolie, l'internalisation, la convergence et l'extension.

II.1.3.a- L'épibolie

L'épibolie correspond à un amincissement et un recouvrement d'une multicouche cellulaire du pôle animal au pôle végétal. Au début de l'épibolie les cellules du blastoderme sont organisées

en trois groupes. Les cellules profondes correspondent aux cellules qui formeront le corps de l'embryon. Les cellules enveloppantes (EVL) qui constituent une couche simple épithéliale qui protègent les cellules profondes ainsi qu'un syncytium nucléaire vitellin (YSL).

L'épibolie commence par une étape de « doming » du vitellus qui inclue une partie de l'YSL dans le blastoderme. Ceci déclenche un amincissement du blastoderme qui passe de 8 couches cellulaires à 2-3 couches cellulaires. Au même moment les cellules enveloppantes continuent de se diviser entraînant l'expansion de la surface (Bruce et Heisenberg 2020). La seconde étape, qui amène au stade 50% de l'épibolie, se caractérise par l'expansion de l'YSL interne vers le pôle végétale (Figure 5). Cette étape induit la réorganisation du cytosquelette d'actine en formant un anneau autour de la périphérie. La constriction de cet anneau d'actomyosine entraîne la progression de l'EVL et de l'YSL et permet la fermeture du blastopore. Au cours de l'épibolie et de la gastrulation, les cellules se divisent continuellement, ce qui contribue à l'étalement du vitellus (Bruce et Heisenberg 2020).

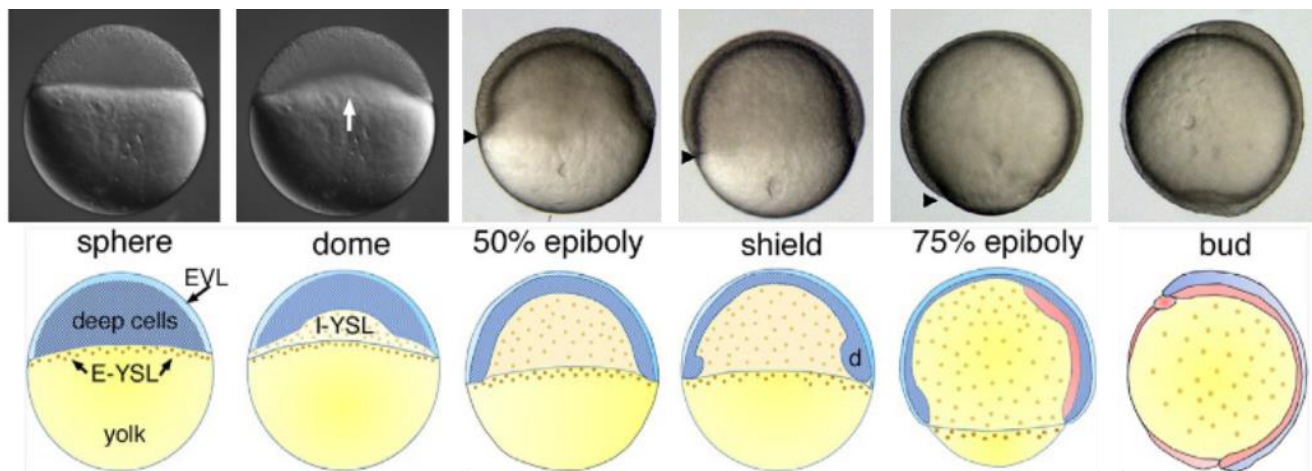


Figure 5 : Le processus de gastrulation chez le poisson zèbre. Sur les images, les flèches montrent la bordure cellulaire. Les schémas montrent les 3 groupes de cellules : le bleu clair correspond aux cellules enveloppantes, le bleu foncé aux cellules profondes ou au neuroectoderme selon le stade, et les points marrons aux couches syncytiales externes (E-YSL) et internes (I-ESL). Sont représentés en rouge les cellules profondes d'internalisation qui forment le mésendoderme. Schéma adapté de Bruce and Heisenberg, 2020.

II.1.3.b- L'internalisation

A 50% de l'épibolie, l'expansion des cellules profondes s'arrête temporairement. Les cellules périphériques se déplacent vers l'intérieur pour former une couche cellulaire interne que l'on appelle hypoblaste (Figure 6, orange). L'hypoblaste comprend les progéniteurs mésendodermiques internalisés et est situé sous l'épiblaste qui correspond au neuroectoderme et aux progéniteurs mésendodermiques non internalisés (Figure 6, bleu clair). Cette internalisation est visible par l'épaississement de la bordure cellulaire du côté dorsal (le « shield ») (Pinheiro et Heisenberg 2020).

II.1.3.c- La convergence et l'extension

A 70% de l'épibolie, les mouvements cellulaires commencent à converger. Les cellules qui s'internalisent du côté dorsal migrent vers le pôle animal (dans la direction opposée de l'épiblaste) et forment le mésoderme axial. Cette migration est permise par les cellules de la plaque préchordale situées à l'extrémité du mésoderme axial. Les cellules qui suivent celles de la plaque préchordale deviennent la notochorde. Ces mouvements convergents sont permis par les cellules du côté dorsal mais pas par celles du côté ventral qui continuent leur migration vers le pôle végétal. Ceci est induit par la voie de signalisation Wnt/PCP, dont les composants sont disposés de manière asymétrique à la membrane cellulaire. Cette voie est essentielle dans la polarisation cellulaire et tissulaire, elle assure la bonne réorganisation du cytosquelette d'actine et des modifications des adhésions cellules/cellules et cellules/MEC par la modulation de l'Ecadherine (Kane, McFarland, et Warga 2005; Montero et al. 2005).

A la fin de la gastrulation, les cellules de l'endoderme convergent dorsalement à mesure que l'axe de l'embryon s'épaissit, via la signalisation nodale. Les cellules de l'épiblaste qui ne s'internalisent pas au cours de la gastrulation sont destinées à devenir l'ectoderme neural (au niveau dorsal) et l'ectoderme non neural (au niveau ventral). Les cellules du neuroectoderme dorsal sont

également sujettes à des mouvements convergents médiés par la voie Wnt/PCP, formant ainsi la plaque neurale (Solnica-Krezel et Sepich 2012).

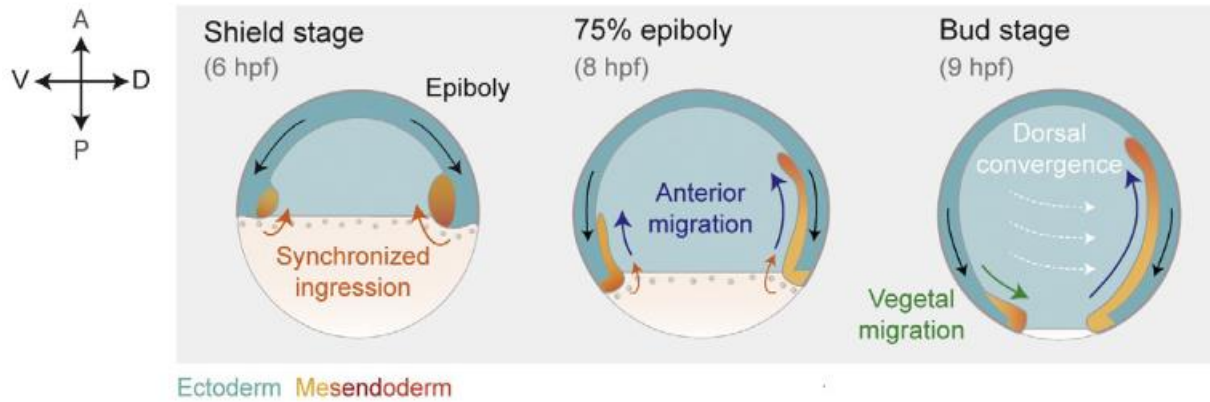


Figure 6 : Schéma de l'internalisation des précurseurs mésendodermiques au cours de la gastrulation. Pinheiro and Heisenberg., 2020.

II.1.4- La neurulation

La neurulation est l'étape permettant la mise en place du système nerveux central par la formation du tube neural à partir du neuroectoderme. Le tube neural est un épithélium doté d'une polarité apico-basale bien définie, constituant ainsi une caractéristique fondamentale pour le développement et le fonctionnement ultérieur du cerveau. Chez le poisson zèbre, la formation du tube neural est initiée environ 10/11 heures après la fécondation lorsque les extrémités de la plaque neurale commencent à converger vers la ligne médiane dorsale de l'embryon (Figure 7A). A 12 heures post fécondation, les cellules neuroectodermiques débutent leur internalisation à la ligne médiane pour former une « quille » neurale (13h post fécondation, Figure 7B). Entre 15 et 17 heures, la quille neurale évolue vers une autre structure solide, la tige neurale, qui présente une morphologie plus cylindrique (Figure 7C). Progressivement, elle développe une polarité apico-basale avec des surfaces apicales opposées le long d'une ligne médiane et à 18 heures post fécondation, la tige neurale s'est transformée en un tube neural creux en générant une lumière (Figure 7D) (Araya et al. 2016).

Bien que la neurulation de l'embryon du poisson zèbre (ou du médaka) se fasse par internalisation des tissus dans un premier temps, et par réarrangement des cellules sur la ligne médiane pour former une lumière au lieu d'un pliage dorsal (qui se produit chez les amniotes par exemple) dans un second temps, le résultat final est la génération d'un tube neural conventionnel. Ce dernier est composé d'un épithélium polarisé, formant un système ventriculaire du cerveau et de la moelle épinière qui est comparable à celui d'autres vertébrés.

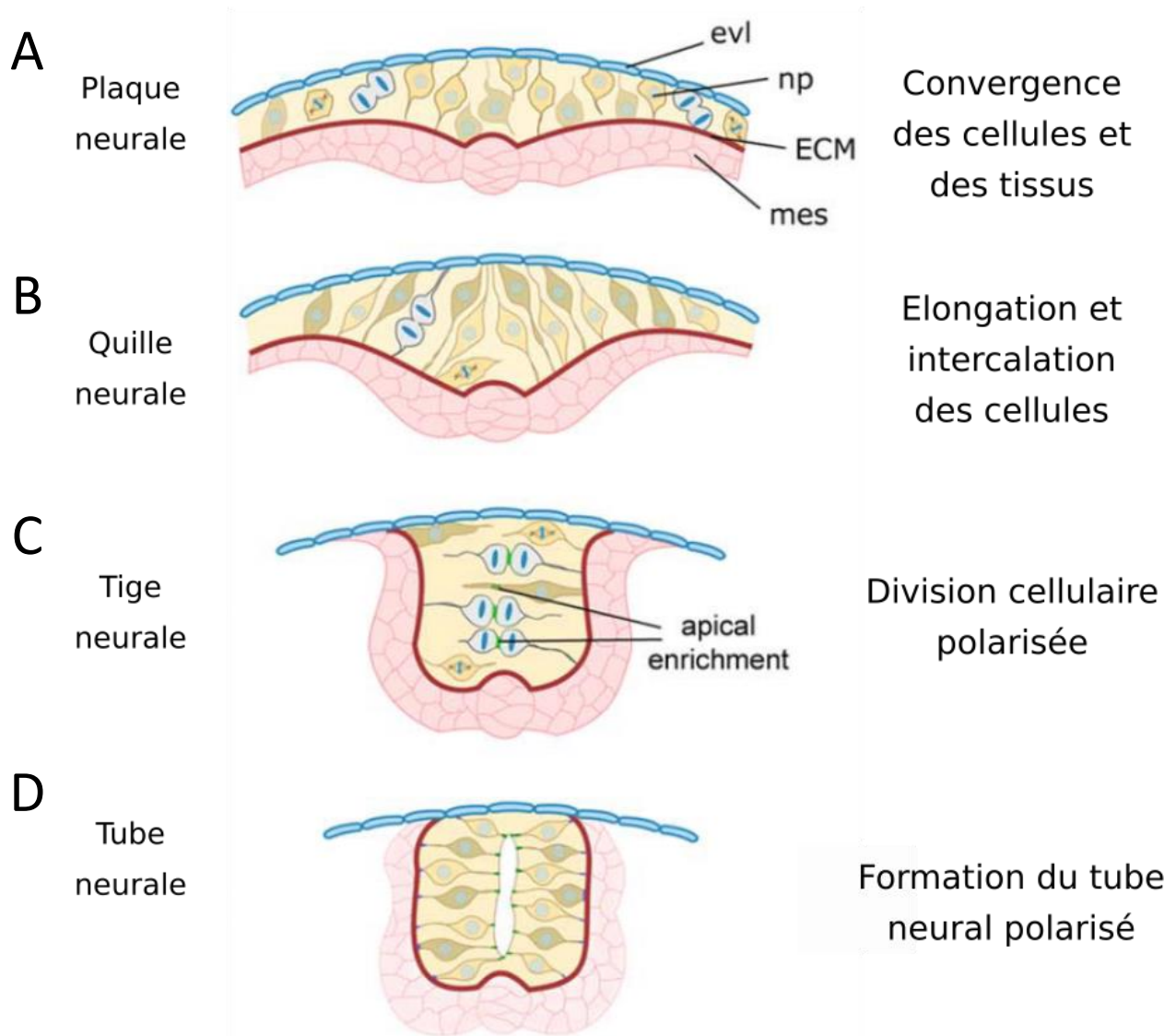


Figure 7 : Le processus de neurulation chez le poisson zèbre. **A** : Au stade la plaque neurale, les cellules neurales sont de forme irrégulière et sont organisées dans l'axe superficiel/profond de la plaque neurale. Peu de cellules se divisent à ce stade. **B** : Au stade la quille neurale, les cellules neurales s'allongent et s'intercalent dans l'axe superficiel/profond. **C** : Au stade de la tige neurale, les progéniteurs neuronaux modifient l'orientation de leur fuseau mitotique à 90 degrés et subissent une division cellulaire polarisée qui croise la ligne médiane. L'information apicale est enrichie au niveau du plan de clivage des cellules en division (vert). **D** : Au stade du tube neural, les cellules neurales présentent une polarité apicale (vert) et basale (violet) bien établie et une lumière centrale est formée. Les cellules en divisions sont représentées en gris. ECM = matrice extra cellulaire, *evl* = cellules enveloppantes, *mes* = mésoderme, *np* = neural plate. Schéma adapté de Araya et al., 2016.

II.1.5- La délimitation et l'organogenèse

Les vertébrés sont des animaux segmentés qui présentent des unités répétitives le long de l'axe du corps. Ces segments sont les rhombomères, neuromères du tube neural qui formeront le rhombencéphale, et les somites, qui sont à l'origine des vertèbres et des muscles striés. Chez le poisson zèbre, lors de la somitogenèse, la formation d'un somite à partir du mésoderme paraxial se produit toutes les 15 minutes et est utilisé comme un marqueur de développement (entre 1h30 et 2h chez le médaka, (Iwamatsu 2004)). La segmentation des somites est un processus séquentiel qui évolue en même temps que l'axe du corps s'allonge de manière antéro-postérieure. Ce processus implique des gradients moléculaires de *fgf* et *wnt* (élevé dans la région postérieure, et faible dans la région antérieure) et d'acide rétinoïque (faible dans la région postérieure et élevé dans la région antérieure). Il implique également une horloge moléculaire via des activations cycliques de la voie Notch delta (Graham et al., 2014). C'est l'expression des gènes *Hox* qui définit l'identité du segment par rapport à sa position dans le corps (Iimura et al., 2009). Pendant ce même temps, les organes se développent à partir des cellules germinales primordiales. Puis le développement embryonnaire se termine par l'éclosion de l'individu qui intervient 48 heures après la fécondation chez le poisson zèbre (contre 9 jours chez le médaka).

II.2- Les facteurs maternels

Le développement embryonnaire précoce repose sur les ARN messagers maternels et les protéines déposées dans l'œuf au cours de la maturation ovocytaire. Ce cargo maternel est responsable des étapes de clivage et de la structuration précoce de l'embryon. Cette régulation précoce est régulée par des modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles. Bien que la transcription soit un élément essentiel des processus cellulaires, elle est absente au début du développement embryonnaire. Ceci est dû à la présence de facteurs maternels qui maintiennent l'ADN génomique dans un état chromatinien incompatible avec la transcription (Harvey et al. 2013). Dès lors que ces facteurs maternels sont éliminés au cours des premiers cycles de division cellulaire, les gènes zygotiques peuvent être transcrits. Cette phase, appelée MZT (pour maternal to zygotic transition), conduit à l'activation du génome zygotique (ZGA).

II.2.1- La dégradation des ARNm

La dégradation des ARN maternels commence dès l'activation de l'œuf. On estime que 60% des transcrits maternels sont déjà dégradés au stade 16 cellules (Aanes et al. 2011). Les 40% restants sont dégradés par la suite, coïncidant avec l'activation du génome zygotique. Les ARNm maternels peuvent être stable dans l'ovocyte pendant des jours, des mois ou des années selon les espèces et sont ensuite dégradés rapidement. Les chercheurs ont donc voulu comprendre les mécanismes qui permettent cette stabilisation/déstabilisation pour mieux caractériser la MZT (Figure 8A). Différents acteurs moléculaires sont responsables de ce processus.

II.2.1.a- Les protéines de liaison à l'ARN

Les protéines de liaison à l'ARN régulent la stabilisation des ARNm maternels stockés dans l'ovocyte. Chez le poisson zèbre, le protéine Ybx1 de type « Y-box », maintient la bonne quantité de protéines en réprimant la traduction des ARNm maternels dans l'ovocyte (Sun et al. 2018). La perte de l'expression de Ybx1 maternel lors du développement précoce de l'embryon conduit à un clivage anormal et anarchique, menant ainsi à un arrêt du développement embryonnaire.

Les protéines de liaison à l'ARN riches en éléments AU (ARE-BPs), PUM et hnRNPA1 (Figure 8B) ont un rôle dans la déstabilisation et la dégradation des ARNm maternels lors de la MZT. Elles nécessitent toutes une activation par des facteurs zygotiques, les rendant donc actives une fois le génome zygotique activé (Rabani et al. 2017; Despici et al. 2017).

II.2.1.b- Les petits ARN non codants

Les petits ARN non codants régulent la répression transcriptionnelle, la déstabilisation et la dégradation des ARNm maternels. Chez le poisson zèbre le micro ARN 430 (miR-430), exprimé au début de la ZGA, permet la régulation d'environ 40% des ARNm maternels éliminés au cours

de la MZT, par le recrutement du complexe RISC (Figure 8C) (Vastenhouw, Cao, et Lipshitz 2019). Ce micro ARN fait partie des premiers gènes activés lors de l'activation du génome zygotique (Bazzini, Lee, et Giraldez 2012).

II.2.1.c- Modifications des ARNm maternels

Les modifications chimiques des ARNm maternels, pendant ou après leur synthèse, peuvent jouer un rôle dans leur destin. Dans l'embryon de poisson zèbre, plus d'un tiers des ARNs maternels peuvent porter des marques méthylées sur des adénosines (N⁶-methyladenosine ou m⁶A), facilitant ainsi leur élimination par l'intermédiaire d'une protéine de liaison au m⁶A : Ythdf2 (Zhao et al. 2017) (Figure 8D). Cette protéine permet l'élimination d'environ la moitié des ARNm éliminés au début de la MZT (avant la ZGA) et d'un quart de ceux éliminés plus tardivement (Zhao et al. 2017). Cependant, tous les ARNm portant ces marques m⁶A ne sont pas éliminés, nécessitant des recherches approfondies quant à ces mécanismes. YTHDF2 maternel, son orthologue murin, est également nécessaire dans l'élimination d'une partie du transcriptome ovocytaire chez la souris (Ivanova et al. 2017). Une autre forme de modification post transcriptionnelle durant la MZT est l'uridylation de la queue poly(A) des ARNm. Celle-ci augmente au cours de la MZT et conduit à la prise en charge des ARNm (exosome, TUT4/7) menant ainsi à leur dégradation rapide (Chang et al. 2018) (Figure 8D).

II.2.1.d- Les codons "optimaux"

Ce terme a été défini chez les organismes unicellulaires. Il désigne les codons dont l'abondance d'ARNt correspondant est élevée (Hanson et Collier 2018). A l'inverse, les codons ayant des faibles niveaux d'ARNt sont qualifiés de « non optimaux ». Chez le poisson zèbre, il a été montré que les transcrits enrichis en codons non optimaux sont préférentiellement dégradés au cours de la MZT (Bazzini et al. 2016). La protéine Ddx6 pourrait être impliqué dans ce processus dont les mécanismes restent méconnus (Figure 8E).

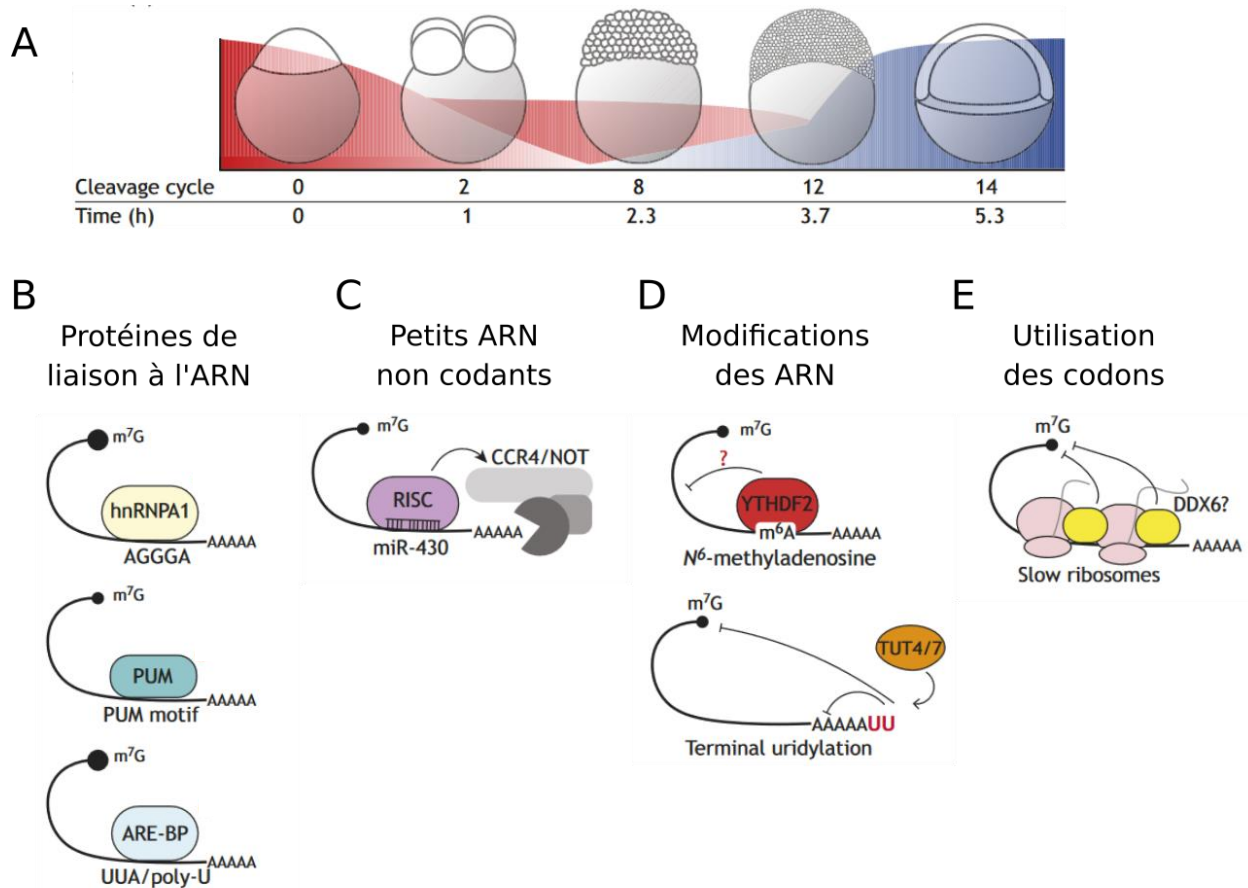


Figure 8 : Schéma de la MZT chez le poisson zèbre et ses mécanismes. **A** : Représentation des niveaux d'ARN maternels (en rouge) et zygotiques (en bleu) au cours de la MZT. Les cycles cellulaires et leur temps de survenu après la fécondation sont indiqués en dessous. **B** : Les protéines de liaison à l'ARN les mieux étudiées sont représentées ici. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNPA1) ; Pumilio (PUM) ; Protéine de liaison riche en élément AU (ARE-BP). **C** : Le micro ARN 430 (miR-430) permet l'élimination des ARNm maternels par le recrutement du complexe RISC/Argonaute. **D** : Les modifications de l'ARN tel que la m⁶A et l'uridylation de la queue poly(A) induisent l'élimination des ARNm maternels par l'intermédiaire de la N⁶-Methyladenosine RNA Binding Protein 2 (YTHDF2) et de la Terminal Uridyl Transferase 4/7 (TUT4/7). Le point d'interrogation signifie que le mécanisme associé n'a pas encore été étudié. **E** : Le codon « optimal » dirige la stabilité de l'ARNm maternel mais le mécanisme d'action de cette régulation a été étudiée uniquement chez la levure. L'homologue de Dhh1p de la levure, DDX6, est représenté. Schéma adapté de [Vastenhouw et al. 2019](#).

La traduction des ARNm maternels est finement régulée dans le temps. C'est la polyadénylation des ARNm qui permet cette régulation. En effet, il existe une corrélation entre la longueur de la queue poly(A) des ARNm maternels et leur traduction (corrélation qui diminue suite à la ZGA et que l'on ne retrouve pas dans les tissus non embryonnaires). Les ARNm produit au cours de l'ovogenèse possède de courtes queues poly(A), ce qui empêche leur traduction. Chez le poisson zèbre, au cours du cinquième cycle de division cellulaire (16 à 32 cellules), les queues poly(A) d'une partie des ARNm maternels subissent une polyadénylation médiée par la protéine Zorba (*cpeb1b*), ce qui régule probablement la première vague d'activation traductionnelle post-fécondation (Winata et Korzh, 2018). On estime qu'au moins 3000 ARNm maternels subissent une augmentation progressive de la queue poly(A) avant la transition mid-blastulienne (Aanes et al. 2011). Après la fécondation, les protéines produites au cours de la maturation ovocytaire peuvent subir des modifications post-traductionnelles, assurant ainsi leur activité.

II.2.2- L'activation du génome zygotique

La seconde partie de la MZT consiste en la transcription des gènes du génome zygotique (ZGA). Tous les gènes du génome zygotique ne sont pas activés au même moment, un premier postulat faisait part d'une première vague d'activation de la transcription ayant lieu à la fin de la blastula et d'une seconde vague plus importante lors de la gastrulation (Tadros et Lipshitz 2009). En réalité, la ZGA reflète plutôt une période au cours de laquelle la transcription est progressivement activée (Aanes et al. 2011; Harvey et al. 2013). En effet, selon les espèces, la ZGA débute plus ou moins tôt. Chez des espèces comme la souris, l'homme ou l'oursin, les premiers transcrits zygotiques ont été détectés au stade une cellule. Chez le poisson zèbre, les premiers transcrits zygotiques sont détectés plus tard (comme chez le xénope ou la drosophile par exemple), au cours du 6^{ème} cycle cellulaire (Vastenhouw, Cao, et Lipshitz 2019). Cependant, les temps de division cellulaires beaucoup plus courts chez ces 3 dernières espèces font que d'un point de vu absolu, leur ZGA commence avant celle de la souris ou de l'homme.

Lors de l'activation du génome du poisson zèbre, environ 25% de la totalité du génome est activé. On retrouve parmi ces gènes des catégories de gènes tel que des facteurs de transcription et autres régulateurs du développement comme les miRNAs (Aanes et al. 2011; Lee et al. 2013; Harvey et al. 2013). Certains d'entre eux sont importants pour la dégradation des ARNm maternels et d'autres pour la transcription de gènes activés ultérieurement. Parmi les gènes activés lors de la ZGA, certains sont uniquement zygotiques (c'est-à-dire qu'ils ne sont pas hérités maternellement), tandis que d'autres sont d'origines maternelles (présent dans l'ovocyte mature) et sont ensuite exprimé de nouveau par l'embryon. Chez le poisson zèbre, environ 25% des gènes sont uniquement zygotiques (Lee et al. 2013). Cependant, parmi les gènes qui sont maternels et zygotiques, de nombreux gènes codent pour des isoformes d'ARNm maternels et zygotiques distinct par le biais d'une utilisation différente des promoteurs ou d'un épissage alternatif. Dans cette situation, la transcription ne renforce pas seulement l'expression des gènes, mais modifie également leur régulation, leur utilisation et leur fonction (Lee et al. 2013).

Plusieurs modèles expliquant l'activation de la ZGA ont été décrits.

II.2.2.a- Activation de la ZGA par dilution des répresseurs transcriptionnels

Chez le poisson zèbre, les histones ont été identifiées comme des répresseurs de la transcription, en agissant en compétition avec les facteurs de transcription, régulant ainsi l'activation du génome zygotique (Joseph et al. 2017). Dans l'embryon précoce, les histones sont présentes en quantité élevée et se lient avec une haute affinité et une faible spécificité à l'ADN. Lorsqu'elles sont liées sous forme de nucléosome, elles bloquent l'accès à l'ADN de la machinerie transcriptionnelle (Lorch, LaPointe, et Kornberg 1987; Workman et Kingston 1998). A l'approche de la ZGA, la concentration d'histones soluble dans le noyau diminue, donnant ainsi l'occasion à la machinerie transcriptionnelle d'accéder à l'ADN et d'activer la transcription (Joseph et al. 2017). Cette diminution de la concentration nucléaire en histone pourrait être dû à un changement dans la dynamique d'importation nucléaire des histones. La dilution des machines d'importation des histones au cours des cycles de division cellulaire ou encore l'augmentation du

rapport entre le volume nucléaire et le volume cytoplasmique (modifiant ainsi la distribution des histones entre noyau et cytoplasme) pourraient expliquer cela (Joseph et al. 2017; Shindo et Amodeo 2019).

II.2.2.b- Activation de la ZGA via des activateurs transcriptionnels

L'absence de facteurs de transcription dans les premiers stades du développement contribue à l'absence d'activité transcriptionnelle. Chez le poisson zèbre, les gènes codants pour les facteurs de transcriptions qui initient le programme de développement zygotique et le nettoyage des ARN maternels par l'activation du miR-430 ont été décrits: *pou5f3*, *sox19b* et *nanog* (Lee et al. 2013). L'ARN codant pour ces facteurs de transcription est chargé maternellement lors de l'ovogenèse et leur traduction permet une augmentation de leur niveau protéique au cours des premiers cycles cellulaires (Lee et al. 2013). Mais pour que ces facteurs de transcription puissent initier la ZGA, il faut qu'ils aient accès à l'ADN génomique. C'est la chromatine qui régule l'accessibilité du génome pour les protéines de liaison à l'ADN, et plus particulièrement la méthylation de l'ADN, le positionnement et la stabilité des nucléosomes. Au cours de la ZGA, le génome devient plus compacte mais également plus accessible grâce à l'apparition de modifications spécifiques des histones (Vastenhouw, Cao, et Lipshitz 2019). Chez le poisson zèbre, la triméthylation de la lysine 4 de l'histone 3 (H3K4me3), une marque associée à une transcription active, apparaît sur les promoteurs juste avant l'initiation de la ZGA (Y. Zhang et al. 2014). Une autre marque d'histone, l'acétylation de la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27Ac), précède également la ZGA chez le poisson zèbre et est requise pour la transcription du miR-430. En effet, une équipe de recherche a démontré que la ZGA pouvait être initiée grâce à la traduction d'ARNm maternels (notamment P300, une acétyltransférase connue pour interagir avec AUTS2 dans le complexe PRC1.3/1.5) et que l'inhibition de l'acétylation des histones bloque l'activation du génome (Chan et al. 2019).

En conclusion, les recherches menées jusqu'à présent sur les mécanismes de l'activation du génome zygotique chez le poisson zèbre plaident pour une activation multifactorielle. La perte de répresseurs, l'accumulation d'activateurs ainsi que des changements dans l'accessibilité de la chromatine amorcent ensemble l'activation du génome zygotique.

II.2.3- Impact de l'expression des facteurs maternels dans le développement du système nerveux

Les ARNs maternels régulent l'activation du génome zygotique mais leurs fonctions vont au-delà et commencent dès l'ovogenèse par la formation adéquate de domaines cytoplasmiques dans l'ovocyte. Juste après la fécondation, le système de coordonnées déterminant la structure et le plan de développement de l'embryon est mis en place par la régulation du flux cytoplasmique (par la mère) et le repositionnement des déterminants dorsaux. Une régulation précise de l'expression des gènes maternels est nécessaire et essentielle, entre autres, au bon développement et fonctionnement du système nerveux.

Dans cette partie, je vais détailler plus précisément la manière dont les ARNm maternels régulent la formation des axes au cours de l'embryogenèse précoce chez le poisson zèbre et passer en revue certains gènes à expression maternelle connus pour réguler la mise en place du système nerveux au cours du développement embryonnaire.

II.2.3.a- La formation des axes chez l'embryon

Le destin des cellules dorsales sous contrôle maternel

L'œuf du poisson zèbre contient des ARNm maternels essentiels à l'établissement du côté dorsal de l'embryon et donc à la définition de son axe dorso-ventral. Juste après la fécondation, les facteurs qui déterminent l'axe dorsal sont transportés vers le côté dorsal de l'embryon par des

réseaux de microtubules du pôle végétal et une protéine de liaison : la syntabuline (*sybu*). L'absence de cette dernière perturbe le transport dorsal des déterminants (Nojima et al. 2010). La syntabuline se lie à la kinesine I dont la chaîne lourde est codée par le gène maternelle *kif5bA*. Les embryons mutants maternels *kif5bA* ne parviennent pas à transloquer la syntabuline, empêchant la dorsalisation de l'embryon (Campbell et al. 2015), ainsi que les transcrits *wnt8a* vers le pôle végétal, bien que l'absence de ceux-ci ne présentent pas de défauts de dorsalisation (Hino et al. 2018). Un autre facteur maternel, *grip2a*, est nécessaire pour organiser et regrouper les microtubules, eux-mêmes nécessaires à la spéciation dorsale. Chez les embryons *grip2a* mutants, les réseaux de mitochondries sont désorganisés et l'expression de la syntabuline est perdue 30 minutes après la fécondation (Ge et al. 2014).

Le destin des cellules ventrales sous contrôle maternel

Les facteurs maternels contrôlent également le destin des cellules ventrales. Les premiers transcrits maternels détectés permettant la ventralisation des cellules sont *gdf6A* et *oct4*, des activateurs de la voie de signalisation des TGF- β (dont *bmp2* et *bmp4*) ainsi que *runx2b*, un activateur transcriptionnel des gènes de la spéciation ventrale : *vox*, *vet* et *ved*. Ces gènes, qui sont des facteurs de transcription, favorisent le développement des cellules ventrales en inhibant l'expression des gènes responsables de la dorsalisation (Imai et al. 2001). Un autre facteur maternel régule la ventralisation cellulaire, *ints6*. En effet, les embryons *ints6* mutants présentent une forte dorsalisation (Kapp et al. 2013). Ce gène empêche les cellules dorsales de s'étendre ventralement en modifiant la réponse à la signalisation Nodal dans les cellules non axiales ou en régulant *wnt8a*, *vox*, *vent* et *ved* (Kapp et al. 2013). Les modes d'action moléculaires d'*ints6* restent cependant méconnus à ce jour. Il a également été démontré par un modèle KD que les gènes maternels *Lzts2* et *Foxo3b* se lient à la β -caténine maternelle pour promouvoir les destins cellulaires ventraux.

La formation de l'axe antéro-postérieur

Lors de la gastrulation, la mise en place de l'axe antéro-postérieur se fait essentiellement grâce aux voies de signalisation Wnt et Fgf (Fibroblast growth factor) (Tuazon et Mullins 2015; Green et al. 2015). La perte de fonction de ces voies de signalisation entraîne la perte des structures postérieures (queue, somites, notochorde et cerveau postérieur) et l'expansion des structures antérieures comme le cerveau antérieur (Fuentes et al. 2020).

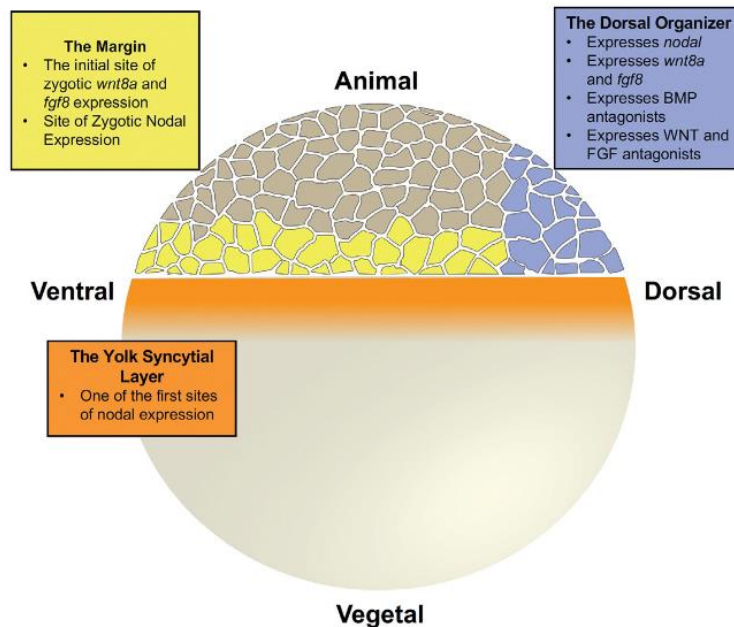


Figure 9 : Voies de signalisation maternelle de la midblastula. L'organisateur dorsal (violet) qui est défini par la β -caténine maternelle exprime *wnt8a*, *fgf8*, *ndr1* et *ndr2*. Il forme également un centre de contrôle antagoniste pour l'établissement des axes antéro-postérieurs et dorsaux-ventraux. Les cellules de la frontière de l'ooplasme (« margin » ; jaune) expriment *wnt8a* et *fgf8* zygotiques. Schéma de Fuentes et al. 2020.

L'expression zygotique de ces ligands est initiée dans les cellules dorsales (Figure 9 ; violet) et à la frontière de l'ooplasme (Figure 9 ; jaune). Les cellules dorsales expriment également les antagonistes de ces ligands tel que *sprouty2/4*, *sef1* et *dkk1b*. L'interaction entre les ligands et leurs antagonistes est forte du côté végétal et diminue vers le pôle animal, établissant un gradient qui va définir l'axe antéro-postérieur (Tuazon et Mullins 2015; Green et al. 2015).

La voie Wnt activée par la localisation de la β -Caténine maternelle est donc dorsalisante tandis que l'expression ultérieure de ces ligands par le zygote est ventralisante/posteriorisante. La chronologie de l'expression des ligands Wnt est régulée par la β -Caténine maternelle qui active plusieurs antagonistes extracellulaires de Wnt (Dkk1, Sfrp1, Frzb) qui limitent l'impact de la signalisation zygotique permettant la mise en place de l'axe antéro-postérieur. De plus, la présence du facteur de transcription *kzp* déposé dans l'ovocyte par la mère initie la transcription zygotique de *wnt8a* (Yao et al. 2010). Un autre gène maternellement exprimé est impliqué dans la définition de l'axe antéro-postérieur : *axin1*. Les individus maternellement mutés pour *axin1* ont montré une signalisation Wnt hyperactive conduisant à la perte de tissus antérieurs tels que les yeux et le cerveau antérieur, reflétant ainsi le rôle d'Axin dans la dégradation de la β -Caténine (Schneider, Slusarski, et Houston 2012; Valenti et al. 2015). Concernant les ligands Fgf, 13 ligands sur 30 sont exprimés maternellement. Jusqu'à présent, les rôles de chacun d'entre eux dans le développement précoce et leur importance maternelle ont été assez peu investigués (Fuentes et al. 2020).

L'établissement de l'axe droite/gauche

Les vertébrés présentent une disposition droite-gauche asymétrique de leurs organes dans le corps qui est régulée par la signalisation Nodal. L'expression différentielle de Nodal dans les mésodermes droits et gauches permet de définir la latéralité de l'embryon. Cependant la signalisation de Nodal est elle-même régulée par un co-facteur : *gdf3*. *Gdf3* est un membre de la superfamille des TGF- β (Transforming Growth Factor beta), famille de gènes impliquée dans les processus cellulaires au cours du développement embryonnaire. Les ARNm *gdf3* sont accumulés en grande quantité dans l'ovocyte au cours de la maturation ovocytaire et dans l'embryon précoce, avant la ZGA. De plus, la séquence protéique de *gdf3* présente un haut degré d'identité de séquence avec la protéine DVR-1 présente chez le xénope (Helde et al. 1993). Ces indications laissent donc supposer un rôle primordial de *gdf3* dans le développement embryonnaire précoce. Cette hypothèse faite au milieu des années 1990 a été définitivement validée chez le poisson zèbre par les travaux de Joseph Yost en 2017. Ce dernier a démontré la nécessité de la présence de l'ARN maternel *gdf3* pour la survie de l'embryon. Lorsqu'il a généré des poissons

zèbres mutants homozygotes pour *gdf3* par la technique des nucléases TALEN, il n'a constaté aucun phénotype anormal. En revanche lorsque *gdf3* était absent dans l'ovocyte des femelles mutantes, cela se traduisait par la mort de l'embryon avec à 24h post fécondation une absence de notochorde, d'endoderme pharyngé et des tissus neuraux antérieurs réduits (pénétrance de 100%) (Bisgrove, Su, et Yost 2017). De plus, l'injection d'ARN *gdf3* au stade 1 cellules chez ces mutants a permis de restaurer un phénotype de développement normal. La Gdf3 maternelle s'hétérodimérise avec l'orthologue de Nodal, Spaw, pendant la somitogenèse pour activer la signalisation de Nodal dans la définition de l'axe droite-gauche. La régulation de l'axe droite-gauche est par ailleurs conservée au cours de l'évolution (Montague, Gagnon, et Schier 2018). Bien que l'embryon transcrive également *gdf3* avant l'expression nodal dans le mésoderme gauche, Gdf3 maternelle peut compenser la perte de cette expression zygotique. Il est assez remarquable que Gdf3 maternel puisse jouer un rôle direct aussi crucial dans un processus de développement aussi tardif, plusieurs heures après l'activation du génome zygotique.

II.2.3.b- Exemples de modèles mettant en lumière le contrôle du neurodéveloppement par les facteurs maternels

Le facteur de transcription rest

Le répresseur transcriptionnel Rest, pour RE1-Silencing Transcription factor, recrute des cofacteurs pour modifier la structure de la chromatine afin d'éteindre l'expression de gènes spécifiques aux neurones dans les tissus non neuraux et pour moduler la transcription dans le système nerveux en développement (Chong et al. 1995; Ballas et al. 2005). Chez le poisson zèbre, il a été démontré que *rest* maternel était nécessaire et suffisant à la répression de gènes cibles dans la blastula. En effet, en comparant des embryons hétérozygotes qui avaient ou n'avaient pas l'expression de *rest* maternel, Sirotkin et son équipe ont montré que 3 gènes présentant un motif RE1 étaient surexprimés lorsque *rest* maternel était absent : *snap25b*, *bdnf* et *pcad* (Kok et al. 2012). Il est tout de même à noter que la neurogenèse se déroule en grande partie normalement chez les embryons mutés pour *rest* bien que des anomalies ont pu être observées

dans le développement des cellules précurseurs des oligodendrocytes et dans le taux de viabilité des alevins 12 jours après l'éclosion (Kok et al. 2012). Sur le même modèle mutant, Sirotkin et son équipe ont montré que l'altération de l'expression maternelle de *rest* avait des conséquences sur le comportement des individus à long terme qui ont montré une hyperactivité et des préférences spatiales atypiques (Moravec et al. 2016).

