



HAL
open science

Identifier le rôle de VPS13B dans le système nerveux central

Charlotte Montillot

► **To cite this version:**

Charlotte Montillot. Identifier le rôle de VPS13B dans le système nerveux central. Biochimie [q-bio.BM]. Université Bourgogne Franche-Comté, 2023. Français. NNT : 2023UBFCI007 . tel-04551295

HAL Id: tel-04551295

<https://theses.hal.science/tel-04551295>

Submitted on 18 Apr 2024

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'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE

PREPAREE A L'UNITE INSERM U1231

Ecole doctorale n°554

Environnements - Santé

Doctorat de Biochimie et Biologie moléculaire

Par

Mlle MONTILLOT Charlotte

Identifier le rôle de VPS13B dans le système nerveux central

Thèse présentée et soutenue à DIJON le 1^{er} septembre 2023

Composition du Jury :

Pr. TESSIER Anne
Dr. BILLUART Pierre
Dr. VAILLEND Cyrille
Dr. GROSJEAN Yaël
Dr. YALCIN Binnaz

Professeur, UB, CAPS U1093, Dijon
CRHC, INSERM, IPNP U1266, Paris
DR, CNRS, NeuroPSI UMR9197, Paris Saclay
DR2, CNRS, CSGA UMR6265, Dijon
CR, INSERM, U1231, Dijon

Présidente
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directrice de thèse

Résumé

La protéine associée au tri vacuolaire 13B (VPS13B) est une protéine de grande taille et très conservée. Les mutations de la protéine VPS13B sont à l'origine du syndrome de Cohen, une maladie rare, à transmission autosomique récessive, caractérisée par une microcéphalie et une déficience intellectuelle accompagnées, notamment, d'un retard de développement, d'une hypotonie et d'une disposition joyeuse et amicale. Cependant, les mécanismes sous-jacents par lesquels la perturbation du gène *VPS13B* entraîne un dysfonctionnement cérébral restent encore inexpliqués.

Pour mieux comprendre la neuropathogénèse du syndrome de Cohen, nous avons caractérisé systématiquement les changements cérébraux chez les souris mutantes *Vps13b^{HOM}* et comparé les résultats murins à ceux de 235 patients déjà publiés et de 17 patients non publiés diagnostiqués avec un syndrome de Cohen lié à VPS13B.

Nous avons montré que *Vps13b* est exprimé de manière différentielle dans toutes les régions du cerveau, avec une expression maximale dans le cervelet, la couche corticale VI et le gyrus denté, et qu'il joue un rôle dans la différenciation neuronale. La moitié des souris homozygotes mutantes pour *Vps13b* meurent au cours de la première semaine de vie, tandis que l'autre moitié a une durée de vie normale et présente les principaux phénotypes de la maladie humaine, notamment la microcéphalie, le retard de croissance, l'hypotonie, l'altération de la mémoire et l'amélioration de la sociabilité. Le neurocrâne des souris mutantes *Vps13b^{HOM}* est plus petit de 7 % et présente des changements de forme, tandis que l'ensemble du tissu cérébral présente une réduction de taille plus importante de 28 %. Des analyses histomorphologiques systématiques en 2D et 3D d'un grand nombre de structures à

plusieurs moments ont révélé un scénario, en mosaïque, de changements structurels dans l'ensemble du cerveau à partir de la naissance. Le cervelet, le gyrus denté et le thalamus sont les régions cérébrales qui présentent la réduction de taille la plus importante, tandis que le cortex moteur est spécifiquement plus mince dans la couche VI, et que le fornix, le fascicule rétroflexe et le cortex cingulaire ne sont pas affectés. Ces changements structurels impliquent une augmentation de la mort neuronale pendant les stades infantiles, sans progression à l'âge adulte, et une augmentation des espèces lipidiques cérébrales, ce qui suggère que *VPS13B* favorise la survie neuronale tôt dans la vie, peut-être par un mécanisme impliquant les lipides. Il convient de noter que les deux sexes ont été systématiquement utilisés tout au long de l'étude et ont montré des caractéristiques communes, certains phénotypes étant moins prononcés ou absents chez les femelles, tant chez les souris que chez les patients.

Ces résultats de thèse fournissent de nouvelles informations sur la neurobiologie de *VPS13B* et mettent en évidence des caractéristiques neuropathologiques inédites qui définissent le syndrome de Cohen comme une nouvelle entité de neurodégénérescence infantile non progressive, tout en impliquant des phénotypes neuroanatomiques et des altérations de la composition du lipidome cérébral comme des pistes de traitement possibles.

Abstract

The vacuolar protein sorting-associated protein 13B (VPS13B) is a large and highly conserved protein. Disruption of VPS13B causes the autosomal recessive Cohen syndrome, a rare disorder characterized by microcephaly and intellectual disability among other features, including developmental delay, hypotonia, and friendly personality. However, the underlying mechanisms by which VPS13B disruption leads to brain dysfunction remain unexplained.

To gain insights into the neuropathogenesis of Cohen syndrome, we systematically characterized brain changes in *Vps13b*-mutant mice and compared murine findings to 235 previously published and 17 unpublished patients diagnosed with *VPS13B*-related Cohen syndrome.

We showed that *Vps13b* is differentially expressed across brain regions with the highest expression in the cerebellum, the cortical layer VI and the dentate gyrus, and has a role in neuronal differentiation. Half of the homozygous mutant mice for *Vps13b* die during the first week of life, while the remaining half have a normal lifespan and display the core phenotypes of the human disease, including microcephaly, growth delay, hypotonia, altered memory, and enhanced sociability. The neurocranium of *Vps13b*-mutant mice is smaller by 7% and exhibits shape changes, while the whole brain tissue presents a greater reduction in size by 28%. Systematic 2D and 3D brain histo-morphological analyses in many structures across multiple time points revealed a mosaic scenario of structural changes throughout the brain starting after birth. The cerebellum, the dentate gyrus, and the thalamus are the brain regions that display most prominent reduction in size, while the motor cortex is specifically thinner in layer VI,

and the fornix, the fasciculus retroflexus, and the cingulate cortex remain unaffected. These structural changes implicate an increase of neuronal death during infantile stages with no progression in adulthood and an increase of brain lipid species suggesting that VPS13B promotes neuronal survival early in life, possibly through a mechanism involving lipids. It is noteworthy that both sexes were systematically used throughout the study and showed shared features with some phenotypes being less pronounced or absent in females both in mice and patients.