L'expression des facteurs maternels chez l'*Astyanax mexicanus*

Une étude menée chez le tétra mexicain (*Astyanax mexicanus*), un poisson téléostéen présentant une forme de surface et une forme cavernicole, a montré que l'expression des facteurs maternels impacte la morphologie du cerveau (Torres-Paz, Leclercq, et Rétaux 2019). Contrairement au morphe de surface qui vit dans les rivières d'Amérique, le morphe cavernicole qui vit dans des grottes est aveugle et ne présente pas d'yeux. La divergence de ces deux morphes se serait produite très récemment, il y a environ 20 000 ans (Fumey et al. 2018). Pour comprendre l'impact des facteurs maternels sur l'évolution phénotypique du tétra cavernicole, les deux morphotypes étant inter-fertiles, les chercheurs de l'institut de neurosciences de Paris-Saclay ont généré des poissons issus d'un père de morphe surface et d'une mère de morphe cavernicole, et inversement. L'étude du transcriptome des embryons au stade 2 cellules résultants de ces croisements a montré une différence significative d'expression des ARN maternels d'environ 32%, dont le gène *axin1* cité ci-dessus. L'analyse des différents transcriptomes leurs ont permis de conclure que la dégénérescence du cristallin n'était pas sous contrôle maternel. Cependant, les différences d'expression maternelle au cours de la gastrulation, qui se traduisent par des différences phénotypiques importantes au stade larvaire, ont montré l'importance de l'expression maternelle sur le développement des dérivés de la plaque neurale, à savoir la rétine et l'hypothalamus. La signalisation Dkk1b/Wnt régulée par la mère au début de la gastrulation pourrait être impliquée dans la morphogenèse rétinienne (Torres-Paz, Leclercq, et Rétaux 2019).

II.3- Expression maternelle du gène *auts2a*

Si les rôles d'*Auts2*/AUTS2 zygotique au cours du développement embryonnaire sont de plus en plus décrits (Cf partie I.2 et I.3), la présence de l'expression maternelle d'*auts2a* observée chez les poissons n'a pour l'heure pas été investiguée.

L'expression du gène *Auts2* par l'embryon (zygotique) est nécessaire au bon déroulement du développement embryonnaire et à la survie de l'embryon. En effet, il a été montré qu'une délétion totale homozygote du gène *Auts2* était létale pour l'embryon (Kei Hori et al. 2014; Castanza et al. 2021). L'absence d'individus présentant des mutations homozygotes chez l'humain le confirme.

Un travail de recherche menée par notre équipe a montré qu'un stress thermique maternel a conduit à la dérégulation d'une douzaine d'ARNm transmis par la mère dans l'œuf chez la truite arc-en-ciel, dont *auts2a* (Colson et al. 2019). Cette dérégulation s'est traduite par des réponses émotionnelles et cognitives altérées avec une diminution des comportements liés à l'anxiété et des capacités d'apprentissage moindres chez la descendance. Bien qu'on ne puisse relier ces phénotypes comportementaux uniquement à l'absence de l'expression du gène *auts2a* dans l'ovocyte mature, on ne peut nier la présence de comportements similaires chez des animaux modèles mutés pour ce gène. Certaines caractéristiques du AUTS2 syndrome tel que le retard mental, les TSA ou encore les troubles de l'attention s'accompagnent également parfois de réponses émotionnelles altérées et de capacités d'apprentissage réduites.

Une étude menée chez le poisson zèbre a montré la présence de deux types de transcrits dans l'œuf (0 hpf) (Igor Kondrychyn, Robra, et Thirumalai 2017). Le premier transcrit présent correspond au plus long transcrit, dont le site de transcription est en amont de l'exon 2. Le second transcrit détecté dans l'œuf, en moins grande quantité, présente un site de transcription dans l'intron 5 en amont de l'exon 6. Les prédictions protéiques de ces deux isoformes correspondent à la protéines canonique (1279 aa) et à la protéine C-terminale (810 aa) commençant dans l'exon 8.

Ces données laissent penser qu'*auts2a* pourrait ne pas agir uniquement comme un régulateur du neurodéveloppement lors du développement embryonnaire mais également comme un régulateur intergénérationnel du neurodéveloppement et par conséquent du comportement. La majeure partie de mon travail de thèse a consisté à comprendre l'impact maternel du gène *auts2a* sur l'établissement du neurodéveloppement grâce un modèle unique où le gène *auts2a* maternel ou paternel a été muté chez le médaka.

III- Le médaka (*Oryzias latipes*): un modèle adapté

Une grande diversité d'organismes est utilisée pour les expérimentations en laboratoire et les poissons ont une histoire riche concernant leur utilisation dans la recherche biologique. L'utilisation des poissons modèles est très répandue et a fortement augmenté lors des deux dernières décennies et plus particulièrement depuis que les réglementations éthiques sont devenues un sujet public dépassant le cadre de la communauté scientifique. Ils sont utilisés pour la recherche en écologie, développement, génétique, pharmacologie ou encore toxicologie. La sélection d'une espèce de poisson particulière pour un projet de recherche implique un équilibre entre les objectifs de recherche du projet scientifique et les besoins d'élevage de l'espèce (DeTolla et al. 1995).

III.1- Généralités

Le médaka est une espèce de poissons d'eau douce appartenant à la classe des Actinoptérogens et à l'infra-classe des téléostéens originaire d'Asie du sud-est. Il a un corps allongé et mesure environ 4 cm à l'âge adulte, ce qui permet le maintien d'un nombre d'individus important en aquariophilie. Un dimorphisme sexuel apparent est présent chez les individus adultes, avec des nageoires dorsales et anales plus longues chez les mâles ainsi que qu'une séparation des derniers rayons de la nageoire dorsale. Les femelles reproductivement actives ont la particularité de pouvoir se reproduire quasiment tous les jours en conditions de laboratoire. Les œufs pondus sont connectés par des filaments et restent placés au niveau de la papille génitale après la ponte jusqu'à ce qu'ils soient prélevés ou déposés sur un substrat. La régulation de leurs pontes, composés d'environ une trentaine d'œufs, est régulée par l'intensité de la lumière et la durée de la photopériode. Après fécondation externe par les spermatozoïdes mâles, les œufs du médaka sont totalement translucides, ce qui est un avantage certain pour étudier le développement embryonnaire, d'autant que les différents stades de développement ont été caractérisés par Takashi Iwamatsu (Iwamatsu 2004). Incubés à 27°C, les alevins éclosent 8 à 9 jours après la fécondation des œufs. Ce temps de développement plus lent que celui du poisson zèbre (48h)

permet une étude plus précise à certains stades. Leur reproduction journalière avec une grande quantité d'œufs permet également de générer des lignées génétiquement modifiées rapidement, on compte généralement 2 à 3 mois pour une génération. Enfin, contrairement au poisson zèbre, le sexe génotypique est induit par un gène caractérisé, *DMY/DMRT1bY*, qui permet l'identification du sexe de l'individu avant sa maturité sexuelle (Matsuda 2002).

III.2- Le comportement du médaka

Le médaka japonais offre un large éventail d'outils génétiques qui permettent la compréhension des mécanismes moléculaires, cellulaire et développementaux traduisant des phénotypes comportementaux altérés. Bien que le médaka soit un modèle animal en vogue depuis le début du 21^{ème} siècle, des tests comportementaux standardisés pour cette espèce ne sont apparus que récemment.

Les tests comportementaux utilisés chez les modèles animaux de poissons ont principalement pour but de mesurer les comportements de type anxieux. Le test en environnement nouveau, ou « novel tank test » est le plus commun (Maximino et al. 2010; Vossen et al. 2022). Il évalue la réaction d'un individu face à une « arène » nouvelle et vide de congénères, situation particulièrement anxiogène pour les poissons modèles. Les paramètres révélant les comportements anxieux sont principalement (i) la thigmotaxie, c'est-à-dire que le poisson nage en restant en contact avec les parois pour éviter la zone centrale considérée comme une zone où il serait vulnérable, et (ii) le temps passé au fond du bac. Concernant la thigmotaxie, les tests réalisés chez le médaka ont montré un comportement de thigmotaxie semblable à celui observé chez les autres espèces de poissons. Il est cependant intéressant de noter que chez le médaka soumis à une situation anxiogène, la thigmotaxie n'est pas stable au cours du test et qu'elle présente une augmentation marquée en début de test (Lucon-Xiccato et al. 2022). Il est possible que lorsque le médaka est placé dans un nouvel environnement, il explore initialement toute l'arène et n'exprime que plus tard une préférence spatiale pour les bords. En revanche, concernant le temps passé au fond du bac, l'utilité de ce paramètre pour cette espèce est plus

nuancée. Selon Lucon-Xiccato et al, le médaka soumis à une situation anxigène ne semble pas montrer de préférence pour le fond du bac comme cela peut être le cas du poisson zèbre (Lucon-Xiccato et al. 2022). A l'inverse, d'autres auteurs ont montré que le médaka présentait une augmentation immédiate du temps passé au fond du bac lors de leur introduction et qu'il se figeait pendant environ une minute, un comportement également observé chez le poisson zèbre bien que chez ce dernier l'effet se prolonge sur une plus grande période (Bencan, Sledge, et Levin 2009; Matsunaga et Watanabe 2010; Hong et Zha 2019). Il est possible que les différents résultats obtenus entre ces études soient liés à la taille et à l'âge des individus ainsi qu'à la profondeur du bac (Lucon-Xiccato et al. 2020; 2022).

De nombreuses études ont également utilisé des tests basés sur le comportement social chez le poisson zèbre. Dans les expérimentations visant à évaluer l'attrait d'un individu pour un groupe de congénères, un poisson isolé est observé dans un dispositif comprenant trois chambres séparées par des parois transparentes. La chambre située à l'une des deux extrémités contient un groupe de congénères servant de stimulus social et la chambre opposée est vide. Le temps passé à proximité du stimulus social par l'individu isolé dans la chambre centrale est considéré comme un indicateur de sa sociabilité. Le médaka manifeste plus de temps dans la zone la plus proche du stimulus social que dans les zones neutres (milieu du bac central) et témoin (zone la plus éloignée du stimulus social) (Y. Zhou et al. 2021; Lucon-Xiccato et al. 2022).

Bien qu'encore assez peu utilisés chez le médaka, certaines des études n'ayant été publiées que récemment (Hong et Zha 2019; Lucon-Xiccato et al. 2022) les tests classiques de comportement utilisés chez les poissons modèles semblent pertinents chez le médaka, même si leur interprétation devra prendre en compte les spécificités de l'espèce.

III.3- Le choix du médaka dans le projet *auts2a*

Le médaka est un poisson modèle très répandu en Asie mais pour ce qui est du reste du monde, le poisson zèbre lui est préféré (4486 articles pour le poisson zèbre contre 231 pour le médaka en 2022). Pourtant, son génome est tout aussi bien caractérisé, avec une dernière version qui est publique (ASM223467v1) depuis 2017 et ses conditions de maintien sont équivalentes à celles du poisson zèbre.

Dans le cadre de notre projet, nous avons choisi le médaka pour tous les arguments décrits ci-dessus, mais également car seul le gène *auts2a* est exprimé chez cette espèce, contrairement au poisson zèbre qui possède deux paralogues : *auts2a* (chromosome 10) et *auts2b* (chromosome 15). Les alignements de séquences montrent que la séquence génomique d'*auts2a* correspond à celle d'*AUTS2* humain. Certaines régions du gène sont même très fortement conservées, comme le « domaine AUTS2 » (Sellers, Robertson, et Tassabehji 2020). Ce domaine est également présent et conservé dans la séquence d'*auts2b* (Cf I.4), cependant ce dernier ne présente pas une séquence aussi longue que celle d'*auts2a*/*AUTS2*. En effet, la région génomique correspondant aux exons 1 à 6 a été perdu chez cette espèce (Igor Kondrychyn, Robra, et Thirumalai 2017). Des hybridations *in situ* réalisées sur des embryons de poisson zèbre ont montré qu'*auts2b* a uniquement une expression zygotique, et qu'il est exprimé à des stades de développement commun avec *auts2a*. Les hybridations *in situ* de cerveaux de poisson zèbre juvéniles ont montré une expression d'*auts2b* dans le prosencéphale et dans le cervelet, qui sont des tissus dans lesquelles *auts2a* s'exprime également. En revanche *auts2b* n'est pas exprimé dans le mésencéphale, contrairement à *auts2a*. *auts2a* et *auts2b* ne semblent pas avoir les mêmes fonctions bien qu'ils puissent avoir des rôles complémentaires au vu de leurs régions d'expression communes (Igor Kondrychyn, Robra, et Thirumalai 2017). La proximité des fonctions de ces paralogues, et le manque d'informations concernant le gène *auts2b*, très peu étudié car présent uniquement chez quelques espèces de poissons, nous est apparu comme une difficulté possible dans notre compréhension des mécanismes d'*auts2a*. Le choix du modèle médaka (à un seul gène) nous a donc semblé plus cohérent que celui du poisson zèbre (à deux gènes).

RESULTATS

Chapitre 1

Déroulement de la thèse

L'objectif de cette thèse est de caractériser et de comprendre l'impact de l'expression dans l'ovocyte du gène *auts2a*. Pour ce faire, j'ai utilisé deux approches expérimentales.

A- Exposition de médakas à un stress thermique

La première consistait à reproduire l'expérience menée par notre équipe en amont de cette thèse (Colson et al. 2019) sur le poisson modèle médaka, pour avoir un nombre de réplicas biologiques importants et une production rapide d'une grande quantité d'œufs. Il avait été démontré qu'une augmentation de la température de l'eau lors de l'ovogenèse chez la truite arc-en-ciel menait à une dérégulation du gène *auts2a* dans l'ovocyte et à des comportements altérés chez la descendance (Colson et al. 2019). J'ai donc exposé des médakas sauvages à maturité sexuelle à un stress thermique de 33°C (contre 26°C pour les individus contrôles), soit une augmentation de 27%. J'ai ensuite caractérisé macroscopiquement les pontes des femelles exposées au stress thermique, et pu observer qu'environ 5% des œufs non fécondés étaient sains (viables et fécondables), et que certaines femelles ne pondaient aucun œuf sain sur plusieurs semaines. J'ai également réalisé des extractions d'ARN sur des œufs sains non fécondés pour quantifier l'expression d'*auts2a* dans les ovocytes. J'ai pu observer des dérégulations du gène *auts2a*, de manière significative (test non paramétrique de Mann-Whitney) par rapport à l'expression chez les individus contrôles, mais avec une variabilité intra échantillons et intra expérimentations très grandes. Selon l'expérimentation, l'expression d'*auts2a* était plus importante ou moins importante comparée aux contrôles pour qui l'expression était stable (données non montrées). Je n'ai donc pas réussi à reproduire les résultats obtenus précédemment chez la truite arc-en-ciel. Ceci peut s'expliquer par le fait que la truite arc-en-ciel et le médaka sont des poissons aux processus physiologiques de vie et de reproduction différents. En effet, la truite est un poisson d'eau froide qui, lorsqu'on l'exposait à une augmentation de température de 45% (17°C au lieu

de 12°C), produisait des œufs sains, tandis que le médaka est un poisson tropical qui pour une augmentation de l'eau de l'ordre de 27% ne produisait que très peu d'œufs viables. Il est à noter que les cycles reproducteurs de ces poissons divergent, quand le médaka pond des quantités moyennes d'œufs tous les jours, la truite arc-en-ciel pond une fois par an un grand nombre d'œufs. N'ayant pas réussi à reproduire ce modèle de stress thermique chez le médaka, je me suis dirigé vers un modèle génétiquement modifié qui constituait l'autre approche expérimentale envisagée au début du projet.

B- Créations de lignées génétiquement modifiées pour le gène *auts2a*

La seconde approche expérimentale consistait à créer des lignées viables de médakas délétées d'une ou plusieurs parties du gène *auts2a*. Pour y parvenir, nous avons sélectionné des séquences d'ARN guide dirigées contre diverses parties du gène. La bibliographie réalisée en amont nous a permis d'identifier que la partie du gène codant pour la partie N-terminale de la protéine, à savoir des exons 2 à 7 chez le médaka, était exprimée dans l'ovocyte chez le poisson zèbre. Nous avons donc ciblé la délétion des exons 2 (couple 1), 7 (couple 2) et 14-18 (couple 3 et 4) avec 4 couples d'ARN guide, par micro-injection dans des œufs de médaka au stade une cellule. Les couples 1 et 2 associés à l'enzyme Cas9 ont été injectés dans une série d'œufs et les couples 3 et 4 dans une autre. Par PCR, j'ai ensuite sélectionné les individus de la génération F0 présentant des délétions de taille intéressante et les ai reproduits entre eux. Ces individus étant mosaïques, seulement une petite partie d'entre eux avait une mutation touchant la lignée germinale et pouvait donc le transmettre à la descendance. Après PCR et séquençage des ADN d'individus de la génération F1, 3 types de délétions ont été retenus pour créer des lignées. Cette phase de caractérisation et d'établissement des lignées, réalisée en parallèle du volet « exposition thermique » décrit plus haut a constitué la majeure partie de la première année de mon travail doctoral.

B.1- Lignée délétée en partie C-terminale

B.1.1- Lignée $\Delta 4032$

Cette lignée se caractérise par une délétion de 4032 paires de bases sur l'ADN génomique. Elle débute dans l'exon 14 et se termine au début de l'exon 18 (Figure 11). Cette délétion provoquerait l'apparition d'un codon stop prématuré du cadre de lecture, entraînant la production d'une protéine de 668 aa (contre 1282 aa pour un individu WT). La transcription pourrait reprendre grâce à la présence d'un codon initiateur (ATG) au début de l'exon 19. Cette délétion n'empêcherait donc pas la production des différents transcrits de la partie N-terminale de la protéine que l'on sait exprimée dans l'ovocyte mature chez le poisson zèbre. Le phénotypage macroscopique de mesure de taille des têtes à l'éclosion et de suivi du développement ont été réalisés pour cette lignée. Une différence de taille de tête significative a pu être observée entre les individus ayant reçu la contribution maternelle d'*auts2a* et ceux ayant reçu la contribution maternelle d'*auts2a* délétée en C-terminale (Figure 10). En revanche, aucun retard et aucune malformation n'a été observée au cours du développement embryonnaire. Un test comportemental en environnement nouveau a également été réalisé sur de jeunes individus (6 semaines). L'analyse des vidéos par le logiciel ethovisionXT a été impossible à réaliser au vu de la taille des poissons et de la couleur peu prononcée de leurs écailles à cet âge. Les analyses ont donc été réalisées manuellement et n'ont montré aucune différence notable entre les différents groupes. Ces résultats sont cependant à relativiser car la mesure manuelle des paramètres ne permet pas une analyse aussi poussée qu'avec un logiciel d'analyse.

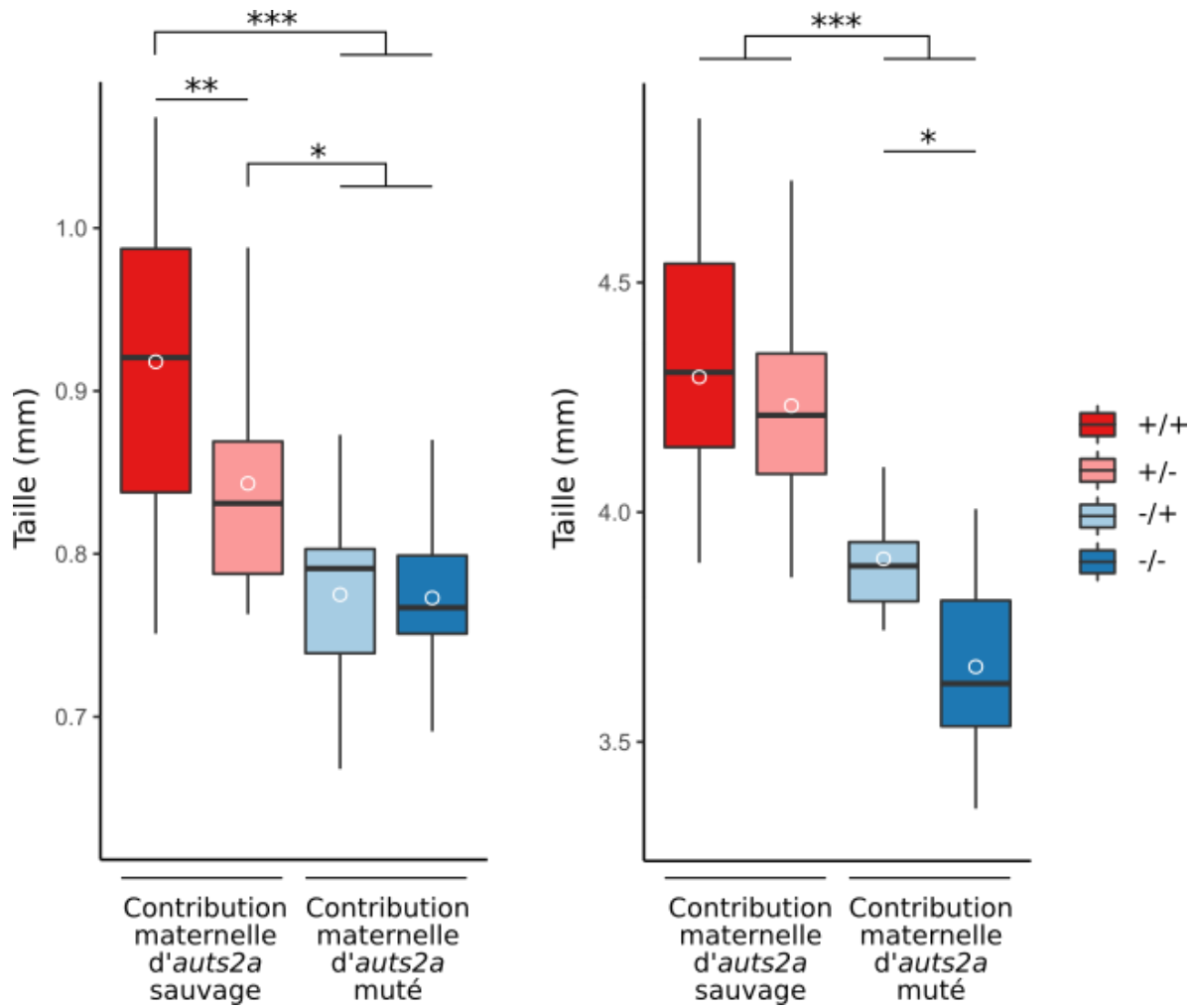


Figure 10 : Phénotype macroscopique des tailles de tête (gauche) et totales (droites) à l'éclosion en mm.
 Les tests statistiques ont été réalisés avec un test ANOVA suivi d'un test post-hoc de Tukey. * $P < 0.05$,
 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

B.2- Lignées délétées en région N-terminale

B.2.1- Lignée 2Δ

Cette lignée se caractérise par une double délétion dans la partie N-terminale de la protéine. La première délétion de 539 pb sur l'ADN génomique débute au milieu de l'exon 2, en amont du premier codon initiateur et se termine dans l'intron 2-3. La seconde délétion de 639 pb débute dans l'intron 6-7 et se termine dans l'intron 7-8, délétant donc tout l'exon 7. La première délétion bloquerait donc l'expression des transcrits exprimant le début du gène et empêcherait l'initiation de la traduction de la protéine canonique, avec une possible initiation de la traduction dans l'exon 8, qu'il y ait présence de la seconde délétion ou non (Figure 11).

Les premières observations de développement de cette lignée ont montré un taux anormal ($\approx 30\%$) de mortalité au cours de l'épibolie, particulièrement aux stade 50% et 70% de l'épibolie (17 à 19 heures après la fécondation). Par la suite, le génotypage des individus vivants a mis en évidence l'absence totale d'individus homozygotes pour la double délétion, ce qui suppose que la mortalité observée au cours de l'épibolie se produisait chez les individus homozygotes portant la double délétion. Cette hypothèse a été renforcée par le fait que le croisement d'individus hétérozygotes (un allèle sauvage et un allèle porteur de la double délétion) donnait 45% d'individus de même génotype que les parents, 35% d'individus sauvage et 20% d'individus porteur d'un allèle doublement délété et d'un allèle avec la seconde délétion (délétion de l'exon 7). Ce dernier cas ne devrait pas pouvoir être obtenu car aucun des parents ne présente un allèle avec seulement cette délétion, ce qui suppose un réarrangement allélique permettant la survie de l'embryon pour ces individus.

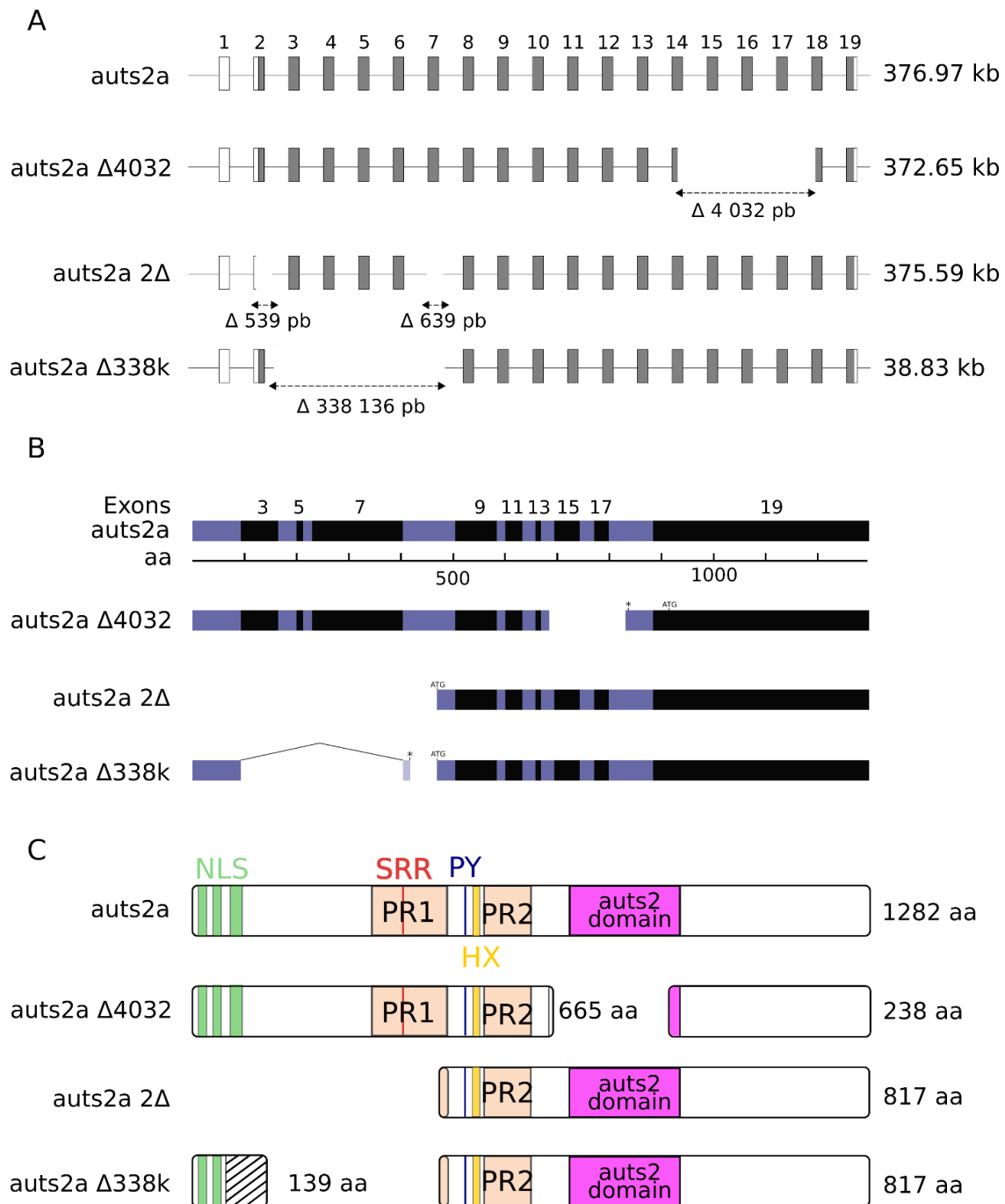


Figure 11 : Schéma illustrant les délétions sur les lignées générées. A Schéma non à l'échelle. Les délétions sont représentées sur l'ADN génomique. Les parties des exons grisées correspondent aux parties normalement traduites. **B** Schéma à l'échelle du transcrit long sauvage et des transcrits prédits dans les lignées mutées. **C** Schéma à l'échelle de la protéine canonique sauvage et des protéines prédites dans les lignées mutées.

La non obtention d'individus homozygotes doublement délétés ainsi que les réarrangements alléliques lors de la fécondation ont rendu difficile la caractérisation de l'impact maternel de cette mutation, que ce soit d'un point de vu macroscopique (pendant le développement), d'un point de vu comportemental ou moléculaire. Cette lignée a donc été écartée à court terme mais conservée pour des études futures.

B.2.2- Lignée $\Delta 338K$

Cette lignée, que nous avons retenue pour mes travaux de thèse, se caractérise par une large délétion de 338 136 pb, ce qui représente environ 90% de la taille totale du gène. Ceci s'explique par le fait que la partie 5' du gène est composée de larges régions introniques et de séquences exoniques longues tandis que la partie 3' du gène est composée de séquences introniques et de séquences exoniques courtes (excepté pour l'exon 19 qui est le dernier et le plus long). Cette délétion débute dans l'intron 2 et se termine dans l'intron 7, délétant entièrement les exons 3 à 7 (Figure 11). Contrairement à la lignée 2Δ , la séquence correspondant à l'exon 2, et donc au codon initiateur de la traduction de la protéine canonique, est présente. Et contrairement à la lignée 2Δ , les individus homozygotes mutants sont vivants et aucun réarrangement allélique n'a été observé.

Chapitre 2

Evolution du gène AUTS2 chez les vertébrés

A- Objectif du travail de recherche



Comme évoqué précédemment, plusieurs espèces de téléostéens, tel que le poisson zèbre présentent un gène nommé *auts2a* et un gène nommé *auts2b*. Malgré l'existence de deux gènes *auts2* chez le poisson zèbre, on ne sait toujours pas si ces gènes proviennent de l'événement de duplication du génome entier qui s'est produit à la racine des téléostéens ou s'ils sont issus de duplications plus tardives spécifiques à certaines espèces.

L'un des arguments principaux pour choisir le médaka comme modèle animal dans la compréhension des effets intergénérationnels d'*auts2a* (Cf Chapitre 3) était la présence d'une seule copie du gène. Cependant, nous avons voulu comprendre pourquoi certaines espèces de poissons présentent deux copies du gène alors que la totalité des mammifères n'en présentent qu'une seule. Ces informations nous semblent essentielles pour approfondir les fonctions d'*auts2* en utilisant des modèles de poissons téléostéens populaires afin de mieux comprendre les rôles et les mécanismes d'actions d'*auts2* pendant le développement du système nerveux. Pour ce faire, nous avons comparé les génomes de 76 espèces de téléostéens et 2 génomes d'espèces de mammifères.

Lors de ce travail que j'ai publié en co-premier auteur, j'ai participé aux prélèvements, aux analyses des données, à la rédaction et à la réalisation de figures.

Article

***auts2* Features and Expression Are Highly Conserved during Evolution despite Different Evolutionary Fates Following Whole Genome Duplication**

Constance Merdrignac [†], Antoine Emile Clément [†], Jérôme Montfort, Florent Murat and Julien Bobe ^{*}

INRAE, LPGP UR1037, Fish Physiology and Genomics, Campus de Beaulieu, F-35000 Rennes, France; constance.merdrignac@inrae.fr (C.M.); antoine.clement@inrae.fr (A.E.C.); jerome.montfort@inrae.fr (J.M.); florent.murat@inrae.fr (F.M.)

* Correspondence: julien.bobe@inrae.fr

† These authors contributed equally to this work



Citation: Merdrignac, C.; Clément, A.E.; Montfort, J.; Murat, F.; Bobe, J. *auts2* Features and Expression Are Highly Conserved during Evolution despite Different Evolutionary

Fates Following Whole Genome Duplication. *Cells* **2022**, *11*, 2694. <https://doi.org/10.3390/cells11172694>

Academic Editors: Sepand Rastegar and Luisa Lübke

Received: 19 July 2022

Accepted: 24 August 2022

Published: 30 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

INRAE, LPGP UR1037, Fish Physiology and Genomics, Campus de Beaulieu, F-35000 Rennes, France

* Correspondence: julien.bobe@inrae.fr † These authors contributed equally to this work.

Abstract: The *AUTS2* gene plays major roles during brain development and is associated with various neuropathologies including autism. Data in non-mammalian species are scarce, and the aim of our study was to provide a comprehensive analysis of *auts2* evolution in teleost fish, which are widely used for in vivo functional analysis and biomedical purposes. Comparative genomics in 78 species showed that *auts2a* and *auts2b* originate from the teleost-specific whole genome duplication (TGD). *auts2a*, which is highly similar to human *AUTS2*, was almost systematically retained following TGD. In contrast, *auts2b*, which encodes for a shorter protein similar to a short human *AUTS2* isoform, was lost more frequently and independently during evolution. RNA-seq analysis in 10 species revealed a highly conserved profile with predominant expression of both genes in the embryo, brain, and gonads. Based on protein length, conserved domains, and expression profiles, we speculate that the long human isoform functions were retained by *auts2a*, while the short isoform functions were retained by *auts2a* and/or *auts2b*, depending on the lineage/species. *auts2a* showed a burst in expression during medaka brain formation, where it was expressed in areas of the brain associated with neurodevelopmental disorders. Together, our data suggest a strong conservation of *auts2* functions in vertebrates despite different evolutionary scenarios in teleosts.

Keywords: autism spectrum disorders (ASDs); neurodevelopmental disorders (NDDs); brain; evolution; teleost; medaka; zebrafish

1. Introduction

The *AUTS2* gene (activator of transcription and developmental regulator, previously known as autism susceptibility candidate 2) is associated with multiple neurodevelopmental disorders (NDDs) and neurological disorders (see [1-4] for a recent review). *AUTS2* was originally linked to autism spectrum disorders (ASDs) [5] and subsequently associated with other intellectual disabilities, short stature, microcephaly, cerebral palsy, facial dimorphism [6], developmental delays [7], mental retardation [8], speech and language disorders [9], addictive behavior [10], and schizophrenia [11]. The human *AUTS2* gene encodes a full-length protein of 1259 amino acids [6]. While numerous splice variants have been described, the best documented variants encode for a 786-amino-acid (S-AUTS2-Var1) protein and a 711-amino-acid (S-AUTS2-Var2) protein, both corresponding to the C-terminal portion of the full-length protein [2,4,6]. In humans, *AUTS2* is expressed in various tissues including the fetal brain [5]. In mice, *Aut2* is expressed in the developing brain, where it localizes to the developing cortex, cerebellum, and hippocampus [12]. In the nucleus, *AUTS2* is believed to activate the transcription of genes involved in brain development and NDDs, many of which being expressed in the developing mouse forebrain [13]. It was also shown that *AUTS2* interacts with an epigenetic regulator type I Polycomb repressive complex (PRC1) [14]. It was however hypothesized that *AUTS2* could function as a transcriptional activator or repressor depending on the cellular context [2,14,15]. In the nucleus, *AUTS2* was also hypothesized to interact with RNA, either directly or through RNA binding proteins to ultimately regulate neuronal differentiation [4,15,16]. Finally, *Aut2* is

also able to regulate cytoskeletal dynamics in the cytoplasm to ultimately regulate neurite outgrowth and branch formation, as well as neuronal formation in mice [17]. In mice, *Auts2* invalidation resulted in neonatal death, as shown by several independent studies specifically targeting different exons [16,17]. When heterozygous mutants were used or conditional knock-out was carried out, abnormal behavioral phenotypes were observed in independent studies targeting different exons [16-20]. While *Auts2* has been studied in humans and mice, existing data in other mammalian species are scarce, with a single study conducted in pig [21]. To the best of our knowledge, *Auts2* orthologs were never studied in any non-mammalian tetrapod species. In teleost fish, *auts2* was studied in zebrafish (*Danio rerio*), in which two distinct genes, *auts2a* and *auts2b*, were reported. Consistent with existing data in mice, *auts2a* and *auts2b* are expressed in the developing zebrafish brain [22]. Knock-down of *auts2a* in zebrafish resulted in phenotypes that were globally consistent with murine data, even though behavioral phenotypes were not assessed [6,23]. In rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), a maternal temperature stress resulted in impaired behavior in the progeny and dysregulation of several neurodevelopmental genes in the eggs, including a reduced expression of *auts2* [24]. Despite the existence of two *auts2* genes in zebrafish, it remains unclear if these genes originate from the whole genome duplication (WGD) event that occurred at the root of teleosts (i.e., the teleost-specific genome duplication (TGD)). It is also unclear if the presence of two *auts2* genes is common to all teleosts or limited to several species such as zebrafish. The existence of two *auts2* gene copies in zebrafish, and possibly other teleost species, raises the question of the evolution of different functions for *auts2a* and *auts2b* after WGD. In this context, the aim of the present study was to comprehensively characterize the evolutionary history of *auts2* genes in teleosts using comparative genomics and shed new light on the evolution and/or conservation of the expression of *auts2* genes in teleost fish. This information is currently missing and required to further investigate the functions of *auts2* using popular teleost fish models to better understand the role(s) and function(s) of *auts2* during neurodevelopment in a biomedical context. Here, we show that most teleost species retained only the *auts2a* copy, which exhibits highly conserved protein size and domain features with humans and mice. Using Japanese medaka (*Oryzias latipes*), a model species for neurodevelopment in which only *auts2a* was retained, we show that the spatio-temporal gene expression is also highly conserved with expression in areas of the brain that are associated with neurodevelopmental disorders.

2. Materials and Methods

2.1. Sequence Availability Synteny Analysis

The synteny analysis was performed using gene orthology information available in genomic version 03.01 (<https://www.genomicus.bio.ens.psl.eu/genomicus-fish-03.01/cgi-bin/search.pl>, accessed on 28 March 2022). For all species, *auts2* accession numbers are available in Table S1. For Atlantic salmon (*Salmo salar*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), and coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), gene synteny was analyzed using Ensembl v106

(<https://uswest.ensembl.org/index.html?redirect=no>, accessed on 20 April 2022). For allis shad (*Alosa alosa*), the synteny analysis was performed using a BLAST search to identify genes present in conserved synteny blocks in the vicinity of *auts2a* and *auts2b* on the publicly available genome assembly (Accession #: GCA_017591415.1). For European conger (*Conger conger*), we used the genome assembly available in the omics Dataverse303 (open-source research data repository) server (<https://doi.org/10.15454/GWL0GP>, accessed on 5 April 2022) [25] to perform a similar analysis. Genome assembly versions, gene positions on the genome, and corresponding accession numbers are available in Table S2.

2.2. Gene Remnants' Identification

To identify potential gene remnants, we performed TBLASTN analysis. The AUTS2 family conserved protein domain was blasted against genomic sequences located in relevant syntenic block possibly bearing *auts2a* or *auts2b* gene remnants. To identify *auts2b* gene remnants, we used zebrafish *auts2b* exon 9 as the bait. To identify *auts2a* gene remnants, we used red-bellied piranha (*Pygocentrus nattereri*) *auts2a* exon 7 as the bait for Mexican tetra (*Astyanax mexicanus*) and electric eel (*Electrophorus electricus*) and *auts2a* exon 10 as the bait for channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and iridescent shark catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*).

2.3. Phylogenetic Analysis

Phylogenetic analysis was performed using AutS2 full-length protein sequences of 33 species with Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 11.0.11 software (State College, PA, USA). Sequences were first aligned using CLUSTALW, and phylogenetic trees were generated using the maximum likelihood method (based on the Whelan and Goldman + Freq. model) with 500 bootstrap replicates and subsequently confirmed using the neighbor-joining and minimum likelihood methods (500 bootstrap replicates).

2.4. Read Processing and Estimation of Expression Levels

RNA-seq datasets across 11 tissues from 10 species from a previous study [26] were downloaded from SRA (Accession #: SRR1524271-81 (Japanese medaka), SRR2045415-25 (Atlantic cod), SRR1533651-61 (Northern pike), SRR1524238-49 (zebrafish), SRR2045404-14 (Mexican tetra Pachon cave morph), SRR2045426-36 (Mexican tetra surface morph), SRR1533640-50 (iridescent shark catfish), SRR1532799-809 (allis shad), SRR1532756-65 (European eel), SRR1524250-60 (spotted gar), SRR1524261-70 (bowfin); see Table S3). Raw reads with known 3' adaptor and low-quality bases (Phred score < 20) were trimmed with TrimGalore (version 0.6.6, Cambridge, UK) (<https://github.com/FelixKrueger/TrimGalore>, accessed on 28 April 2022) (parameters: -r_clip 13 -three_prime_clip 2). Next, we mapped the trimmed reads from each library against the reference genome and annotated transcripts of the species (Table S4) using Salmon (version 1.8) [27] (parameters: defaults). Gene-expression levels were measured in transcripts per kilobase million (TPM), a unit which corrects for both feature length and sequencing depth.

2.5. Sequence Features

To investigate conserved sequence features between species, amino acid sequences (accession numbers available in Table S5 and S6) were aligned using the BioEdit software (version 7.0.5.3, Raleigh, NC, USA) and conserved domains were visually identified based on existing data [4].

2.6. Embryo Sampling

Fertilized medaka eggs were collected, and developing embryos were subsequently incubated at 27 °C in mineral medium (water, 0.1% NaCl, 0.003% KCl, 0.004% CaCl₂, 0.016% MgSO₄) until they reached the targeted developmental stage. Embryos were then snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until RNA extraction. The following eleven development stages were used to characterize the *auts2a* expression profile throughout medaka embryonic development: 1, 4, 8–9, 11, 17–18, 20, 25, 29, 30, 36, 38, according to Iwamatsu [28]. For each developmental stage, 4 biological replicates, corresponding to pools of embryos, were used. At early stages (stages 1 to 11), pools of 60–95 embryos were used. For later stages (stage 17–18 to 38), pools of 28–44 embryos were used.

2.7. RNA Extraction

Frozen medaka embryos were lysed with a Precellys Evolution Homogenizer (Ozyme, Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France) in TRI Reagent (TR118; Euromedex, Cincinnati, OH, USA), and total RNA was extracted according to the manufacturer's instructions. After extraction, RNA concentration was measured using a nanodrop, and luciferase exogenous RNA was added in each sample at a ratio of 9 pg per embryo for subsequent qPCR data normalization. RNA was stored at -80 °C until reverse transcription.

2.8. Reverse Transcription and Quantitative PCR

Reverse transcription (RT) was performed from 1 µg of total RNA using the Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) following the manufacturer's instructions. Real-time PCR reactions were performed using the PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions in a total volume of 10 µL, containing RT products diluted at 1:62.5 and 400 nM of each primer. Primer sequences are available in Table S7. As *auts2a* is believed to have multiple transcription start sites and transcripts [22], we used primers surrounding the exons 2–3 junction to target the full-length isoform and the exons 18–19 junction to target both full-length and short C-terminal isoforms. Each biological replicate was analyzed in quadruplicate. The qPCR cycle was run on the Light Cycler 480 (Roche, Bâle, Switzerland) and included a pre-amplification step of 2 min at 50 °C and 2 min of initial denaturation at 95 °C, followed by 40 cycles at 95 °C for 3 sec and 60 °C for 30 sec. To visualize the melting curve, a third step included 15 sec of denaturation at 95 °C followed by 1 sec at 60 °C and a final denaturation at 95 °C. Finally, a cooling step was performed for 30 sec at 40 °C. The relative abundance (absorbance quantification/fit points) of target cDNA was evaluated from a serially diluted cDNA pool (standard curve) using the Light

Cycler 480 software (version 1.5.1.62, Roche, Bâle, Switzerland). Before analysis, gene expression data were normalized using luciferase signal.

2.9. Statistical Analysis

To compare *auts2a* expression levels between stages for each set of primers independently, a Kruskal test was performed ($p < 0.05$), and a pairwise Wilcoxon signed rank test was subsequently used ($p < 0.05$) to make two by two comparisons between stages.

2.10. RNAscope

RNAscope is a state-of-the-art in situ hybridization method [29-31]. It was carried out following the manufacturer's instructions (ACDBio, bio-technie, Newark, CA, USA) with minor changes inspired by previous studies conducted on whole-mount tissues [30,31].

2.10.1. Probe Design

The RNAscope *auts2a* probe was designed by ACDBio company. It consisted of a 20 ZZ probes targeting nucleotides 3356–4345 of the Japanese medaka *auts2a* full-length transcript (XM_011483791.3).

2.10.2. Embryo Sampling and Preprocessing

Stage 29 embryos were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA)/phosphate-buffered saline (PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7) one day at room temperature. The PFA fixation was stopped by a 10 min PBS + 0.1% tween (PBST) wash. The chorion, a thick acellular envelope surrounding the egg, was removed manually using thin forceps. Embryos were then gradually dehydrated in methanol/PBST (increasing methanol concentration: 10 min in 25% methanol, 10 min in 50% methanol, 10 min in 75% methanol, 10 min in 100% methanol) and were subsequently stored in 100% methanol at –20 °C until the RNAscope assay was performed. Assays were run using five embryos for each condition. Embryos were put in mesh inserts within cryotubes and culture plate wells. RNAscope reagent steps (Protease Plus, AMP, HRP-C1/HRP-C3, Opal520 and HRP blocker steps) were carried out in 2 mL round-bottom plastic cryotubes and other steps in a 24-well cell culture plate (working volume : 750µL).

2.10.3. Sample Pre-Treatment

First, samples were gradually rehydrated in methanol/PBST (decreasing methanol concentration: 10 min in 75% methanol, 10 min in 50% methanol, 10 min in 25% methanol, 10 min in 100% PBST). Unmasking was then performed using the RNAscope Target Retrieval reagent (ACDBio, ref: 322000). The aim of this step was to improve the signal quality. Samples were incubated (15 min at 100 °C) in Target Retrieval reagent 1X previously briefly boiled in a microwave oven. Two 10 min PBST washes were then performed. Embryos were then permeabilized using a few drops of RNAscope Protease Plus Reagent (ACDBio, ref: 322331) for 15 min at 40 °C. Protease Plus action was stopped by three 10 min PBST washes.

2.10.4. RNAscope Multiplex Fluorescent V2 Assay

The assay was carried out using the RNAscope Multiplex Fluorescent V2 kit (ACDBio, ref: 323100). The RNAscope 3-plex negative control channel 3 probe (ACDBio, ref: 320871), targeting the *Bacillus subtilis dapB* gene (accession # EF191515), was used as a negative control. Hybridization was carried out using a few drops of pre-warmed RNAscope probe, overnight at 50 °C. The following day, three 10 min 0.2X saline-sodium citrate + 0.01% tween (0.2X SSCT) washes were performed. Embryos were fixed with 4% PFA in PBST for 6 min. The fixation was followed by three 10 min 0.2X SSCT washes. Then, six steps were carried out to hybridize preamplifiers and amplifiers, each one with a different RNAscope reagent. Each step started with adding a few drops of RNAscope reagent on the sample at 40 °C and lasted as follows: AMP1: 45 min, AMP2: 45 min, AMP3: 30 min, HRP-C1/HRP-C3: 45 min. Between each RNAscope reagent incubation, three 10 min 0.2X SSCT washes were performed at room temperature. RNAscope HRP reagent was used according to the probe channel (HRP-C1 for RNAscope channel 1 probes, HRP-C3 for RNAscope 3-plex negative control channel 3 probe). Finally, the signal was revealed using Fluorescein Opal520 reagent (1/1500 dilution of Fluorescein Opal520 reagent (Akoya Biosciences, Marlborough, MA, USA, ref: FP1487001KT) in RNAscope TSA buffer). The revelation was conducted in the dark for 30 min. Then, samples were washed three times 10 min in 0.2X SSCT in the dark. Subsequently, the HRP blocker step was carried out in the dark, and samples were washed three times for 10 min in 0.2X SSCT in the dark. Finally, embryos were incubated with methyl green overnight at 4 °C in the dark.

2.10.5. Microscopy

Images of whole embryos were acquired on a TCS SP8 laser scanning confocal microscope with a 25X objective (0.95 NA) using the LASX software (Leica Microsystems Wetzlar, Germany, version 3.5.7). Embryos were orientated and immobilized in 2% agarose grooves made using Stampwell molds (Idylle, Cape Town, South Africa) prior to observation. Maximum Z projection images of RNAscope staining and standard deviation Z projection images of methyl green staining were obtained using the ImageJ (FIJI) software (version 1.53f51, Bethesda, MD, USA).

3. Results

3.1. Evolution of the *auts2* Gene Repertoire

The analysis of the genomic region in the vicinity of the *Auts2* gene did not show any long-range conservation between tetrapods and teleosts (Figures 1A and S1A). We used the spotted gar (*Lepisosteus oculatus*), a species belonging to the Holostei group, which did not experience the teleost-specific whole genome duplication (TGD), to bridge the gap between tetrapods and teleosts [32]. We observed a conserved gene synteny (i.e., conservation of gene blocks on chromosome regions) between tetrapods and spotted gar and between spotted gar and teleosts (Figures 1A and S1A). The synteny was especially well conserved among teleosts, with several

orthologous genes such as *med13*, *vmp1*, *ctlc*, and *map6* present in the vicinity of *auts2* genes (Figure 1A, Figure S1A). The conserved synteny between spotted gar and teleosts, in which two distinct genomic regions could systematically be identified, indicates that teleost *auts2a* and *auts2b* originate from the TGD. This observation was further supported using bowfin (*Amia calva*), another Holostei species (Figure S1A). When performing phylogenetic analysis, we clearly observed a separation between *auts2a* genes and *auts2b* genes (Figure 1B). A similar tree topology was observed using three different tree-building methods (Figure S2).

A



B

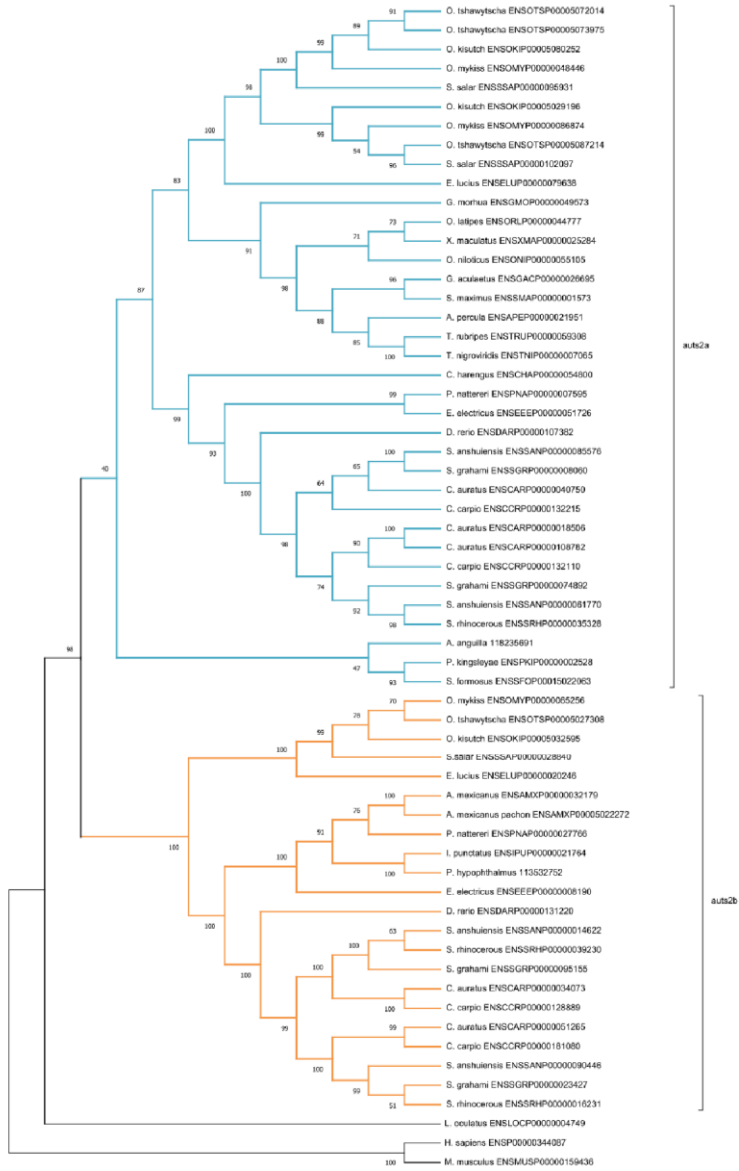


Figure 1. Identification of teleost *auts2* ohnologs and their origin using synteny and phylogenetic analysis (A). Identification of teleost *auts2a* and *auts2b* in 7 species using synteny analysis. Chromosome and scaffold numbers are indicated. Gene positions are in kilobases. The names of phylogenetic groups are indicated on tree branches. (B). Phylogenetic analysis of full-length *Auts2* proteins using CLUSTALW alignment and maximum likelihood method. Protein accession numbers are provided in front

The analysis of the *auts2* gene repertoire in teleost species revealed a striking diversity in gene retention patterns among species. Two copies of the gene, *auts2a* and *auts2b*, were found in European conger (*Conger conger*), zebrafish, and Northern pike (*Esox lucius*) (Figure 1A and S1A). In contrast, only *auts2a* was found in European eel (*Anguilla anguilla*), Asian arowana (*Scleropages formosus*), Atlantic cod (*Gadus morhua*), and Japanese medaka, while only *auts2b* could be identified in the two morphs of Mexican tetra (*Astyanax mexicanus*) (Figures 1A and S1A). We then performed a more comprehensive analysis using 76 teleost species. We observed that only *auts2a* could be identified in 52 species belonging to Acanthomorpha, a large group of fish species that encompasses medakas, guppies, mollies, stickleback, perch, flatfishes, tetraodons, and cods (Figures 2A and 3). Non-functional remnants of *auts2b* genes could systematically be found in ohnologous regions when the *auts2b* exon 9 amino acid sequence was blasted onto the genome (Figures 1A and S3) in all species for which the analysis was performed ($n = 8$). This demonstrates that *auts2b* was lost in this lineage, which diverged approximately 150 Mya [33]. Similarly, *auts2b* was lost in the three Osteoglossomorpha species (*Scleropages formosus*, *Paramormyrops kingsleyae*, and *Arapaima gigas*) that we investigated (Figures 2A and 3). In these species, we did not succeed in identifying non-functional *auts2b* gene remnants in available genome assemblies. This absence of *auts2b* gene remnants would be consistent with a rapid loss of the gene after the Osteoglossomorpha radiation, which occurred approximately 200–250 Mya [33]. In contrast, a great diversity of evolutionary fates was observed in the Otomorpha clade (Figure 2A and 3). While only *auts2a* was retained in Atlantic herring (*Clupea harengus*), other species retained either both genes, in the case of electric eel (*Electrophorus electricus*), red-bellied piranha (*Pygocentrus nattereri*), and zebrafish, or only *auts2b*, in the case of Mexican tetra (both surface and Pachon cave morphs), channel catfish (*Ictalurus punctatus*), and iridescent shark catfish (*Pangasianodon hypophtalmus*). These observations were supported by the identification of possible gene remnants spanning over 6–8 amino acids, depending on the species (Figure S3), corresponding to a highly conserved sequence of the *Auts2* family [22] in the *auts2a* syntenic block.

Together, these observations suggest relatively recent species-specific gene losses in Otomorpha resulting in highly variable *auts2* gene repertoires in this group. This recent species-specific loss was also observed in Elopomorpha in which *auts2b* was found in European conger, but not in European eel (Figures 2A, 3, and S1A), despite the short divergence time (i.e., approximately 90 Mya) between the two species [33]. The loss of *auts2b* in European eel was further supported by the presence of a possible gene remnant spanning over six amino acids (Figure S3), corresponding to a highly conserved sequence of the *Auts2* family [22] in the *auts2b* syntenic block.

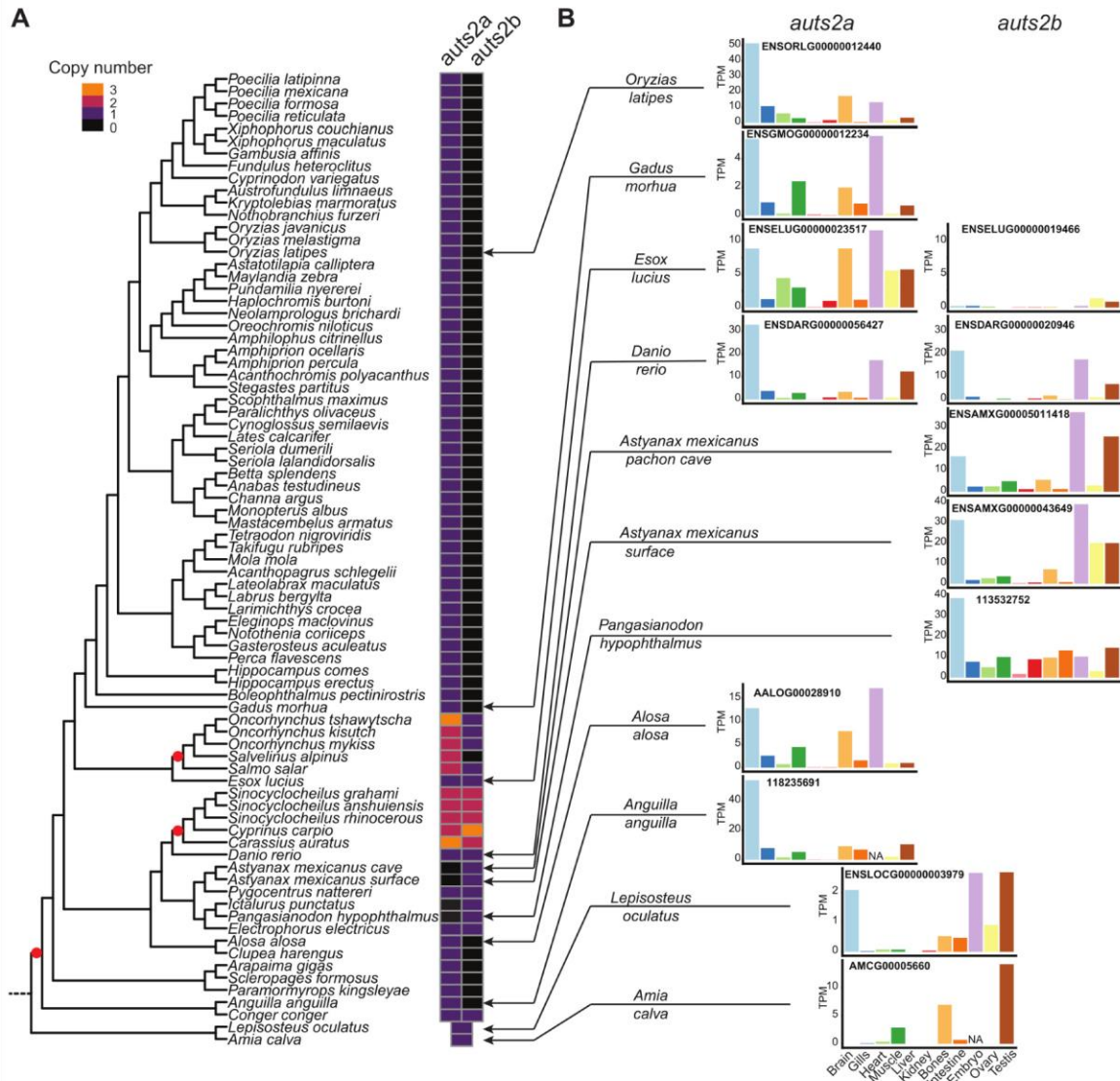


Figure 2. Comprehensive analysis of teleost *auts2* gene retention and expression after teleost-specific whole genome duplication. **(A).** Retention of teleost *auts2a* and *auts2b* in 78 species using synteny analysis. Whole genome duplication events are indicated by a red spot. **(B).** Tissue expression analysis of *auts2* using RNA-seq data in 10 species. Different colors correspond to different tissues.

In summary (Figure 3), the comprehensive gene analysis shows that, in contrast to many other genes [34,35] including *foxl3*[36], *nmp2a*, *nmp2b* [37], *shbga*, *shbgb*, *pros1*, and *gas6* [38] to name just a few, a rapid loss of one of the two *auts2* gene copies did not occur after TGD. We however observed the loss of *auts2b* in the Acanthomorpha ancestor, approximately 150 Mya. Similarly, *auts2b* was not present in Osteoglossomorpha, suggesting that the loss of the gene could have occurred between 200 and 250 Mya [33]. In contrast, we observed much more recent losses of either *auts2a* or *auts2b*, which occurred in a species-specific manner in different clades. We observed that additional WGD events that occurred in Salmonidae [39] and Cyprininae[40] also impacted the *auts2* gene repertoires. In Cyprininae, both genes were

retained in two copies (*auts2a1*, *auts2a2*, *auts2b1* and *auts2b2*) in most species (Figures 2 and S1B). We also observed additional copies of *auts2a* and *auts2b* in goldfish and carp, respectively. It remains unclear if these additional copies are due to local duplications or to genome assembly artefacts (Figure 2 and S1B). Similar observations were made in Salmonidae, in which two copies of *auts2a*, *auts2a1*, and *auts2a2*, could be identified in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), Atlantic salmon (*Salmo salar*), and Arctic char (*Salvelinus alpinus*). In contrast, a single copy of *auts2b* was retained in these three species (Figures 2 and S1C).

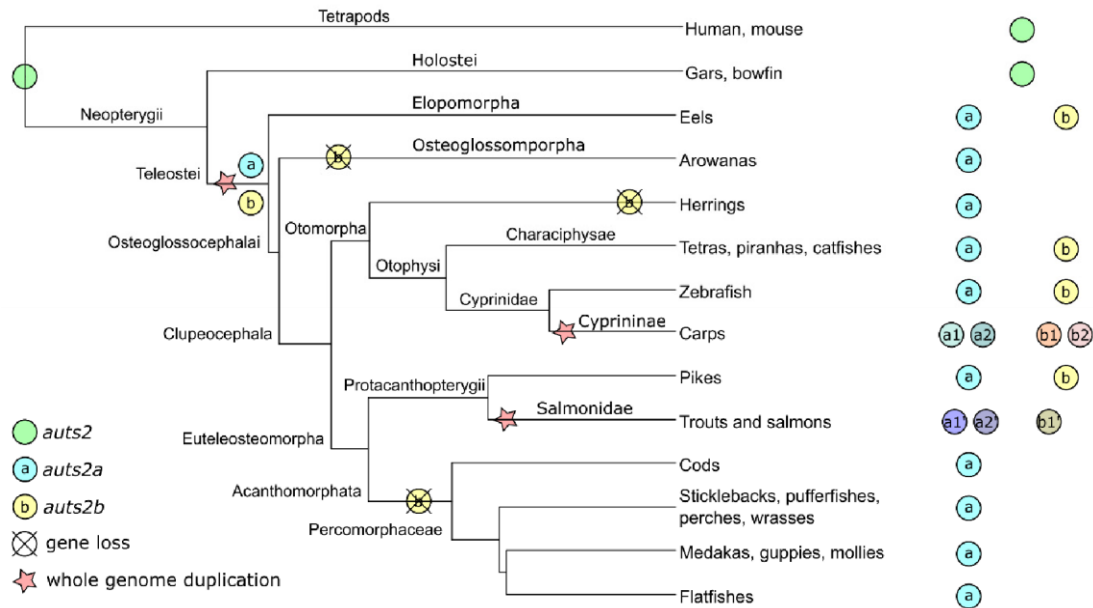


Figure 3. Teleost *auts2* orthologs' evolutionary history. The presence of a gene in a specific clade denotes the retention in at least one species of the clade.

3.2. *Auts2* Protein and Gene Sequence Features

The human *AUTS2* gene is very large and consists of 19 exons [5]. This exon structure is conserved in mice [12], zebrafish [6,22], and medaka (Figure 4), suggesting a highly conserved genomic structure among vertebrates. The coding sequence, however, starts on exon 2 in zebrafish [22] and medaka (Figure 4), while it starts on exon 1 in humans [5] and mice [12]. The full-length *AUTS2* protein was extensively described in humans [5] and mice [12]. The human *AUTS2* includes three nuclear localization sequence (NLS) motifs located in the N-terminal region of the protein (Figure 4). Two proline-rich repeat domains, PR1 and PR2, are encoded by exons 7–8 and 9–13, respectively (Figure 4). The PPPY and HXR domains are located between the two PR domains and are encoded by exon 9. A serine-rich repeat domain (SRR) is encoded by exon 7. Finally, an *AUTS2* domain, that is also found in all members of the *Auts2* family (i.e., *AUTS2*, *FBRS*, and *FBRS1*) is encoded by exons 13–19. All these domains are also present in

zebrafish [6] and medaka (Figure 4) *Auts2a*, indicating a highly conserved protein structure in vertebrates. We however observed differences in the size of the HXR domain with 11 HX repeats in zebrafish and medaka *Auts2a* and 9 HX repeats in human *AUTS2*. When comparing *Auts2a* and *Auts2b*, we observed that the HXR domain was shorter in *Auts2b* in comparison to *Auts2a* (Figures 4 and S4).

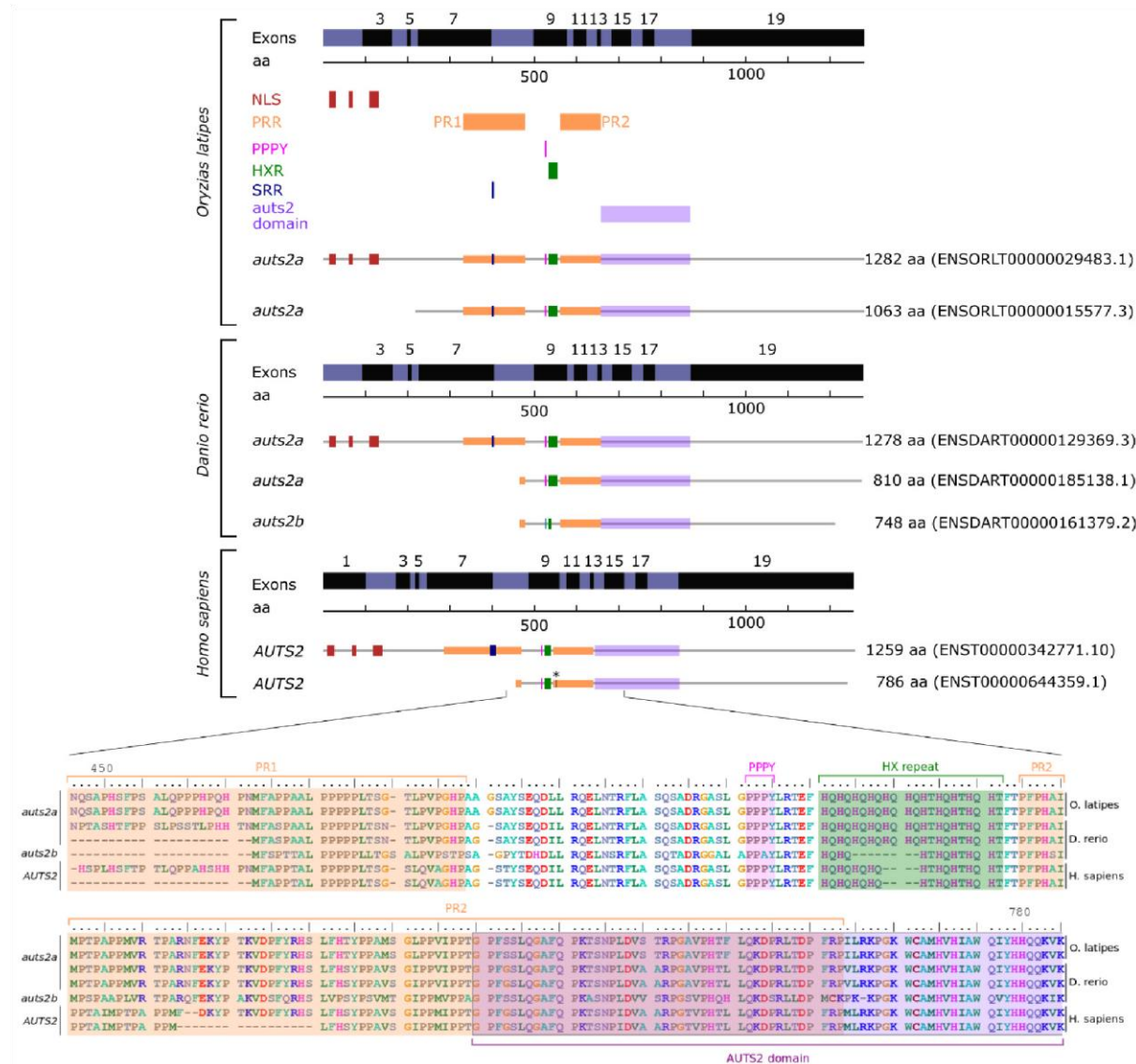


Figure 4. *AUTS2* exons and protein domains in humans, zebrafish, and Japanese medaka based on Ensembl. NLS: nuclear localization sequence. PRR: proline-rich repeat domain. PPPY: PPPY protein binding motif. HXR: HX repeat motif. SRR: serine-rich repeat domain. * indicates the position of the initiation codon of the S-*AUTS2*-Var2 human short C-terminal isoform [4,6].

3.3. Evolution of *auts2* Gene Expression

RNA-seq data available from the PhyloFish database [26] were remapped on available genomes to characterize *auts2a* and *auts2b* expression in different tissues and organs, as well as embryos. We observed highly conserved expression patterns with a predominant expression in the embryo, adult brain, and gonads. This pattern was strikingly similar in species in which either *auts2a* or *auts2b* was retained. In zebrafish, in which both *auts2a* and *auts2b* are present, both genes exhibited a similar expression pattern both in terms of tissue distribution and expression levels with a predominant expression in the embryo, adult brain, and testis. In contrast, *auts2b* expression in Northern pike appeared to be extremely reduced in comparison to *auts2a*, suggesting a possible pseudogenization of this copy (Figure 2B).

3.4. Expression of *auts2a* during Japanese Medaka Neurodevelopment

Using medaka as a model, we monitored *auts2a* expression throughout embryonic development with special interest in embryonic brain formation. Given the existence of different transcripts, we used quantitative RT-PCR to target the N-terminal region (exons 2–3) or the C-terminal region (exons 18–19) of the protein. We were able to detect *auts2a* above background levels in fertilized eggs and at various developmental stages prior to zygotic genome activation (Figure 5B), indicating that *auts2a* mRNA is maternally inherited. Similar profiles were observed when exons 2–3 and 18–19 were targeted. A burst in *auts2a* expression was subsequently observed with a 7-fold increase at the early neurula stage (stage 17 according to Iwamatsu [28]) for both targeted regions. Throughout neurulation (stages 17–24 according to Iwamatsu [28]), *auts2a* expression exhibited a stepwise increase at stages 20 and 25 (i.e., neural tube development) when targeting exons 2–3. This increase was however not observed until stage 25 when targeting exons 18–19. We subsequently observed, for both targeted regions, a dramatic increase in *auts2a* expression at stage 29, which corresponds to the beginning of late embryonic brain establishment. Expression further increased at stage 36 and remained elevated during subsequent embryo development (i.e., stage 38) (Figure 5A).

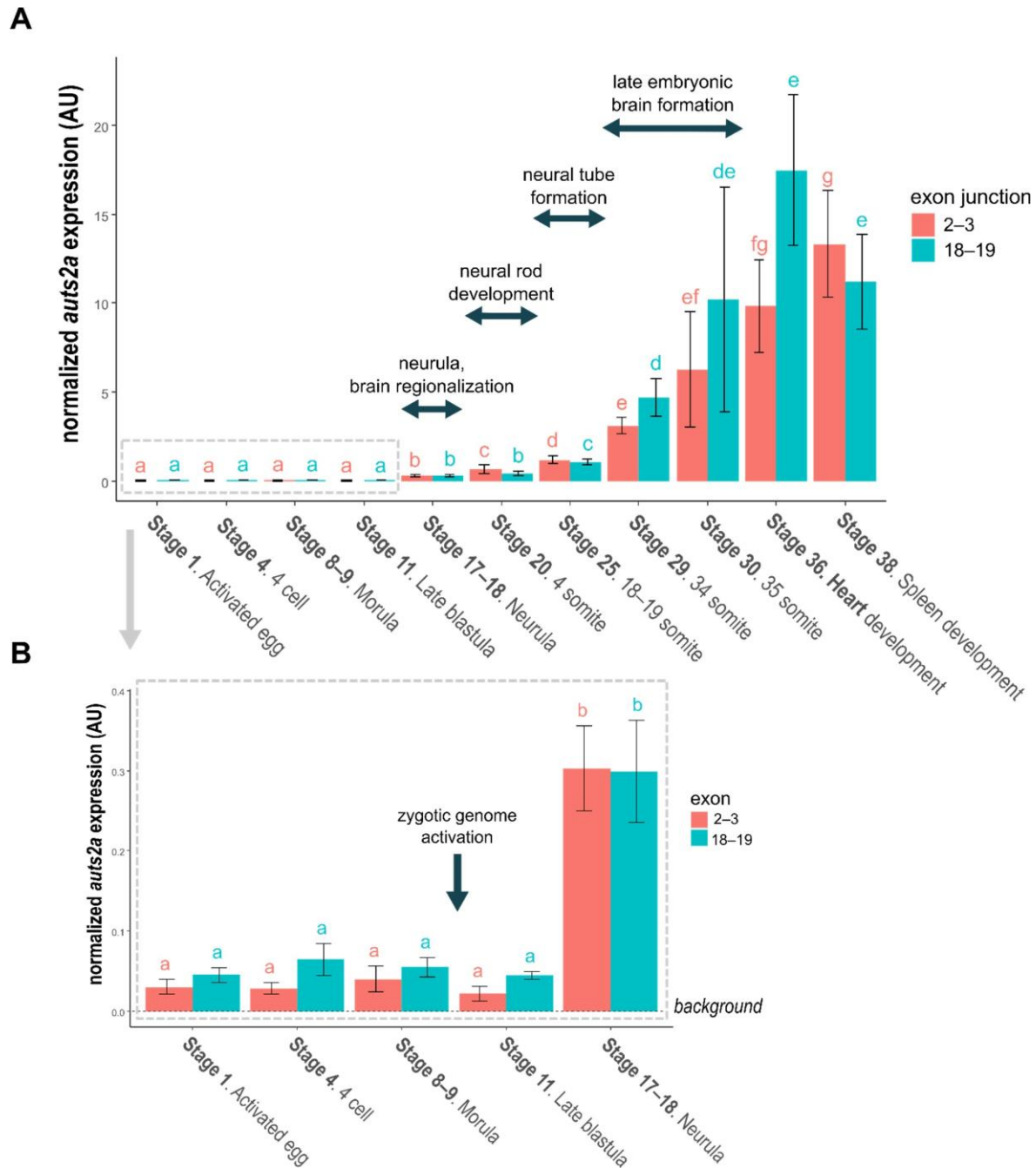


Figure 5. (A). Japanese medaka *auts2a* expression during embryonic development. **(B).** Focus on early embryonic development. For both panels bars represent the mean normalized expression calculated using 4 different pools of embryos. The standard deviation is displayed. Primers surrounding exons 2–3 junction target the full-length isoform. Primers surrounding the exons 18–19 junction target both full-length and short C-terminal isoforms. Comparisons were performed independently for each set of primer. Stages sharing the same letter are not significantly different ($p < 0.05$).

We then used *in situ* hybridization (RNAscope technology) to localize *auts2a* expression in the developing brain. At the beginning of late embryonic brain establishment (stage 29), *auts2a*

was expressed in the forebrain (telencephalon and diencephalon), midbrain (optic tectum), hindbrain (cerebellum and rhombencephalon), and eyes (Figure 6). In the hindbrain, the expression was especially strong in the rhombencephalon, while *auts2a* could be detected at much lower levels in the cerebellum. In midbrain, strong *auts2a* levels were found in the optic tectum. Lower, yet significant *auts2a* levels were detected in the forebrain in the telencephalon and diencephalon. Finally, very low *auts2a* levels were detected in the eyes.

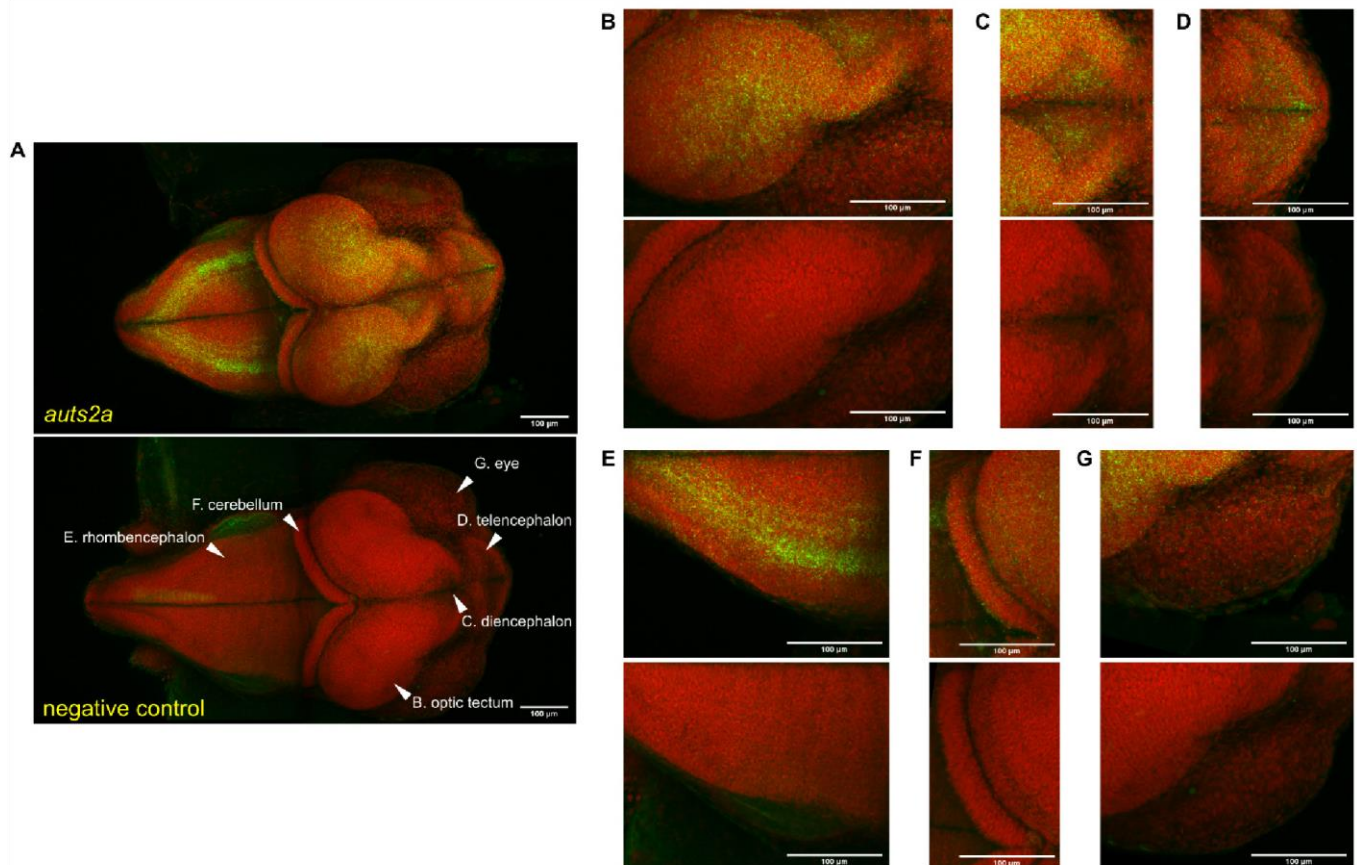


Figure 6. *auts2a* spatial expression in stage 29 medaka whole embryos using RNAscope. Green staining corresponds to the RNAscope signal. Red staining corresponds to the methyl-green-stained cell nucleus. An RNAscope probe targeting the *Bacillus subtilis dapB* gene (Accession #: EF191515) was used as a negative control. Images correspond to a maximum intensity Z axis projection for the RNAscope probe and standard deviation Z axis projection for methyl green. (A). Whole embryo. (B). Optic tectum. (C). Diencephalon. (D). Telencephalon. (E). Rhombencephalon. (F). Cerebellum. (G). Eyes.

4. Discussion

4.1. Origins and Evolution of the *auts2* Gene Repertoire

In the present study, we provide a comprehensive characterization of the evolution of the *auts2* gene repertoire in teleosts. Using a total of 76 species from the three main teleost clades (Elopomorpha, Osteoglossomorpha, and Clupeocephala), we provide comparative genomic data demonstrating that *auts2a* and *auts2b* originate from TGD. Our teleost-wide observations are fully consistent with observations previously made in zebrafish indicating that *auts2a* and *auts2b* originate from TGD [22]. After whole genome duplication, the loss of one ohnologous copy is the most common evolutionary fate with approximately only 12–24% genes retained in duplicates for protein-coding genes [34,35,41]. In the case of *auts2*, both copies were retained in Elopomorpha and Clupeocephala basal teleost lineages. Our analysis revealed a diversity of subsequent evolutionary fates leading to all possible retention patterns (one of the two genes or both) depending on the species. The *auts2a* gene was however retained in most lineages and appeared to be lost relatively recently, when lost. In Characiphysae (i.e., tetras, piranhas and catfishes), *auts2a* is present in the red-bellied piranha (*Pygocentrus nattereri*) and in the electric eel (*Electrophorus electricus*). In contrast, *auts2a* could not be identified in three species: Mexican tetra (both morphs), channel catfish, and iridescent shark catfish. The identification of possible *auts2a* gene remnants in conserved synteny blocks in these species would be in favor of the loss of *auts2a* in these species, even though the remaining amino acid sequences are very short (i.e., a few amino acids).

In contrast to *auts2a*, *auts2b* was lost in many species and several lineages, sometimes relatively early during evolution. This is, for instance, the case for the 52 species belonging to the Acanthomorphata lineage in which *auts2b* was systematically absent with a non-functional gene remnant being found in the corresponding ohnologous genomic region. Gene remnants were systematically identified in the eight species that were investigated (Figure S3). The *auts2b* gene was also absent from the genome of the three investigated Osteoglossomorpha species. This pattern is compatible with a rapid loss of *auts2b* after the Osteoglossomorpha radiation, even though we cannot rule out that this loss occurred later during evolution. It should however be stressed that we failed in identifying any *auts2b* gene remnant in these species. Finally, we also failed in identifying *auts2b* in European eel, even though the gene is present in the closely related European conger, which suggests a very recent gene loss.

After WGD, ohnologous gene copies can have different evolutionary fates. While the most common fate is the loss of one copy relatively rapidly after WGD (i.e., pseudogenization), both copies can remain and exhibit different behaviors [42,43]. Ohnologous copies can retain similar functions and act in a dose-dependent manner through cumulative effects, to produce sufficient amounts of the protein to perform the same ancestral function [42]. In contrast, the partitioning of ancestral functions between the two ohnologous copies can occur in the case of sub-functionalization [43]. Finally, it is also possible that one copy retained the ancestral function, while the other acquired new functions (i.e., neo-functionalization). In the case of *auts2*, we

observed that retention of a single copy, mostly *auts2a*, was the most common fate and was associated with strikingly similar expression patterns characterized by predominant expression in the embryo, adult brain, and gonads, which is also observed in spotted gar. These observations are consistent with the pseudogenization of one ohnologous copy, the remaining copy retaining ancestral functions. We, however, showed that the loss of one copy did not occur rapidly after TGD (i.e., before the divergence between Elopomorpha and Osteoglossomorpha/Clupeocephala), but later during evolution. In the case of Northern pike, the *auts2b* copy appears to be currently undergoing pseudogenization. Together, these observations suggest that retaining the two ohnologous copies, at least for a while, provided an evolutionary advantage. It should, however, be noted that most species eventually lost one of the two copies, suggesting that a single copy of the gene is sufficient. When looking at the *auts2* gene structure and predicted protein coding size and domains, we observed that in teleost fish (as highlighted here in medaka and zebrafish in Figure 4), the *auts2a* gene encodes for a long (1282 and 1278 amino acids in medaka and zebrafish, respectively) protein that is highly similar to the human AUTS2 protein [4]. The human gene is also known to encode many alternatively spliced variants. Among them, the best-documented ones encode short forms of 786 (S-AUTS2-Var1) and 711 (S-AUTS2-Var2) amino acids, both corresponding to the C-terminal part of the full-length protein and starting from exons 8 and 9, respectively [2,4]. The Aut2b protein described here in teleosts is also much shorter than the full-length Aut2a protein with 748 amino acids in zebrafish and roughly corresponds to mammalian S-AUTS2-Var1, both in terms of size and protein domain features (Figure 4). A similar size of the Aut2b protein was also observed in all teleost species that have retained *auts2b* (Figure S4). Data in mammals have suggested that the N-terminal and C-terminal regions of AUTS2 have different functions and are associated with different syndrome severity [4,6,14,15]. Recent data from a Yeast 2-hybrid screen using long and short isoforms suggest that the C-terminus of AUTS2, which is included in both isoforms, is responsible for transcription activation, whereas the N-terminal region, which is specific to the long isoform, is able to repress transcription [15]. In zebrafish, *auts2a* and *auts2b* exhibit distinct spatio-temporal expression patterns. The *auts2a* gene is maternally inherited and zygotically expressed, while *auts2b* is only expressed after zygotic genome activation during zebrafish development [22]. As in humans, several alternatively spliced transcripts are predicted for *auts2a* genes in teleosts both by Ensembl and by 5' RACE experiments in zebrafish [22]. The ATG motif corresponding to the beginning of human AUTS2-C is also present in teleosts. Collectively, these data are consistent with different functions for full-length and short C-terminal proteins in vertebrates. While it is established that human AUTS2 can yield AUTS2 full-length and short C-terminal AUTS2 isoforms, different scenarios would be occurring in teleosts. Species in which only *auts2a* was retained would be similar to humans, with a single gene encoding both full-length and short C-terminal proteins. For species in which both *auts2a* and *auts2b* were retained, we speculate that the full-length form would be encoded by *auts2a*, while the short C-terminal forms would be encoded by *auts2a* and/or *auts2b*. This is also fully consistent with the loss of *auts2b* at different times during evolution in different lineages due to partial redundancy between Aut2b and the short C-terminal Aut2a. This raises the question of the loss of *auts2a* that we observed in three different

species. It is possible that other proteins of the *Auts2* family (i.e., *Fbrs* and *Fbrsl1*) have taken over the ancestral function of full-length *Auts2a*. This would be consistent with existing data in humans showing that *FBRSL1* and *FBRSL1* are able to interact with *PRC1* components [44]. In addition, *FBRSL1* and *AUTS2* exhibit a highly conserved domain, the *AUTS2/FBRSL1* short homology (AHsh), of 46 aa in the N-terminal region of the protein [4]. We cannot however rule out that the absence of *auts2a* in these species is due to artifacts in genome assemblies, even though we have identified what could be gene remnants in corresponding orthologous regions. Further investigations are needed to fully unravel this question.