This PhD work provides new insights about the neurobiology of VPS13B and highlight previously unreported neuropathological features defining Cohen syndrome as a new entity of non-progressive infantile neurodegeneration while implicating neuroanatomical phenotypes and alterations in the brain lipidome composition as possible treatment avenues.

Tables des matières

Résumé	4
Abstract	6
Tables des matières.....	8
Remerciements	16
Abréviations et sigles.....	22
Liste des figures	26
Liste des tableaux.....	30
Introduction.....	32
Chapitre 1 : Développement cérébral et cognition.....	34
1. Développement du cerveau humain	34
1.1. Neurulation.....	35
1.2. Prolifération et Migration neuronale	36
1.3. Neuritogenèse et Synaptogenèse.....	37
1.4. Raffinement et apoptose.....	38
1.5. Myélinisation	40
1.6. Développement postnatal	40
2. Structures cérébrales impliquées dans la cognition humaine.....	41
2.1. Cortex	42
2.1.1. Anatomie	42
2.1.2. Connectivité.....	45
2.2. Thalamus	46
2.2.1. Anatomie	46
2.2.2. Connectivité.....	48
2.3. Formation hippocampique	49
2.3.1. Anatomie	50
2.3.2. Circuiterie	54
2.4. Cervelet	55
2.4.1. Anatomie	56
2.4.2. Circuiterie	57
3. Rôles des lipides dans le développement et le maintien de l'homéostasie neuronale.....	59
3.1. Le Cholestérol.....	61
3.2. Les Glycérophospholipides.....	62

3.3. Les Sphingolipides.....	62
Chapitre 2 : Anomalies du développement cérébral et déficiences intellectuelles	64
1. Anomalies du développement et malformations cérébrales	64
1.1. Anomalies globales.....	64
1.2. Imagerie cérébrale.....	65
2. Trouble du développement intellectuel.....	66
2.1. Définition et prévalence	66
2.2. Origines	69
2.2.1. Facteurs environnementaux.....	70
2.2.2. Facteurs génétiques.....	70
3. Analyse de l'implication des gènes dans le développement cérébral et la cognition.....	73
3.1. Etudes <i>in vitro</i>	73
3.1.1. Lignées cellulaires commerciales.....	74
3.1.2. Cellules dérivées de patients.....	75
3.1.2.1. iPSC.....	75
3.1.2.2. Organoïdes cérébraux.....	76
3.2. Etudes <i>in vivo</i>	77
Chapitre 3 : Apport des modèles murins dans l'étude des anomalies du développement cérébral et de la cognition.....	78
1. Développement du cerveau de la souris	78
2. Avantages de l'utilisation de modèles murins dans l'étude des maladies génétiques	79
3. Techniques de génération de modèles murins.....	81
3.1. Modèles spontanés.....	81
3.2. Modèles induits	81
3.3. Modèles knock-out.....	82
3.3.1. Recombinaison Cre/LoxP.....	83
3.3.2. CRISPR/Cas9	84
4. Evaluation de la cognition chez la souris.....	85
4.1. Evaluation du comportement	85
4.1.1. Anxiété et dépression.....	86
4.1.2. Traits autistiques : Stéréotypie et Sociabilité.....	87
4.1.3. Apprentissage et mémoire.....	88
4.1.4. Fonctions motrices	90
4.2. Evaluation des paramètres neuroanatomiques.....	91
4.3. Evaluation des paramètres électrophysiologiques.....	92
Chapitre 4 : La neurobiologie de VPS13B dans le Syndrome de Cohen.....	93

1. Le Syndrome de Cohen.....	94
1.1. Dysmorphie faciale typique.....	94
1.2. Hématologie.....	95
1.3. Ophtalmologie.....	96
1.4. Métabolisme.....	96
1.5. Développement et tonicité	97
1.6. Neurologie et comportement.....	98
1.7. Génétique	103
2. La protéine VPS13B	104
2.1. Généralités sur les protéines VPS13	104
2.2. VPS13B	107
2.2.1. Structure.....	107
2.2.2. Fonctions.....	109
Objectifs de la thèse	112
Méthodes.....	116
1. Animaux	118
1.1. Permis éthique	118
1.2. Génération du modèle murin <i>Vps13b^{tm1.ICS}</i>	118
1.3. Hébergement des animaux et maintien de la colonie	120
1.4. Génotypage	121
2. Biologie moléculaire	122
2.1. Annotation du génome au niveau du locus	122
2.2. Sur cellules Neuro2A	123
2.2.1. Culture et différenciation cellulaire	123
2.2.2. Extraction d'ARN et RT-qPCR.....	123
2.3. Sur tissus murins	124
2.3.1. Extraction d'ARN	124
2.3.2. Transcription inverse, PCR et qPCR	125
2.3.2.1. Expression longitudinale de <i>Vps13b</i>	126
2.3.2.2. Expression relative de <i>Vps13b</i>	126
2.3.2.3. Expression spécifique du transcrite codant pour la petite protéine codante 127	
2.3.2.4. Expression des gènes voisins de <i>Vps13b</i> dans le locus	128
2.3.2.5. Expression des gènes de la famille des <i>Vps13</i>	129
3. Séquençage d'ARN	129
3.1. Séquençage d'ARN sur population cellulaire (Bulk RNA sequencing)	129
3.2. Séquençage d'ARN sur cellule unique.....	131

4. Test de viabilité	131
5. Analyses neuroanatomiques	133
5.1. Analyses morphométriques du crâne des souris	133
5.2. Analyse 2D.....	134
5.2.1. Analyse globale du cerveau	134
5.2.2. Analyses approfondies de régions cérébrales spécifiques	138
5.3. Analyse 3D.....	139
5.3.1. Préparation des échantillons	140
5.3.2. Segmentation et analyse	140
6. Histologie.....	142
6.1. Marquage Golgi-Cox.....	142
6.2. Marquage TUNEL	143
6.3. Marquages immunohistochimiques.....	143
6.3.1. Marquage des neurones matures et des astrocytes.....	143
6.3.2. Marquage des différentes couches corticales et vérification de la prolifération.....	144
7. Tests comportementaux	145
7.1. Test de l'openfield.....	147
7.2. Test de force d'agrippement	147
7.3. Paradigme des trois chambres de Crawley	147
7.4. Labyrinthe surélevé.....	148
7.5. Test de l'enfouissement des billes	149
7.6. Labyrinthe en Y	149
7.7. Test de la plaque chaude.....	150
7.8. Test de suspension.....	150
7.9. Test de nage forcée	150
8. Analyses lipidomiques	151
9. Revue systématique de la littérature	153
10. Statistiques.....	154
Résultats.....	156
1. <i>Vps13b</i> est un gène ubiquitaire qui possède une diversité et une spécificité de ses transcrits pour chaque tissu étudié.	158
2. <i>Vps13b</i> est exprimé dans les neurones du stade embryonnaire au stade adulte, avec un pic postnatal.....	163
3. La mutation de l'exon 4 de <i>Vps13b</i> dans le modèle murin <i>Vps13b^{tm1.ICS}</i> n'entraîne pas de dégradation des ARNm non-sens.....	166
4. <i>Vps13b</i> est essentiel pour la survie, la croissance et l'homéostasie cérébrale	

5. <i>Vps13b</i> est impliqué dans la résilience à l'anxiété et à la dépression, l'exacerbation de la sociabilité, l'altération de la mémoire, l'hyperactivité et l'hypotonie.....	180
6. Les souris <i>Vps13b</i> mutantes présentent une mosaïque de défauts neuromorphologiques	184
7. <i>Vps13b</i> favorise la survie des neurones après la naissance	195
8. <i>Vps13b</i> est impliqué dans la régulation de l'homéostasie lipidique de l'hippocampe.....	203
9. L'analyse des caractéristiques neurologiques du syndrome de Cohen confirme les altérations infantiles sans aggravation plus tard, et les filles sont moins touchées.....	206
Discussion	210
1. Quelle est la conséquence de l'absence de <i>Vps13b</i> sur la survie des souris ? 212	
2. Quelle est la conséquence de l'absence de <i>Vps13b</i> sur la croissance des souris ?	214
3. Quelle est la conséquence de l'absence de <i>Vps13b</i> sur la mise en place et le maintien de l'architecture cérébrale ?	216
4. Quelle est la conséquence de l'absence de <i>Vps13b</i> sur cognition et le comportement ?	219
5. Quelle est la conséquence de l'absence de <i>Vps13b</i> sur la morphologie et la survie neuronale ?	220
Conclusions & Perspectives	224
Bibliographie.....	228
Méthodes Annexes	246
1. Etude approfondie de la neuroanatomie de l'hippocampe.....	246
2. Etude approfondie de la neuroanatomie du cortex.....	249
3. Etude approfondie de la neuroanatomie du cervelet	252
Résultats Annexes.....	254
Résultats annexes 1 : Analyses de la morphologie du crâne des souris.....	254
Résultats annexes 2: Figure supplémentaire de résultats des tests de comportement	260
Publication du travail de thèse.....	262
Publications annexes.....	303

“ What doesn’t kill you, makes you stronger “

- Friedrich Nietzsche

Remerciements

Voilà... On y arrive... Enfin... Le moment de l'écriture des remerciements ! Parce que, comme dirait un petit chansonnier très cher à mon cœur « Tout seul, on est peu de chose » 🎵 Et je me dois de faire les choses bien parce que, on sait très bien vous et moi que, pour la plupart d'entre vous, la lecture de mon manuscrit de thèse s'arrêtera à l'issue de ces quelques pages ! Pas d'inquiétude, je ne vous en veux pas ! En revanche, si vous me le permettez, je vais commencer par remercier les personnes qui, elles, ont acceptés de lire et d'évaluer tout mon travail.

*J'adresse mes profonds remerciements aux Dr. **Pierre Billuart**, Dr. **Cyrille Vaillend**, Pr. **Anne Tessier** et Dr. **Yaël Grosjean** qui ont accepté de faire partie du jury d'évaluation de ma thèse. Je remercie également sincèrement le Dr. **Juliette Godin** qui a fait partie de mon comité de suivi de thèse. Merci de m'avoir donné, à l'issue de chaque année, de précieux conseils et remarques constructives qui m'ont aidé à recentrer mon projet sur l'essentiel et évité de succomber à la tentation, souvent forte en science, de « partir dans tous les sens ».*

*Ma thèse a été réalisée, à Dijon, au sein de l'unité INSERM U1231, dans l'équipe de Génétique des Anomalies du Développement (GAD), dirigée par les Pr. **Christel Thauvin-Robinet** et Pr. **Laurence Faivre**. Equipe qui a accueilli, au début de ma thèse, le groupe, désormais « émergent » NeuroGénétique des Modèles Murins (NeuroGeMM) dirigé par ma directrice de thèse. J'exprime ma reconnaissance envers le Dr. Yalcin, pour avoir été porteur de ce projet et avoir obtenu les financements nécessaires à la réalisation de mes expérimentations. Ces trois ans de thèse m'auront permis de me surpasser, mentalement, de m'endurcir et d'en apprendre plus sur moi-même et sur le genre de scientifique que j'aspire à devenir.*