4.2. A Strong Expression during Brain Formation

As shown here, both *auts2a* and *auts2b* are predominantly expressed in the adult brain in comparison to other organs and tissues in all investigated species with the exception of the bowfin. We also observed significant expression levels in whole embryos. During development, we observed a burst in *auts2a* expression at the time of neurula and brain regionalization, followed by a dramatic, but progressive increase during embryonic brain formation. These results are fully consistent with existing data in zebrafish in which *auts2a* mRNA could be detected using in situ hybridization from 10–11 h post-fertilization (hpf) (i.e., neurula) until 24hpf (i.e., late embryonic formation) [22]. Existing data in zebrafish showed a wide expression in the brain of zebrafish at 24hpf using digoxigenin probes and chromogenic detection [22]. Using RNAscope, a sensitive and quantitative technique [29-31] coupled with fluorescence detection, we were able to precisely map *auts2a* expression during late embryonic brain formation. In mammals, *Auts2* expression has been extensively studied in the developing brain. In postnatal and fully developed mouse brain, *Auts2* is expressed in glutamatergic projection neurons in the prefrontal cortex, pyramidal CA neurons in the hippocampus, granule neurons of the dentate gyrus, and Purkinje and Golgi cells in the cerebellum [12,18]. During late medaka embryonic brain formation (i.e., 34-somite stage), *auts2a* was expressed in the forebrain (telencephalon and diencephalon), midbrain (optic tectum), hindbrain (cerebellum and rhombencephalon), and in the eyes. To our knowledge, this is the first investigation of the spatial expression of the *auts2a* gene during medaka neurodevelopment. Two previous studies have, however, investigated *auts2a* expression in zebrafish and showed that *auts2a* was expressed in the forebrain, midbrain, and hindbrain of zebrafish at the 30-somite and 35-somite stages [6,23]. Another study showed that *auts2a* was expressed in the brain with stronger expression in the midbrain (optic tectum) of the zebrafish at the 30-somite stage [22]. The results obtained here in medaka at the 34-somite stage are therefore highly consistent with previous observations in zebrafish. In contrast to previous studies in fish, we were able to precisely map *auts2a* expression in the different regions of the late embryonic brain. In mice, *Auts2* is expressed in the cerebral cortex and cerebellum of the developing brain [12]. The *auts2a* expression pattern in medaka telencephalon and diencephalon reported here is therefore fully consistent with existing data in mice. Similarly, we were able to detect *auts2a* expression in the cerebellum, a highly conserved region between mammals and fish [45,46], at low, yet significant, levels. Together, these observations indicate a conserved expression in regions of the developing brain (i.e., developing cerebral cortex and cerebellum),

which have been closely associated with the neuropathologies of autism [12] and with social behavior, memory, emotion, and learning in fish [47].

5. Conclusions

Here, we show that the whole genome duplication event that occurred at the stem of the teleost lineage yielded two ohnologous copies of the *auts2* gene, *auts2a* and *auts2b*. A comparative genomic analysis using a large number ($n = 76$) of species from the three main teleost clades (Elopomorpha, Osteoglossomorpha, and Clupeocephala) revealed different lineage-specific evolutionary fates. The retention of *auts2a* was observed in most investigated species with the exception of Mexican tetra (*Astyanax mexicanus*, both morphs), iridescent shark catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*), and channel catfish (*Ictalurus punctatus*). In contrast, we were able to demonstrate that the *auts2b* gene was often lost during teleost evolution. This loss occurred either in the ancestor of large phylogenetic groups (e.g., Acanthomorpha, $n=52$ species) or more recently in a species-specific manner. In most cases, the loss of *auts2b* was non-ambiguously supported by the presence of gene remnants in the corresponding conserved synteny blocs. Several species, including zebrafish, have retained the two gene copies, which were further duplicated in Salmonidae and Cyprininae. Despite different evolutionary fates, both genes exhibit a strikingly similar tissue distribution, which also appears to be conserved among vertebrates. The gene and protein structure of teleost *auts2a* is extremely conserved between teleost and mammals, both in terms of size and protein domains. We also observed that teleost *auts2b* genes encode for a shorter protein similar to a short protein isoform encoded by human and murine genes (S-AUTS2-Var1), both in size and in terms of conserved domains. We hypothesize that following genome duplication, *auts2a* retained the function of the full-length human AUTS2 protein, while *auts2a* and/or *auts2b* retained the function of the S-AUTS2-Var1 isoform, depending on the species. Using medaka, in which only *auts2a* was retained, we showed that *auts2a* messenger RNA was maternally inherited and expressed throughout embryonic development with bursts in expression during brain regionalization and late embryonic brain formation. We were also able to demonstrate that *auts2a* was expressed in the forebrain (telencephalon and diencephalon), midbrain (optic tectum), hindbrain (cerebellum and rhombencephalon), and eyes during late embryonic brain formation. These observations are consistent with expression patterns in mice in brain regions associated with neurodevelopmental disorders. Together, our observations show that *auts2* features and expression are highly conserved during vertebrate evolution. This sets the ground for the use of fish model species to decipher the role of *auts2a* during neurodevelopment.

Supplementary Materials: The following Supporting Information can be downloaded at: www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: Identification of teleost *auts2a* and *auts2b* in 27 species using synteny analysis; Figure S2: Phylogenetic analysis of full-length AutS2 proteins using CLUSTALW alignment and the neighbor joining (B) or minimum likelihood (C) method; Figure S3: Identification of *auts2* gene remnants; Figure S4: AutS2 protein domains features' analysis on 15 species based on Ensembl. A. AutS2a, B. AutS2b; Table S1: *auts2* genes' accession numbers for

synteny analysis on 78 species; Table S2: Genome assembly versions, gene positions on the genome, and corresponding accession numbers for synteny analysis on 27 species; Table S3: RNA-seq SRA ID used for tissue expression; Table S4: Reference genomes used for tissue expression; Table S5: Accession numbers used for humans, zebrafish, and medaka protein domain features analysis; Table S6: Accession numbers used for protein domain features' analysis on 15 species; Table S7: Japanese medaka *auts2a* primer sequences.

Author Contributions: Conceptualization, C.M. and J.B.; formal analysis, C.M., A.E.C., J.M., and F.M.; investigation, C.M. and A.E.C.; writing—original draft preparation, C.M.; writing—review and editing, J.B.; visualization, C.M., A.E.C., and F.M.; supervision, J.B.; project administration, J.B.; funding acquisition, J.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Agence Nationale de la Recherche (ANR), Grant Number GenoFish (ANR-16-CE12-0035) and CAVEMOM (ANR-21-CE13-0017). The APC was funded by ANR.

Institutional Review Board Statement: Ethical review and approval were waived for this study due to the use of embryos before hatching (i.e., non-autonomously feeding) and the use of in silico or publicly available expression data.

Data Availability Statement: All data used are available either as Supplementary Material or in public repositories referenced in the Methods Section.

Acknowledgments: The authors thank Guillaume Gourmelen and the INRAE LPGP ISC fish facility staff for animal care, Thaovi Nguyen and Lucas Génévé for technical assistance, and Violette Thermes and Manon Thomas from the INRAE LPGP 3D imaging facility for the confocal microscope analysis.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Hori, K.; Hoshino, M. Neuronal Migration and AUTS2 Syndrome. *Brain Sci.* **2017**, *7*, 54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Hori, K.; Shimaoka, K.; Hoshino, M. *AUTS2* Gene: Keys to Understanding the Pathogenesis of Neurodevelopmental Disorders. *Cells* **2021**, *11*, 11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Pang, W.; Yi, X.; Li, L.; Liu, L.; Xiang, W.; Xiao, L. Untangle the multi-facet functions of *Auts2* as an entry point to understand neurodevelopmental disorders. *Front. Psychiatry* **2021**, *12*, 580443. [[CrossRef](#)]
4. Biel, A.; Castanza, A.S.; Rutherford, R.; Fair, S.R.; Chifamba, L.; Wester, J.C.; Hester, M.E.; Hevner, R.F. *AUTS2* Syndrome: Molecular Mechanisms and Model Systems. *Front. Mol. Neurosci.* **2022**, *15*, 858582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Sultana, R.; Yu, C.-E.; Yu, J.; Munson, J.; Chen, D.; Hua, W.; Estes, A.; Cortes, F.; de la Barra, F.; Yu, D. Identification of a novel gene on chromosome 7q11.2 interrupted by a translocation breakpoint in a pair of autistic twins. *Genomics* **2002**, *80*, 129–134. [[CrossRef](#)]
6. Beunders, G.; Voorhoeve, E.; Golzio, C.; Pardo, L.M.; Rosenfeld, J.A.; Talkowski, M.E.; Simonic, I.; Lionel, A.C.; Vergult, S.; Pyatt, R.E. Exonic deletions in *AUTS2* cause a syndromic form of intellectual disability and suggest a critical role for the C terminus. *Am. J. Hum. Genet.* **2013**, *92*, 210–220. [[CrossRef](#)]
7. Jolley, A.; Corbett, M.; McGregor, L.; Waters, W.; Brown, S.; Nicholl, J.; Yu, S. De novo intragenic deletion of the autism susceptibility candidate 2 (*AUTS2*) gene in a patient with developmental delay: A case report and literature review. *Am. J. Med. Genet. A* **2013**, *161*, 1508–1512. [[CrossRef](#)]
8. Kalscheuer, V.M.; FitzPatrick, D.R.; Tommerup, N.; Bugge, M.; Niebuhr, E.; Neumann, L.M.; Tzschach, A.; Shoichet, S.A.; Menzel, C.; Erdogan, F.; et al. Mutations in autism susceptibility candidate 2 (*AUTS2*) in patients with mental retardation. *Qual. Life Res.* **2007**, *121*, 501–509. [[CrossRef](#)]
9. Amarillo, I.E.; Li, W.L.; Li, X.; Vilain, E.; Kantarci, S. De novo single exon deletion of *AUTS2* in a patient with speech and language disorder: A review of disrupted *AUTS2* and further evidence for its role in neurodevelopmental disorders. *Am. J. Med Genet. Part A* **2014**, *164*, 958–965. [[CrossRef](#)]
10. Schumann, G.; Coin, L.J.; Lourdasamy, A.; Charoen, P.; Berger, K.H.; Stacey, D.; Desrivieres, S.; Aliev, F.A.; Khan, A.A.; Amin, N.; et al. Genome-wide association and genetic functional studies identify *autism susceptibility candidate 2* gene (*AUTS2*) in the regulation of alcohol consumption. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 7119–7124. [[CrossRef](#)]
11. Zhang, B.; Xu, Y.-H.; Wei, S.-G.; Zhang, H.-B.; Fu, D.-K.; Feng, Z.-F.; Guan, F.-L.; Zhu, Y.-S.; Li, S.-B. Association Study Identifying a New Susceptibility Gene (*AUTS2*) for Schizophrenia. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 19406–19416. [[CrossRef](#)]
12. Bedogni, F.; Hodge, R.D.; Nelson, B.R.; A Frederick, E.; Shiba, N.; Daza, R.A.; Hevner, R.F. Autism susceptibility candidate 2 (*Auts2*) encodes a nuclear protein expressed in developing brain regions implicated in autism neuropathology. *Gene Expr. Patterns* **2010**, *10*, 9–15. [[CrossRef](#)]
13. Oksenberg, N.; E Haliburton, G.D.; Eckalbar, W.L.; Oren, I.; Nishizaki, S.; Murphy, K.; Pollard, K.S.; Birnbaum, R.Y.; Ahituv, N. Genome-wide distribution of *Auts2* binding localizes with active neurodevelopmental genes. *Transl. Psychiatry* **2014**, *4*, e431. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Gao, Z.; Lee, P.; Stafford, J.; von Schimmelmann, M.; Schaefer, A.; Reinberg, D. An *AUTS2*-Polycomb complex activates gene expression in the CNS. *Nature* **2014**, *516*, 349–354. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Monderer-Rothkoff, G.; Tal, N.; Risman, M.; Shani, O.; Nissim-Rafinia, M.; Malki-Feldman, L.; Medvedeva, V.; Groszer, M.; Meshorer, E.; Shifman, S. *AUTS2* isoforms control neuronal differentiation. *Mol. Psychiatry* **2021**, *26*, 666–681. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Castanza, A.S.; Ramirez, S.; Tripathi, P.P.; Daza, R.A.M.; Kalume, F.K.; Ramirez, J.-M.; Hevner, R.F. *AUTS2* Regulates RNA Metabolism and Dentate Gyrus Development in Mice. *Cereb. Cortex* **2021**, *31*, 4808–4824. [[CrossRef](#)]
17. Hori, K.; Nagai, T.; Shan, W.; Sakamoto, A.; Taya, S.; Hashimoto, R.; Hayashi, T.; Abe, M.; Yamazaki, M.; Nakao, K.; et al. Cytoskeletal Regulation by *AUTS2* in Neuronal Migration and Neuritogenesis. *Cell Rep.* **2014**, *9*, 2166–2179. [[CrossRef](#)]
18. Hori, K.; Nagai, T.; Shan, W.; Sakamoto, A.; Abe, M.; Yamazaki, M.; Sakimura, K.; Yamada, K.; Hoshino, M. Heterozygous Disruption of Autism susceptibility candidate 2 Causes Impaired Emotional Control and Cognitive Memory. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0145979. [[CrossRef](#)]
19. Yamashiro, K.; Hori, K.; Lai, E.S.; Aoki, R.; Shimaoka, K.; Arimura, N.; Egusa, S.F.; Sakamoto, A.; Abe, M.; Sakimura, K.; et al. *AUTS2* Governs Cerebellar Development, Purkinje Cell Maturation, Motor Function and Social Communication. *iScience* **2020**, *23*, 101820. [[CrossRef](#)]
20. Gao, Z.; Zhang, J.; Bonasio, R.; Strino, F.; Sawai, A.; Parisi, F.; Kluger, Y.; Reinberg, D. PCGF Homologs, CBX Proteins, and RYBP Define Functionally Distinct PRC1 Family Complexes. *Mol. Cell* **2012**, *45*, 344–356. [[CrossRef](#)]

21. Sato, S.; Hayashi, T.; Kobayashi, E. Characterization of porcine autism susceptibility candidate 2 as a candidate gene for the number of corpora lutea in pigs. *Anim. Reprod. Sci.* **2011**, *126*, 211–220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Kondrychyn, I.; Robra, L.; Thirumalai, V. Transcriptional complexity and distinct expression patterns of *auts2* paralogs in *Danio rerio*. *G3 (Bethesda)* **2017**, *7*, 2577–2593. [[CrossRef](#)]
23. Oksenberg, N.; Stevison, L.; Wall, J.D.; Ahituv, N. Function and Regulation of *AUTS2*, a Gene Implicated in Autism and Human Evolution. *PLoS Genet.* **2013**, *9*, e1003221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Colson, V.; Cousture, M.; Damasceno, D.; Valotaire, C.; Nguyen, T.; Le Cam, A.; Bobe, J. Maternal temperature exposure impairs emotional and cognitive responses and triggers dysregulation of neurodevelopment genes in fish. *PeerJ* **2019**, *7*, e6338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Parey, E.; Louis, A.; Montfort, J.; Bouchez, O.; Roques, C.; Iampietro, C.; Lluch, J.; Castinel, A.; Donnadiou, C.; Desvignes, T. Genome structures resolve the early diversification of teleost fishes. **2022**, 487469. [[CrossRef](#)]
26. Pasquier, J.; Cabau, C.; Nguyen, T.; Jouanno, E.; Severac, D.; Braasch, I.; Journot, L.; Pontarotti, P.; Klopp, C.; Postlethwait, J.H.; et al. Gene evolution and gene expression after whole genome duplication in fish: The PhyloFish database. *BMC Genom.* **2016**, *17*, 368. [[CrossRef](#)]
27. Patro, R.; Duggal, G.; Love, M.I.; Irizarry, R.A.; Kingsford, C. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat. Methods* **2017**, *14*, 417–419. [[CrossRef](#)]
28. Iwamatsu, T. Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Mech. Dev.* **2004**, *121*, 605–618. [[CrossRef](#)]
29. Wang, F.; Flanagan, J.; Su, N.; Wang, L.-C.; Bui, S.; Nielson, A.; Wu, X.; Vo, H.-T.; Ma, X.-J.; Luo, Y. RNAscope: A novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J. Mol. Diagn.* **2012**, *14*, 22–29. [[CrossRef](#)]
30. Gross-Thebing, T.; Paksa, A.; Raz, E. Simultaneous high-resolution detection of multiple transcripts combined with localization of proteins in whole-mount embryos. *BMC Biol.* **2014**, *12*, 55. [[CrossRef](#)]
31. Kersigo, J.; Pan, N.; Lederman, J.D.; Chatterjee, S.; Abel, T.; Pavlinkova, G.; Silos-Santiago, I.; Fritzsche, B. A RNAscope whole mount approach that can be combined with immunofluorescence to quantify differential distribution of mRNA. *Cell Tissue Res.* **2018**, *374*, 251–262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Braasch, I.; Gehrke, A.R.; Smith, J.J.; Kawasaki, K.; Manousaki, T.; Pasquier, J.; Amores, A.; Desvignes, T.; Batzel, P.; Catchen, J. The spotted gar genome illuminates vertebrate evolution and facilitates human-teleost comparisons. *Nat. Genet.* **2016**, *48*, 427–437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Hughes, L.C.; Ortí, G.; Huang, Y.; Sun, Y.; Baldwin, C.C.; Thompson, A.W.; Arcila, D.; Betancur-R, R.; Li, C.; Becker, L.; et al. Comprehensive phylogeny of ray-finned fishes (Actinopterygii) based on transcriptomic and genomic data. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 6249–6254. [[CrossRef](#)]
34. Inoue, J.; Sato, Y.; Sinclair, R.; Tsukamoto, K.; Nishida, M. Rapid genome reshaping by multiple-gene loss after whole-genome duplication in teleost fish suggested by mathematical modeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 14918–14923. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Pasquier, J.; Braasch, I.; Batzel, P.; Cabau, C.; Montfort, J.; Nguyen, T.; Jouanno, E.; Berthelot, C.; Klopp, T.; Journot, L. Evolution of gene expression after whole-genome duplication: New insights from the spotted gar genome. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* **2017**, *328*, 709–721. [[CrossRef](#)]
36. Bertho, S.; Pasquier, J.; Pan, Q.; Le Trionnaire, G.; Bobe, J.; Postlethwait, J.H.; Pailhoux, E.; Scharl, M.; Herpin, A.; Guiguen, Y. *Foxl2* and Its Relatives Are Evolutionary Conserved Players in Gonadal Sex Differentiation. *Sex. Dev.* **2016**, *10*, 111–129. [[CrossRef](#)]
37. Cheung, C.T.; Pasquier, J.; Bouleau, A.; Nguyen, T.; Chesnel, F.; Guiguen, Y.; Bobe, J. Double maternal-effect: Duplicated nucleoplasmin 2 genes, *npm2a* and *npm2b*, with essential but distinct functions are shared by fish and tetrapods. *BMC Evol. Biol.* **2018**, *18*, 167. [[CrossRef](#)]
38. Guiguen, Y.; Pasquier, J.; Fostier, A.; Bobe, J. Evolution of sex hormone binding globulins reveals early gene duplication at the root of vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2021**, *300*, 113646. [[CrossRef](#)]
39. Berthelot, C.; Brunet, F.; Chalopin, D.; Juanchich, A.; Bernard, M.; Noël, B.; Bento, P.; Da Silva, C.; Labadie, K.; Alberti, A.; et al. The rainbow trout genome provides novel insights into evolution after whole-genome duplication in vertebrates. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3657. [[CrossRef](#)]
40. Yang, L.; Sado, T.; Vincent Hirt, M.; Pasco-Viel, E.; Arunachalam, M.; Li, J.; Wang, X.; Freyhof, J.; Saitoh, K.; Simons, A.M. Phylogeny and polyploidy: Resolving the classification of cyprinine fishes (Teleostei: Cypriniformes). *Mol. Phylogenet. Evol.* **2015**, *85*, 97–116. [[CrossRef](#)]
41. Braasch, I.; Postlethwait, J.H. Polyploidy in fish and the teleost genome duplication. In *Polyploidy and Genome Evolution*; Soltis, P.S., Soltis, D.E., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2012; pp. 341–383.

42. Force, A.; Lynch, M.; Pickett, F.B.; Amores, A.; Yan, Y.L.; Postlethwait, J. Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics* **1999**, *151*, 1531–1545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. He, X.; Zhang, J. Rapid Subfunctionalization Accompanied by Prolonged and Substantial Neofunctionalization in Duplicate Gene Evolution. *Genetics* **2005**, *169*, 1157–1164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Geng, Z.; Gao, Z. Mammalian PRC1 Complexes: Compositional Complexity and Diverse Molecular Mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Hibi, M.; Matsuda, K.; Takeuchi, M.; Shimizu, T.; Murakami, Y. Evolutionary mechanisms that generate morphology and neural-circuit diversity of the cerebellum. *Dev. Growth. Differ.* **2017**, *59*, 228–243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Ikenaga, T.; Yoshida, M.; Uematsu, K. Cerebellar efferent neurons in teleost fish. *Cerebellum*. **2006**, *5*, 268–274. [[CrossRef](#)]
47. Vaz, R.; Hofmeister, W.; Lindstrand, A. Zebrafish Models of Neurodevelopmental Disorders: Limitations and Benefits of Current Tools and Techniques. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1296. [[CrossRef](#)]

C- En conclusion

Nous montrons que la duplication du génome entier qui s'est produite à la base des téléostéens a produit deux ohnologues du gène *auts2* : *auts2a* et *auts2b*. La rétention d'*auts2a* a été observée chez la quasi-totalité des espèces ce qui n'est pas le cas d'*auts2b* qui n'est présent que chez une minorité d'espèces (n=18). Nous avons déterminé deux cas de figure pour la perte d'*auts2b* qui a soit été perdu chez l'ancêtre d'un grand groupe phylogénétique, soit de manière spécifique à une espèce.

Nous avons émis l'hypothèse qu'*auts2a* permettait la production d'une isoforme courte et longue, comme le gène AUTS2 humain, tandis qu'*auts2b* était capable d'exprimer uniquement une forme courte dont la localisation chez le poisson zèbre semble en partie similaire à l'expression d'*auts2a* ([Igor Kondrychyn, Robra, et Thirumalai 2017](#)).

Outre l'existence d'un seul gène, l'expression maternelle confirmée d'*auts2a* chez le médaka, la conservation de ses domaines et son expression similaire aux mammifères dans les différentes régions du cerveau en développement nous ont confortés dans le choix d'utiliser cette espèce comme animal modèle pour caractériser l'impact de l'absence de sa contribution maternelle.

Chapitre 3

Impact de l'absence de la contribution maternelle d'*auts2a*

A- Objectif du travail de recherche

La grande majorité de mon travail de thèse a consisté à caractériser l'impact de l'absence de contribution maternelle d'*auts2a*, sur le développement embryonnaire mais également sur les effets à longs termes, notamment en terme de comportement. De nombreuses fonctions de ce gène connu comme étant à l'origine du AUTS2 syndrome, pathologie regroupant des caractéristiques morphologiques et pathologies liées à des problème de développement du système nerveux, ont été décrites ces quinze dernières années. Une étude précédemment menée dans notre laboratoire a montré qu'un stress thermique chez des femelles truites arc-en-ciel était à l'origine de la dérégulation de l'expression d'une douzaine de gènes, dont *auts2a*, dans l'œuf. Les descendants des mères exposées au stress thermique ont par la suite montré des réponses émotionnelles altérées et des capacités d'apprentissage réduites. Ces résultats laissent penser qu'*auts2a* pourrait ne pas agir uniquement comme un régulateur du neurodéveloppement lors du développement embryonnaire mais également comme un régulateur intergénérationnel du neurodéveloppement et par conséquent du comportement.

J'ai utilisé notre lignée $\Delta 338K$ de médaka génétiquement altérée et générée au cours de ma première année de thèse par la technique de CRISPR/Cas9 pour caractériser les phénotypes macroscopiques et comportementaux d'individus dont la mutation du gène provenait de la mère. Le séquençage du transcriptome à différents stades du développement a ensuite été réalisé pour nous aider à comprendre les mécanismes d'action de l'expression maternelle d'*auts2a*.

Cet article que je vais publier en tant que premier auteur est en cours de finalisation et sera soumis à publication d'ici la fin du mois de Février 2023.

Maternal *auts2a* contribution is a major intergenerational driver of neurodevelopment and behavior

Antoine Emile Clément¹, Constance Merdrignac¹, Aurélien Brionne¹, Thaovi Nguyen¹, Jérôme Montfort¹, Cervin Guyomar², Alexandra Dauvé³, Amaury Herpin¹, Violaine Colson¹, Julien Bobe^{1*}

1 INRAE LPGP

2 INRAE SIGENAE

3 MGX

* corresponding author julien.bobe@inrae.fr

Abstract

AUTS2 gene has been associated with numerous human pathologies including autism. The respective importance of its maternal and paternal contribution remains however unknown. Here we show using a vertebrate model that the lack of maternal, but not paternal, gene contribution triggers reduced embryonic survival and long-term macroscopic and behavioral differences, including reduced head size and reduced environment recognition abilities and anxiety. Maternal *auts2* acts through the modulation of maternally-inherited factors that control, in turn, early embryonic gene expression through epigenetic modifications or RNA-binding activity and ultimately regulate numerous transcription factors and evolutionarily conserved signaling pathways during neurodevelopment. We observed a significant enrichment in genes associated with human neuropathologies among genes that are under maternal *auts2* control. We report that *AUTS2* belongs to a group of 45 evolutionarily-conserved maternally-expressed genes associated with behavior and neurodevelopment in vertebrates and linked to

a diversity of human diseases. These results shed new light on intergenerational determinism of neurodevelopment and behavior in vertebrates, including in the context of human pathologies associated with *AUTS2*.

Main text

Neurodevelopmental diseases are highly complex disorders characterized by both clinical and genetic heterogeneity and with a complex genetic architecture¹. *AUTS2* (activator of transcription and developmental regulator) is a human gene originally identified in monozygotic twins with autism spectrum disorder (ASD) and previously named “Autism susceptibility candidate 2”². *AUTS2* was subsequently associated with a diversity of diseases and phenotypes, including intellectual disability, microcephaly, short stature, and developmental delay now known as the *AUTS2* syndrome³. During neurodevelopment, *AUTS2* regulates central nervous system gene expression through the PRC1.5 transcriptional regulatory complex^{4,5}. *AUTS2* is involved in neuronal migration as well as in axon and neurite elongation during neuronal differentiation⁶. *AUTS2* is a very large gene comprising 19 exons. Many *AUTS2* genomics regions located in both 5'- and 3'-terminal parts of the gene have been associated with the *AUTS2* syndrome including cases with a high severity index⁷, which can explain, at least in part, the complex genetic architecture of *AUTS2* syndrome. *AUTS2*, and more specifically non-coding sequence in the 5' region of the gene, has been implicated in human-specific evolution and a link with the evolution of cognitive and behavioral features was proposed⁸. The *Auts2* gene has however been extremely well conserved during vertebrate evolution both in terms of genomic structure and protein domains^{9,10}. Existing data in various vertebrate models, including rodents and teleosts, have revealed conserved expression of *Auts2* during neurodevelopment^{6,11}. Similarly, behavioral studies in various knock out mutants have clearly established a link between *Auts2* and behavior^{12,13} suggesting a major role of the gene in controlling vertebrate neurodevelopment and behavior in consistency with our current understanding of *AUTS2* syndrome. Preliminary evidence suggested that *auts2* could be mediating long-term behavior in response to maternal stress in a teleost species¹⁴. Existing studies in vertebrate models and human medicine have however never considered the possibility that *Auts2* could be acting not only as a zygotically expressed regulator of neurodevelopment but also as a direct or indirect

intergenerational modulator of neurodevelopment and subsequent behavior. We established a unique model in which maternal or paternal *auts2a*, the ortholog of human *AUTS2* in medaka, was invalidated to specifically characterize maternal *auts2a* contribution to macroscopic traits, neurodevelopmental gene expression program, and long-term behavior in progeny. In our model, a copy of the gene (i.e., originating from one parent) was fully functional while the other copy (i.e., originating from the other parent) was invalidated, which typically corresponds to the genetic situation of patients suffering from *AUTS2* syndrome^{7,15}. We specifically targeted the 5' part of the gene corresponding to the region associated with human evolution and generated two different knock-out lines. While one line was embryonically lethal at homozygous state, the other one, in which 90% of *auts2a* genomic sequence was deleted, was viable and used for further investigations. We show that maternal, but not paternal, *auts2a* contribution is a major intergenerational driver of neurodevelopment, macroscopic traits and long-term behavior in the progeny. We also report the overrepresentation of genes associated with neurodevelopmental disorders among the genes that are under maternal *auts2a* influence during neurodevelopment. We provide evidence indicating that maternal *auts2a* acts, at least in part, through the transcriptional regulation of maternally-inherited factors in the gamete that control, in turn, early embryonic gene expression through epigenetic modifications or RNA-binding activity. Finally, we show that *AUTS2* belongs to a group of 45 evolutionarily-conserved maternally-expressed genes, associated with behavior and neurodevelopment in vertebrates and linked to a diversity of human diseases. Our results strongly suggest that *Auts2* plays a major role in mediating intergenerational regulation of neurodevelopment and behavior in vertebrates, possibly in response to maternal stress. Our observations also raise the question of the role of maternally contributed factors in the complex genetic architecture of *AUTS2* syndrome, and possibly other neurodevelopmental disorders.

Results

Biological model of maternal *auts2a* contribution

To examine the role and importance of maternal *auts2a*, we used the medaka (*Oryzias latipes*), a model species in which a single ortholog of human *AUTS2* (named *auts2a* in fish) is present¹⁰.

Because the long *Auts2* isoform (i.e., encoding the N-terminal region of the protein) is maternally-inherited¹⁶, involved in neuronal differentiation⁶, required for participation in PRC1/AUTS2-regulated gene expression^{4,5} and known to be expressed in nuclei and cytoplasm⁶ we decided to target the N-terminal part of the medaka *Auts2a* protein. Using CRISPR/Cas9-based genome editing we generated two different mutant lines (*auts2a* 2 Δ and *auts2a* Δ 338k) (Fig. 1a-b). Because a full mortality was observed in homozygous *-/- auts2a* 2 Δ mutants during gastrulation, the *auts2a* Δ 338k line was used in the present study. The *auts2a* Δ 338k line harbors a deletion of 338,136 bp spanning exons 3-7 and is missing large intronic regions (introns 2-7) (Fig. 1a).

To specifically determine maternal *auts2a* contribution and analytically separate the impact of maternal and paternal *auts2a* parental expression, we crossed *auts2a* *-/-* females with *auts2a* *+/+* males to generate heterozygous fish lacking maternal *auts2a* contribution (MCH- group). We also performed the opposite crossing to generate heterozygous fish with maternal *auts2a* contribution (MCH+ group) (Fig. 1c). Comparing these heterozygous individuals lacking or not maternal *auts2a* contribution allowed us to specifically study the impact of *auts2a* maternal contribution in fish exhibiting the same genotype. This heterozygous state is highly relevant as it also corresponds to documented *AUTS2* mutations in human patients^{3,7,15,17}. In addition, we also used wild-type (WT group) and *-/-* (mutant group) individuals in which both maternal and zygotic gene contribution were either absent (mutant group) or present (WT group).

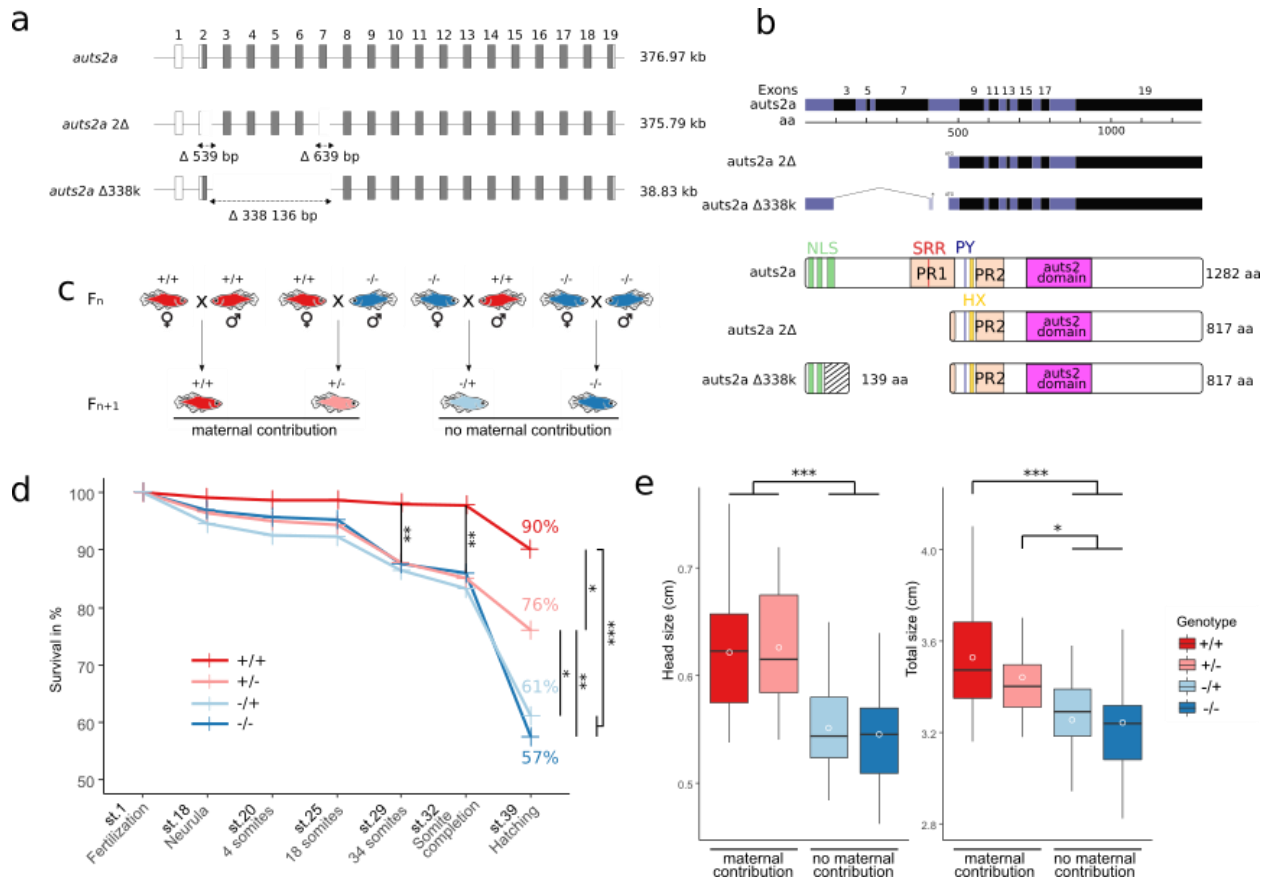


Fig. 1 *auts2a* mutant lines and macroscopic phenotyping. **a** Scale-free diagram of genomic DNA of WT and mutant *auts2a* gene in medaka. Shaded exons represent the translated parts of the gene. **b** Scaled diagram of the full-length WT and mutant predicted transcripts and proteins. *Auts2a* protein domains are represented by different colors. Nuclear Localization Signal (NLS, green), Serine Rich Repeat (SRR, red), Proline Rich region 1 and 2 (PR1 & PR2, orange), PY protein binding motif (PY, blue), Histidine repeats (HX, yellow), *Auts2* family domain (*auts2*, pink). **c** Crossing scheme to generate individuals of various phenotypes with or without maternal and/or paternal *auts2a* contribution. Deep red (wild-type, WT) and deep blue (mutants) individuals are homozygous. Light red (MCH+) and blue (MCH-) individuals are heterozygous. **d** Embryo survival throughout development. Stages of development according Iwamatsu developmental table¹⁸. Chi square statistical test was performed between WT (n=965), MCH+ (n=681), MCH- (n=578) and mutant (n=937) groups. **e** Head and body size of 14 weeks old fish. Anova and post hoc Tuckey statistical test were performed on WT (n=49), MCH+ (n=22), MCH- (n=36) and mutant (n=29) groups. *P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001.

Intergeneration control of macroscopic traits

The negative effect of *Auts2* mutation/deletion on survival¹⁹, body size and head^{3,5,20} development has been reported in various vertebrate models as well as in humans but the specific contribution of maternal gene expression to these phenotypes has never been quantified. To characterize the contribution of maternal *auts2a* to developmental success and

macroscopic traits, we monitored embryo survival throughout development, as well as head and body size in adult progeny. No difference in embryo survival could be observed until the 34-somite stage when WT individual exhibited a significantly higher survival (chi square, $P=5.7 \times 10^{-20}$) than the three other groups (MCH+, MCH-, mutant) (Fig. 1d). The same difference was also observed at the end of somitogenesis (chi square, $P=1.2 \times 10^{-24}$). At hatching, while the difference between MCH+ and WT groups remained significant (chi square, $P=1.6 \times 10^{-14}$), we observed further differences with a significantly lower survival in MCH- in comparison to MCH+ (chi square, $P=9.4 \times 10^{-9}$) and WT groups (chi square, $P=5.7 \times 10^{-42}$). Similarly, we observed a significantly lower survival in mutants in comparison to MCH+ (chi square, $P=1.0 \times 10^{-14}$) and WT groups (chi square, $P=5.7 \times 10^{-42}$). In contrast, no difference was observed between mutant and MCH- groups (chi square, $P=0.17$). In adult individuals, we observed significant differences in head (Tukeys's post hoc test, $P < 1.0 \times 10^{-7}$) and body (Tukeys's post hoc test, $P=1.4 \times 10^{-6}$) size between WT and mutant groups with a reduced head and body size in the mutant group compared to WT (Fig. 1e). A similar profile was observed between MCH+ and MCH- that exhibited the same genotype with a significantly reduced head (Tukeys's post hoc test, $P=2.8 \times 10^{-5}$) and body (Tukeys's post hoc test, $P=0.047$) size in the MCH- group compared to MCH+. In contrast, no differences in head or body size were observed between WT and MCH+ groups or between MCH- and mutant groups, indicating that the maternal *auts2a* contribution, alone, is sufficient to drive these macroscopic phenotypes.

Intergeneration control of progeny behavior

To determine the intergenerational impact of maternal *auts2a* contribution to long-term (i.e., adult) progeny behavior we used a novel tank test and a recognition test to estimate anxiety-like behavior and environment recognition abilities, respectively (Fig. 2a). To minimize possible tank effects, the crossing scheme (Fig. 2b) was slightly modified (see methods for details) in order to raise half of the WT individuals with fish of the MCH+ group and the other half with fish of the MCH- and mutant groups. Fish were genotyped only after behavioral tests. The time spent in the lower zone of the tank was used as a parameter to estimate anxiety-like behavior.

We observed a significantly reduced anxiety-like behavior in the mutant group in comparison to both WT (Tukeys's post hoc test, $P=1.4E-3$) and MCH+ (Tukeys's post hoc test, $P=0.014$) groups (Fig. 2c). Similarly, we observed a significantly reduced anxiety-like behavior in the MCH- group in comparison to both WT (Tukeys's post hoc test, $P=3.5E-3$) and MCH+ (Tukeys's post hoc test, $P=0.035$) groups (Fig. 2c). In contrast, no difference in anxiety-like behavior was observed between WT and MCH+ groups or between MCH- and mutant groups, indicating that the lack of maternal *auts2a* contribution, alone, is sufficient to drive reduced anxiety-like behavior in the long-term.

To determine their ability to recognize their environment, fish were placed back in the test tank on day 2 (Fig. 2a) and their velocity mean was used as an estimator of their exploratory behavior. After 10 minutes in the test tank, fish of the WT and MCH+ groups, but not of the MCH- and mutant groups, exhibited a reduced exploratory behavior in comparison to day 1 (Fig. 2d). After 60 minutes in the tank test, all experimental group exhibited a significantly reduced exploratory behavior in comparison to day 1 (Fig. 2d). Together, these results indicate that groups with maternal *auts2a* contribution exhibit a higher ability to recognize their environment, regardless of their genotype. This shows that maternal *auts2a* contribution, alone, is sufficient to drive enhanced environmental recognition in the progeny.

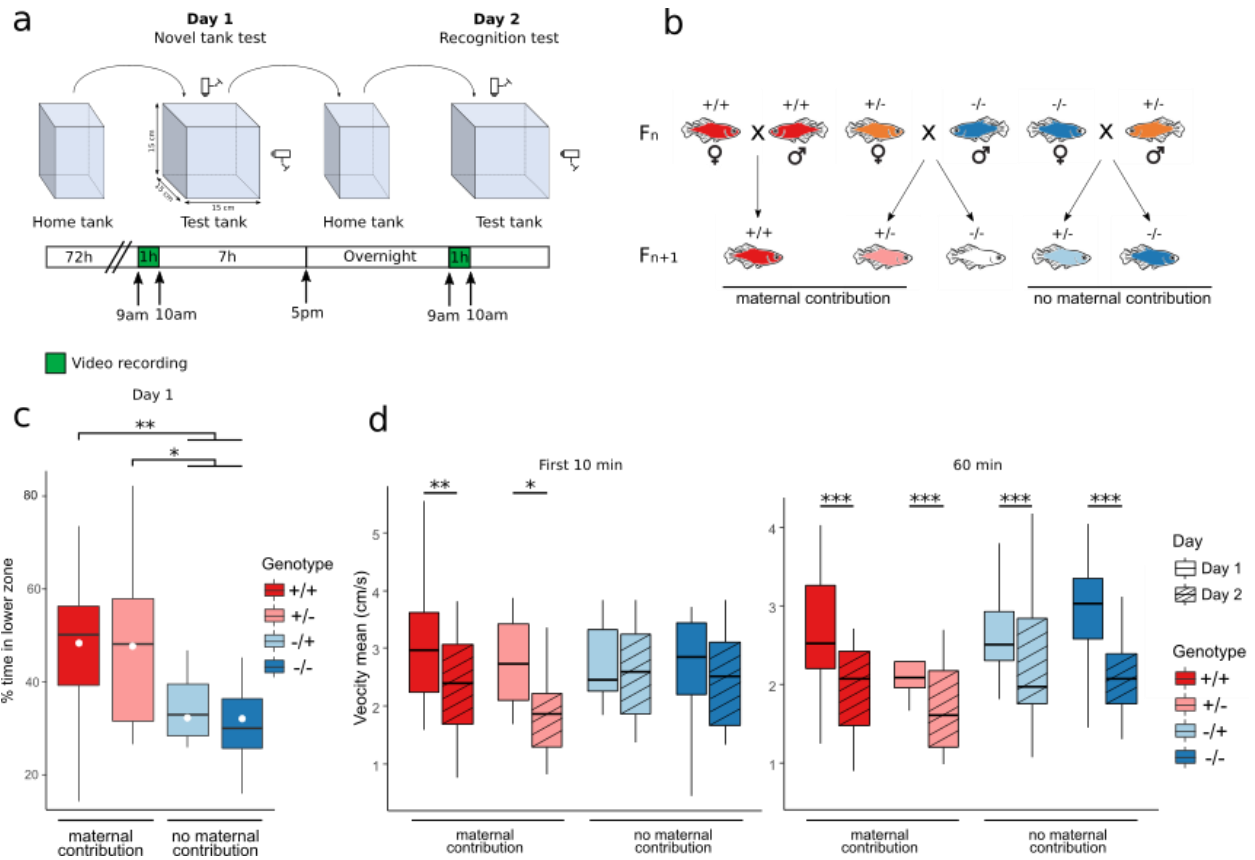


Fig. 2 Long term behavioral phenotypes. **a** Schematic representation of behavioral tests. **b** Crossing of individuals used for behavioral test to compare the impact of maternal vs paternal *auts2a* contribution. Orange individuals are heterozygous and originate from heterozygous *auts2a* parents. **c** Percent of time spent in lower zone in the novel tank test and **d** velocity mean on day 1 and day 2, 10 or 60 minutes after the begin of the experiment. Anova and post hoc Tuckey statistical test were performed on WT (n=23), MCH+ (n=10), MCH- (n=16) and mutant (n=13) groups. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001.