*Je remercie également toutes les personnes avec lesquelles j'ai pu collaborer et qui ont participé, de près ou de loin, à ce projet. Un grand merci aux équipes du Dr. **Shilpi Minocha**, Dr. **Nicolas Navarro**, Dr. **Jean-Paul Pais de Barros** et Dr. **Fabrice Prin** pour leur implication dans ce projet. Merci aux filles de CellIMAP, **Audrey**, **Rim** et **Amandine**. Audrey pour avoir tout donné pour essayer de faire fonctionner ce fichu*

anticorps Vps13b sur les coupes de cerveau !! Et Rim, pour toutes nos discussions, en microscopie, sur « les avantages et les inconvénients de faire une thèse » ;).

Merci à tous les membres de l'équipe GAD, tellement nombreux qu'il me serait impossible de tous les citer. J'ai été très contente de passer ces 4 dernières années à vos côtés. Merci, pour vos conseils, scientifiques ou non, votre gentillesse, votre écoute et votre soutien. Merci pour toutes les pauses dej' et autres moments de convivialité passés ensemble. Merci à toutes les personnes qui n'auront été que de passage mais avec qui je me suis réellement bien entendu.

*Un grand merci à **Benazir** pour son travail. Tu as vraiment géré sur l'analyse des colo Golgi, ce n'était pas facile mais tu t'en es sorti comme une cheffe, alors merci !*

*Je ne peux pas évoquer les stagiaires que l'on a accueilli dans l'équipe sans avoir un petit mot pour Mme. **Lola Tanneur** aka « l'américaine mais dont le nom ne se prononce même pas à l'américaine ». Merci d'avoir participé à la construction de mon patrimoine financier en m'ayant si gentiment offert un dollar américain et pas merci de n'avoir pas participé à l'amélioration de mon niveau d'anglais en me parlant constamment en français.*

*Je voudrais aussi remercier un petit rayon de soleil, qui a apporté tellement de joie et de vie au labo pendant 1 année complète : **Iliona**, ma 2000 préférée. Merci pour les 12 milliards de fous rire (où le plus drôle n'est même pas la blague mais ton rire en lui-même), merci pour les parfaites imitations de chèvre, les séances de danse (Pas biiiiien) et les soirées. Passer du temps avec toi c'est juste prendre une énorme bouffée d'air frais. Merci pour ça ! Et peuchère ma petite, on se voit bientôt dans le sud hein !*

*Je me dois aussi de parler d'un autre rayon de soleil qui a illuminé le labo pendant quelques mois : ma **Zlem-Zlem**. J'ai bien cru que tu allais battre mon record de contrats de vacataire mais non, tu as fini par t'envoler vers de plus jolies contrées. Merci pour les fous-rire, les petits sablés, les victoires d'escape game, les road trips virtuels sur Google map, les 3 min quotidiennes de chansons de Noël pendant le mois de décembre... mais pas merci pour les crumbles pleins de cannelle de Zanzibar ahah. Tu sais déjà tout le bien que je pense de toi ma Zlem-Zlem. Je te souhaite du plus profond de mon cœur de t'épanouir dans ta thèse mais surtout, et c'est le plus important, de continuer à t'épanouir dans ta vie :)*

Là, on arrive au moment où je vais sûrement me mettre à pleurer sur mon clavier.... Parce que, cette thèse n'aurait jamais abouti sans le soutien, sans faille, des personnes que je m'appête à nommer. Vous le savez, ces trois dernières années n'ont clairement pas été sans embûches et si aujourd'hui, je suis en mesure d'écrire ces remerciements, dans un manuscrit fini, c'est parce que j'ai eu la chance de vous avoir à mes côtés, parce que j'ai la chance de vous avoir dans ma vie.

*Je vais commencer par toi **Laurence**. Je ne vais pas m'étaler parce que je sais très bien que ça ne te plairait pas, mais je suis obligée d'écrire quelques mots pour toi. Tu as été d'un soutien sans faille tout au long de cette thèse. Tu as toujours été là pour répondre à chacune de mes interrogations scientifiques, pour répondre à chacune de mes interrogations techniques. Tu as toujours été disponible pour m'aiguiller, m'encourager, me remettre les idées en place quand j'avais tort, me remonter le moral quand ça n'allait vraiment pas. Jusqu'à la fin, où tu as même gentiment accepté de relire quelques parties de ce manuscrit pour m'aider. Je pense que même 12 tonnes de chocolat ne seraient pas assez pour te remercier ! Je rigole souvent en disant « Quand je serais grande je voudrais être Laurence », mais c'est la vérité. Je parlais plus haut du genre de scientifique que j'aspire à devenir, et bien, saches qu'en ayant la chance de te côtoyer, j'en ai la parfaite incarnation sous les yeux depuis 4 ans.*

*Je voudrais également remercier une autre personne. Une personne qui ne sait pas faire une pâte à crêpes lisse, qui ne sais pas garder un cocotier en vie (oui **Julien**, je parle de toi). Un lord écossais qui n'hésite pas une seule seconde à partager ses yaourts à l'ananas le midi et qui, quand il vient à Menton avec moi, propose gentiment de payer mes citronniers ;) Ça, c'est le genre de Grumeau dont on a besoin dans sa vie, alors merci !*

*J'ai aussi une pensée pour mes super coupines restées dans le Sud. Merci à ma **Félicé**, qui a quand même été à l'origine de tout ça en me trouvant cette offre de stage de M2. Je ne te remercierai jamais assez pour toutes tes bonnes idées ;) Et merci à toi **Aurore**, ma coupine d'aventure, mon mister bean, ma camarade de galère. Depuis le master on vit tout ça ensemble. Aujourd'hui c'est quasiment terminé et on a tenu les filles !!! Alors franchement, je trouve qu'on peut être super fières de nous !!*

Enfin, je voudrai également remercier une personne qui est arrivée dans ma vie à un moment qui n'était pas des plus faciles mais qui m'a soutenu et aidé à garder la tête hors de l'eau. **Victorien**, je pense que je n'ai pas besoin d'écrire un pavé pour que tu saches à quel point je te remercie de faire partie de ma vie. Je sais que tu diras que j'ai fait ça toute seule mais quoi qu'il arrive, et peu importe ce que l'avenir nous réservera, tu m'as épaulé pendant toute l'écriture de ce manuscrit et c'est en grande partie grâce à toi que j'ai gardé la motivation à terminer cette thèse. Alors comme dirait Kyo : « Merci...d'avoir enchanté ma vie » ♪.

Je vais terminer par remercier les personnes les plus importantes de ma vie : ma famille ♥.

Sylvie. Oui, je t'ai placé dans la « section » famille... La vérité, c'est que tu y as toute ta place (et pas uniquement parce que toute ma famille t'a déjà adopté ;)). On dit souvent qu'il y a la famille du sang et la famille du cœur. Tu ne peux pas imaginer à quel point je suis reconnaissante que tu fasses partie de ma famille du cœur. Punaise ! On en a vécu des choses ensemble ces quatre dernières années !! On a pleuré de rire, de tristesse, de joie, de fatigue même quelques fois. On a vécu trois milliards d'aventures plus drôles les unes que les autres. Une tempête en bord de mer, des pannes d'ascenseur, une virée en congrès, des journées de travail interminables qui se finissent en concerts improvisés pour décompresser, des fous rires à ne plus pouvoir s'arrêter... ça a pu en agacer certains, notre complicité, ça nous a même été reproché mais ça nous a sauvé... En tout cas, moi ça m'a sauvé ! Sans toi, ça n'aurait pas fonctionné. Bien sûr, il y a eu l'aspect « boulot ». Toutes ces manips faites ensemble, en binôme. Un binôme de choc. Un « package ». Mais il y a surtout eu tout le côté « perso ». Je n'ai pas besoin de t'écrire un roman, tu sais déjà tout. Tu as toujours cru en moi, même quand moi-même je n'y arrivais plus. Tu m'as fait sortir me changer les idées les jours où le seul fait même de sortir de mon lit me semblait impossible. Je ne pourrai jamais assez te remercier pour ça. Pour être toi. Cette thèse m'a apporté beaucoup de choses mais je sais que la plus importante d'entre elles est, et restera, le fait que ça m'a permis de rencontrer ma meilleure amie. Et ça, ça n'a pas de prix. Je t'aime Sylvie.

Anne-Sophie, Cyril, Simon, Cassie, Marie, Gaby, je vous aime. Je vous ai saoulé mais vous m'avez supporté, vous m'avez laissé tranquille quand je ne voulais parler à personne, vous m'avez écouté quand j'avais besoin de vider mon sac, vous m'avez changé les idées, vous m'avez encouragé. Vous êtes toute ma vie.

Etant donné qu'on garde toujours le meilleur pour la fin. Je vais terminer en m'adressant à la personne la plus importante de ma vie. **Maman**. Je voudrais te dire que ce manuscrit est pour toi, même si je sais que tu ne feras même pas semblant d'essayer de lire ahah.. Si j'en suis là aujourd'hui, et que je m'apprête à devenir, comme dirait mamie, « docteur de petites souris », c'est uniquement grâce à toi. Parce que tu as toujours tout donné pour moi, pour nous. Tu t'es toujours dépassée et tu as encaissé tous les coups de la vie pour nous offrir le meilleur. Tu as fait en sorte qu'on devienne, Marie, Anne-Sophie et moi, les femmes fortes et épanouies que nous sommes aujourd'hui, même si perso, je sais que je ne t'arrive même pas à la cheville. Je t'aime maman. PS : Ça y est, maintenant tu peux souffler, mes études sont enfin terminées ;).