Maternal *auts2a* contribution-dependent developmental gene expression sequence

To determine the impact of maternal *auts2a* contribution on the gene expression sequence of neurodevelopment, embryo transcriptome was studied during late neurula (stage 18¹⁸) and late embryonic brain formation (stage 29¹⁸) (Supplementary tables 1-4). Differences in gene expression were assessed between fish with or without maternal *auts2a* contribution. In order to separate the impact of maternal contribution and fish genotype (*i.e.*, the number of *auts2a* copies in the genome) comparisons were made among heterozygous individuals (MCH+ vs. MCH-), or regardless of the genotype (MCA+ vs. MCA-). For the later, the maternal contribution group (MCA+) included both WT and MCH+ individuals, while the no maternal contribution group

(MCA-) included both MCH- and mutant individuals (Fig. 3a). We first focused on heterozygous individuals (MCH) in which only the maternal *auts2a* contribution, but not the genotype, varied. This model corresponds to pathological cases in which only one copy of the human *AUTS2* gene is usually mutated^{3,7}. We observed major differences in gene expression between MCH+ and MCH- groups at both stages with 487 and 277 differentially expressed gene (DEG) at stages 18 and 29, respectively (Fig. 3b). The higher number of DEG at stage 18, in comparison to stage 29, indicates that the lack of maternal *auts2a* contribution drives major differences in gene expression early during development (i.e., at late neurula stage). At this stage, we observed a significantly higher proportion (66 %) of up-regulated genes in the MCH- group in comparison to MCH+ (Fig. 3c). In contrast, we did not observe any difference in the proportion of up- and down-regulated genes at stage 29. This suggests that, during neurulation, maternal *auts2a* contribution regulates gene expression mostly through gene repression rather than gene activation.

When analyzing maternal *auts2a* contribution regardless of the genotype (MCA+ vs. MCA-) we identified a similar number of DEG at both stages (N= 549 and 568 at stage 18 and 29, respectively) (Fig. 3b). We also observed a similar proportion of up-regulated and down-regulated genes at both stages (Fig. 3c). These results obtained in MCA individuals in which the impact of both maternal contribution and genotype are assessed are in sharp contrast with the results obtained above in MCH individuals in which only maternal *auts2a* contribution is assessed. These observations are fully consistent with the high number of DEG (Fig. 3b, yellow sectors) that are found when comparing MCA+ and MCA- groups, but not when comparing MCH+ and MCH- groups (Fig. 3b, blue sectors). These genotype-dependent genes, that are not regulated in MCH fish are thus likely to be regulated by zygotic, rather than maternal, *auts2a*.

Together, these results show that maternal *auts2a* contribution, alone, drives major differences in gene expression especially during early development (i.e., at late neurula stage) and mostly through gene repression rather than activation.

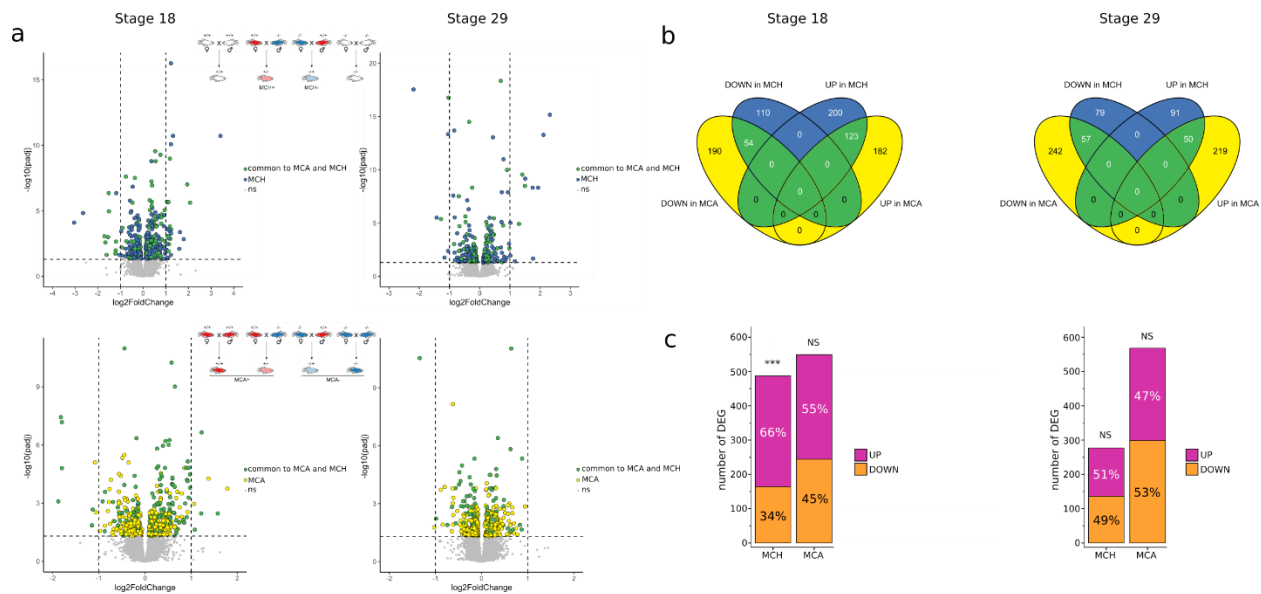


Fig. 3 RNA-seq analysis. **a** Volcano plots of MCH and MCA analyses. Blue (MCH analysis), yellow (MCA analysis) and green (common to MCH & MCA analysis) dots correspond to genes with a P-value adjusted $< 0,05$. ns dots correspond to gene with a P-value adjusted $> 0,05$. **b** Venn diagrams show the number of dysregulated (up or down regulated) genes in MCH and MCA analyses for each developmental stage. **c** Barplots show the proportion of up regulated (purple) or down regulated (orange) genes in MCH and MCA analyses for both developmental stages. Chi square analysis was performed against a theoretical distribution of 50% up and down regulated genes. *** $P < 0.001$.

Dysregulated genes associated with neuropathologies

To reveal any existing link between *auts2a* maternal contribution and molecular mechanisms or genes linked to human neuropathologies, we used the DisGeNET database that covers more than 24 000 diseases and traits, 17 000 genes and 117 000 genomic variants²¹. At stage 18, a highly significant proportion (47%) of the 319 human orthologs of DEG originating from the MCH analysis (i.e., comparison of MCH+ and MCH- groups) were associated with neuropathologies, in comparison to 32% for a random selection of 319 genes in the genome (Fig. 4a, Supplementary table 5). This strong association with neuropathologies was observed for both up-regulated and down-regulated genes at stage 18 (Fig. 4a). In contrast, no significant association between DEG and neuropathologies was observed at stage 29 using the 186 human orthologs of DEG at this stage. Among the genes identified at both stages, we identified genes associated with various pathologies including autism spectrum disorder (ASD), behavioral abnormalities, epilepsy, hypotonia, intellectual disability, microcephaly and schizophrenia (Fig. 4a). At stage 18, maternal

auts2a contribution, alone, was able to trigger differences in the expression of a significant number of genes associated with the 7 above-listed classes of neuropathologies (Fig. 4a).

For DEG identified in the MCA analysis (i.e., comparison of MCA+ and MCA- groups), we observed a significantly higher proportion of genes associated with neuropathologies, in comparison to a random selection of genes in the genome, for both stages 18 and 29 (Fig. 4b). Despite the higher number of DEG identified in the MCA analysis, the overrepresentation of neuropathology-associated genes at stage 18 was however less significant than the overrepresentation found in the MCH analysis, and was not significant for down-regulated gene in the MCA analysis. This suggests that the dysregulation of genes associated with human neuropathologies during neurulation is for the most part driven by maternal *auts2a* contribution even though we cannot rule out a possible contribution of zygotic *auts2a*. During late embryonic brain formation (i.e., stage 29), the dysregulation of genes associated with neuropathologies appears to me mostly zygotically regulated even though we cannot rule out a milder contribution of maternal *auts2a* that would be statistically difficult to reveal due to the lower number of DEG in the MCH analysis at this stage.

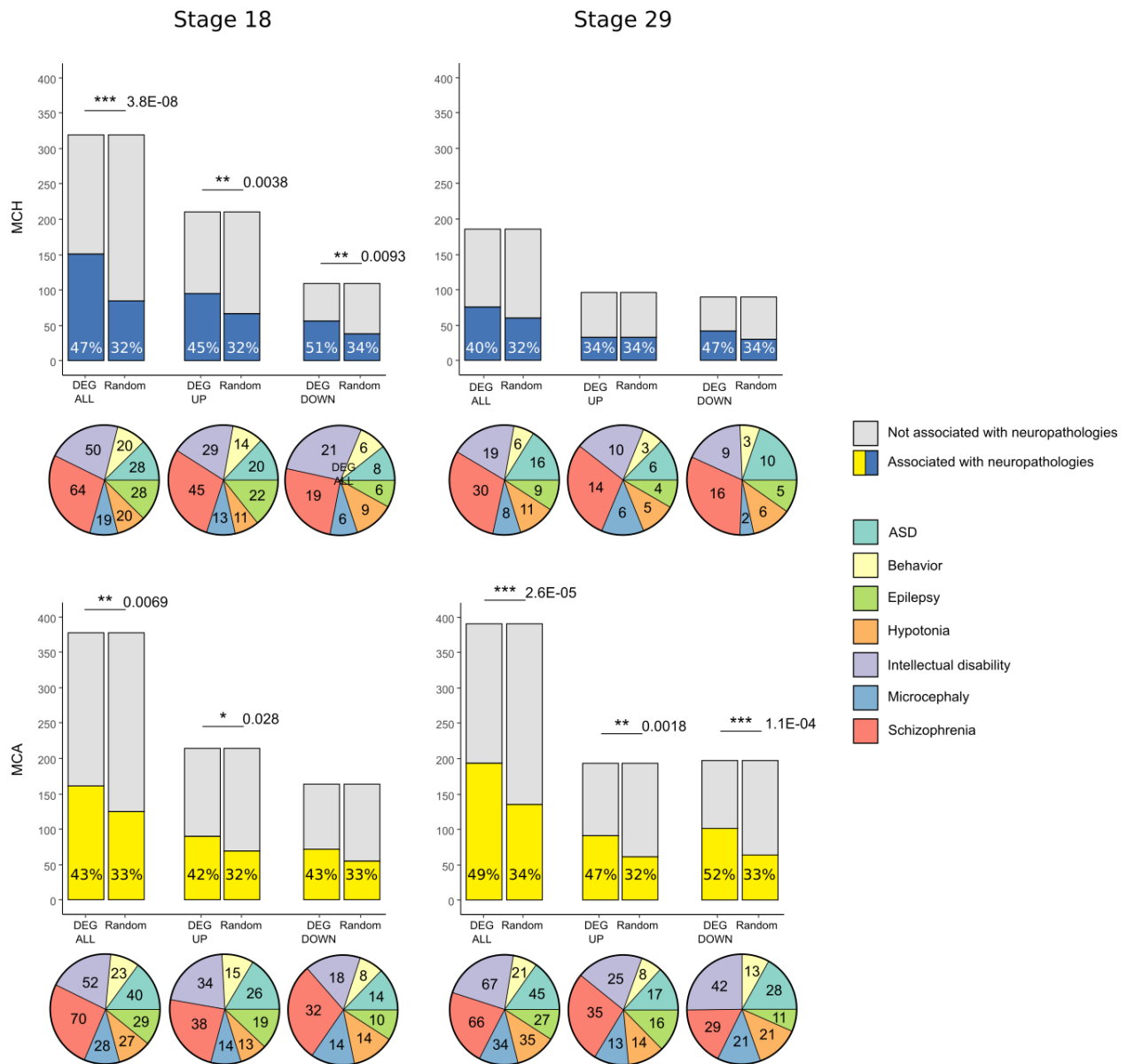


Fig. 4 Dysregulated genes associated with neuropathologies. a Barplots and pie charts show the number of orthologous MCH (blue) dysregulated genes and b MCA (yellow) dysregulated genes associated with neuropathologies for both developmental stages. Neuropathologies include ASD, Aura, Behavior alterations, Cognition disorders, Delirium, Developmental disorders, Epilepsy, Huntington, Hyperactivity, Hyperopia, Hypotonia, ID, Language disabilities, Mental retardation, Microcephaly, Nervous system disorders, Neurodevelopment disorders, Sleep apnea and Schizophrenia. Human orthologs of medaka genes were obtained using Genomicus (see methods). Chi square analysis was performed against a theoretical distribution of 50% up and down regulated genes. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Dysregulated molecular signaling pathways during neurodevelopment

To further characterize dysregulated molecular processes in the absence of maternal *auts2a* contribution, we specifically investigated the seven conserved metazoan signaling pathways²² and the components that comprise the basement membrane and adhesion complex (i.e., extracellular matrix). These pathways are known to orchestrate complex cell and tissue interactions regulating development, including neurodevelopment²³⁻²⁶. When comparing heterozygous individuals lacking (MCH-) or not (MCH+) maternal *auts2a* contribution, we observed a dysregulation of genes belonging to all pathways, with the exception of the Hedgehog pathway (Supplementary table 6). At stage 18, the number of genes dysregulated was especially high for the RTK/growth factors (*iqgap3*, *hbegfa*, *rab8b*, *rab25a*, *rab25b*, *rab42*, *rrad*, *rraga*, *rras*, *rras2*), TGF-beta (*amh*, *bmp2*, *bmper*, *brinp3b*, *nomo*, *smad9*) and canonical Wnt (*mfrp*, *nkd2a*, *ved*, *vwde*) pathways, as well as for the extracellular matrix (*itga6b*, *hmcn2*, *lamc1*, *lamb2*, *lamb2l*, *nid1a*, *nid2a*) (Fig. 5a, blue bars). Similar results, even though less pronounced, were observed when analyzing maternal *auts2a* contribution regardless of the genotype (MCA+ vs. MCA-) (Fig5. a, yellow bars). At stage 29, the comparison of MCH+ and MCH- groups led to the identification of dysregulated genes in all pathways, with the exception of the Hedgehog pathway (Fig. 5a, blue bars). The number of dysregulated genes was however much lower (1-3 genes) with the exception of the Notch-Delta pathway in which 5 genes (*her8.2*, *her12*, *hey1*, *nle*, *tuba8l2*) were dysregulated. In contrast to stage 18, we observed a more pronounced dysregulation of most pathways when the comparison was made regardless of the genotype (MCA+ vs. MCA-) (Fig5. a, yellow bars) indicating that these pathways are more predominantly regulated by zygotic *auts2a*. This was however much less pronounced for the Notch-Delta pathway indicating that this pathway remains mostly regulated by maternal *auts2a* contribution at stage 29.

Together, our results show that maternal *auts2a* contribution acts through the regulation of most evolutionarily conserved metazoan pathways, especially RTK/growth factors, TGF-beta, canonical Wnt, as well as extracellular matrix components at late neurula stage. We also observed that the impact of maternal *auts2a* contribution on the Notch Delta pathway is important during late embryonic brain formation.

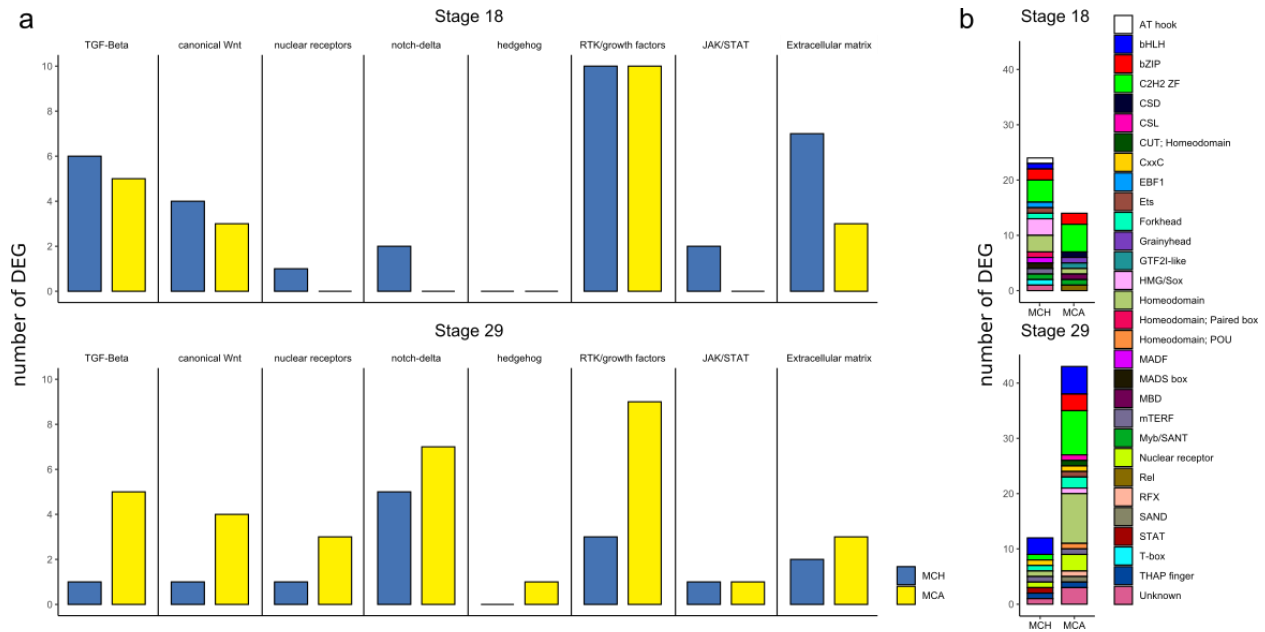


Fig. 5. Dysregulated molecular signaling pathways and transcription factors during neurodevelopment. **a** Number of DEG belonging to the seven conserved metazoan signaling pathways and the components that comprise the basement membrane and adhesome complex (i.e., extracellular matrix) at stage 18 (top panel) and stage 29 (bottom panel) in MCH (blue bars) and MCA (yellow bars) analysis. **b** Number of DEG with human ortholog have been identified as transcription factors at stage 18 (top panel) and stage 29 (bottom panel) in MCH and MCA analysis. Different colors correspond to different transcription factor families.

Dysregulated transcription factors during neurodevelopment

Because maternal *auts2a* contribution was able to influence the expression of several hundreds of genes during neurodevelopment, we specifically investigated transcription factors and monitored the orthologs or all inventoried human transcription factors (TFs)²⁷. When comparing heterozygous individuals lacking (MCH-) or not (MCH+) maternal *auts2a* contribution, we observed a dysregulation of a large number of TFs at both stage 18 (N= 24) and stage 29 (N= 12) (Supplementary table 7). At stage 18, we observed the up-regulation of 7 transcriptional activators (*msantd1*, *spi1b*, *ebf2*, *mef2aa*, *sox10*, *bnc1*, *meox2a*) and the down regulation of 2 transcriptional repressors (*hbp1*, *znf703*) in MCH- individual, consistent with the hypothesis that maternal *auts2a* contribution acts mostly through gene repression during neurulation. It should be noted that among the 24 dysregulated TFs, 12 are classified as regulators and cannot be specifically associated with either repression or activation. Among the different categories of TFs

dysregulated at stage 18 in absence of maternal *auts2a* contribution, some were of specific interest due to their known function in human brain development. This was especially the case for the homeodomain and HMG/Sox categories (displayed in yellow brown and pink, respectively in Fig. 5b). DLX2 and SIX3, that belong to the Homeodomain TF category, are known activators of transcription. DLX2 is involved in interneuron differentiation and forebrain development, and plays a role in craniofacial patterning and morphogenesis²⁸. DLX2 is also a negative regulator of the Notch-Delta pathway that is dysregulated in absence of maternal *auts2a* contribution²⁹. Six3 participates in anterior brain formation through the modulation of *Wnt1* and *Shh*³⁰. In the HMG/Sox category, SOX10 plays a major role in neural crest and peripheral nervous system development^{31,32} while mutations in the *CIC* genes have been associated with brain tumor, epilepsy and mental retardation^{33,34}. Finally, our analysis reveals *srcap*, a AT hook TF acting upstream of the Notch pathway. Mutations in human *SRCAP* cause Floating-Harbor, a rare disorder characterized by short stature, language deficits, and dysmorphic facial features, which are also observed in AUTS2 syndrome^{3,35}.

When incorporating WT and mutant groups in the analysis (i.e., MCA analysis), the number of dysregulated TFs was less important suggesting that their regulation by *auts2a* at stage 18 is mostly under maternal *auts2a* rather than zygotic control. In addition, the absence of dysregulated TFs in the HMG/Sox and AT hook categories in the MCA analysis suggests that TFs belonging to these categories are mostly, if not exclusively, under maternal *auts2a* control. For the Homeodomain category, the only dysregulated TF (*six4*) in the MCA analysis is not dysregulated in the MCH analysis, indicating that dysregulated Homeodomain TFs (*dlx2*, *six3*) are also exclusively regulated by maternal *auts2a*.

These observations at stage 18 are in sharp contrast with our observations at stage 29 for which a much higher number of dysregulated TFs was observed in the MCA analysis (n=43) in comparison to the MCH analysis (n=12). Because wild-type and mutant groups are included in the MCA analysis, this observation suggests that, in contrast to stage 18, zygotic *auts2a* acts through a large number of specific TFs. Interestingly, three TFs belonging to the bHLH category (*sim2*, *atoh7*, *hey1*) are found in both MCA and MCH analyses suggesting that they are mostly, if not exclusively, under maternal *auts2a* control. *Sim2* is a regulator of transcription known to be

a master gene of central nervous system (CNS) development³⁶. Interestingly, SIM2 is ubiquitinated by RING ubiquitin ligase, a component of the PRC1.5 complex³⁷.

Our analysis reveals that the lack of maternal *auts2a* contribution is sufficient to trigger the dysregulation of several key TF families, including Homeodomain, HMG/Sox, AT Hook, and bHLH during development in a stage dependent-manner. More specifically, dysregulated genes belonging to these TFs categories are major player of nervous system development and, for some of them, associated with neuropathologies.

Intergenerational transmission mechanisms

To gain insight into the mechanisms of intergenerational determination, we investigated the molecular cargo (i.e., maternally inherited mRNAs, or maternal mRNAs) in eggs originating from females lacking (mutant) or not (wild-type) maternal *auts2a* contribution. Because of the role of *AUTS2* in regulating gene expression, we reasoned that *auts2a* could regulate gene expression in the oocyte, leading to the specific accumulation of specific maternal factors that could, after being inherited by the zygote, act to regulate gene expression during neurodevelopment. We therefore performed RNA-seq analysis in 1-cell stage embryos originating from mothers exhibiting (WT group) or not (mutant group) *auts2a* contribution (Supplementary table 8). We decided to focus on maternal mRNAs exhibiting a depletion in mutant eggs under the hypothesis that these factors would be more likely to intergenerationally regulate neurodevelopment under maternal *auts2a* control. We identified 30 transcripts exhibiting a significant depletion in the absence of maternal *auts2a* contribution (Fig. 6a). Collectively, these transcripts have known or predicted functions related to cellular communication, cell migration, cell proliferation and differentiation, DNA and RNA binding, and intracellular trafficking that are consistent with a regulatory role during embryonic development. Among these depleted maternal mRNAs, *msi2a* and *hdac1* were of particular interest. The musashi RNA binding protein 2 (Msi2) is a transcriptional regulator that targets genes involved in development and cell cycle regulation. Msi2 is believed to play a role in the proliferation and maintenance of stem cells, including neuronal progenitor, in the central nervous system^{38,39}. Similarly, we observed a significant depletion in *hdac1* mRNA in 1-cell stage embryos originating from mothers lacking *auts2a*

contribution. Hdac1 is an epigenetic regulator known as a transcriptional repressor and acting as a component of the histone deacetylase complex. In all investigated animal species, *Hdac1* is maternally inherited. In mice, HDAC1 regulates cell cycle and zygotic genome activation^{40,41} and is critical for preimplantation development⁴². In zebrafish, *hdac1* plays major role in central and peripheral nervous system development⁴³. Our observations suggest that maternal *auts2a* acts through maternally inherited factors accumulated in the oocyte that regulate, in turn, early embryonic development and neurodevelopment. We hypothesize that this intergenerational effect is mediated, at least in part par mRNAs encoding for transcriptional regulators such as *hdac1* and *msia2*.

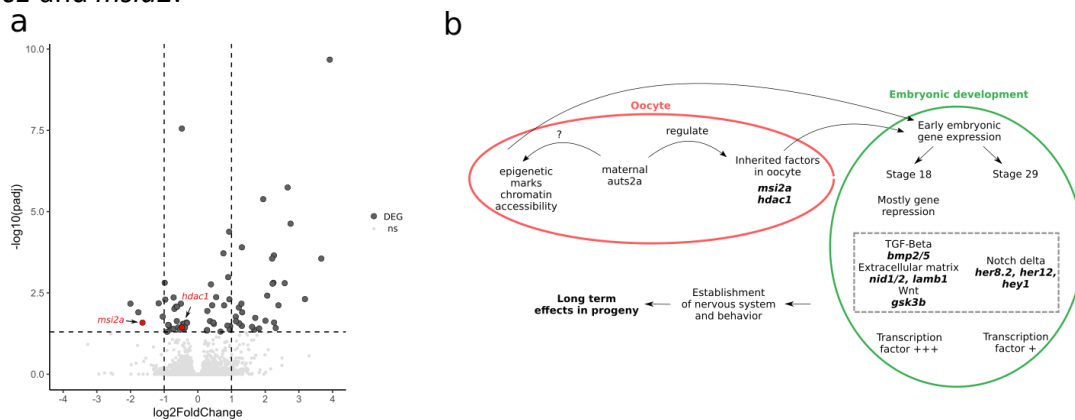


Fig. 6 One-cell stage RNA-seq analysis. **a** Volcano plot of dysregulated genes in *auts2a* mutants eggs. Red dots correspond to *msia2* and *hdac1*. **b** schematic depiction of maternal *auts2a* control of neurodevelopment and behavior.

Evolutionary conserved genes linked to behavior and nervous system development

In the present study we showed that maternal *auts2a* contribution, alone, can triggers major differences in gene expression during neurodevelopment and long-term behavior in the progeny. This study is a unique vertebrate example demonstrating that maternal, but not paternal, invalidation of a gene linked to numerous human neuropathologies (i.e., 149 according to the DisGeNET database) triggers major neurodevelopmental and long-term behavioral differences in the progeny. We therefore aimed at identifying other genes tightly associated with human neuropathologies that could exhibit similar features. We reasoned that relevant genes had to be expressed in the oocyte and used maternal inheritance as a criterion to search publicly available gene expression data. We used the mouse and the zebrafish, two popular model vertebrate

species that are heavily used for biomedical purposes. We identified 11,521 and 22,738 maternally inherited transcripts in mice and zebrafish, respectively (Supplementary table 9). To be able to subsequently link candidate genes to human pathologies, the zebrafish and mouse lists were filtered for common orthologs, which led to the identification of a list of evolutionarily conserved maternal mRNAs. These conserved maternally inherited genes were subsequently filtered for gene that could be associated with either “Behavior” (GO:0007610) or “Nervous system development (NSD)” (GO:0007399) in either humans, mice (*Mus musculus*), rat (*Rattus norvegicus*), or zebrafish (*Danio rerio*) using the gene ontology database (<http://geneontology.org/> , see methods for details). We were able to identify 107 genes maternally-inherited genes in both mice and zebrafish and associated with “Behavior” and “NSD” GO terms (Fig. 7a). We then used the DisGeNET database to identify genes linked to human pathologies, and more specifically the Disease Pleiotropy Index (DPI) that ranges between 0 and 1 and reflects the diversity of associated diseases, a DPI of 1 corresponding to the highest diversity. Among the 107 identified genes, 92 had a human ortholog present in DisGeNET database (Supplementary table 10). The DPI of these genes (green box plot, Fig. 7b) was significantly higher than the DPI of genes not associated with “behavior” or “NSD” GO terms (grey box plot, Fig. 7b). Similarly, the DPI of the genes with “Behavior” and “NSD” GO terms (green box plot, Fig. 7b) was significantly higher than the DPI of the genes associated only with “NSD” (yellow box plot, Fig. 7b). We then focused on the genes associated with a higher diversity of diseases (i.e., DPI > 0.75). Among the evolutionarily conserved maternal genes associated with “behavior” and “NSD” GO terms, 49% (45/92) had a DPI above 75, including AUT2 and EP300, another member of the PRC1.5 complex. The proportion of genes with a DPI above 0.75 was significantly lower for genes associated only with either one of these two GO terms, and for genes not associated with either one of these categories. These results indicate that AUTS2 and EP300, its partner in the PRC1.5 complex that transcriptionally regulates CNS genes, belong to a group of 45 evolutionarily conserved maternally-inherited genes that are associated with “behavior” and “NSD” and linked to a wide diversity of human pathologies.

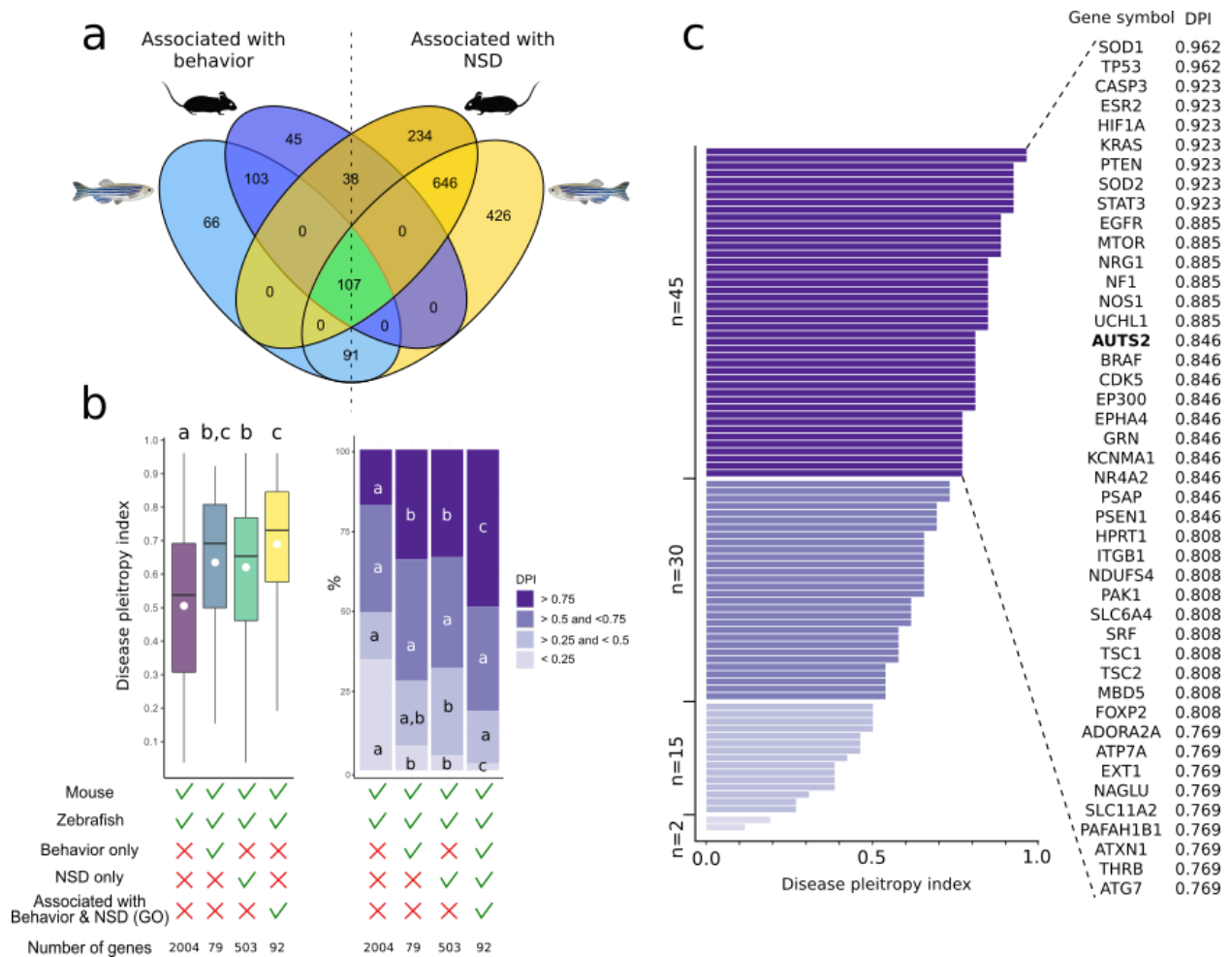


Fig. 7 Evolutionarily conserved maternal genes linked to behavior and nervous system development. **a** Venn diagram shows the number of orthologous maternal genes for zebrafish (blue) and mouse (orange) associated with either behavior or nervous system development (NSD). Green area corresponds to maternal genes in both species and associated with both GO terms. **b** Boxplots shows the distribution of DPI of human genes orthologous to all common maternal zebrafish and mouse genes (grey), genes associated with behavior GO term (deep blue), NSD GO term (orange) or both GO terms (green). Anova and post hoc Tuckey statistical test were performed on grey (n=2004), blue (n=79), orange (n=503) and green (n=92) groups. Barplots show the proportion of DPI ranges for each group. Chi square was performed between each DPI range for 4 groups. Groups sharing the same letter are not significantly different ($P < 0.05$). **c** Zoom on human genes evolutionarily-conserved maternally-expressed genes associated with behavior and neurodevelopment. The symbol of genes associated with DPI above 0.75 are displayed

Discussion

AUTS2 is an important gene for neurodevelopment in vertebrates that has been heavily investigated due to its link with a diversity of neurological disorders known as the AUTS2 syndrome^{3,7}. AUTS2 acts during development as a transcriptional regulator of CNS genes through the PCR1.5 complex⁵. Here we report a previously unsuspected intergenerational effect and shown that *auts2a* expression in the mother drives nervous system development with major long-term consequences on progeny behavior. We provide evidence that *auts2a* acts in the mother oocyte through the regulation of maternal factors (i.e., maternally inherited mRNAs) that will, in turn, regulate gene expression during early development through epigenetic modifications or RNA-binding activity. We cannot however rule out that other mechanisms including modification of epigenetic marks of the female gamete or maternal inheritance of *auts2a* itself could also contribute to mediating the observed intergenerational effect. We show that maternal *auts2a* expression has major consequences beyond zygotic genome activation including through the modulation of numerous transcription factors, which is consistent with the high number of dysregulated genes observed. Maternal *auts2a* contribution is responsible for regulating conserved signaling pathways during neurulation, and more specifically RTK/Growth factors, TGF beta and canonical Wnt. Wnt signaling is active in the central nervous system (CNS), orchestrating a broad range of neurodevelopmental processes including CNS regionalization²⁵. Wnt signaling as one mechanistic link between diverse mental illnesses, including ASD⁴⁰ During embryogenesis, TGF- β family members regulate the initial formation of the nervous system^{24,26}, patterning of the central nervous system (CNS)^{44,45}, stem-cell lineage commitment to neurons, and cell survival⁴⁵. We also observed that maternal *auts2a* contribution specifically regulates extracellular matrix components. Later during development (i.e., late embryonic brain formation), we observed a milder, yet significant, impact of maternal *auts2a* contribution. At this stage, the Notch-delta pathway, a main regulator of neuronal differentiation⁴⁷ and specification⁴⁸, appears to be tightly regulated by maternal *auts2a* contribution. Together our data show that maternal *auts2a* expression in the mother intergenerationally regulates molecular pathways that are required for normal neurodevelopment as illustrated by a significant enrichment in gene associated with NDDs among differentially expressed genes.

The main characteristics of AUTS2 syndrome are global developmental delay or Intellectual Disability in 97% of patients, microcephaly in 65%, feeding difficulties in 60%, ADHD (attention deficit hyperactivity disorder) or hyperactivity in 62%, autistic traits in 56%⁷, and short stature in 44%. Here we report that several morphological and behavioral features are under maternal *auts2a* control, some them being fully consistent with phenotypes described for the AUTS2 syndrome. The reduced head and body size observed in our model appear to be driven mostly, if not exclusively, by maternal *auts2a*, rather than by *auts2a* zygotic expression (Fig. 1e). Similarly, maternal *auts2a* contribution, alone, was sufficient to trigger a higher (i.e., faster) recognition of the environment while its absence triggered a reduced anxiety-like behavior. These results were observed after deleting a portion of the gene sequence corresponding to exons 3-7, including large intronic sequences, known to be functionally important in mammals^{8,9,49}. Existing data in humans^{2,7,15,17,50-52}, invalidation of specific regions on the gene in model species^{5,12,20}, and Y2H screens using long and short isoforms of the AUTS2 protein⁴⁹ revealed that the different regions of the gene and protein can have different functions and intra-cellular localizations, act through different mechanisms, and be associated with various levels or AUTS2 syndrome severity. Our findings suggest that the N-terminal region of the protein encoded by exons 3-7 and/or the genomics regions corresponding to introns 3 to 8 in medaka plays a major role in the maternal determinism of neurodevelopment and behavior in our model. It is however possible that other parts of the gene, including exons encoding for the C-terminal part of the *Auts2a* protein are important for mediating zygotically expressed *auts2a* functions during development. This hypothesis would be fully consistent with the role of AUTS2 in recruiting P300 in the PRC1.5 complex, which involves a HX repeat sequence encoded by exon 9⁵³, which is downstream of the region deleted in our study. Further analyses are required to disentangle the role of the different parts of *auts2a* gene in the intergenerational (i.e., maternal) and zygotic regulation of neurodevelopment and behavior in humans and vertebrates.

We provide here a unique example of a gene associated with various NDDs that exhibits intergenerational effects on progeny neurodevelopment and behavior. We also show that other vertebrate genes have similar features including maternal expression, association with NSD and behavior as well as a link with a large number of human diseases. Our data suggest that

evolutionarily conserved mechanisms and genes exist that intergenerationally regulate neurodevelopment and behavior in vertebrates. This paves for the way for studying intergenerational effects on behavior in various scientific fields, including in response to maternal stress. Because of the observed association with multiple diseases, it also raises the question of the intergenerational determinism of NDDs, which has received no or very little attention thus far, including in the case of the AUTS2 syndrome.

Methods

Fish rearing

Adult medaka (*Oryzias latipes*) from the HdrR strain were raised at 26°C under a reproduction photoperiod (15.5 hours light/ 8.5 hours dark). The fertilization date and the density of fish (0.36L/fish) were similar for fish raised in different tanks. All tanks were part of the same recirculated water system in which physico-chemical parameters and pH of the water were controlled. Fish were fed 3-4 times daily.

Creation of mutant lines

Genome editing was performed using CRISPR/Cas9 to independently delete the genomic regions corresponding to different genomic regions. Identification of target sites was performed using the CRISPOR tool (<http://crispor.org>)⁵⁴. Guide RNA were prepared as previously described⁵⁵. Briefly, the DR274 plasmid (Addgene # 42250) was linearized using Bsa1 and gel purified. Oligonucleotides were annealed (40mM Tris-HCl [pH 8.0], 20mM MgCl₂, 50mM NaCl buffer) for 2min at 95°C, then cooled down for 1 h at 25°C. The double strand oligonucleotides were then ligated into the linearized pDR274 vector. The resulting plasmid was linearized using Dra1 and used for RNA synthesis. For the Cas9 guide RNA, the pCS2-nCas9n plasmid (Addgene plasmid #47929) was linearized using Not1 before RNA synthesis. One-cell medaka embryos were injected with 50 ng/μl of each guide RNA, 150 ng/ul of Cas9 RNA and 200 ng/ul Cas 9 protein (Invitrogen). Injected individual was screened (see below genotyping procedure) 2 months after injection and fish harboring a suitable deletion of the targeted zone were crossed with wild-type individuals to generate a stable line.

Genotyping

Adult fishes were anesthetized and a small piece of the caudal fin was biopsied for genomic DNA extraction. Fin samples were lysed in 35µL of lysis buffer containing 1.25 M NaOH and 10 mM EDTA (pH 12) incubated at 95°C for 45 min and the lysis reaction was neutralized by adding 35µL of neutralization solution containing 2 M Tris-HCl (pH 5). The identification of wild-type and mutant fish was performed by PCR using primers flanking the site of deletion. PCR was performed using the Jump Start polymerase and the following PCR conditions:

	temperature	time	cycles
Enzyme activation	94 °C	2 min	
Denaturation	94°C	30 s	
Hybridization	60°C	30 s	37 cycles
Elongation	72°C	30 s-1m	
End of elongation	72°C	2 min	

Guide sequence

Name	Guide Sequence	Genomic location
Target 1	GCTCGAGTGGTGTACAGTTTGG	Exon 2, 5' UTR
Target 2	GTCTAACCTGGACACAGGCTTGG	Intron 2
Target 3	GATCAAAGTATCAGTCAGAAAGG	Intron 6
Target 4	TCTCACATCATCTCATGTTCTGG	Intron 7

Primer sequences:

Name	Sequence (5' → 3')
Auts2gN_extF	CTTGAAGAACGCTGCTGTTG
Auts2gN_extR	CTGCACAAACAGCTCTGCAT
Auts2gN_intF	AAACCCACAGCCAACATTC
Auts2gN_intR	GGCAGTGCCCACTGTTTAG

Macroscopical Phenotyping

For embryo survival, fertilized eggs were collected directly from the female approximately 10 minutes after the fertilization. Embryonic survival was monitored at Neurula (25 hpf), 4-somite (1d 7.5 hpf), 18-somite (2d 2hpf), 34-somite (3d 2hpf), somite completion (4d 5hpf) and hatching

(8/9 dpf) stages. Dead embryos were counted and removed. We considered that eggs that didn't hatch 12 dpf could not hatch.

Behavioral phenotyping

Behavioral protocol for novel tank test and recognition test is illustrated in Fig. 2a. Sixty two naïve fish of 14 weeks old were tested. Each fish came from stock populations and was kept alone in 3L aquarium (Home tank) for 3 days before the beginning of the test. The temperature of the home tank water was maintained at $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$. One fish adapted to its home tank was carefully transferred to a 15 cm^3 cube (Test tank; 3.4L) at 9:00. Video is recording for one hour and fish were kept in their test tank until 17:00 (habituation period). They were then carefully transferred to their original home tank for night. On day 2, the fish was transferred back into the test tank at 9:00 and video recorded for one hour. Then, fish were euthanized and a small piece of caudal fin was sampled for genotyping. During video recording, fish were alone in the room to avoid human-induced bias. Fish activities in test tank were analyzed using the EthovisionXT software (v. 15.0.1418) (Noldus, Wageningen, The Netherlands).

RNA-sequencing

Sample collection

Fertilized medaka eggs were collected, and developing embryos were subsequently incubated at 27°C in mineral medium (water, 0.1% NaCl, 0.003% KCl, 0.004% CaCl_2 , 0.016%, MgSO_4) until they reached the targeted developmental stage (stage 2, 18 or 29) according to Iwamatsu¹⁸. Embryos were then snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction. For stage 2 analysis, mutant and WT group embryos were collected and 5 biological replicates, corresponding to pools of 100 embryos originating from 5 different female were used for each group. For stage 18 and 29 analyses, mutant, MCH-, MCH+ and WT group embryos were collected and 6 biological replicates, corresponding to pools of 50 embryos spawned by 6-10 females, were used for each group.

RNA extraction

Frozen medaka embryos were lysed with a Precellys Evolution Homogenizer (Ozyme, Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France) in TRI Reagent (TR118; Euromedex, Cincinnati,

OH, USA), and total RNA was extracted according to the manufacturer's instructions. Due to the large proportion of vitellus at stage 2, these samples were additionally purified using NucleoSpin RNA plus kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). After extraction, RNA concentration was measured using a Nanodrop ND-1000 (Nixor Biotech, France), sample integrity was checked using a 2100 Bioanalyser (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA) and/or Fragment Analyzer RNA Standard Sensitivity kit (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA). RNA was stored at -80°C until library synthesis.

Library synthesis

All libraries were synthesized from at least 2 µg of template RNA. For stage 18 and 29 embryos, polyadenylated RNA were captured using oligo(dT) magnetic bead and library was synthesized using Stranded mRNA Prep Ligation (Illumina, San Diego, CA, USA). For stage 2 embryos, as maternal mRNAs are little to no polyadenylated, ribosomal RNA was depleted using riboPOOLS kit (siTOOLS Biotech, Rückgebäude, Germany) and library synthesis was performed on remaining RNAs using TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation kit (Illumina, San Diego, CA, USA). Briefly, RNAs were chemically fragmented and synthesis of the first strand of cDNA was made in presence of actinomycin D to block the second strand synthesis. The second strand of cDNA was synthesized with dUTP to block its synthesis during PCR amplification. Adapters were ligated to the 5' end (P5) and 3' end (P7) and cDNAs were then amplified by PCR. Libraries were quantified and their quality checked using Fragment Analyzer NGS High Sensitivity kit (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA) and qPCR (Roche, Bâle, Switzerland).

Clustering and sequencing

Clustering and sequencing were performed on a NovaSeq6000 (Illumina, San Diego, CA, USA) using NovaSeq Reagent Kits (Illumina, San Diego, CA, USA) and the SBS (Sequence By Synthesis) technique. To avoid any bias in MCH analysis, stage 18 and 29 MCH+ and MCH- samples were processed on a single-read 100 bp flow cell SP, stage 18 and 29 WT and mutant samples on a second one and stage 2 WT and mutant samples on a third one. More than 1,073 million reads were obtained (i.e., sequences after the Illumina purify filter) with the number of reads per library ranging from 32 to 60 million for stage 18 and 29 MCH+/MCH- samples. More than 981 million

reads were obtained with the number of reads per library ranging from 25 to 61 million for stage 18 and 29 WT/mutant samples. More than 779 million reads were obtained with the number of reads per library ranging from 60 to 105 million for stage 2 WT/mutant samples.

RNAseq analysis

Raw read adapter and quality trimming were performed using Trim Galore (version 0.6.6, Cambridge, UK)⁵⁵ (parameters: `--clip_r1 13, --three_prime_clip_r1 2`). Recent publications highlighted improvement in transcriptome alignment and quantification accuracy using Salmon through Selective Alignment mode^{57,58}. Trimmed reads were therefore mapped against *Oryzias latipes* (ASM223467v1 Ensembl version 106) coding sequence as transcriptome and genome as decoy sequences, and subsequently quantified using Salmon (version 1.8) through Selective Alignment mode based. These steps have been gathered in the form of a rnaseq workflow which agrees to FAIR principles (<https://forgemia.inra.fr/lpgp/rnaseq>). Genes (pseudo) counts (≥ 40 reads per gene in at least 4 of 5 samples per condition (WT, mutant) for stage 2 analysis and in at least 5 of 6 samples per condition (WT, MCH+, MCH-, mutant) for stage 18 and 29 analysis), normalization and differential gene expression analysis have been carried out using DESeq2 package on R software (version 4.2.2)⁵⁹ using default parameters.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using R software (v4.1.0)/R commander package. Effects were considered statistically significant at $p < 0.05$. Analyses were carried out using untransformed data when criteria for normality and homogeneity of variances were fulfilled (Shapiro-Wilk and Levene's test, respectively).

Computational analysis

Gene annotation and ortholog identification

For RNA-seq analysis, human-medaka gene orthology relationships were assessed using the Genomicus web server (<https://www.genomicus.bio.ens.psl.eu/genomicus-fish-03.01/cgi->

[bin/search.pl](#)). The complete list of human-medaka orthologs sharing the same Euteleostomi gene ancestor can be downloaded via an ftp server (<ftp://ftp.biologie.ens.fr/pub/dyogen/genomicus-fish/03.01/ancGenes.tgz>). For the evolutionarily conserved gene analysis, zebrafish-human, zebrafish-mouse and zebrafish-rat orthology relationships were assessed using the Ensembl BioMart (<https://www.ensembl.org/biomart/martview/54025bd283efc6f4758f0a040f518884>)⁶⁰.

Gene Ontology

Gene ontology was characterized using <http://geneontology.org/>^{61,62}. The identifiers GO:0007610 and GO:0007399 correspond to “Behavior” and “Nervous system development” terms respectively. Genes of *Homo sapiens*, *Mus musculus* and *Rattus norvegicus* associated with both GO terms were upload.

Association with human diseases

Genes associated with human diseases were obtained using the DisGeNET database (<https://www.disgenet.org/search>). This database integrates information on human gene-disease associations from various repositories including Mendelian, complex and environmental disease²¹.

Signaling pathways and transcription factors

Genes were sorted in signaling pathways by crossing medaka genes names from RNA-seq analysis with gene name lists of signaling pathways conserved across metazoan²². Transcription factors were identified by crossing human ortholog of differentially expressed genes from RNA-seq analysis with human transcription factor catalog²⁷.

Evolutionarily-conserved maternally-expressed genes associated with behavior and neurodevelopment in vertebrates and linked to a diversity of human diseases

Maternal transcriptome datasets of zebrafish (*Danio rerio*) and mouse (*Mus musculus*) were downloaded from NCBI SRA (respectively SRX3542388 and ERX1787686). The minimum threshold of TPM was fixed at 0.5. Lists of genes belonging to “Behavior” and “Nervous system

development” biological processes were downloaded (04/2020) from Gene Ontology/Amigo database for 3 mammalian species: rat (*Rattus norvegicus*), human (*Homo sapiens*) and mouse (*Mus musculus*). These species were selected because they were the most described for these gene ontology (GO). All orthologous genes were obtained from BioMart on ENSEMBL platform(Smedley et al. 2015). GO lists and maternal transcriptomes were merged using Rstudio (R version 3.1.5). The curated gene-disease associations lists were downloaded from the DisGeNET website and contains gene-disease associations from UNIPROT, CGI, ClinGen, Genomics England, CTD, PsyGeNET and Orphanet. It was merged in Rstudio with others data frame by “human gene name”²¹.

Data availability

All transcriptomics datasets generated as part of the study are publicly available. RNA-seq dataset are available on the NCBI SRA portal under accession numbers PRJNA929688 and PRJNA930338.

Code availability

All codes used for the computational analysis are publicly available as detailed in the methods section.

Acknowledgements

The project has received funding from INRAE PHASE division, Région Bretagne and Agence Nationale de la Recherche (ANR CAVEMOM). The authors thank Pierre-Lo Sudan, Guillaume Gourmelen and the INRAE LPGP ISC staff for animal care and behavioral setup development.

Author contributions

J.B., V.C., A.C. and C.M. conceived and designed the experiments; A.C., C.M., A.B., J.M. and C.G. carried out computational analysis, T.N. and A.D. performed RNA-seq analysis; A.C. and V.C. performed behavioral analysis; J.B., A.C. and A.H. created mutant lines, A.C. performed macroscopic phenotyping analysis, A.C. and C.M. performed statistical analyses; A.C., C.M. and J.B. wrote the manuscript and J.B. provided funding and supervised the study.

Ethics declaration

Investigations were conducted according to the guiding principles for the use and care of laboratory animals and in compliance with French and European regulation on animal welfare and were approved by the Comité Rennais d’Ethique en Expérimentation Animale (CREEA) and the French ministry of Research and Innovation under approval # APAFIS #32290-2022010611342063.

Supplementary tables

Supplementary Table 1

List of expressed genes at stage 18 with pvalues, log2FC and normalized counts (MCH analysis)

Supplementary Table 2

List of expressed genes at stage 29 with pvalues, log2FC and normalized counts (MCH analysis)

Supplementary Table 3

List of expressed genes at stage 18 with pvalues, log2FC and normalized counts (MCA analysis)

Supplementary Table 4

List of expressed genes at stage 29 with pvalues, log2FC and normalized counts (MCA analysis)

Supplementary Table 5

List of DEG human orthologs associated with human pathologies

Supplementary Table 6

List of DEG belonging to evolutionary conserved pathways or extracellular matrix

Supplementary Table 7

List DEG with human orthologs belonging to the different categories of transcription factors according to

Supplementary Table 8

List of expressed genes at stage 2 with pvalues, log2FC and normalized counts

Supplementary Table 9

List of maternally conserved genes with GO terms associations

Supplementary Table 10

List of human orthologs genes associated with diseases and DPI score

References

1. Thapar, A., Cooper, M. & Rutter, M. Neurodevelopmental disorders. *The Lancet Psychiatry* **4**, 339–346 (2017).
2. Sultana, R. *et al.* Identification of a Novel Gene on Chromosome 7q11.2 Interrupted by a Translocation Breakpoint in a Pair of Autistic Twins. *Genomics* **80**, 129–134 (2002).
3. Beunders, G. *et al.* Exonic Deletions in AUTS2 Cause a Syndromic Form of Intellectual Disability and Suggest a Critical Role for the C Terminus. *The American Journal of Human Genetics* **92**, 210–220 (2013).
4. Gao, Z. *et al.* PCGF Homologs, CBX Proteins, and RYBP Define Functionally Distinct PRC1 Family Complexes. *Molecular Cell* **45**, 344–356 (2012).
5. Gao, Z. *et al.* An AUTS2–Polycomb complex activates gene expression in the CNS. *Nature* **516**, 349–354 (2014).
6. Hori, K. *et al.* Cytoskeletal Regulation by AUTS2 in Neuronal Migration and Neurogenesis. *Cell Reports* **9**, 2166–2179 (2014).
7. Sanchez-Jimeno, C. *et al.* Attention Deficit Hyperactivity and Autism Spectrum Disorders as the Core Symptoms of AUTS2 Syndrome: Description of Five New Patients and Update of the Frequency of Manifestations and Genotype-Phenotype Correlation. *Genes* **12**, 1360 (2021).
8. Oksenberg, N. & Ahituv, N. The role of AUTS2 in neurodevelopment and human evolution. *Trends in Genetics* **29**, 600–608 (2013).
9. Sellers, R. A., Robertson, D. L. & Tassabehji, M. Ancestry of the AUTS2 family—A novel group of polycomb-complex proteins involved in human neurological disease. *PLoS ONE* **15**, e0232101 (2020).
10. Merdrignac, C., Clément, A. E., Montfort, J., Murat, F. & Bobe, J. *auts2* Features and Expression Are Highly Conserved during Evolution Despite Different Evolutionary Fates Following Whole Genome Duplication. *Cells* **11**, 2694 (2022).
11. Bedogni, F. *et al.* Autism susceptibility candidate 2 (*Auts2*) encodes a nuclear protein expressed in developing brain regions implicated in autism neuropathology. *Gene Expression Patterns* **10**, 9–15 (2010).
12. Hori, K. *et al.* Heterozygous Disruption of Autism susceptibility candidate 2 Causes Impaired Emotional Control and Cognitive Memory. *PLoS ONE* **10**, e0145979 (2015).
13. Jha, U., Kondrychyn, I., Korzh, V. & Thirumalai, V. High Behavioral Variability Mediated by Altered Neuronal Excitability in *auts2* Mutant Zebrafish. *eNeuro* **8**, ENEURO.0493-20.2021 (2021).
14. Colson, V. *et al.* Maternal temperature exposure impairs emotional and cognitive responses and triggers dysregulation of neurodevelopment genes in fish. *PeerJ* **7**, e6338 (2019).
15. Beunders, G. *et al.* A detailed clinical analysis of 13 patients with AUTS2 syndrome further delineates the phenotypic spectrum and underscores the behavioural phenotype. *J Med Genet* **53**, 523–532 (2016).

16. Kondrychyn, I., Robra, L. & Thirumalai, V. Transcriptional Complexity and Distinct Expression Patterns of *auts2* Paralogs in *Danio rerio*. *G3* **7**, 2577–2593 (2017).
17. Amarillo, I. E., Li, W. L., Li, X., Vilain, E. & Kantarci, S. De novo single exon deletion of *AUTS2* in a patient with speech and language disorder: A review of disrupted *AUTS2* and further evidence for its role in neurodevelopmental disorders. *Am. J. Med. Genet.* **164**, 958–965 (2014).
18. Iwamatsu, T. Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. *Mechanisms of Development* **121**, 605–618 (2004).
19. Castanza, A. S. *et al.* *AUTS2* Regulates RNA Metabolism and Dentate Gyrus Development in Mice. *Cerebral Cortex* bhab124 (2021) doi:10.1093/cercor/bhab124.
20. Oksenberg, N. *et al.* Genome-wide distribution of *Auts2* binding localizes with active neurodevelopmental genes. *Transl Psychiatry* **4**, e431–e431 (2014).
21. Piñero, J. *et al.* The DisGeNET knowledge platform for disease genomics: 2019 update. *Nucleic Acids Research* gkz1021 (2019) doi:10.1093/nar/gkz1021.
22. Babonis, L. S. & Martindale, M. Q. Phylogenetic evidence for the modular evolution of metazoan signalling pathways. *Phil. Trans. R. Soc. B* **372**, 20150477 (2017).
23. Meyers, E. A. & Kessler, J. A. TGF- β Family Signaling in Neural and Neuronal Differentiation, Development, and Function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **9**, a022244 (2017).
24. Placzek, M. & Briscoe, J. The floor plate: multiple cells, multiple signals. *Nat Rev Neurosci* **6**, 230–240 (2005).
25. Mulligan, K. A. & Chayette, B. N. R. Neurodevelopmental Perspectives on Wnt Signaling in Psychiatry. *Complex Psychiatry* **2**, 219–246 (2016).
26. Lupo, G., Harris, W. A. & Lewis, K. E. Mechanisms of ventral patterning in the vertebrate nervous system. *Nat Rev Neurosci* **7**, 103–114 (2006).
27. Lambert, S. A. *et al.* The Human Transcription Factors. *Cell* **172**, 650–665 (2018).
28. Gordon, C. T., Brinas, I. M. L., Rodda, F. A., Bendall, A. J. & Farlie, P. G. Role of *Dlx* genes in craniofacial morphogenesis: *Dlx2* influences skeletal patterning by inducing ectomesenchymal aggregation in ovo: *Dlx* genes in craniofacial morphogenesis. *Evolution & Development* **12**, 459–473 (2010).
29. Yun, K. *et al.* Modulation of the notch signaling by *Mash1* and *Dlx1/2* regulates sequential specification and differentiation of progenitor cell types in the subcortical telencephalon. *Development* **129**, 5029–5040 (2002).
30. Lagutin, O. V. *et al.* *Six3* repression of Wnt signaling in the anterior neuroectoderm is essential for vertebrate forebrain development. *Genes Dev.* **17**, 368–379 (2003).
31. Britsch, S. *et al.* The transcription factor *Sox10* is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev.* **15**, 66–78 (2001).
32. Mollaaghababa, R. & Pavan, W. J. The importance of having your SOX on: role of *SOX10*⁺ in the development of neural crest-derived melanocytes and glia. *Oncogene* **22**, 3024–3034 (2003).

33. Liu, Z., Liu, H., Liu, Z. & Zhang, J. Oligodendroglial tumours: subventricular zone involvement and seizure history are associated with CIC mutation status. *BMC Neurol* **19**, 134 (2019).
34. Alagoz, M., Kherad, N., Gunger, E., Kaymaz, S. & Yuksel, A. The New CIC Mutation Associates with Mental Retardation and Severity of Seizure in Turkish Child with a Rare Class I Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *J Mol Neurosci* **70**, 2077–2084 (2020).
35. Hood, R. L. *et al.* Mutations in SRCAP, Encoding SNF2-Related CREBBP Activator Protein, Cause Floating-Harbor Syndrome. *The American Journal of Human Genetics* **90**, 308–313 (2012).
36. Coumailleau, P. & Duprez, D. Sim1 and Sim2 expression during chick and mouse limb development. *Int. J. Dev. Biol.* **53**, 149–157 (2009).
37. Okui, M. *et al.* Transcription factor single-minded 2 (SIM2) is ubiquitinated by the RING–IBR–RING-type E3 ubiquitin ligases. *Experimental Cell Research* **309**, 220–228 (2005).
38. Sakakibara, S., Nakamura, Y., Satoh, H. & Okano, H. RNA-Binding Protein Musashi2: Developmentally Regulated Expression in Neural Precursor Cells and Subpopulations of Neurons in Mammalian CNS. *J. Neurosci.* **21**, 8091–8107 (2001).
39. Sakakibara, S. *et al.* RNA-binding protein Musashi family: Roles for CNS stem cells and a subpopulation of ependymal cells revealed by targeted disruption and antisense ablation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 15194–15199 (2002).
40. Ma, P. & Schultz, R. M. HDAC1 and HDAC2 in mouse oocytes and preimplantation embryos: Specificity versus compensation. *Cell Death Differ* **23**, 1119–1127 (2016).
41. Dang, Y. *et al.* The lysine deacetylase activity of histone deacetylases 1 and 2 is required to safeguard zygotic genome activation in mice and cattle. *Development* **149**, dev200854 (2022).
42. Ma, P. & Schultz, R. M. Histone deacetylase 1 (HDAC1) regulates histone acetylation, development, and gene expression in preimplantation mouse embryos. (2009).
43. Ignatius, M. S. *et al.* Distinct Functional and Temporal Requirements for Zebrafish Hdac1 during Neural Crest-Derived Craniofacial and Peripheral Neuron Development. *PLoS ONE* **8**, e63218 (2013).
44. Dutta, D. J. *et al.* Combinatorial actions of Tgf β and Activin ligands promote oligodendrocyte development and CNS myelination. *Development* **141**, 2414–2428 (2014).
45. Kiecker, C. & Lumsden, A. The Role of Organizers in Patterning the Nervous System. *Annu. Rev. Neurosci.* **35**, 347–367 (2012).
46. Roussa, E. *et al.* Transforming Growth Factor β Is Required for Differentiation of Mouse Mesencephalic Progenitors into Dopaminergic Neurons In Vitro and In Vivo: Ectopic Induction in Dorsal Mesencephalon. *STEM CELLS* **24**, 2120–2129 (2006).
47. Grandbarbe, L. *et al.* Delta-Notch signaling controls the generation of neurons/glia from neural stem cells in a stepwise process. *Development* **130**, 1391–1402 (2003).
48. Park, H.-C. & Appel, B. Delta-Notch signaling regulates oligodendrocyte specification. *Development* **130**, 3747–3755 (2003).

49. Monderer-Rothkoff, G. *et al.* AUTS2 isoforms control neuronal differentiation. *Mol Psychiatry* (2019) doi:10.1038/s41380-019-0409-1.
50. Palumbo, P. *et al.* Whole Exome Sequencing Reveals a Novel AUTS2 In-Frame Deletion in a Boy with Global Developmental Delay, Absent Speech, Dysmorphic Features, and Cerebral Anomalies. *Genes* **12**, 229 (2021).
51. Ben-David, E. *et al.* Identification of a functional rare variant in autism using genome-wide screen for monoallelic expression. *Human Molecular Genetics* **20**, 3632–3641 (2011).
52. Nagamani, S. C. S. *et al.* Detection of copy-number variation in AUTS2 gene by targeted exonic array CGH in patients with developmental delay and autistic spectrum disorders. *Eur J Hum Genet* **21**, 343–346 (2013).
53. Liu, S. *et al.* NRF1 association with AUTS2-Polycomb mediates specific gene activation in the brain. *Molecular Cell* **81**, 4663-4676.e8 (2021).
54. Concordet, J.-P. & Haeussler, M. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Research* **46**, W242–W245 (2018).
55. Herpin, A. *et al.* A novel evolutionary conserved mechanism of RNA stability regulates synexpression of primordial germ cell-specific genes prior to the sex-determination stage in medaka. *PLoS Biol* **17**, e3000185 (2019).
56. Krueger, F. A wrapper tool around Cutadapt and FastQC to consistently apply quality and adapter trimming to FastQ files, with some extra functionality for MspI-digested RRBS-type (Reduced Representation Bisulfite-Seq) libraries. (2019).
57. Srivastava, A. *et al.* Alignment and mapping methodology influence transcript abundance estimation. *Genome Biol* **21**, 239 (2020).
58. Patro, R., Duggal, G., Love, M. I., Irizarry, R. A. & Kingsford, C. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat Methods* **14**, 417–419 (2017).
59. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**, 550 (2014).
60. Smedley, D. *et al.* The BioMart community portal: an innovative alternative to large, centralized data repositories. *Nucleic Acids Res* **43**, W589–W598 (2015).
61. Carbon, S. *et al.* AmiGO: online access to ontology and annotation data. *Bioinformatics* **25**, 288–289 (2009).
62. The Gene Ontology Consortium *et al.* The Gene Ontology resource: enriching a GOLD mine. *Nucleic Acids Research* **49**, D325–D334 (2021).

C- Résultats supplémentaires et discussion

C.1- Lignées mutantes

Afin d'étudier l'impact de la contribution maternelle d'*auts2a* chez le médaka, nous avons généré une large délétion de 338 kb (90% du gène) dans la partie 5' du gène. Cette délétion, n'étant pas létale à l'état homozygote, plaide pour une perte de fonction partielle du gène. En revanche une délétion plus petite de deux exons (2 et 7) dans une autre de nos lignées, semble présenter une perte de fonction totale du gène puisque qu'aucun individu n'a survécu jusqu'à éclosion. Mes observations laissent même penser que la totalité des individus homozygotes pour cette double délétion ne terminaient pas l'étape de la gastrulation, étape nécessaire au bon développement des axes suivant l'activation du génome zygotique (Fuentes et al. 2020). L'absence de l'exon 7 dans la lignée $\Delta 338K$, suppose que la létalité observée dans la lignée 2Δ est dû à l'absence totale de l'exon 2 qui porte le codon initiateur de la traduction nécessaire à la production de la protéine canonique. Cette hypothèse est soutenue par la forte expression de l'exon 2 au stade une cellule chez les individus sauvages (Figure 12). Bien que l'expression de l'exon 2 semble altérée chez les individus mutants de la lignée $\Delta 338K$ (expression fortement réduite en amont de la délétion et totale à partir de la délétion), elle n'est pas totalement éteinte et pourrait permettre la production d'une protéine tronquée, qui assurerait les fonctions vitales du gène lors de l'ovogenèse ou au début du développement embryonnaire. Il est a noté que ces données d'expression doivent être interprétées avec du recul car la faible profondeur de séquençage utilisé montre des variabilités dans l'expression de certaines régions entre individus d'un même groupe.

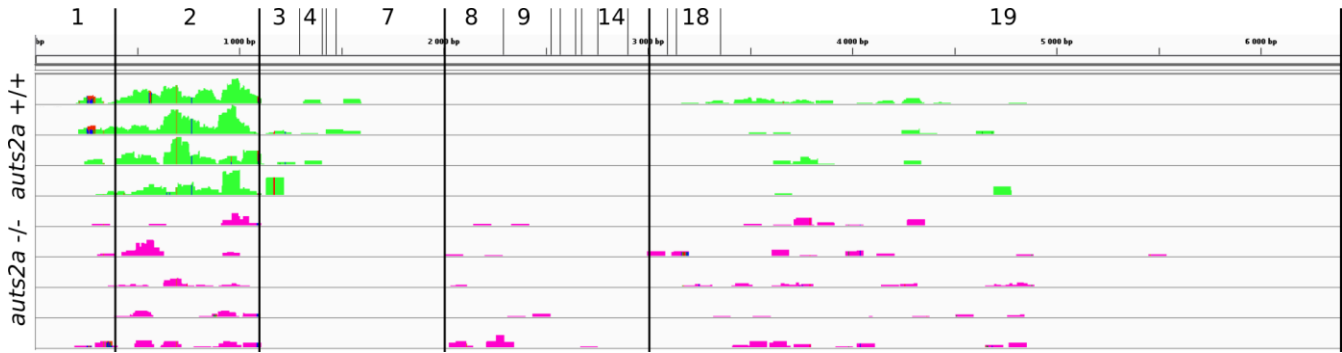


Figure 12 : Expression d'*auts2a* au stade une cellule. Alignements des reads détectés au stade une cellule chez les individus de la lignée $\Delta 338K$ homozygotes sauvages (+/+) et homozygotes mutants (-/-).

Bien que de nombreuses délétions exoniques d'AUTS2 ont été corrélés à des phénotypes de l'AUTS2 syndrome (Beunders et al. 2013; 2016; Sanchez-Jimeno et al. 2021), des délétions uniquement introniques ont également été associés à un déficit de l'attention avec hyperactivité (Elia et al. 2010), de la dyslexie (Girirajan et al. 2011), de l'épilepsie (Talkowski et al. 2012; Mefford et al. 2010), de la microcéphalie et autres. De plus, une méta analyse d'association à l'échelle du génome a identifié le SNP rs6943555, présent dans l'intron 4 d'AUTS2, comme étant le SNP le plus statistiquement associé à la consommation d'alcool (Gunter Schumann et al. 2011). Ce même SNP a également été associé à de la schizophrénie chez une population d'hommes Turques (Ozsoy et al. 2020). Les larges régions introniques du gène AUTS2 comporteraient des séquences « enhancers » exprimées dans le cerveau, que ce soit chez le poisson zèbre ou chez la souris (Nir Oksenberg et Ahituv 2013). D'autres travaux ont montré la présence de nombreux sites alternatifs (n=13) de transcription du gène *auts2a* chez le poisson zèbre dont la plupart seraient présents dans les larges régions introniques du gène (Igor Kondrychyn, Robra, et Thirumalai 2017). La présence d'une courte séquence intronique de 10 paires de bases (de l'intron 4) conservée dans la délétion de la lignée $\Delta 338K$, ne nous permet donc pas d'exclure totalement que cette dernière pourrait avoir un impact moléculaire et pourrait permettre la survie des individus homozygotes mutés.

C.2- Conséquences de l'invalidation d'*auts2a* maternel au cours du développement embryonnaire

C.2.1- Stade une cellule

Parmi les 13 034 gènes détectés dans l'œuf au stade une cellule, 75 d'entre eux sont dérégulés de manière significative chez les individus mutants par rapport aux individus sauvages (0,58%). L'absence d'*auts2a** dans cette liste de gènes dérégulés s'explique par une expression doublée dans un des cinq échantillons mutants (par rapport aux 4 autres échantillons) et par le fait que des régions non détectées dans les échantillons sauvages aient été détectées dans les échantillons des individus mutants (Figure 11 ; exons 8 à 14). Malgré une différence d'expression non significative d'*auts2a*, les individus mutants présentent une expression réduite de moitié pour *auts2a* au stade une cellule. Cette différence d'expression dans l'œuf du médaka femelle conduit à la dérégulation de 75 gènes, 47 d'entre eux étant sur-exprimés et 28 sous-exprimés.

Parmi les gènes sur-exprimés, un grand nombre d'entre eux présentent une expression basale (chez les individus sauvages) faible voire nulle, le nombre de reads nécessaires pour conclure statistiquement à une sur-expression est donc plus faible, ce qui se traduit par un nuage de point plus hétérogène pour les gènes sur-exprimés (Fig6 Article2). Néanmoins, quelques gènes présentant des différences d'expression importantes avec un seuil d'expression suffisamment élevé chez les individus mutants ont attiré notre attention. Des gènes connus comme impliqués dans les voies de signalisation Wnt/Hedgehog/Notch (*alpl*, *dll4*, *ripk4*), TGF- β (*grem1a*, *cdc23*, *rp6kb1*, *tfap2b*, *mapk8ip3*) ou FGF. Ces voies sont impliquées dans le modelage du cerveau, l'organogenèse, l'organisation du développement embryonnaire précoce ou encore dans la croissance neuronale (Bond, Bhalala, et Kessler 2012; Mehler et al. 1997; Meyers et Kessler 2017; Mulligan et Cheyette 2016).

*Tout au long de cette discussion, le terme d'absence maternelle d'*auts2a* fait référence à l'absence d'*auts2a* sauvage car nous ne pouvons exclure l'expression d'isoformes mutants d'*auts2a* muté

C.2.1.a- *grem1a*

C'est notamment le cas du gène *grem1a* qui code pour la protéine Grem1, un antagoniste des protéine BMP, et qui est sécrété par l'organisateur dorsal de l'embryon, région importante régulant l'orientation de l'embryon (Meyers et Kessler 2017a; Fuentes et al. 2020). Les protéine BMP (pour bone morphogenetic proteins) appartiennent à la super famille des TGF- β et sont notamment impliquées dans l'induction du système nerveux, de l'oligodendrogenèse ou de la neurogenèse dans l'épithélium olfactif (Meyers et Kessler 2017a). La voie de signalisation des BMP est d'ailleurs en partie régulée par la voie Wnt/ β -caténine. Ce gène, très faiblement exprimé à ce stade chez les individus sauvages est six fois plus exprimé chez les individus *auts2a* mutants, ce qui pourrait engendrer des dérégulations de gradients moléculaire et causer des différences notables dans le développement du système nerveux.

Les gènes sous-exprimés chez les individus mutants montrent une expression globalement plus importante, avec une médiane du nombre de reads détectés chez les individus sauvages (expression basale) de 2267 contre 143 pour les gènes sur-exprimés. Les différences d'expression observées sont donc moins grandes pour les gènes sous-exprimés chez les individus mutants (Fig6 Article2).

Parmi les gènes sous-exprimés au stade une cellule, aucune voie de signalisation n'est significativement enrichie. Cependant, la dérégulation de deux gènes en particulier nous a interpellée.

C.2.1.b- *msi2a*

Le gène *msi2a* fait partie de la famille de protéines Musashi, un groupe de protéines de liaison à l'ARN, régulateur de transcription, conservé au cours de l'évolution. Chez le xénope, Musashi contrôle l'activation traductionnelle d'ARNm maternels au cours des divisions méiotique en bloquant leur polyadénylation cytoplasmique (Charlesworth et al. 2006). Il a été démontré dans des cellules embryonnaires de souris que la perte de *Msi2* stimule la migration des cellules

épithéliales et compromet la croissance cellulaire (Bennett et al. 2016). Chez l'homme, *MSI2* joue un rôle dans le maintien des cellules souches embryonnaires et dans la différenciation cellulaire pendant la neurogenèse et a été associé à de la schizophrénie (Luan et al. 2016).

C.2.1.c- *hdac1*

Le gène *hdac1* code pour une histone désacétylase de classe I, groupe de protéines qui régule la transcription par acétylation des histones. Il régule notamment la voie de signalisation Wnt durant la formation des axes dorso-ventraux et antéro-postérieurs chez le poisson zèbre (Ignatius et al. 2013) et chez la souris (S. Chen et al. 2015). Il a été également montré chez le poisson zèbre que la protéine Hdac1 est requise pour maintenir la prolifération des cellules progénitrices neurales et qu'elle joue un rôle majeur dans le développement des systèmes nerveux centraux et périphériques (Schultz et al. 2018). Il a également été proposé que HDAC1 serait indispensable à une bonne activation du génome zygotiques chez des mammifères tel que la souris ou les bovins (Ma et Schultz 2009; Dang et al. 2022).

Nous émettons donc l'hypothèse qu'une partie des régulations maternelles d'*auts2a* chez le médaka agissent par le biais de facteurs maternels tel que des régulateurs de la transcription accumulés dans l'ovocyte, qui vont à leur tour permettre la mise en place du développement du système nerveux de l'individu. Ces facteurs maternels sous contrôle d'*auts2a* agiraient notamment comme des régulateurs épigénétiques ou via des interactions directes avec les ARN messagers.

C.2.2- Stade de late neurula

Le nombre de gènes dérégulés entre les individus hétérozygotes ayant ou n'ayant pas la contribution maternelle d'*auts2a* est bien plus important que ce qui a pu être observé au stade une cellule, traduisant ainsi l'effet boule de neige des dérégulations des gènes maternels provoquée par l'absence d'*auts2a* dans l'ovocyte. En effet, 487 gènes sont dérégulés en fonction de l'absence maternelle d'*auts2a* sur 13675 gènes détectés à ce stade (3.6 %). Nous remarquons également que 66% des gènes sont sur-exprimés en l'absence de la contribution maternelle d'*auts2a*. Ces résultats sont cohérents avec le fait que la partie N-terminale de la protéine (partie ciblée dans notre modèle) régulerait la répression de la transcription (Monderer-Rothkoff et al. 2019).

Nous avons identifié plusieurs gènes connus comme étant impliqué dans sept des voies de signalisation fortement conservées au cours de l'évolution des métazoaires ainsi que dans les composantes modulaires de la MEC (Babonis et Martindale 2017) . Parmi ces voies, seul la voie de signalisation Hedgehog ne montre pas d'enrichissement au stade de late neurula chez nos individus ne possédant pas la contribution maternelle d'*auts2a*. D'autres voies impliquées dans le développement du système nerveux lors de la neurulation, tels que TGF- β , Wnt, RTK growth factor (comprenant les récepteurs des FGF), montrent en revanche de nombreux gènes dont l'expression est altérée par l'absence d'*auts2a* maternel. Les gènes impliqués dans la modulation de la MEC sont également hautement dérégulés à ce stade de développement.

Sans lister la totalité des gènes (Supplementary Table 1 de l'article 2), je vais ici passer en revue quelques gènes qui ont retenu plus particulièrement mon attention.

C.2.2.a- *bmp2*

Le gène *bmp2* est un gène appartenant à la super famille des TGF- β et à la famille des protéines BMP, groupe de protéines essentiels au développement du système nerveux (Meyers et Kessler 2017). Elles sont exprimées tout au long du développement embryonnaire et leurs effets changent à chaque étape du développement. Lors du développement précoce de l'embryon,

l'inhibition de la signalisation BMP différencie l'ectoderme et le neuroectoderme tandis que son expression lors de la neurulation contribue à la spécification de la crête neurale (Tríbulo et al. 2003). Les BMP sont capables d'exercer ces divers effets par le biais d'une expression temporelle étroitement régulée et d'une interaction avec d'autres voies de signalisation. Plus de 30 BMP différentes classées dans plusieurs groupes structurels ont été identifiées chez plusieurs espèces. Le sous-groupe composé de BMP2 et de BMP4 joue un rôle particulièrement important tout au long du développement du SNC (Mehler et al., 1997). En effet, lors de la neurulation, BMP2 est exprimé par l'ectoderme et le plancher du tube neural pour former un gradient de concentration dorso-ventral. Lorsque ce gradient est perturbé, on constate une perte de la population d'interneurones les plus dorsaux (Bond, Bhalala, et Kessler 2012). La protéine BMP2 est également connue pour supprimer la prolifération engendrée par *Shh* via la phosphorylation de *Smad5* et initier la différenciation cellulaire dans le cerveau antérieur et dans le cervelet (Rios et al. 2004). Il a également été montré que BMP2 était capable de sur-exprimer l'expression d'*Hes5* dans les cellules progénitrices neuronales ayant pour effet d'inhiber la différenciation neuronale et de favoriser la formation des astroglies (Nakashima 2001).

La fine régulation de l'expression de ce gène est donc nécessaire au bon développement du système nerveux. Or nous constatons qu'en l'absence d'*auts2a* maternel, l'expression de *bmp2* est significativement plus faible lors de la neurulation que chez les individus sauvages. Cette baisse d'expression de *bmp2* au stade neurula pourrait s'expliquer par la surexpression de *grem1a* maternel, un antagoniste de *Bmp2*, qui est surexprimé au stade une cellule chez les embryons sans *auts2a* maternel.

C.2.2.b-*nid1a/nid2a*

Les nidogènes *nid1a* et *nid2a* sont des composants majeurs de la membrane basale, une forme spécialisée de la MEC sous-jacente aux épithéliums et endothéliums entourant les muscles et les nerfs. Les composants de la membrane basale (laminine, nidogène, perlecan et collagène de type IV) sont des régulateurs de la croissance, de la différenciation, de la migration cellulaire ainsi que du développement et de la réparation des tissus (Figure 13) (S. Zhou et al. 2022). Nidogen-1 stabilise les réseaux de laminine et de collagène IV (Marchand et al. 2019) tandis que Nidogen-2,

qui possède des domaines similaires à Nidogen-1, interagirait également avec le collagène IV, le perlecan et la laminine bien que l'interaction avec cette dernière soit évalué à 10 fois moins forte que pour NID1 (Salmivirta et al. 2002). Chez la souris, il a été montré que la délétion des deux nidogènes se traduisait par une létalité périnatale (Bader et al. 2005).

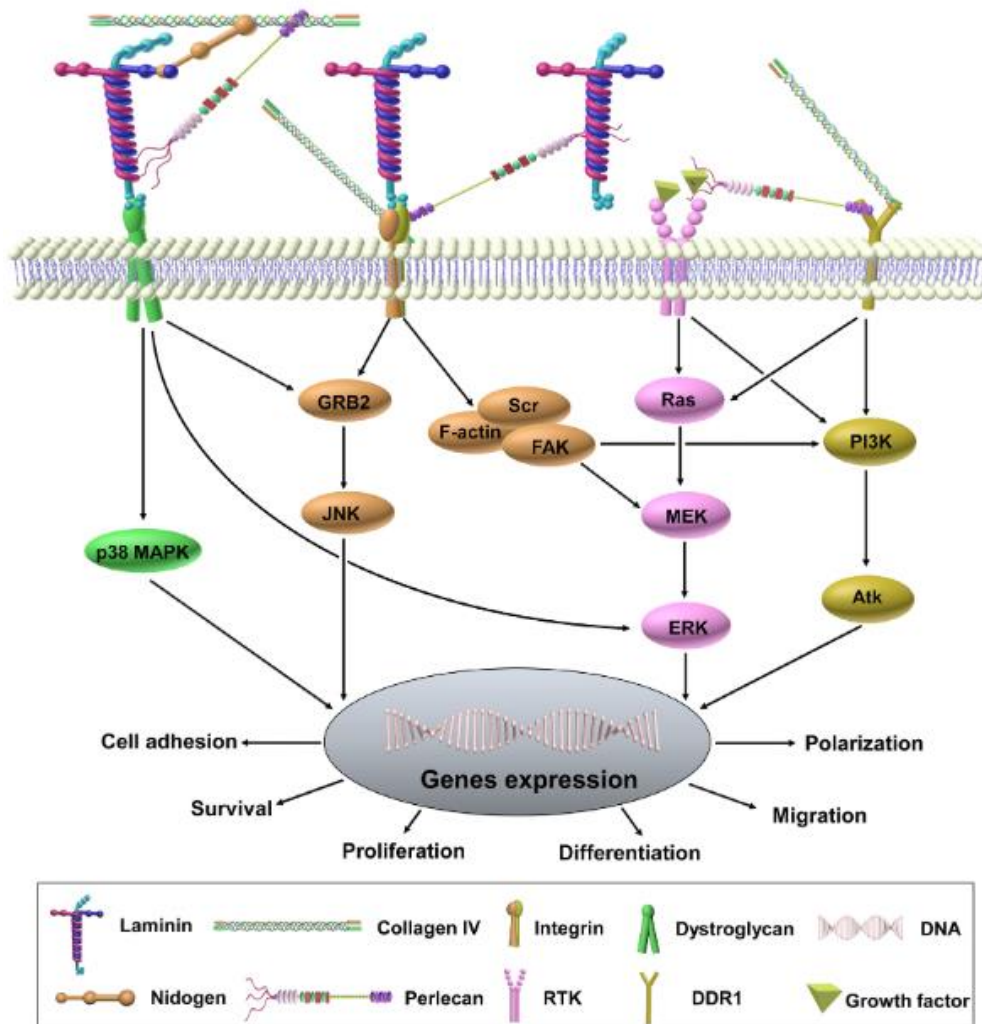


Figure 13 : Cascade de signalisation de la membrane basale. Les molécules centrales de la membrane basale régulent l'adhésion, la prolifération, la différenciation, la polarisation et la migration cellulaire en se liant directement ou indirectement à des récepteurs tels que le dystroglycane, l'intégrine, des récepteurs tyrosine kinase. Le nidogène joue un rôle dans le maintien de l'intégrité des capillaires en formant un pont stabilisateur de haute affinité entre la laminine et le collagène de type IV Marchand et al. 2019. Schéma de (Zhou et al. 2022).

Des modèles de souris KO homozygotes pour *Nid1* et hétérozygotes pour *Nid2*(*Nid1*^{-/-} et *Nid2*^{+/-}) ou pour *Nid1* seul (*Nid1*^{-/-}) ont montré que le Nidogen-1 était nécessaire à l'excitabilité et à la plasticité normale des réseaux de neurones. Chez les KO *Nid1*, des comportements semblables à des crises épileptiques se produisent et des pics épileptiformes ont été observés à l'EEG. Leurs expérimentations *in vitro* ont également montré que l'absence de *Nid1* entraîne une augmentation significative du rapport entrée/sortie des réponses synaptiques dans le gyrus denté accompagnée d'une perte du potentiel synaptique à long terme (Vasudevan et al., 2009).

En plus de la dérégulation de *nid1a* et *nid2a* lors de la neurulation en l'absence de la contribution maternelle d'*auts2a*, nous avons également constaté par un crible double hybride réalisé à plusieurs stades du développement chez des individus sauvages du médaka (Tableau 3) que la protéine *Auts2a* interagissait avec les nidogènes. Les score de confiance (A) pour *nid2a* indique clairement qu'il existe une interaction protéique entre *Auts2a* zygotique et *Nid2a*. Le score de confiance (D) pour *Nid1a* signifie que des analyses supplémentaires sont nécessaires pour confirmer l'interaction entre *Auts2a* et le Nidogen-1. La protéine *Auts2a* interagirait également avec des glycoprotéines de type laminine tels que *Lamb* (dont l'expression d'ARN est dérégulée aux stade 18 et 29 chez les hétérozygotes n'ayant pas la contribution maternelle d'*auts2a*) et *Lama5*.

En plus d'être régulé par la contribution maternelle d'*auts2a*, les acteurs majeurs de la MEC tels que les nidogènes et les laminines pourraient former un complexe avec *Auts2a* pendant le développement embryonnaire, ce qui soulève des questions sur les fonctions multiples d'*auts2a* (maternel ou zygotique) dans la MEC et plus particulièrement dans la membrane basale.