Abréviations et sigles

ACPA : Analyse Chromosomique sur Puce à ADN

AG : Appareil de Golgi

AP : Progéniteurs neuronaux apicaux

APOE : Apolipoprotéine E

APT1 : Acyl-Protein Thioesterase

ATG2-C: Autophagy related Protein 2 C-terminal

BP : Progéniteurs neuronaux basaux

CAM : Molécules d'Adhésion Cellulaire

CNV : Variation du Nombre de Copies

COX6C : Cytochrome C Oxidase Subunit 6C

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

E : Jour embryonnaire

EEG : Electroencéphalogramme

EN : Neurones précoces

ENU : N-éthyl-N-nitroso-urée

ES : Cellules Souches Embryonnaires

FBS : Sérum de Veau Foetal

FMR1 : Fragile X Mental Ribonucleoprotein 1

GABA : Acide gamma-aminobutyrique

GC-MS : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

GD: Gyrus Denté

GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein

GNAS: Guanine Nucleotide binding protein, Alpha Stimulating activity polypeptide

HET: Hétérozygote

HOM: Homozygote

HPRT: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase

HREM : Microscopie Episcopique à Haute Résolution

ICS : Institut Clinique de la Souris

IMC : Indice de Masse Corporelle

IMPC : International Mouse Phenotyping Consortium

Indels : Variations de séquences
iPSC : Cellules Souches Pluripotentes Induites
IRM : Imagerie à Résonance Magnétique
LC-MS/MS : Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry
LN : Neurones tardifs
LPC : Lysophosphatidylcholines
LPE : Lysophosphatidyléthanolamines
MEA: Multi Electrode Array
MEM: Minimum Essential Media Eagle
NeuN: Neuronal Nuclei
NGF : Facteur de Croissance Nerveuse
NGS : Sérum de Chèvre Normal
NMD : Dégradation des ARN messagers non-sens
KO: Knock-out
OFC: Circonférence fronto-occipitale
OSR2: Odd-Skipped Related Transcription Factor 2
P: Jour postnatal
PBS: Tampon Phosphate Salin
PC: Phosphatidylcholine
PCR : Polymerase Chain Reaction
PE : Phosphatidyléthanolamines
PFA : Paraformaldéhyde
PH : Pleckstrin-Homology
PS : Phosphatidylsérine
QI : Quotient Intellectuel
RE : Réticulum Endoplasmique
RIN : RNA Integrity Number
SC : Syndrome de Cohen
SGZ : Zone Sous-Granulaire du gyrus denté
SM : Sphingomyéline
SNP : Polymorphismes nucléotidiques simples
SNV : Variants MonoNucléotidiques
SV : Variants Structuraux
SV2B : Synaptic Vesicul Protein 2B

TBR1 : T-box brain transcription factor 1 .

TDAH : Troubles du Déficit de l'Attention avec ou sans Hyperactivité

TDI : Troubles du Développement Intellectuel

TSA : Troubles du Spectre de l'Autisme

TSLA : Troubles Spécifiques du Langage et des Apprentissages

TUNEL: Terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labelling

WES : Séquençage de l'Exome Entier

WGS : Séquençage du Génome Entier

WT : Sauvage

Liste des figures

Figure 1 : Chronologie des principaux évènements du développement du cerveau humain.....	34
Figure 2 : Ontogenèse du cerveau humain.....	35
Figure 3 : Illustration schématique des sites de neurogenèse dans le cerveau adulte humain.....	41
Figure 4 : Représentation schématique de la localisation du cortex, du thalamus, de l'hippocampe et du cervelet dans le cerveau humain.	41
Figure 5 : Organisation du cortex cérébral humain.....	43
Figure 6 : Organisation histologique du cortex humain.....	44
Figure 7 : Organisation du thalamus dans le cerveau humain.....	47
Figure 8 : Représentation schématique des connexions entre le cortex et le thalamus dans le cerveau humain.....	48
Figure 9 : Organisation de la formation hippocampique dans le cerveau humain. ...	50
Figure 10 : La neurogenèse dans le gyrus denté humain adulte.	53
Figure 11 : La circuiterie hippocampique : la Boucle Tri-Synaptique.	55
Figure 12 : Organisation du cervelet dans le cerveau humain.....	57
Figure 13 : La circuiterie cérébelleuse.....	58
Figure 14 : Fonctions et caractéristiques des lipides cérébraux.	60
Figure 15: Les Troubles du Développement Intellectuel au sein des Troubles du Neurodéveloppement.	67
Figure 16: Etiologie de la déficience intellectuelle.	69
Figure 17: Inhibition de l'expression d'un gène par traitement aux siARN.....	73
Figure 18 : Chronologie des principaux événements du développement du cerveau murin.	78
Figure 19 : Les approches d'investigation en génétique des modèles murins.....	80
Figure 20 : Représentation schématique de l'édition du génome de la souris par recombinaison Cre/LoxP et CRISPR/Cas9.....	83

Figure 21 : Phénotype facial de patients atteints du syndrome de Cohen.....	95
Figure 22 : Résultats d'imagerie cérébrale de 3 patients atteints du syndrome de Cohen.....	102
Figure 23 : Localisation des différentes mutations faux-sens et non-sens retrouvées chez les patients atteints du Syndrome de Cohen.....	104
Figure 24 : Domaines protéiques conservés dans les protéines humaines de la famille des VPS13.....	105
Figure 25 : Schéma récapitulatif des différentes étapes de génération du modèle murin <i>Vps13b^{tm1.ICS}</i>	119
Figure 26 : Déroulement chronologique des différents tests de comportement.....	146
Figure 27 : Représentation schématique du locus et des différents transcrits de <i>Vps13b</i> annotés chez la souris.....	159
Figure 28 : Expression du transcrit canonical de <i>Vps13b</i> dans les différents tissus de la souris.	160
Figure 29 : Représentation schématique des différents transcrits de <i>VPS13B</i> annotés dans le génome humain.	161
Figure 30 : Expression du transcrit correspondant à la petite protéine codante <i>Vps13b</i> dans les différents tissus de la souris.	162
Figure 31 : Expression longitudinale de <i>Vps13b</i> chez la souris.....	163
Figure 32 : Expression de <i>Vps13b</i> dans la cellule neuronale.....	165
Figure 33 : Vérification de la correcte délétion de l'exon 4 de <i>Vps13b</i> dans le modèle <i>Vps13b^{tm1.ICS}</i>	167
Figure 34 : Effet de la mutation de <i>Vps13b</i> sur l'expression de ses gènes voisins dans le locus et des autres gènes <i>Vps13</i>	168
Figure 35 : Effet de la mutation de <i>Vps13b</i> sur l'expression de son transcrit canonical dans le cerveau des souris.....	170
Figure 36 : Evolution de la viabilité des souris mutantes mâles et femelles.	172
Figure 37 : Evolution de la croissance corporelle des souris mutantes mâles et femelles.....	175
Figure 38 : Evolution de la croissance du cerveau des souris mutantes mâles et femelles.....	176