Gene Name (Best Match)	Global PBS	Gene ID (NCBI)
gamma-crystallin M2-like	A	101167703
gamma-crystallin	A	101169012
nid2a	A	101173773
tle1	B	100125463
beta-crystallin A1	B	101157555
cornifelin homolog B	B	101174737
cbfa2t2	B	101168281
mahce	B	100049314
odc1	B	101170722
sec24c	B	100529191
gamma-crystallin M2-like	C	110013316
ctsc	C	101170449
lama5	C	101162509
nid1a	D	101171549
notch1	D	101171596
Demethylase 5B-B	D	101155110
Jagged 2	D	101155738
LOC101157151	D	101157151
prss12 (neurotrypsin)	D	101157816
lamb2	D	101158765
rbfox2	D	101159019
pel12	D	101160520
gamma-crystallin M2	D	101161489
mgat5	D	101162079
celf1	D	101163095
RNA binding protein 6	D	101163139
otx2	D	100049357
pax6	D	100049356
ptk2	D	101155713
col6a6	D	101168576

Tableau 3 : Tableau des interactions protéiques d'outs2a au cours du développement embryonnaire.

Quatre stades de prélèvement ont été utilisés (9, 15, 27, 35, [Iwamatsu., 2004](#)). Le PBS global (Predicted Biological Score) est un score correspondant à un intervalle de confiance de l'interaction. A, B et C sont des hauts scores de confiance tandis que D représente généralement des interactions identifiées avec un faible nombre de « proie » ou des interactions difficiles à détecter par cette technique. Ces expérimentations et leurs analyses ont été réalisées par la société HYBRIGENICS®.

C.2.3- Stade de formation du cerveau embryonnaire

Le nombre de gènes dérégulés entre les individus hétérozygotes ayant ou n'ayant pas la contribution maternelle d'*auts2a* au stade de formation du cerveau embryonnaire est moins important que lors du stade late neurula, bien que la proportion de gènes dérégulés reste supérieure à celle observée au stade une cellule. En effet, 277 gènes sont dérégulés en fonction de l'absence maternelle d'*auts2a* sur 14975 gènes détectés à ce stade (1,85 %). Cela pourrait s'expliquer par la dilution de l'effet maternel d'*auts2a* par d'autres mécanismes comme cela a été proposé dans d'autres modèles s'intéressant aux effets maternels (Moravec et al. 2016; Torres-Paz, Leclercq, et Rétaux 2019). Les voies de signalisation régulées majoritairement par *auts2a* maternelle au stade de la neurula sont désormais régulées par l'expression du génome zygotique, hormis la voie de signalisation Notch-Delta qui présente encore une forte dérégulation liée à l'absence de contribution maternelle d'*auts2a*.

C.2.4- Enrichissement chromosomique

C.2.4.a-Le génome nucléaire

Il a été démontré que la protéine AUTS2 zygotique, par l'intermédiaire du complexe PRC1.3/1.5, a la capacité d'activer ou de réprimer la transcription de gènes par modifications des marques des histones (Gao et al. 2014). J'ai donc cherché à savoir si l'ARN des partenaires d'Auts2a dans ces complexes multiprotéiques étaient présents au stade une cellule chez le médaka. Nos données de RNA-sequencing au stade une cellule indiquent que Ring1 (*ring1*), Pcgf3/5 (*pcgf3* et *pcgf5a*), P300 (*ep300a/b*), Ck2 (*csnk2a1/2*) et Nrf1 (*nrf1*) sont tous exprimés avant l'activation du génome zygotique. J'ai donc émis l'hypothèse que le complexe PRC1.3/1.5-AUTS2 décrit chez la souris, pourrait être actif dans l'ovocyte du médaka pour réguler l'expression de certains gènes cibles au cours de l'ovogenèse.

Je me suis ensuite demandé si certaines régions du génome pouvaient être préférentiellement régulées par *auts2a* maternel, que ce soit par un potentiel complexe PRC1.3/1.5-Auts2a ou par un autre mécanisme d'action. Au stade une cellule, parmi les 75 gènes dérégulés chez les individus ne possédant pas *auts2a* maternel, 28 se trouvent sur le chromosome 14, chromosome portant le gène *auts2a*, qui est donc significativement enrichie. Pour nous assurer que les dérégulations du chromosome 14 n'étaient pas engendrés de façon artéfactuelle par notre modèle, nous avons vérifié que la plupart des 982 gènes codants présents sur le chromosome 14 n'était pas dérégulés, ce qui était le cas avec seulement 2.8% de gènes codants dérégulés sur le chromosome. De plus le gène dérégulé le plus proche d'*auts2a* se situe à plus 900 kb. Aux stades plus tardifs, le chromosome 14 est également significativement plus enrichi, mais contrairement au stade une cellule, d'autres chromosomes (16 et 17) le sont également (Figure 14). Il se pourrait donc que *auts2a* maternel régule préférentiellement certaines régions du génome par l'intermédiaire du complexe PRC1.3/1.5-Auts2a, notamment de gènes géographiquement proches d'*auts2a*. Ils se pourrait également que la très grande délétion de plus de 338 000 paires de bases dans le gène *auts2a* ait pu modifier l'accessibilité de certaines régions génomiques lorsque l'ADN est sous forme d'hétérochromatine, entraînant des dérégulations d'expression. Enfin, il est possible que les larges séquences introniques délétées soient impliquées dans la régulation de gènes voisins par des mécanismes d'interactions de la chromatine. Des analyses Hi-C (High Chromosome Contact map) dans des ovocytes de médakas de notre lignée pourraient permettre de valider cette hypothèse.

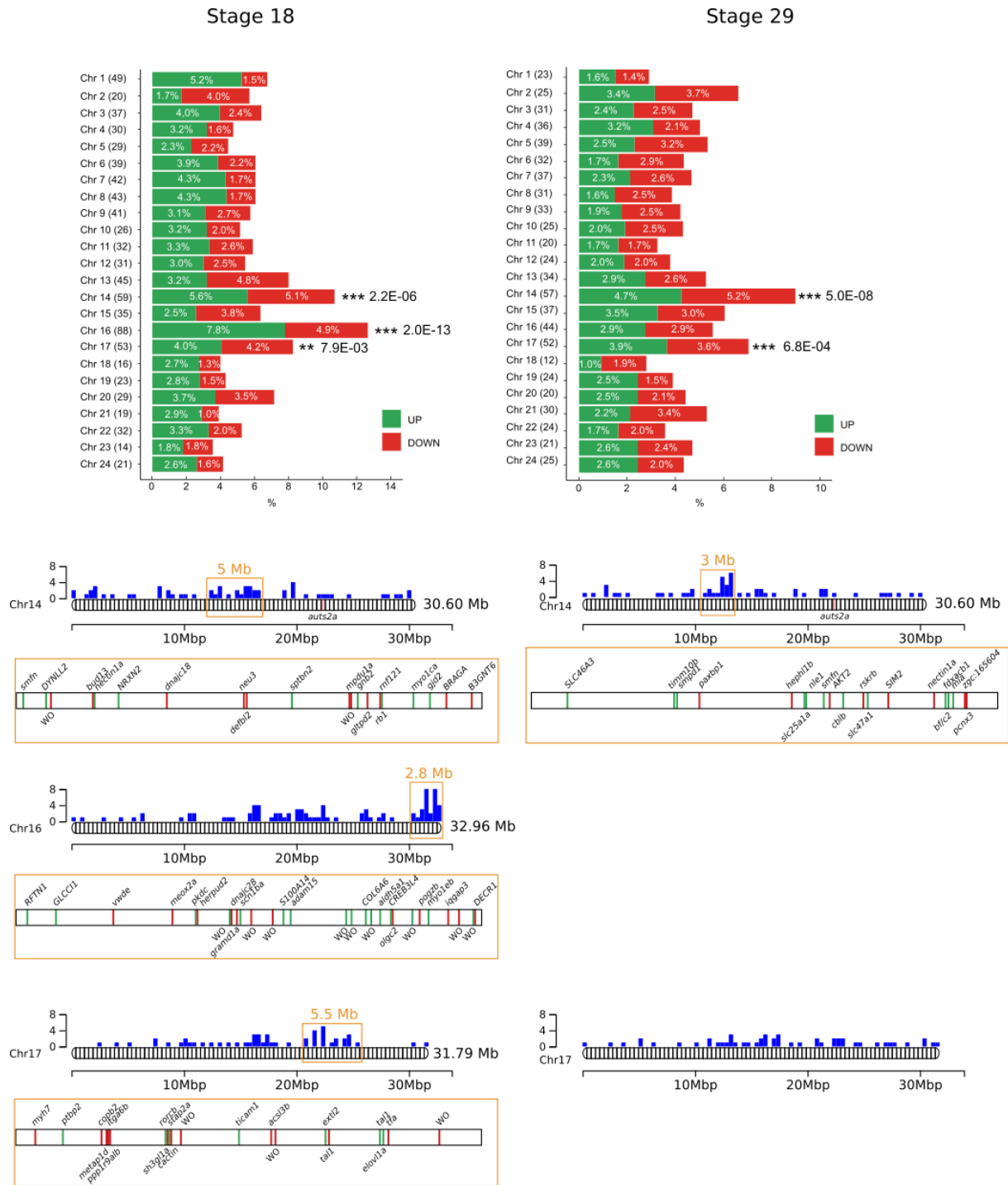


Figure 14 : Enrichissement chromosomique des gènes dérégulés par l'absence de contribution maternelle d'auts2a. A Proportion des gènes sur (vert) ou sous-exprimés (rouge) par chromosome aux stades de la neurulation et de la régionalisation du cerveau. Les statistiques ont été obtenues par la réalisation d'un test binomial entre les proportions de dérégulation théoriques et observées. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. **B** Zoom sur les chromosomes significativement enrichies. Les barres bleues montrent le nombre de gènes dérégulés sur une longueur de 383 kb. Les fenêtres oranges présentent les régions « hot spots » d'auts2a maternel sur le chromosome. *WO* = *Without Ortholog* pour les gènes ne portant pas de noms chez le médaka.

C.2.4.b- Le génome mitochondrial

Chez les vertébrés, le génome mitochondrial, uniquement transmis par la mère, joue un rôle essentiel dans le maintien des réserves d'énergie cellulaire, dans la thermogénèse et dans l'apoptose au cours de l'embryogenèse (Petruzza et al. 2009; Kelly et Scarpulla 2004). Il est constitué d'un génome d'ADN circulaire d'environ 16.5 kb composé d'enzymes nécessaires à sa transcription et à sa réplication ainsi que d'une machinerie de synthèse protéique nécessaire à la traduction des 13 ARNm mitochondriaux. Il code également pour deux ribosomes et vingt-deux ARN de transfert requis pour la traduction dans la matrice (Garesse et Vallejo 2001). Parmi les treize ARN mitochondriaux, trois sont sur-exprimés chez les individus hétérozygotes n'ayant pas la contribution d'*auts2a* (*nd2*, *atp6* et *atp8*), et même six (*nd1*, *nd2*, *nd3*, *atp6*, *atp8* et *cox2*) sur les deux groupes de génotypes n'exprimant pas *auts2a* maternel. Le génome mitochondrial semble donc être fortement perturbé par rapport au génome nucléaire lors de la neurulation.

Le gène *mt-nd2* code pour une NADH déshydrogénase, une oxydoréductase membranaire qui permet le transfert d'électrons nécessaires à la respiration cellulaire et à l'apoptose. Des mutations du gène ont pu être associées à des neuropathologies tels que l'épilepsie, le syndrome de Leigh (encéphalomyopathie nécrosante) ou encore la polyneuropathie axonale sensorimotrice (Na et al. 2021; Bruhn et al. 2021). Les gènes *mt-atp6* et *mt-atp8* sont des ATP synthases qui permettent la production d'ATP à partir d'ADP par la translocation des protons à la membrane. Des mutations dans ces gènes ont également été associées à des neuropathologies tels que le syndrome de Leigh et l'ataxie spinocérébelleuse (De Michele et al. 2018; Nolte et al. 2021). La contribution maternelle régule donc aussi certains gènes du génome mitochondrial, lors du développement de l'embryon. L'absence de dérégulation des gènes mitochondriaux au stade une cellule ne plaide pas pour un contrôle direct des gènes par *auts2a* lors de l'ovogenèse. Sachant que NRF1 régule la biogenèse de l'ADN mitochondrial (Scarpulla 2011) et qu'elle interagit avec la protéine AUTS2 dans le cerveau (Liu et al. 2021), on pourrait supposer une potentielle régulation des gènes mitochondriaux par un complexe protéique AutS2a-Nrf1 chez le médaka.

C.3- Phénotypes macroscopiques observés

C.3.1- Au cours du développement embryonnaire

Les observations réalisées au cours du développement embryonnaire des médakas ont montré une différence significative dans la survie des embryons hétérozygotes et homozygotes mutés à partir de la formation tardive du cerveau embryonnaire (stade 29, (Iwamatsu 2004) , Fig1C de l'article). Les différences observées entre les individus ayant ou n'ayant pas la contribution maternelle d'*auts2a* ne surviennent étonnamment qu'à l'éclosion des alevins. Les différences des taux d'éclosion entre les groupes WT et hétérozygotes avec contribution maternelle démontrent l'implication du *auts2a* zygotique dans la réussite finale du développement embryonnaire. Mais les différences constatées entre les deux groupes hétérozygotes démontrent également l'importance du *auts2a* maternel dans le succès global du développement embryonnaire. Nous pouvons donc en conclure qu'*auts2a* maternel et zygotiques sont indispensables à la survie de l'embryon et l'obtention d'un phénotype normal.

C.3.2- Chez l'individu adulte

C.3.2.a- Phénotype macroscopique

Chez l'individu adulte, les mesures des tailles de tête ont montré clairement deux populations distinctes. Les individus de quatorze semaines ayant la contribution maternelle d'*auts2a* présentent des tailles de tête et de corps normales tandis que ceux ne possédant pas la contribution maternelle d'*auts2a* présentent des tailles de tête et de corps réduites, des phénotypes observés chez des patients humains présentant des mutations du gène (Beunders et al. 2013). Ces chercheurs ont conclu que la partie C-terminale de la protéine Aut2a était la partie régulant la taille de tête, ce que nous confirmons en partie ici, puisque nous n'observons pas de différences dans les tailles de têtes des individus possédant la contribution maternelle d'*auts2a* avec des haplotypes différents. Cependant nous montrons également que l'absence de l'expression maternelle d'une partie de la région N-terminale de la protéine peut définir un

phénotype de taille de tête anormal comme décrit auparavant dans une autre étude (Monderer-Rothkoff et al. 2019). Ce phénotype n'ayant pas été rétabli avec le temps, nous supposons que les dérégulations transcriptomiques au cours de la neurulation, étape clef de la définition de la tête (Tam et Behringer 1997), causées par l'absence d'*auts2a* maternel, pourraient provoquer des dommages irréversibles à long terme sur la taille de la tête des individus.

C.3.2.b- Phénotype comportemental

Les tests comportementaux réalisés sur des médakas isolés ont montré des différences comportementales à long terme entre les individus ayant ou n'ayant pas la contribution maternelle du gène *auts2a*.

Premièrement, le test en environnement nouveau chez des individus âgés de 14 semaines n'a pas montré de différences entre les différents génotypes sur des paramètres tels que la thigmotaxie, les vitesses moyennes et maximales et la vitesse angulaire, après 1, 5, 10 et 60 minutes suivant le début du test. L'augmentation immédiate du temps passé au fond du bac n'a également montré aucune différence entre génotypes sur les premières minutes suivant le début du test. En revanche, nous avons constaté que, sur la durée totale du test (1 heure), les individus n'ayant pas la contribution maternelle d'*auts2a* passaient seulement en moyenne 35% du temps dans la partie inférieure du bac tandis que ceux possédant la contribution maternelle du gène passaient 50% du temps dans la zone inférieure (et 50% du temps en surface). Bien qu'habituellement c'est seulement au cours des premières minutes suivant leur introduction dans un nouvel environnement que les médakas se positionnent majoritairement au fond du bac (Matsunaga et Watanabe 2010), nous observons ici un comportement dit « de plongée » qui se prolonge sur toute la durée du test. Par ailleurs, le comportement atypique observé chez les individus n'ayant pas la contribution maternelle d'*auts2a* qui restent majoritairement en surface, peut être interprété comme un manque de prudence dans un nouvel environnement potentiellement dangereux pour eux. Ce comportement de « prise de risque » (Thomson et al. 2011; Castanheira et al. 2013) pourrait représenter un manque d'adaptation face aux modifications environnementales rencontrées chez les poissons mutés. Ces résultats sont cohérents avec l'absence de réponses de peur chez les descendants de mères stressées pendant

l'ovogenèse qui présentaient également des dérégulations du gène *auts2a* dans l'ovocyte (Colson et al. 2019).

Dans un second temps, l'évaluation des capacités cognitives par le test de reconnaissance de l'environnement a montré que la vitesse moyenne des individus lors des 10 premières minutes du second jour du test était réduite de manière significative chez les individus ayant la contribution maternelle d'*auts2a* (Fig. 2d article). Cette réduction de la vitesse de nage traduit une diminution du comportement exploratoire, ce qui peut être interprété comme une reconnaissance de l'environnement auquel le poisson a déjà été exposé et qui n'est alors plus considéré comme un environnement nouveau. En revanche, les individus n'ayant pas la contribution maternelle d'*auts2a* n'ont pas réduit leur vitesse de nage lors des dix premières minutes du test réalisé le second jour. Cela montre que 10 minutes n'ont pas suffi pour que ces poissons reconnaissent l'environnement dans lequel ils ont été exposés pendant huit heures la veille. Les résultats obtenus après 60 minutes de test montrent une reconnaissance de l'environnement par tous les individus. Nous pouvons en conclure que les capacités de reconnaissance de l'environnement faisant appel à une fonction cognitive simple, i.e. l'habituation (Schmid, Wilson, et Rankin 2015), sont diminuées, mais pas absentes, chez les individus n'ayant pas la contribution maternelle d'*auts2a*. Ces résultats sont une nouvelle fois cohérents avec ceux obtenus dans notre étude précédente montrant des capacités cognitives diminuées chez des alevins issus de mères stressées, et dont le gène *auts2a* était dérégulé (Colson et al. 2019). D'autres études chez diverses espèces de poissons ont également montré que des stress maternels précédant la fécondation pouvaient induire des défauts d'apprentissage spatial chez les descendants (Roche, McGhee, et Bell 2012; L. Eaton et al. 2015).

Les individus atteints de TSA présentent des interactions sociales et une communication altérée (World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2019). J'ai donc réalisé deux autres tests comportementaux afin d'évaluer un potentiel impact de l'absence de contribution maternelle du gène *auts2a* sur les comportements sociaux du médaka. Le premier test était un test visant à mesurer les interactions sociales au sein d'un groupe de poissons (shoaling test). Six poissons de

même génotype, comprenant trois mâles et trois femelles de 15 semaines, ont été regroupés dans un bac de 20x12x16 cm pendant dix minutes (Figure 15). Les distances inter-individuelles ont été mesurées avec le logiciel EthovisionXT pour établir une valeur reflétant la proximité des poissons au sein du groupe. Le test montre que les individus sauvages sont plus proches de leurs congénères et présentent un nombre d'interactions sociales plus important que les individus homozygotes mutants. La présence du gène *auts2a* semble donc déterminante pour le développement des comportements sociaux chez le médaka. Cependant, nous ne constatons aucune différence du nombre d'interactions entre les individus hétérozygotes ayant ou non la contribution maternelle d'*auts2a*. La contribution maternelle d'*auts2a* ne semble donc pas influencer sur le comportement social du médaka. Cependant, les poissons, étant sexuellement matures à l'âge de 15 semaines, ont exprimé un comportement sexuel qui pourrait biaiser les résultats du test. L'étude des interactions sociales des médakas possédant ou non la contribution maternelle d'*auts2a* serait à envisager à des stades plus précoces.

Le second test consistait à isoler un individu au centre d'un dispositif comprenant trois chambres séparées par des parois transparentes (Figure 15 ; Cf III.3). Le groupe de congénères situé à une extrémité du dispositif était le même que pour le shoaling test et de même génotype que l'individu isolé. La chambre située à l'autre extrémité était vide. Le poisson focus était filmé pendant une phase d'habituation de 10 minutes, pendant lesquelles des plaques opaques étaient positionnées sur chaque paroi transparente afin qu'il ne puisse pas visualiser ses congénères. Les deux plaques ont ensuite été retirées et le poisson isolé a été filmé pendant 10 autres minutes. Après le retrait des plaques, les poissons ne présentant pas la contribution maternelle (hétérozygotes et homozygotes) semblent moins réactifs à l'apparition des congénères et passent plus de temps immobiles (données préliminaires) mais la variabilité importante entre les individus de ce groupe n'a pas permis de montrer de différence significative avec les groupes possédant la contribution maternelle d'*auts2a*. Les autres paramètres mesurés tels que la distance des individus isolés à la zone proche des congénères et la fréquence d'entrée dans cette zone n'ont pas permis d'observer de différences notables entre les individus hétérozygotes ayant ou non la contribution maternelle d'*auts2a*. Il semblerait donc que la réaction à l'apparition des congénères soit plus faible chez les individus n'ayant pas la contribution maternelle d'*auts2a*

mais de nouveaux tests avec un effectif plus important (> 20 individus par groupe) seront nécessaires pour atténuer la variabilité et potentiellement, le confirmer. Nous proposons également pour ce test de le reproduire sur des individus plus jeunes (8 semaines) pour éviter de potentiels biais dus aux comportements reproducteurs des poissons.

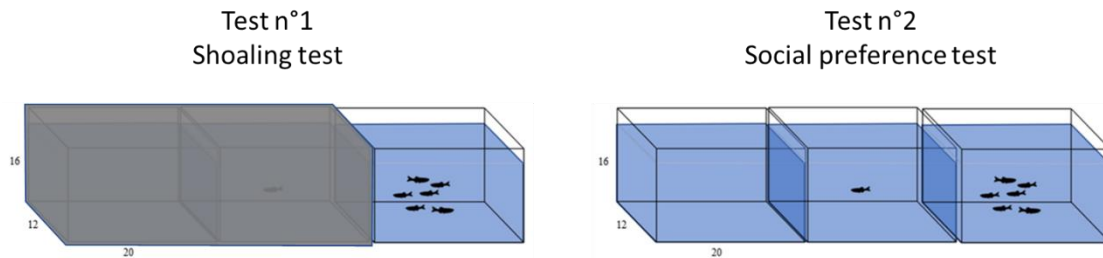


Figure 15 : Schéma des installations pour les tests comportementaux préliminaires.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les travaux de ma thèse nous ont permis d'étendre nos connaissances sur l'histoire évolutive du gène *AUTS2* au cours de l'évolution des vertébrés et de caractériser l'effet intergénérationnel d'*auts2a* sur le neurodéveloppement du médaka.

Nos résultats ont montré que l'activité zygotique du gène *auts2a* n'était potentiellement pas la seule cause des anomalies observées chez l'homme et que l'activité d'*auts2a* maternelle médiait la mise en place du neurodéveloppement et par conséquent du comportement. En effet, les individus présentant une copie mutée du gène dans la partie N-terminale de la protéine provenant de la mère ont montré des dérégulations de facteurs maternels dans l'œuf, dont l'expression finement régulée est nécessaire à des processus majeurs du neurodéveloppement (Figure 16), qui ne le sont pas lorsque la mutation provient du père. La contribution maternelle d'*auts2a* permet donc, au minimum, une régulation indirecte de voies impliquées dans la définition des axes dorso-ventraux et antéro-postérieurs, dans la croissance et la différenciation neuronale ainsi que dans le modelage global du cerveau. Nos analyses phénotypiques ont également montré que les effets de l'absence de la contribution maternelle d'*auts2a* n'étaient pas entièrement palliés au cours de l'embryogenèse et ce, malgré la diminution de l'impact des effets maternels avec le temps. Les phénotypes macroscopiques et comportementaux altérés que présentaient ces individus adultes en témoignent (Figure 16). Nos résultats ont également mis en évidence un groupe de gènes présentant des caractéristiques similaires à *Auts2* tels qu'une expression maternelle conservée au cours de l'évolution, une association à des fonctions impliquées dans la mise en place du développement du système nerveux avec un impact sur le comportement, ainsi qu'un lien avec de nombreuses pathologies humaines. Ceci démontre un peu plus l'importance des effets intergénérationnels sur le comportement et la nécessité de comprendre les mécanismes qui y sont associés pour mieux appréhender les neuropathologies humaines.

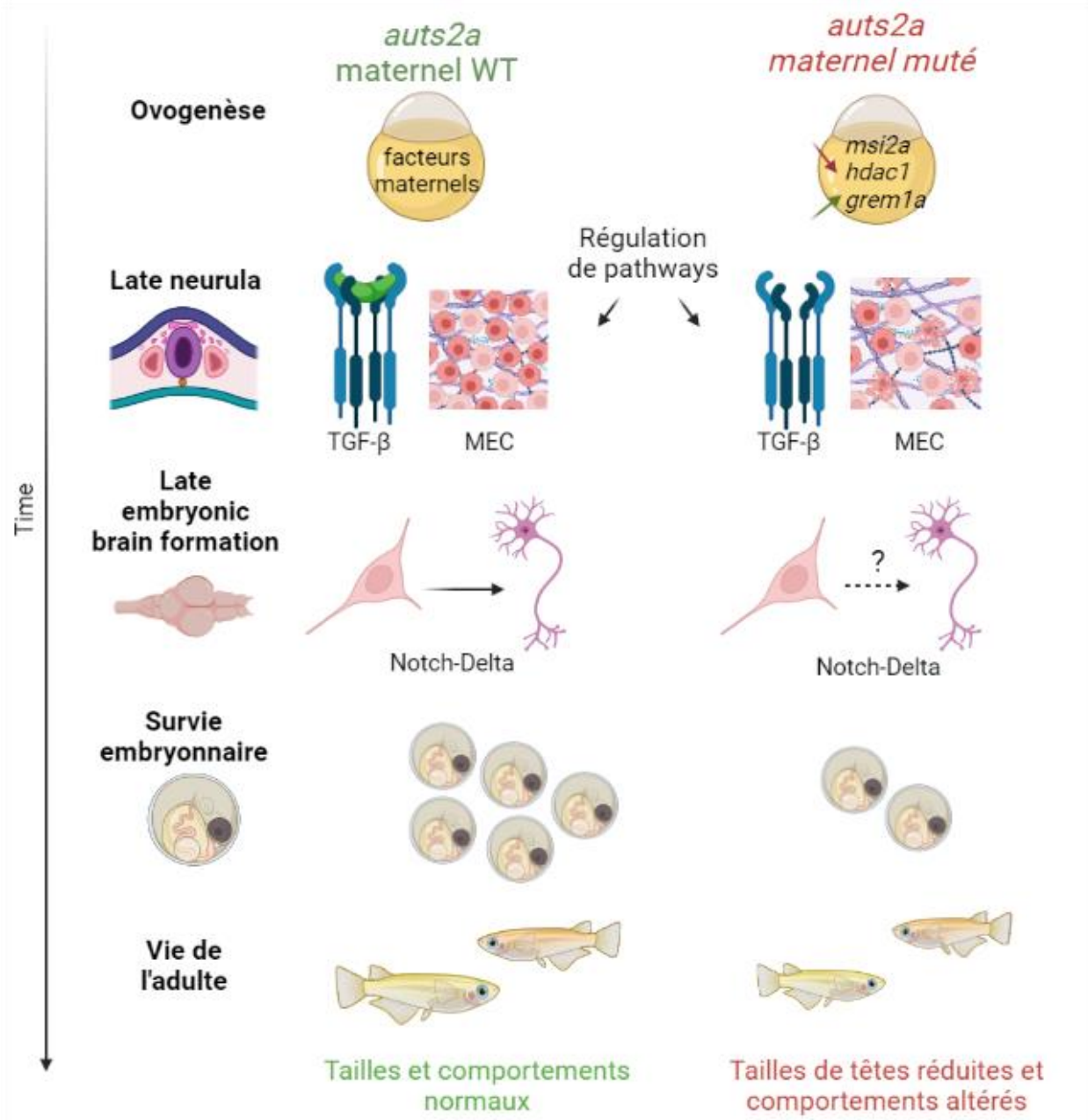


Figure 16 : Schéma récapitulatif de mon travail de thèse sur la contribution maternelle du gène *auts2a*. Créé sur BioRender.com

Ce travail ouvre également de nouvelles perspectives de recherche, qu'elles concernent *auts2a* ou les mécanismes impliquant les effets maternels des gènes. En effet, il serait intéressant de mieux caractériser les fonctions des différentes isoformes d'*auts2a* maternel au cours de l'ovogenèse, et plus particulièrement celles de l'exon 2. La compréhension des régulations des séquences introniques semblent être également une piste à développer pour ce gène dont les introns représentent 98.3% de la taille totale du gène. Des analyses tel que de l'ATAC-seq et du Hi-C pourraient permettre d'identifier des régions régulatrices majeures dans les différentes configurations de la chromatine. Il serait également intéressant de comprendre les mécanismes de régulation du génome mitochondrial par *auts2a* maternel, qui semble contribuer à son inhibition. A moins que la mitochondrie compense l'absence d'*auts2a* maternel en surexprimant certains de ces gènes.

Pour mieux comprendre les fonctions et les modes d'actions d'*auts2a* au cours de l'ovogenèse, il pourrait également être utile de comparer les marques épigénétiques du génome tels que des marques de méthylation et d'acétylation des histones, à la base de la régulation de l'expression des gènes avant l'activation du génome zygotique.

Les régulations et les interactions des acteurs majeurs de la membrane basale par/avec *auts2a*/*Auts2a* décrites pour la première fois dans ce travail interrogent sur un potentiel rôle d'*auts2a* dans l'établissement de la MEC.

Afin de mieux caractériser l'impact d'*auts2a* maternel sur le comportement social des individus, il est nécessaire de reproduire des tests comportementaux sur des individus adultes sexuellement immatures et d'analyser les données de manière individuelle. Il se pourrait que comme chez l'humain, la pénétrance de la mutation ne soit pas totale, c'est-à-dire qu'uniquement une fraction des individus pourrait montrer un comportement sociale altéré.

Enfin, dans le but de démontrer que le cas d'*auts2a* n'est pas unique, des modèles similaires pour d'autres gènes exprimés dans l'ovocyte associés à des neuropathologies humaines pourraient être générés. Cela pourrait contribuer à élucider le rôle de la contribution maternelle dans la vie d'un individu, notamment en termes d'effets intergénérationnels influençant le neurodéveloppement et le comportement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aanes, Håvard, Cecilia L. Winata, Chi Ho Lin, Jieqi P. Chen, Kandhadayar G. Srinivasan, Serene G.P. Lee, Adrian Y.M. Lim, et al. 2011. « Zebrafish mRNA Sequencing Deciphers Novelty in Transcriptome Dynamics during Maternal to Zygotic Transition ». *Genome Research* 21 (8): 1328-38. <https://doi.org/10.1101/gr.116012.110>.
- Amarillo, Ina E., Wenhui Laura Li, Xinmin Li, Eric Vilain, et Sibel Kantarci. 2014. « De Novo Single Exon Deletion of *AUTS2* in a Patient with Speech and Language Disorder: A Review of Disrupted *AUTS2* and Further Evidence for Its Role in Neurodevelopmental Disorders ». *American Journal of Medical Genetics Part A* 164 (4): 958-65. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36393>.
- Araya, Claudio, Laura C. Ward, Gemma C. Girdler, et Miguel Miranda. 2016. « Coordinating Cell and Tissue Behavior during Zebrafish Neural Tube Morphogenesis: Zebrafish Neural Tube Cell and Tissue Morphogenesis ». *Developmental Dynamics* 245 (3): 197-208. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24304>.
- Babonis, Leslie S., et Mark Q. Martindale. 2017. « Phylogenetic Evidence for the Modular Evolution of Metazoan Signalling Pathways ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 372 (1713): 20150477. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0477>.
- Bader, Bernhard L., Neil Smyth, Sabine Nedbal, Nicolai Miosge, Anke Baranowsky, Sharada Mokkalapati, Monzur Murshed, et Roswitha Nischt. 2005. « Compound Genetic Ablation of Nidogen 1 and 2 Causes Basement Membrane Defects and Perinatal Lethality in Mice ». *Molecular and Cellular Biology* 25 (15): 6846-56. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.15.6846-6856.2005>.
- Ballas, Nurit, Christopher Grunseich, Diane D. Lu, Joan C. Speh, et Gail Mandel. 2005. « REST and Its Corepressors Mediate Plasticity of Neuronal Gene Chromatin throughout Neurogenesis ». *Cell* 121 (4): 645-57. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.03.013>.
- Baltz, Alexander G., Mathias Munschauer, Björn Schwanhäusser, Alexandra Vasile, Yasuhiro Murakawa, Markus Schueler, Noah Youngs, et al. 2012. « The mRNA-Bound Proteome and Its Global Occupancy Profile on Protein-Coding Transcripts ». *Molecular Cell* 46 (5): 674-90. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.05.021>.
- Bazzini, Ariel A., Miler T. Lee, et Antonio J. Giraldez. 2012. « Ribosome Profiling Shows That MiR-430 Reduces Translation Before Causing mRNA Decay in Zebrafish ». *Science* 336 (6078): 233-37. <https://doi.org/10.1126/science.1215704>.
- Bazzini, Ariel A., Florencia Viso, Miguel A. Moreno-Mateos, Timothy G. Johnstone, Charles E. Vejnár, Yidan Qin, Jun Yao, Mustafa K. Khokha, et Antonio J. Giraldez. 2016. « Codon Identity Regulates mRNA Stability and Translation Efficiency during the Maternal-to-zygotic Transition ». *The EMBO Journal* 35 (19): 2087-2103. <https://doi.org/10.15252/embj.201694699>.

- Bedogni, Francesco, Rebecca D. Hodge, Branden R. Nelson, Erika A. Frederick, Naoko Shiba, Ray A. Daza, et Robert F. Hevner. 2010. « Autism Susceptibility Candidate 2 (Aut2) Encodes a Nuclear Protein Expressed in Developing Brain Regions Implicated in Autism Neuropathology ». *Gene Expression Patterns* 10 (1): 9-15. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2009.11.005>.
- Bencan, Zachary, Damiyon Sledge, et Edward D. Levin. 2009. « Buspirone, Chlordiazepoxide and Diazepam Effects in a Zebrafish Model of Anxiety ». *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 94 (1): 75-80. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2009.07.009>.
- Ben-David, Eyal, Einat Granot-HersHKovitz, Galya Monderer-Rothkoff, Elad Lerer, Shlomit Levi, Maya Yaari, Richard P. Ebstein, Nurit Yirmiya, et Sagiv Shifman. 2011. « Identification of a Functional Rare Variant in Autism Using Genome-Wide Screen for Monoallelic Expression ». *Human Molecular Genetics* 20 (18): 3632-41. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr283>.
- Bennett, Christopher G., Kent Riemondy, Douglas A. Chapnick, Eric Bunker, Xuedong Liu, Scott Kuersten, et Rui Yi. 2016. « Genome-Wide Analysis of Musashi-2 Targets Reveals Novel Functions in Governing Epithelial Cell Migration ». *Nucleic Acids Research* 44 (8): 3788-3800. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw207>.
- Beunders, Gea, Jiddeke van de Kamp, Pradeep Vasudevan, Jenny Morton, Katrien Smets, Tjitske Kleefstra, Sonja A de Munnik, et al. 2016. « A Detailed Clinical Analysis of 13 Patients with AUTS2 Syndrome Further Delineates the Phenotypic Spectrum and Underscores the Behavioural Phenotype ». *Journal of Medical Genetics* 53 (8): 523-32. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103601>.
- Beunders, Gea, Els Voorhoeve, Christelle Golzio, Luba M. Pardo, Jill A. Rosenfeld, Michael E. Talkowski, Ingrid Simonic, et al. 2013. « Exonic Deletions in AUTS2 Cause a Syndromic Form of Intellectual Disability and Suggest a Critical Role for the C Terminus ». *The American Journal of Human Genetics* 92 (2): 210-20. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.12.011>.
- Biel, Alecia, Anthony S. Castanza, Ryan Rutherford, Summer R. Fair, Lincoln Chifamba, Jason C. Wester, Mark E. Hester, et Robert F. Hevner. 2022. « AUTS2 Syndrome: Molecular Mechanisms and Model Systems ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 15: 858582. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.858582>.
- Bisgrove, Brent W, Yi-Chu Su, et H Joseph Yost. 2017. « Maternal Gdf3 Is an Obligatory Cofactor in Nodal Signaling for Embryonic Axis Formation in Zebrafish ». *eLife* 6 (novembre): e28534. <https://doi.org/10.7554/eLife.28534>.
- Bond, Allison M., Oneil G. Bhalala, et John A. Kessler. 2012. « The Dynamic Role of Bone Morphogenetic Proteins in Neural Stem Cell Fate and Maturation ». *Developmental Neurobiology* 72 (7): 1068-84. <https://doi.org/10.1002/dneu.22022>.
- Britsch, Stefan, Derk E. Goerich, Dieter Riethmacher, Reto I. Peirano, Moritz Rossner, Klaus-Armin Nave, Carmen Birchmeier, et Michael Wegner. 2001. « The Transcription Factor Sox10 Is a Key Regulator of Peripheral Glial Development ». *Genes & Development* 15 (1): 66-78. <https://doi.org/10.1101/gad.186601>.
- Bruce, Ashley E.E., et Carl-Philipp Heisenberg. 2020. « Mechanisms of Zebrafish Epiboly: A Current View ». In *Current Topics in Developmental Biology*, 136:319-41. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2019.07.001>.

- Bruhn, Helene, Kristin Samuelsson, Florian A. Schober, Martin Engvall, Nicole Lesko, Rolf Wibom, Inger Nennesmo, et al. 2021. « Novel Mutation m.10372A>G in *MT-ND3* Causing Sensorimotor Axonal Polyneuropathy ». *Neurology Genetics* 7 (2): e566. <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000566>.
- Campbell, Philip D., Amanda E. Heim, Mordechai Z. Smith, et Florence L. Marlow. 2015. « Kinesin-1 Interacts with Bucky Ball to Form Germ Cells and Is Required to Pattern the Zebrafish Body Axis ». *Development*, janvier, dev.124586. <https://doi.org/10.1242/dev.124586>.
- Castanheira, Maria Filipa, Marcelino Herrera, Benjamín Costas, Luís E. C. Conceição, et Catarina I. M. Martins. 2013. « Can We Predict Personality in Fish? Searching for Consistency over Time and across Contexts ». Édité par Patrick Callaerts. *PLoS ONE* 8 (4): e62037. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062037>.
- Castanza, Anthony S, Sanja Ramirez, Prem P Tripathi, Ray A M Daza, Franck K Kalume, Jan-Marino Ramirez, et Robert F Hevner. 2021a. « *AUTS2* Regulates RNA Metabolism and Dentate Gyrus Development in Mice ». *Cerebral Cortex*, mai, bhab124. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhab124>.
- Castanza, Anthony S., Sanja Ramirez, Prem P. Tripathi, Ray A. M. Daza, Franck K. Kalume, Jan-Marino Ramirez, et Robert F. Hevner. 2021b. « *AUTS2* Regulates RNA Metabolism and Dentate Gyrus Development in Mice ». *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)* 31 (10): 4808-24. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhab124>.
- Chan, Shun Hang, Yin Tang, Liyun Miao, Hiba Darwich-Codore, Charles E. Vejnar, Jean-Denis Beaudoin, Damir Musaev, et al. 2019. « *Brd4* and *P300* Confer Transcriptional Competency during Zygotic Genome Activation ». *Developmental Cell* 49 (6): 867-881.e8. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.05.037>.
- Chang, Hyeshik, Jinah Yeo, Jeong-gyun Kim, Hyunjoon Kim, Jaechul Lim, Mihye Lee, Hyun Ho Kim, et al. 2018. « Terminal Uridyltransferases Execute Programmed Clearance of Maternal Transcriptome in Vertebrate Embryos ». *Molecular Cell* 70 (1): 72-82.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.03.004>.
- Charlesworth, Amanda, Anna Wilczynska, Prajitha Thampi, Linda L Cox, et Angus M MacNicol. 2006. « *Musashi* Regulates the Temporal Order of mRNA Translation during *Xenopus* Oocyte Maturation ». *The EMBO Journal* 25 (12): 2792-2801. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601159>.
- Chen, Shaowei, Xiao Yao, Yuwen Li, Zubaida Saifudeen, Dimcho Bachvarov, et Samir S. El-Dahr. 2015. « Histone Deacetylase 1 and 2 Regulate Wnt and P53 Pathways in the Ureteric Bud Epithelium ». *Development* 142 (6): 1180-92. <https://doi.org/10.1242/dev.113506>.
- Chen, Yun-Hsiang, Ding-Lieh Liao, Chih-Hao Lai, et Chia-Hsiang Chen. 2013. « Genetic Analysis of *AUTS2* as a Susceptibility Gene of Heroin Dependence ». *Drug and Alcohol Dependence* 128 (3): 238-42. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2012.08.029>.
- Chong, Jayhong A, José Tapia-Ramirez, Sandra Kim, Juan J Toledo-Aral, Yingcong Zheng, Michael C Boutros, Yelena M Altshuller, Michael A Frohman, Susan D Kraner, et Gail Mandel. 1995. « REST: A Mammalian Silencer Protein That Restricts Sodium Channel Gene Expression to Neurons ». *Cell* 80 (6): 949-57. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90298-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90298-8).
- Colson, Violaine, Morgane Cousture, Danielle Damasceno, Claudiane Valotaire, Thaovi Nguyen, Aurélie Le Cam, et Julien Bobe. 2019. « Maternal Temperature Exposure Impairs

- Emotional and Cognitive Responses and Triggers Dysregulation of Neurodevelopment Genes in Fish ». *PeerJ* 7 (janvier): e6338. <https://doi.org/10.7717/peerj.6338>.
- Dang, Yanna, Shuang Li, Panpan Zhao, Lieying Xiao, Lefeng Wang, Yan Shi, Lei Luo, Shaohua Wang, Huanan Wang, et Kun Zhang. 2022. « The Lysine Deacetylase Activity of Histone Deacetylases 1 and 2 Is Required to Safeguard Zygotic Genome Activation in Mice and Cattle ». *Development* 149 (11): dev200854. <https://doi.org/10.1242/dev.200854>.
- de la Barra F, Skoknic V, Alliende A, Raimann E, Cortes F, Lacassie Y (1986) [Twins with autism and mental retardation associated with balanced (7;20) chromosomal translocation]. *Rev Chil Pediatr* 57:549–554
- De Michele, Giovanna, Pierpaolo Sorrentino, Claudia Nesti, Anna Rubegni, Lucia Ruggiero, Silvio Peluso, Antonella Antenora, et al. 2018. « Reversible Valproate-Induced Subacute Encephalopathy Associated With a MT-ATP8 Variant in the Mitochondrial Genome ». *Frontiers in Neurology* 9 (août): 728. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00728>.
- Despic, Vladimir, Mario Dejung, Mengting Gu, Jayanth Krishnan, Jing Zhang, Lydia Herzel, Korinna Straube, Mark B. Gerstein, Falk Butter, et Karla M. Neugebauer. 2017. « Dynamic RNA–Protein Interactions Underlie the Zebrafish Maternal-to-Zygotic Transition ». *Genome Research* 27 (7): 1184-94. <https://doi.org/10.1101/gr.215954.116>.
- DeTolla, L. J., S. Srinivas, B. R. Whitaker, C. Andrews, B. Hecker, A. S. Kane, et R. Reimschuessel. 1995. « Guidelines for the Care and Use of Fish in Research ». *ILAR Journal* 37 (4): 159-73. <https://doi.org/10.1093/ilar.37.4.159>.
- Dingwall, Colin, Stephen V. Sharnick, et Ronald A. Laskey. 1982. « A Polypeptide Domain That Specifies Migration of Nucleoplasmin into the Nucleus ». *Cell* 30 (2): 449-58. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90242-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90242-2).
- Eaton, L., E.J. Edmonds, T.B. Henry, D.L. Snellgrove, et K.A. Sloman. 2015. « Mild Maternal Stress Disrupts Associative Learning and Increases Aggression in Offspring ». *Hormones and Behavior* 71 (mai): 10-15. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.03.005>.
- Eaton, R.C., R.K.K. Lee, et M.B. Foreman. 2001. « The Mauthner Cell and Other Identified Neurons of the Brainstem Escape Network of Fish ». *Progress in Neurobiology* 63 (4): 467-85. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(00\)00047-2](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(00)00047-2).
- Egger, Gerald, Katharina M. Roetzer, Abdul Noor, Anath C. Lionel, Huda Mahmood, Thomas Schwarzbraun, Oliver Boright, et al. 2014. « Identification of Risk Genes for Autism Spectrum Disorder through Copy Number Variation Analysis in Austrian Families ». *Neurogenetics* 15 (2): 117-27. <https://doi.org/10.1007/s10048-014-0394-0>.
- Elia, J, X Gai, H M Xie, J C Perin, E Geiger, J T Glessner, M D'arcy, et al. 2010. « Rare Structural Variants Found in Attention-Deficit Hyperactivity Disorder Are Preferentially Associated with Neurodevelopmental Genes ». *Molecular Psychiatry* 15 (6): 637-46. <https://doi.org/10.1038/mp.2009.57>.
- Force, A., M. Lynch, F. B. Pickett, A. Amores, Y. L. Yan, et J. Postlethwait. 1999. « Preservation of Duplicate Genes by Complementary, Degenerative Mutations ». *Genetics* 151 (4): 1531-45. <https://doi.org/10.1093/genetics/151.4.1531>.

- Fuentes, Ricardo, Benjamin Tajer, Manami Kobayashi, Jose L. Pelliccia, Yvette Langdon, Elliott W. Abrams, et Mary C. Mullins. 2020. « The Maternal Coordinate System: Molecular-Genetics of Embryonic Axis Formation and Patterning in the Zebrafish ». In *Current Topics in Developmental Biology*, 140:341-89. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2020.05.002>.
- Fumey, Julien, Hélène Hinaux, C  line Noirot, Claude Thermes, Sylvie Rétaux, et Didier Casane. 2018. « Evidence for Late Pleistocene Origin of *Astyanax Mexicanus* Cavefish ». *BMC Evolutionary Biology* 18 (1): 43. <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1156-7>.
- Gao, Zhonghua, Pedro Lee, James M. Stafford, Melanie von Schimmelmann, Anne Schaefer, et Danny Reinberg. 2014. « An AUTS2–Polycomb Complex Activates Gene Expression in the CNS ». *Nature* 516 (7531): 349-54. <https://doi.org/10.1038/nature13921>.
- Gao, Zhonghua, Jin Zhang, Roberto Bonasio, Francesco Strino, Ayana Sawai, Fabio Parisi, Yuval Kluger, et Danny Reinberg. 2012. « PCGF Homologs, CBX Proteins, and RYBP Define Functionally Distinct PRC1 Family Complexes ». *Molecular Cell* 45 (3): 344-56. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.01.002>.
- Garesse, Rafael, et Carmen G. Vallejo. 2001. « Animal Mitochondrial Biogenesis and Function: A Regulatory Cross-Talk between Two Genomes ». *Gene* 263 (1-2): 1-16. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00582-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00582-5).
- Ge, Xiaoyan, Danielle Grotjahn, Elaine Welch, Jamie Lyman-Gingerich, Christiana Holguin, Eva Dimitrova, Elliot W. Abrams, et al. 2014. « Hecate/Grip2a Acts to Reorganize the Cytoskeleton in the Symmetry-Breaking Event of Embryonic Axis Induction ».   dit   par Gregory S. Barsh. *PLoS Genetics* 10 (6): e1004422. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004422>.
- Girirajan, Santhosh, Zoran Brkanac, Bradley P. Coe, Carl Baker, Laura Vives, Tiffany H. Vu, Neil Shafer, et al. 2011. « Relative Burden of Large CNVs on a Range of Neurodevelopmental Phenotypes ».   dit   par Harry T. Orr. *PLoS Genetics* 7 (11): e1002334. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002334>.
- Green, David, Amy E. Whitener, Saurav Mohanty, et Arne C. Lekven. 2015. « Vertebrate Nervous System Posteriorization: Grading the Function of Wnt Signaling: Wnt Signaling and Neural Posteriorization ». *Developmental Dynamics* 244 (3): 507-12. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24230>.
- Gropman, Andrea L., et Mark L. Batshaw. 2010. « Epigenetics, Copy Number Variation, and Other Molecular Mechanisms Underlying Neurodevelopmental Disabilities: New Insights and Diagnostic Approaches ». *Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics* 31 (7): 582-91. <https://doi.org/10.1097/DBP.0b013e3181ee384e>.
- Gross-Thebing, Theresa, Azadeh Paksa, et Erez Raz. 2014. « Simultaneous High-Resolution Detection of Multiple Transcripts Combined with Localization of Proteins in Whole-Mount Embryos ». *BMC Biology* 12 (ao  t): 55. <https://doi.org/10.1186/s12915-014-0055-7> (consult   le 14/06/2021).
- Hanson, Gavin, et Jeff Collier. 2018. « Codon Optimality, Bias and Usage in Translation and mRNA Decay ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19 (1): 20-30. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.91>.

- Harvey, Steven A., Ian Sealy, Ross Kettleborough, Fruzsina Fenyés, Richard White, Derek Stemple, et James C. Smith. 2013. « Identification of the Zebrafish Maternal and Paternal Transcriptomes ». *Development* 140 (13): 2703-10. <https://doi.org/10.1242/dev.095091>.
- Hasley, Andrew, Shawn Chavez, Michael Danilchik, Martin Wühr, et Francisco Pelegri. 2017. « Vertebrate Embryonic Cleavage Pattern Determination ». In *Vertebrate Development*, édité par Francisco Pelegri, Michael Danilchik, et Ann Sutherland, 953:117-71. Advances in Experimental Medicine and Biology. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-46095-6_4.
- Hatstat, A. Katherine, Hannah D. Ahrendt, Matthew W. Foster, Leland Mayne, M. Arthur Moseley, S. Walter Englander, et Dewey G. McCafferty. 2021. « Characterization of Small-Molecule-Induced Changes in Parkinson's-Related Trafficking via the Nedd4 Ubiquitin Signaling Cascade ». *Cell Chemical Biology* 28 (1): 14-25.e9. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2020.10.008>.
- He, Xionglei, et Jianzhi Zhang. 2005. « Rapid Subfunctionalization Accompanied by Prolonged and Substantial Neofunctionalization in Duplicate Gene Evolution ». *Genetics* 169 (2): 1157-64. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.037051>.
- Helde et Grunwald. 1993. "The DVR-1 (VG1) Transcript of Zebrafish is Maternally Supplied and Distributed throughout the embryo". *Developmental Biology*.
- Hibi, Masahiko, Koji Matsuda, Miki Takeuchi, Takashi Shimizu, et Yasunori Murakami. 2017. « Evolutionary Mechanisms That Generate Morphology and Neural-Circuit Diversity of the Cerebellum ». *Development, Growth & Differentiation* 59 (4): 228-43. <https://doi.org/10.1111/dgd.12349>.
- Hicks, Steven D., et Frank A. Middleton. 2016. « A Comparative Review of MicroRNA Expression Patterns in Autism Spectrum Disorder ». *Frontiers in Psychiatry* 7 (novembre). <https://doi.org/10.3389/fpsy.2016.00176>.
- Hino, Hiromu, Akiko Nakanishi, Ryoko Seki, Tsubasa Aoki, Etsuro Yamaha, Atsuo Kawahara, Takashi Shimizu, et Masahiko Hibi. 2018. « Roles of Maternal Wnt8a Transcripts in Axis Formation in Zebrafish ». *Developmental Biology* 434 (1): 96-107. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.11.016>.
- Hong, Xiangsheng, et Jinmiao Zha. 2019. « Fish Behavior: A Promising Model for Aquatic Toxicology Research ». *Science of The Total Environment* 686 (octobre): 311-21. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.028>.
- Hori, Kei, Taku Nagai, Wei Shan, Asami Sakamoto, Manabu Abe, Maya Yamazaki, Kenji Sakimura, Kiyofumi Yamada, et Mikio Hoshino. 2015. « Heterozygous Disruption of Autism Susceptibility Candidate 2 Causes Impaired Emotional Control and Cognitive Memory ». Édité par Takeo Yoshikawa. *PLOS ONE* 10 (12): e0145979. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145979>.
- Hori, Kei, Taku Nagai, Wei Shan, Asami Sakamoto, Shinichiro Taya, Ryoya Hashimoto, Takashi Hayashi, et al. 2014a. « Cytoskeletal Regulation by AUTS2 in Neuronal Migration and Neurogenesis ». *Cell Reports* 9 (6): 2166-79. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.11.045>.
- Hori, Kei, Kazumi Shimaoka, et Mikio Hoshino. 2021. « AUTS2 Gene: Keys to Understanding the Pathogenesis of Neurodevelopmental Disorders ». *Cells* 11 (1): 11. <https://doi.org/10.3390/cells11010011>.

- Hori, Kei, Kunihiro Yamashiro, Taku Nagai, Wei Shan, Saki F. Egusa, Kazumi Shimaoka, Hiroshi Kuniishi, et al. 2020. « AUTS2 Regulation of Synapses for Proper Synaptic Inputs and Social Communication ». *iScience* 23 (6): 101183. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101183>.
- Ignatius, Myron S., Arife Unal Eroglu, Smitha Malireddy, Glen Gallagher, Roopa M. Nambiar, et Paul D. Henion. 2013. « Distinct Functional and Temporal Requirements for Zebrafish Hdac1 during Neural Crest-Derived Craniofacial and Peripheral Neuron Development ». Édité par Henry H. Roehl. *PLoS ONE* 8 (5): e63218. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063218>.
- Ikenaga, Takanori, Masayuki Yoshida, et Kazumasa Uematsu. 2006. « Cerebellar Efferent Neurons in Teleost Fish ». *Cerebellum (London, England)* 5 (4): 268-74. <https://doi.org/10.1080/14734220600930588>.
- Imai, Yoshiyuki, Michael A. Gates, Anna E. Melby, David Kimelman, Alexander F. Schier, et William S. Talbot. 2001. « The Homeobox Genes *Vox* and *Vent* Are Redundant Repressors of Dorsal Fates in Zebrafish ». *Development* 128 (12): 2407-20. <https://doi.org/10.1242/dev.128.12.2407>.
- Inoue, Jun, Yukuto Sato, Robert Sinclair, Katsumi Tsukamoto, et Mutsumi Nishida. 2015. « Rapid Genome Reshaping by Multiple-Gene Loss after Whole-Genome Duplication in Teleost Fish Suggested by Mathematical Modeling ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (48): 14918-23. <https://doi.org/10.1073/pnas.1507669112>.
- Ishikawa, K.-i. 1997. « Prediction of the Coding Sequences of Unidentified Human Genes. VIII. 78 New CDNA Clones from Brain Which Code for Large Proteins in Vitro ». *DNA Research* 4 (5): 307-13. <https://doi.org/10.1093/dnares/4.5.307>.
- Ivanova, Ivayla, Christian Much, Monica Di Giacomo, Chiara Azzi, Marcos Morgan, Pedro N. Moreira, Jack Monahan, Claudia Carrieri, Anton J. Enright, et Dónal O'Carroll. 2017. « The RNA m6A Reader YTHDF2 Is Essential for the Post-Transcriptional Regulation of the Maternal Transcriptome and Oocyte Competence ». *Molecular Cell* 67 (6): 1059-1067.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.08.003>.
- Iwamatsu, Takashi. 2004. « Stages of Normal Development in the Medaka *Oryzias Latipes* ». *Mechanisms of Development* 121 (7-8): 605-18. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2004.03.012>.
- Jha, Urvashi, Igor Kondrychyn, Vladimir Korzh, et Vatsala Thirumalai. 2021. « High Behavioral Variability Mediated by Altered Neuronal Excitability in *Auts2* Mutant Zebrafish ». *Eneuro* 8 (5): ENEURO.0493-20.2021. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0493-20.2021>.
- Joseph, Shai R, Máté Pálffy, Lennart Hilbert, Mukesh Kumar, Jens Karschau, Vasily Zaburdaev, Andrej Shevchenko, et Nadine L Vastenhouw. 2017. « Competition between Histone and Transcription Factor Binding Regulates the Onset of Transcription in Zebrafish Embryos ». *ELife* 6 (avril): e23326. <https://doi.org/10.7554/eLife.23326>.
- Kalscheuer, Vera M., David FitzPatrick, Niels Tommerup, Merete Bugge, Erik Niebuhr, Luitgard M. Neumann, Andreas Tzschach, et al. 2007. « Mutations in Autism Susceptibility Candidate 2 (AUTS2) in Patients with Mental Retardation ». *Human Genetics* 121 (3-4): 501-9. <https://doi.org/10.1007/s00439-006-0284-0>.
- Kane, Donald A, et Charles B Kimmel. 1993. « The Zebrafish Midblastula Transition », 10.

- Kane, Donald A., Karen N. McFarland, et Rachel M. Warga. 2005. « Mutations in *Half Baked* /E-Cadherin Block Cell Behaviors That Are Necessary for Teleost Epiboly ». *Development* 132 (5): 1105-16. <https://doi.org/10.1242/dev.01668>.
- Kapp, Lee D., Elliott W. Abrams, Florence L. Marlow, et Mary C. Mullins. 2013. « The Integrator Complex Subunit 6 (Ints6) Confines the Dorsal Organizer in Vertebrate Embryogenesis ». Édité par Gregory S. Barsh. *PLoS Genetics* 9 (10): e1003822. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003822>.
- Kelly, Daniel P., et Richard C. Scarpulla. 2004. « Transcriptional Regulatory Circuits Controlling Mitochondrial Biogenesis and Function ». *Genes & Development* 18 (4): 357-68. <https://doi.org/10.1101/gad.1177604>.
- Kersigo, Jennifer, Ning Pan, Joseph D. Lederman, Snehajyoti Chatterjee, Ted Abel, Gabriela Pavlinkova, Immaculada Silos-Santiago, et Bernd Fritzsche. 2018. « A RNAscope Whole Mount Approach That Can Be Combined with Immunofluorescence to Quantify Differential Distribution of mRNA ». *Cell and Tissue Research* 374 (2): 251-62. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2864-4> (consulté le 24/07/2021).
- Kok, Fatma O., Andrew Taibi, Sarah J. Wanner, Xiayang Xie, Cara E. Moravec, Crystal E. Love, Victoria E. Prince, Jeff S. Mumm, et Howard I. Sirotkin. 2012. « Zebrafish *Rest* Regulates Developmental Gene Expression but Not Neurogenesis ». *Development* 139 (20): 3838-48. <https://doi.org/10.1242/dev.080994>.
- Kondrychyn, I., L. Robra, et V. Thirumalai. 2017. « Transcriptional Complexity and Distinct Expression Patterns of *Auts2* Paralogs in *Danio Rerio* ». *G3 (Bethesda, Md.)* 7 (8): 2577-93. <https://doi.org/10.1534/g3.117.042622>.
- Lee, Miler T., Ashley R. Bonneau, Carter M. Takacs, Ariel A. Bazzini, Kate R. DiVito, Elizabeth S. Fleming, et Antonio J. Giraldez. 2013. « *Nanog*, *Pou5f1* and *SoxB1* Activate Zygotic Gene Expression during the Maternal-to-Zygotic Transition ». *Nature* 503 (7476): 360-64. <https://doi.org/10.1038/nature12632>.
- Lin, Zhijie, Zhou Yang, Ruiling Xie, Zeyang Ji, Kunliang Guan, et Mingjie Zhang. 2019. « Decoding WW Domain Tandem-Mediated Target Recognitions in Tissue Growth and Cell Polarity ». *ELife* 8 (septembre): e49439. <https://doi.org/10.7554/eLife.49439>.
- Liu, Sanxiong, Kimberly A. Aldinger, Chi Vicky Cheng, Takae Kiyama, Mitali Dave, Hanna K. McNamara, Wukui Zhao, et al. 2021. « *NRF1* Association with *AUTS2*-Polycomb Mediates Specific Gene Activation in the Brain ». *Molecular Cell* 81 (22): 4663-4676.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.09.020>.
- Lorch, Yahli, Janice W. LaPointe, et Roger D. Kornberg. 1987. « Nucleosomes Inhibit the Initiation of Transcription but Allow Chain Elongation with the Displacement of Histones ». *Cell* 49 (2): 203-10. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90561-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90561-7).
- Lord, Catherine, Mayada Elsabbagh, Gillian Baird, et Jeremy Veenstra-Vanderweele. 2018. « Autism Spectrum Disorder ». *The Lancet* 392 (10146): 508-20. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31129-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31129-2).
- Luan, Zhilin, Tianlan Lu, Yanyan Ruan, Weihua Yue, et Dai Zhang. 2016. « The Human *MSI2* Gene Is Associated with Schizophrenia in the Chinese Han Population ». *Neuroscience Bulletin* 32 (3): 239-45. <https://doi.org/10.1007/s12264-016-0026-9>.

- Lucon-Xiccato, Tyrone, Francesca Conti, Felix Loosli, Nicholas S. Foulkes, et Cristiano Bertolucci. 2020. « Development of Open-Field Behaviour in the Medaka, *Oryzias Latipes* ». *Biology* 9 (11): 389. <https://doi.org/10.3390/biology9110389>.
- Lucon-Xiccato, Tyrone, Felix Loosli, Francesca Conti, Nicholas S. Foulkes, et Cristiano Bertolucci. 2022. « Comparison of Anxiety-like and Social Behaviour in Medaka and Zebrafish ». *Scientific Reports* 12 (1): 10926. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14978-1>.
- Ma, Pengpeng, et Richard M Schultz. 2009. « Histone Deacetylase 1 (HDAC1) Regulates Histone Acetylation, Development, and Gene Expression in Preimplantation Mouse Embryos ».
- Marchand, Marion, Catherine Monnot, Laurent Muller, et Stéphane Germain. 2019. « Extracellular Matrix Scaffolding in Angiogenesis and Capillary Homeostasis ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 89 (mai): 147-56. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2018.08.007>.
- Matsunaga, Wataru, et Eiji Watanabe. 2010. « Habituation of Medaka (*Oryzias Latipes*) Demonstrated by Open-Field Testing ». *Behavioural Processes* 85 (2): 142-50. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2010.06.019>.
- Maximino, Caio, Thiago Marques de Brito, Annanda Waneza da Silva Batista, Anderson Manoel Herculano, Silvio Morato, et Amauri Gouveia. 2010. « Measuring Anxiety in Zebrafish: A Critical Review ». *Behavioural Brain Research* 214 (2): 157-71. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.05.031>.
- Mefford, Heather C., Hiltrud Muhle, Philipp Ostertag, Sarah von Spiczak, Karen Buysse, Carl Baker, Andre Franke, et al. 2010. « Genome-Wide Copy Number Variation in Epilepsy: Novel Susceptibility Loci in Idiopathic Generalized and Focal Epilepsies ». Édité par Wayne N. Frankel. *PLoS Genetics* 6 (5): e1000962. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000962>.
- Mehler, Mark F, Peter C Mabie, Damin Zhang, et John A Kessler. s. d. « Bone Morphogenetic Proteins in the Nervous System ».
- Meyers, Emily A., et John A. Kessler. 2017a. « TGF- β Family Signaling in Neural and Neuronal Differentiation, Development, and Function ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 9 (8): a022244. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022244>.
- Mollaaghababa, Ramin, et William J Pavan. 2003. « The Importance of Having Your SOX on: Role of SOX10⁺ in the Development of Neural Crest-Derived Melanocytes and Glia ». *Oncogene* 22 (20): 3024-34. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206442>.
- Monderer-Rothkoff, Galya, Nitzan Tal, Marina Risman, Odem Shani, Malka Nissim-Rafinia, Laura Malki-Feldman, Vera Medvedeva, Matthias Groszer, Eran Meshorer, et Sagiv Shifman. 2019. « AUTS2 Isoforms Control Neuronal Differentiation ». *Molecular Psychiatry*, avril. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0409-1>.
- Montague, Tessa G., James A. Gagnon, et Alexander F. Schier. 2018. « Conserved Regulation of Nodal-Mediated Left-Right Patterning in Zebrafish and Mouse ». *Development*, janvier, dev.171090. <https://doi.org/10.1242/dev.171090>.
- Montero, Juan-Antonio, Lara Carvalho, Michaela Wilsch-Bräuninger, Beate Kilian, Chigdem Mustafa, et Carl-Philipp Heisenberg. 2005. « Shield Formation at the Onset of Zebrafish Gastrulation ». *Development* 132 (6): 1187-98. <https://doi.org/10.1242/dev.01667>.

- Moravec, Cara E., John Samuel, Wei Weng, Ian C. Wood, et Howard I. Sirotkin. 2016. « Maternal Rest/Nrsf Regulates Zebrafish Behavior through *Snap25a/b* ». *The Journal of Neuroscience* 36 (36): 9407-19. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1246-16.2016>.
- Mulligan, Kimberly A., et Benjamin N.R. Cheyette. 2016. « Neurodevelopmental Perspectives on Wnt Signaling in Psychiatry ». *Complex Psychiatry* 2 (4): 219-46. <https://doi.org/10.1159/000453266>.
- Na, Ji-Hoon, Min Jung Lee, Chul Ho Lee, et Young-Mock Lee. 2021. « Association Between Epilepsy and Leigh Syndrome With MT-ND3 Mutation, Particularly the m.10191T>C Point Mutation ». *Frontiers in Neurology* 12 (décembre): 752467. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.752467>.
- Nagamani, Sandesh C S, Ayelet Erez, Bruria Ben-Zeev, Moshe Frydman, Susan Winter, Robert Zeller, Dima El-Khechen, et al. 2013. « Detection of Copy-Number Variation in AUTS2 Gene by Targeted Exonic Array CGH in Patients with Developmental Delay and Autistic Spectrum Disorders ». *European Journal of Human Genetics* 21 (3): 343-46. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2012.157>.
- Nojima, Hideaki, Sophie Rothhämel, Takashi Shimizu, Cheol-Hee Kim, Shigenobu Yonemura, Florence L. Marlow, et Masahiko Hibi. 2010. « Syntabulin, a Motor Protein Linker, Controls Dorsal Determination ». *Development* 137 (6): 923-33. <https://doi.org/10.1242/dev.046425>.
- Nolte, Dagmar, Jun-Suk Kang, Amrei Hofmann, Eva Schwaab, Heidrun H. Krämer, et Ulrich Müller. 2021. « Mutations in MT-ATP6 Are a Frequent Cause of Adult-Onset Spinocerebellar Ataxia ». *Journal of Neurology* 268 (12): 4866-73. <https://doi.org/10.1007/s00415-021-10607-5>.
- Oksenberg, N, G D E Haliburton, W L Eckalbar, I Oren, S Nishizaki, K Murphy, K S Pollard, R Y Birnbaum, et N Ahituv. 2014. « Genome-Wide Distribution of AutS2 Binding Localizes with Active Neurodevelopmental Genes ». *Translational Psychiatry* 4 (9): e431-e431. <https://doi.org/10.1038/tp.2014.78>.
- Oksenberg, Nir, Laurie Stevison, Jeffrey D. Wall, et Nadav Ahituv. 2013. « Function and Regulation of AUTS2, a Gene Implicated in Autism and Human Evolution ». Édité par James Noonan. *PLoS Genetics* 9 (1): e1003221. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003221>.
- Ozsoy, Filiz, Nevin Balci Karakus, Serbulent Yigit, et Muberra Kulu. 2020. « Effect of AUTS2 Gene Rs6943555 Variant in Male Patients with Schizophrenia in a Turkish Population ». *Gene* 756 (septembre): 144913. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144913>.
- Palumbo, Pietro, Ester Di Muro, Maria Accadia, Mario Benvenuto, Marilena Carmela Di Giacomo, Stefano Castellana, Tommaso Mazza, Marco Castori, Orazio Palumbo, et Massimo Carella. 2021. « Whole Exome Sequencing Reveals a Novel AUTS2 In-Frame Deletion in a Boy with Global Developmental Delay, Absent Speech, Dysmorphic Features, and Cerebral Anomalies ». *Genes* 12 (2): 229. <https://doi.org/10.3390/genes12020229>.
- Pasquier, Jeremy, Ingo Braasch, Peter Batzel, Cedric Cabau, Jérôme Montfort, Thaovi Nguyen, Elodie Jouanno, et al. 2017. « Evolution of Gene Expression after Whole-Genome Duplication: New Insights from the Spotted Gar Genome ». *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 328 (7): 709-21. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22770>.

- Petrussa, Elisa, Alberto Bertolini, Valentino Casolo, Jana Krajiňáková, Francesco Macrì, et Angelo Vianello. 2009. « Mitochondrial Bioenergetics Linked to the Manifestation of Programmed Cell Death during Somatic Embryogenesis of *Abies Alba* ». *Planta* 231 (1): 93-107. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-1028-x>.
- Pinheiro, Diana, et Carl-Philipp Heisenberg. 2020. « Zebrafish Gastrulation: Putting Fate in Motion ». In *Current Topics in Developmental Biology*, 136:343-75. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2019.10.009>.
- Pinto, Dalila, Alistair T. Pagnamenta, Lambertus Klei, Richard Anney, Daniele Merico, Regina Regan, Judith Conroy, et al. 2010. « Functional Impact of Global Rare Copy Number Variation in Autism Spectrum Disorders ». *Nature* 466 (7304): 368-72. <https://doi.org/10.1038/nature09146>.
- Rabani, Michal, Lindsey Pieper, Guo-Liang Chew, et Alexander F. Schier. 2017. « A Massively Parallel Reporter Assay of 3' UTR Sequences Identifies In Vivo Rules for mRNA Degradation ». *Molecular Cell* 68 (6): 1083-1094.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.11.014>.
- Rios, Iria, Rubén Alvarez-Rodríguez, Elisa Martí, et Sebastián Pons. 2004. « Bmp2 Antagonizes Sonic Hedgehog-Mediated Proliferation of Cerebellar Granule Neurons through Smad5 Signalling ». *Development* 131 (13): 3159-68. <https://doi.org/10.1242/dev.01188>.
- Roche, Daniel P., Katie E. McGhee, et Alison M. Bell. 2012. « Maternal Predator-Exposure Has Lifelong Consequences for Offspring Learning in Threespined Sticklebacks ». *Biology Letters* 8 (6): 932-35. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2012.0685>.
- Salichs, Eulàlia, Alice Ledda, Loris Mularoni, M. Mar Albà, et Susana de la Luna. 2009. « Genome-Wide Analysis of Histidine Repeats Reveals Their Role in the Localization of Human Proteins to the Nuclear Speckles Compartment ». Édité par Nicholas Katsanis. *PLoS Genetics* 5 (3): e1000397. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000397>.
- Salmivirta, Katriina, Jan F. Talts, Magnus Olsson, Takako Sasaki, Rupert Timpl, et Peter Ekblom. 2002. « Binding of Mouse Nidogen-2 to Basement Membrane Components and Cells and Its Expression in Embryonic and Adult Tissues Suggest Complementary Functions of the Two Nidogens ». *Experimental Cell Research* 279 (2): 188-201. <https://doi.org/10.1006/excr.2002.5611>.
- Sanchez-Jimeno, Carolina, Fiona Blanco-Kelly, Fermina López-Grondona, Rebeca Losada-Del Pozo, Beatriz Moreno, María Rodrigo-Moreno, Elena Martínez-Cayuelas, et al. 2021. « Attention Deficit Hyperactivity and Autism Spectrum Disorders as the Core Symptoms of AUTS2 Syndrome: Description of Five New Patients and Update of the Frequency of Manifestations and Genotype-Phenotype Correlation ». *Genes* 12 (9): 1360. <https://doi.org/10.3390/genes12091360>.
- Sandin, Sven, Paul Lichtenstein, Ralf Kuja-Halkola, Henrik Larsson, Christina M. Hultman, et Abraham Reichenberg. 2014. « The Familial Risk of Autism ». *JAMA* 311 (17): 1770. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.4144>.
- Scarpulla, Richard C. 2011. « Metabolic Control of Mitochondrial Biogenesis through the PGC-1 Family Regulatory Network ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1813 (7): 1269-78. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.09.019>.

- Schmid, Susanne, Donald A. Wilson, et Catharine H. Rankin. 2015. « Habituation Mechanisms and Their Importance for Cognitive Function ». *Frontiers in Integrative Neuroscience* 8 (janvier). <https://doi.org/10.3389/fnint.2014.00097>.
- Schneider, Patricia N., Diane C. Slusarski, et Douglas W. Houston. 2012. « Differential Role of Axin RGS Domain Function in Wnt Signaling during Anteroposterior Patterning and Maternal Axis Formation ». Édité par Michael Klymkowsky. *PLoS ONE* 7 (9): e44096. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044096>.
- Schultz, Laura E., Jeffrey A. Haltom, Maira P. Almeida, Wesley A. Wierson, Staci L. Solin, Trevor J. Weiss, Jordan A. Helmer, Elizabeth J. Sandquist, Heather R. Shive, et Maura McGrail. 2018. « Epigenetic Regulators Rbbp4 and Hdac1 Are Overexpressed in a Zebrafish Model of RB1 Embryonal Brain Tumor, and Are Required for Neural Progenitor Survival and Proliferation ». *Disease Models & Mechanisms* 11 (6): dmm034124. <https://doi.org/10.1242/dmm.034124>.
- Schumann, G., L. J. Coin, A. Lourdasamy, P. Charoen, K. H. Berger, D. Stacey, S. Desrivieres, et al. 2011. « Genome-Wide Association and Genetic Functional Studies Identify Autism Susceptibility Candidate 2 Gene (AUTS2) in the Regulation of Alcohol Consumption ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (17): 7119-24. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017288108>.
- Sebat, Jonathan, B. Lakshmi, Dheeraj Malhotra, Jennifer Troge, Christa Lese-Martin, Tom Walsh, Boris Yamrom, et al. 2007. « Strong Association of De Novo Copy Number Mutations with Autism ». *Science* 316 (5823): 445-49. <https://doi.org/10.1126/science.1138659>.
- Sellers, Robert A., David L. Robertson, et May Tassabehji. 2020. « Ancestry of the AUTS2 Family—A Novel Group of Polycomb-Complex Proteins Involved in Human Neurological Disease ». Édité par Qasim Ayub. *PLOS ONE* 15 (12): e0232101. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232101>.
- Shaikh, Tamim H. 2017. « Copy Number Variation Disorders ». *Current Genetic Medicine Reports* 5 (4): 183-90. <https://doi.org/10.1007/s40142-017-0129-2>.
- Shindo, Yuki, et Amanda A. Amodeo. 2019. « Dynamics of Free and Chromatin-Bound Histone H3 during Early Embryogenesis ». *Current Biology* 29 (2): 359-366.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.12.020>.
- Smedley, Damian, Syed Haider, Steffen Durinck, Luca Pandini, Paolo Provero, James Allen, Olivier Arnaiz, et al. 2015. « The BioMart Community Portal: An Innovative Alternative to Large, Centralized Data Repositories ». *Nucleic Acids Research* 43 (W1): W589-98. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv350>.
- Spector, D. L., et A. I. Lamond. 2011. « Nuclear Speckles ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (2): a000646-a000646. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000646>.
- Sultana, Razia, Chang-En Yu, Jun Yu, Jeffery Munson, Donghui Chen, Wenhui Hua, Annette Estes, et al. 2002. « Identification of a Novel Gene on Chromosome 7q11.2 Interrupted by a Translocation Breakpoint in a Pair of Autistic Twins ». *Genomics* 80 (2): 129-34. <https://doi.org/10.1006/geno.2002.6810>.
- Sun, Jiawei, Lu Yan, Weimin Shen, et Anming Meng. 2018. « Maternal Ybx1 Safeguards Zebrafish Oocyte Maturation and Maternal-to-Zygotic Transition by Repressing Global Translation ». *Development*, janvier, dev.166587. <https://doi.org/10.1242/dev.166587>.

- Tadros, Wael, et Howard D. Lipshitz. 2009. « The Maternal-to-Zygotic Transition: A Play in Two Acts ». *Development* 136 (18): 3033-42. <https://doi.org/10.1242/dev.033183>.
- Talkowski, Michael E., Jill A. Rosenfeld, Ian Blumenthal, Vamsee Pillalamarri, Colby Chiang, Adrian Heilbut, Carl Ernst, et al. 2012. « Sequencing Chromosomal Abnormalities Reveals Neurodevelopmental Loci That Confer Risk across Diagnostic Boundaries ». *Cell* 149 (3): 525-37. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.028>.
- Tam, Patrick P.L, et Richard R Behringer. 1997. « Mouse Gastrulation: The Formation of a Mammalian Body Plan ». *Mechanisms of Development* 68 (1-2): 3-25. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(97\)00123-8](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(97)00123-8).
- Thomson, Jack S., Phillip C. Watts, Tom G. Pottinger, et Lynne U. Sneddon. 2011. « Physiological and Genetic Correlates of Boldness: Characterising the Mechanisms of Behavioural Variation in Rainbow Trout, *Oncorhynchus Mykiss* ». *Hormones and Behavior* 59 (1): 67-74. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.10.010>.
- Torres-Paz, Jorge, Julien Leclercq, et Sylvie Rétaux. 2019. « Maternally Regulated Gastrulation as a Source of Variation Contributing to Cavefish Forebrain Evolution ». *ELife* 8 (octobre): e50160. <https://doi.org/10.7554/eLife.50160>.
- Tribulo, Celeste, Manuel J. Aybar, Vu H. Nguyen, Mary C. Mullins, et Roberto Mayor. 2003. « Regulation of Msx Genes by a Bmp Gradient Is Essential for Neural Crest Specification ». *Development* 130 (26): 6441-52. <https://doi.org/10.1242/dev.00878>.
- Tuazon, Francesca B., et Mary C. Mullins. 2015. « Temporally Coordinated Signals Progressively Pattern the Anteroposterior and Dorsoventral Body Axes ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 42 (juin): 118-33. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.06.003>.
- Ufartes, Roser, Hanna Berger, Katharina Till, Gabriela Salinas, Marc Sturm, Janine Altmüller, Peter Nürnberg, et al. 2020. « De Novo Mutations in FBRSL1 Cause a Novel Recognizable Malformation and Intellectual Disability Syndrome ». *Human Genetics* 139 (11): 1363-79. <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02175-x>.
- Valenti, Fabio, Jessica Ibeti, Yuko Komiya, Melissa Baxter, Anna Maria Lucchese, Lauren Derstine, Claudia Covaciu, et al. 2015. « The Increase in Maternal Expression of *Axin1* and *Axin2* Contribute to the Zebrafish Mutant *Ichabod* Ventralized Phenotype: A XES F ORMATION IN Z EBRAFISH E MBRYO ». *Journal of Cellular Biochemistry* 116 (3): 418-30. <https://doi.org/10.1002/jcb.24993>.
- Vastenhouw, Nadine L., Wen Xi Cao, et Howard D. Lipshitz. 2019. « The Maternal-to-Zygotic Transition Revisited ». *Development* 146 (11): dev161471. <https://doi.org/10.1242/dev.161471>.
- Vasudevan, Ho, Weirgräber, Nischt, Schneider, Lie, Smyth, Köhling. 2009. "Basement membrane protein Nidogen-1 shapes hippocampal synaptic plasticity and excitability"; Wiley Interscience. DOI10.1002/hipo.20660.
- Vossen, Laura E., Ronja Brunberg, Pontus Rådén, Svante Winberg, et Erika Roman. 2022. « The Zebrafish Multivariate Concentric Square Field: A Standardized Test for Behavioral Profiling of Zebrafish (*Danio Rerio*) ». *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 16 (mars): 744533. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.744533>.
- Vries, Bert B.A. de. 2005. « Diagnostic Genome Profiling in Mental Retardation ». *Am. J. Hum. Genet.*

- Wang, Qiang, Zhuangzhuang Geng, Yi Gong, Kaitlyn Warren, Haiyan Zheng, Yuka Imamura, et Zhonghua Gao. 2018. « WDR68 Is Essential for the Transcriptional Activation of the PRC1-AUTS2 Complex and Neuronal Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells ». *Stem Cell Research* 33 (décembre): 206-14. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.10.023>.
- Weisner, P Anne, Chih-Ying Chen, Younguk Sun, Jennifer Yoo, Wei-Chun Kao, Huimin Zhang, Emily T Baltz, Joseph M Troy, et Lisa Stubbs. 2019. « A Mouse Mutation That Dysregulates Neighboring *Galnt17* and *Auts2* Genes Is Associated with Phenotypes Related to the Human AUTS2 Syndrome ». *G3 Genes/Genomes/Genetics* 9 (11): 3891-3906. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400723>.
- Williamson, M P. 1994. « The Structure and Function of Proline-Rich Regions in Proteins ». *Biochemical Journal* 297 (2): 249-60. <https://doi.org/10.1042/bj2970249>.
- Winata et Korzh. 2018. "The translational regulation of maternal mRNAs in time and space" FEBS PRESS. doi: 10.1002/1873-3468.13183.
- Workman, J. L., et R. E. Kingston. 1998. « ALTERATION OF NUCLEOSOME STRUCTURE AS A MECHANISM OF TRANSCRIPTIONAL REGULATION ». *Annual Review of Biochemistry* 67 (1): 545-79. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.545>.
- Yagi, Ryohei, Lin-Feng Chen, Katsuya Shigesada, Yota Murakami, et Yoshiaki Ito. 1999. « A WW Domain-Containing Yes-Associated Protein (YAP) Is a Novel Transcriptional Co-Activator ». *The EMBO Journal* 18 (9): 2551-62. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.9.2551>.
- Yamashiro, Kunihiko, Kei Hori, Esther S.K. Lai, Ryo Aoki, Kazumi Shimaoka, Nariko Arimura, Saki F. Egusa, et al. 2020. « AUTS2 Governs Cerebellar Development, Purkinje Cell Maturation, Motor Function and Social Communication ». *iScience* 23 (12): 101820. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101820>.
- Yao, Shaohua, Meilin Qian, Senyi Deng, Lifang Xie, Hanshuo Yang, Chun Xiao, Ting Zhang, et al. 2010. « Kzp Controls Canonical Wnt8 Signaling to Modulate Dorsoventral Patterning during Zebrafish Gastrulation ». *Journal of Biological Chemistry* 285 (53): 42086-96. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.161554>.
- Zhang, Bao, Yue-Hong Xu, Shu-Guang Wei, Hong-Bo Zhang, Dong-Ke Fu, Zu-Fei Feng, Fang-Lin Guan, Yong-Sheng Zhu, et Sheng-Bin Li. 2014a. « Association Study Identifying a New Susceptibility Gene (AUTS2) for Schizophrenia ». *International Journal of Molecular Sciences* 15 (11): 19406-16. <https://doi.org/10.3390/ijms151119406>.
- Zhang, Yong, Nadine L. Vastenhouw, Jianxing Feng, Kai Fu, Chenfei Wang, Ying Ge, Andrea Pauli, Paul van Hummelen, Alexander F. Schier, et X. Shirley Liu. 2014. « Canonical Nucleosome Organization at Promoters Forms during Genome Activation ». *Genome Research* 24 (2): 260-66. <https://doi.org/10.1101/gr.157750.113>.
- Zhao, Boxuan Simen, Xiao Wang, Alana V. Beadell, Zhike Lu, Hailing Shi, Adam Kuuspalu, Robert K. Ho, et Chuan He. 2017. « M6A-Dependent Maternal mRNA Clearance Facilitates Zebrafish Maternal-to-Zygotic Transition ». *Nature* 542 (7642): 475-78. <https://doi.org/10.1038/nature21355>.
- Zhou, Sheng, Song Chen, Yixuan Amy Pei, et Ming Pei. 2022. « Nidogen: A Matrix Protein with Potential Roles in Musculoskeletal Tissue Regeneration ». *Genes & Diseases* 9 (3): 598-609. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2021.03.004>.

Zhou, Yixi, Xue Han, Yuanyuan Bao, Zihan Zhu, Jiali Huang, Chunyan Yang, Chengyong He, et Zhenghong Zuo. 2021. « Chronic Exposure to Environmentally Realistic Levels of Diuron Impacts the Behaviour of Adult Marine Medaka (*Oryzias Melastigma*) ». *Aquatic Toxicology* 238 (septembre): 105917. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105917>.

Titre : Impact de la contribution maternelle du gène *auts2a* sur le neurodéveloppement et le comportement de la descendance chez le médaka (*Oryzias latipes*)

Mots clés : *auts2a*, contribution maternelle, développement embryonnaire précoce, neurodéveloppement, comportement, médaka

Résumé : Les mutations du gène *AUTS2* humain ont été associées à de nombreuses neuropathologies tels que des troubles du spectre autistique, un retard global de développement associé à une déficience intellectuelle, des troubles de l'hyperactivité ou encore de la schizophrénie. Ce gène fortement conservé au cours de l'évolution des vertébrés, est un régulateur majeur du développement du système nerveux central. Que ce soit par des rôles de facteur de transcription, de régulation du métabolisme de l'ARN ou de mise en place du cytosquelette d'actine. L'importance de sa contribution maternelle n'a cependant pas été caractérisée. Dans cette thèse, nous retraçons dans un premier temps l'histoire évolutive de ce gène présentant deux copies (*auts2a* et *auts2b*) chez certains poissons téléostéens. Nous cherchons également à caractériser l'impact de la contribution

maternelle d'*auts2a* chez les poissons en générant, par la technique de CRISPR/Cas9, des lignées de médakas (*Oryzias latipes*) présentant des mutations dans diverses parties du gène. Nous démontrons ici que l'expression d'*auts2a* dans l'ovocyte régule l'expression de facteurs maternels qui vont eux même réguler l'expression de gènes nécessaires au développement du système nerveux au cours du développement embryonnaire précoce. L'absence de contribution maternelle d'*auts2a* se traduit également par des phénotypes macroscopiques et comportementaux atypiques chez les individus adultes. Ce travail apporte de nouvelles perspectives sur l'importance et les mécanismes du déterminisme intergénérationnel du développement du système nerveux et du comportement.

Title : Impact of maternal contribution of *auts2a* gene in neurodevelopment and behavior of progeny in Japanese medaka (*Oryzias latipes*)

Keywords : *auts2a* maternal contribution, early embryonic development, neurodevelopment, behavior

Abstract : Mutations in the human *AUTS2* gene have been associated with numerous neuropathologies including autism spectrum disorders, global developmental delay associated with intellectual disability, hyperactivity disorders and schizophrenia. This gene, highly conserved during vertebrate evolution, is a major regulator of central nervous system development, whether through its role as a transcription factor, regulation of RNA metabolism or establishment of the actin cytoskeleton. However, the importance of its maternal contribution has not been characterized. In this thesis, we first trace the evolutionary history of this gene, which has two copies (*auts2a* and *auts2b*) in several teleost fish.

We also seek to characterize the impact of the maternal contribution of *auts2a* in fish by generating, using the CRISPR/Cas9 technique, lines of Japanese medakas (*Oryzias latipes*) with mutations in various parts of the gene. We demonstrate that *auts2a* expression in the oocyte regulates the expression of maternal factors that in turn, regulate the expression of genes required for nervous system development during early embryonic development. The absence of maternal contribution of *auts2a* also results in atypical macroscopic and behavioral phenotypes in adult individuals. This work provides new insights into the importance and mechanisms of intergenerational determinism of neurodevelopment and behavior