Figure 39 : Comparaison du poids corporel et du poids du cerveau des souris WT et HET mâles et femelles.	177
Figure 40 : Analyse de la morphologie du crâne des souris mutantes.	179
Figure 41 : L'évaluation du comportement des souris <i>Vps13b</i> mutantes HOM montre une hypotonie, une altération de la mémoire et une hausse de la sociabilité.	183
Figure 42 : Caractérisation morphologique, en 3 dimensions, du cerveau des souris <i>Vps13b</i> mutantes.....	186
Figure 43 : Quantification des caractéristiques neuroanatomiques des souris adultes et nouveaux-nés.	188
Figure 44 : Evolution de l'aire totale du cerveau des souris mutantes mâles et femelles.	189
Figure 45 : Tableau récapitulatif des tailles d'effet (en % par rapport aux souris WT) enregistrés dans l'étude neuroanatomique 2D des souris mutantes.	190
Figure 46 : Caractérisation morphologique, en 2 dimensions, du cerveau des souris <i>Vps13b</i> mutantes.....	192
Figure 47 : Analyse approfondie des caractéristiques morphologiques de la formation hippocampique des souris <i>Vps13b</i>	197
Figure 48 : Analyse approfondie des caractéristiques morphologiques du cervelet et du cortex des souris <i>Vps13b</i>	201
Figure 49 : Les souris mutantes <i>Vps13b</i> présentent des altérations de la composition lipidique dans l'hippocampe.....	205
Figure 50 : Revue de la littérature sur les caractéristiques cérébrales du syndrome de Cohen.....	209

Liste des tableaux

Tableau 1 : Séquences des amorces utilisées dans l'étude d'expression relative de Vps13b dans les différents tissus murins.	127
Tableau 2 : Design du couple d'amorce spécifique au transcrit de la petite protéine codante.....	128
Tableau 3 : Tableau récapitulatif des paramètres observés dans le test de viabilité.	132
Tableau 4 : Tableau récapitulatif des paramètres neuroanatomiques mesurés dans le cerveau de la souris nouveau-né.....	136
Tableau 5 : Tableau récapitulatif des paramètres neuroanatomiques mesurés dans le cerveau de la souris adulte.....	137
Tableau 6 : Tableau récapitulatif des régions anatomiques évaluées dans l'étude neuroanatomique approfondie de l'hippocampe, du cortex et du cervelet.....	139
Tableau 7 : Tableau récapitulatif des différentes observations faites sur les nouveaux nés pendant le test de viabilité	174
Tableau 8 : Tableau récapitulatif des différentes mesures prises dans l'étude de la neuroanatomie des souris en 3 dimensions.	187
Tableau 9 : Tableau récapitulatif des tailles d'effet (en % par rapport aux souris WT) enregistrés dans l'étude neuroanatomique des souris HET.	194

Introduction

Chapitre 1 : Développement cérébral et cognition

1. Développement du cerveau humain

Le développement du cerveau humain est un processus fascinant qui a été et demeure encore, énigmatique. Il débute très tôt après la conception, continue pendant toute la période de gestation et se poursuit même après la naissance, voire, à l'âge adulte. Le développement cérébral est composé de 6 étapes clés : la neurulation, la prolifération neuronale, la migration neuronale, la synaptogenèse, l'apoptose et la myélinisation. La chronologie d'apparition de ces différentes phases est représentée en **Figure 1**.

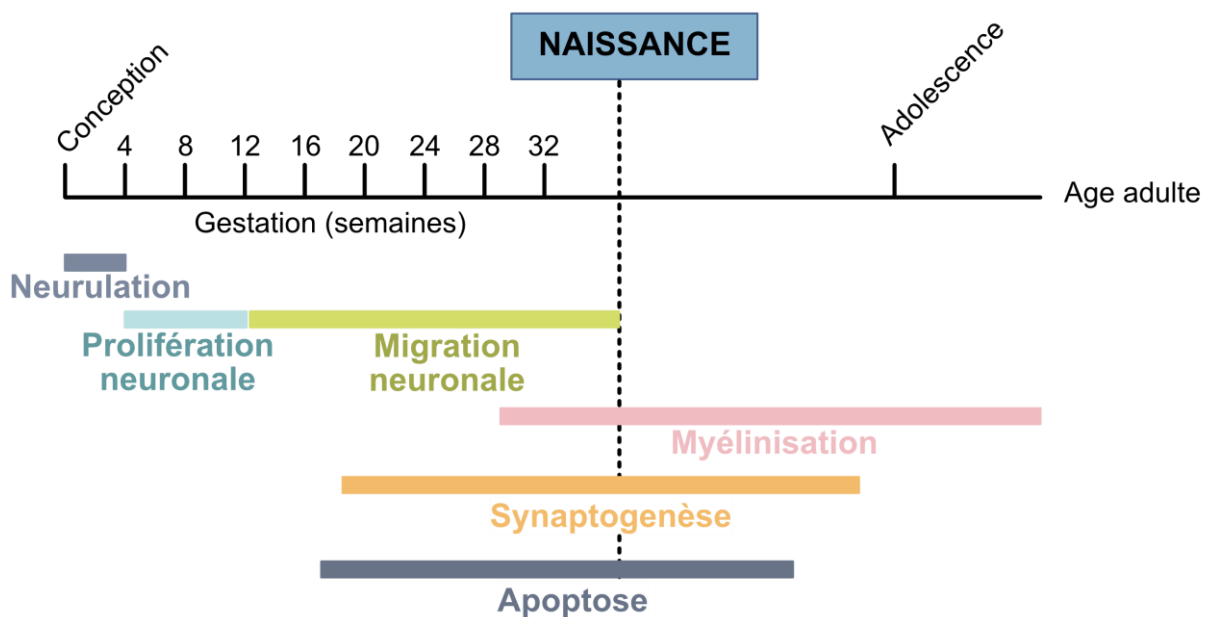


Figure 1 : Chronologie des principaux événements du développement du cerveau humain.

Le diagramme représente le développement du cerveau du moment de la conception jusqu'à l'âge adulte. Les 6 étapes clés du développement cérébral y sont représentées : la neurulation, la prolifération neuronale, la migration neuronale, la synaptogenèse, l'apoptose et la myélinisation. *Figure adaptée de (Tau & Peterson 2010).*

1.1. Neurulation

Le développement neuronal commence, chez l'Homme, entre la 2^{ème} et la 3^{ème} semaine de gestation avec le repliement et la fusion de l'ectoderme pour former le tube neural. La partie postérieure du tube neural donne la moelle épinière tandis que sa partie antérieure présente un renflement correspondant à une vésicule unique, ébauche du système nerveux céphalique. Cette vésicule donne ensuite naissance à trois vésicules : le prosencéphale (antérieur), le mésencéphale (moyen) et le rhombencéphale (postérieur). Le prosencéphale se divise en un télencéphale (cortex cérébral) et un diencéphale (thalamus, hypothalamus et autres structures) tandis que le rhombencéphale donne le métencéphale (cervelet) et le myélocéphale (bulbe rachidien) (Stern 2001; Rhinn et al. 2006) (**Figure 2**).

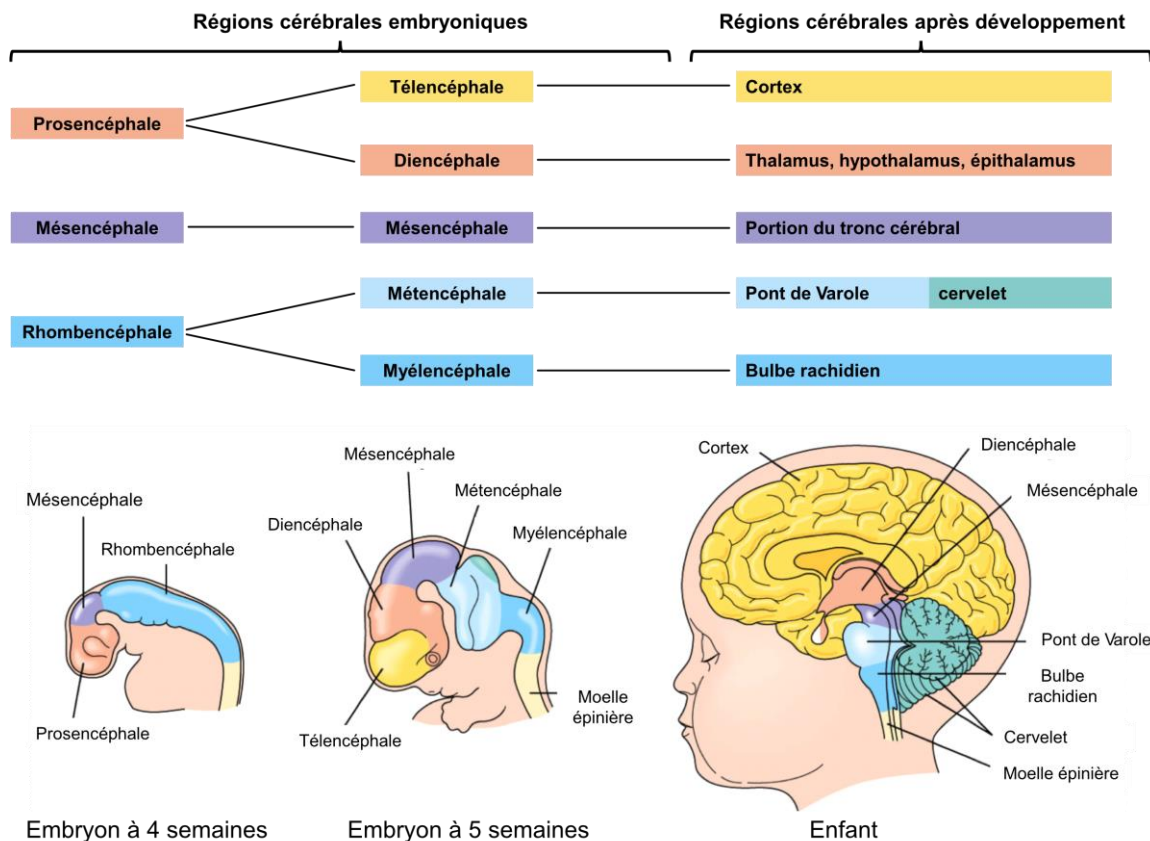


Figure 2 : Ontogenèse du cerveau humain.

Le diagramme représente l'évolution des différentes vésicules céphaliques : le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale. Les illustrations montrent l'évolution de l'architecture cérébrale chez l'embryon de 4 semaines, de 5 semaines et chez le jeune enfant. © Pearson Education 2011

1.2. Prolifération et Migration neuronale

Les précurseurs des cellules neuronales, appelés neuroblastes, prolifèrent dans la zone ventriculaire au cours des semaines gestationnelles 5 et 6 (Monk et al. 2001) puis commencent à se différencier, à partir de la huitième semaine, en différents types cellulaires spécifiques neuronal et microgliale. Les neurones produits migrent et s'accumulent au fur et à mesure que le cerveau grossit. La migration des neurones post-mitotiques est un processus finement régulé qui culmine entre la douzième et la vingtième semaine de gestation (de Graaf-Peters & Hadders-Algra 2006). Dans le cortex, les neurones excitateurs migrent de la zone de prolifération jusqu'à la surface en suivant la glie radiaire (Rakic et al. 1994). Ce processus de migration permet d'acheminer les neurones à la surface selon un mode « inversé » (Hatten 1993), les neurones les plus jeunes constituent les couches superficielles tandis que les neurones plus anciens se retrouvent dans la couche la plus profonde. Les neurones inhibiteurs, nés dans des régions plus éloignées provenant des ébauches des noyaux des ganglions de la base, vont, quant à eux, migrer vers le cortex et le thalamus de manière tangentielle (McManus et al. 2004).

Les erreurs de migration peuvent avoir de grosses conséquences sur le développement cérébral. L'exemple le plus connu est la lissencéphalie, un trouble de migration qui perturbe la formation des circonvolutions à la surface du cerveau. Cela peut avoir des conséquences dramatiques qui peuvent aller du retard mental jusqu'au décès dans la petite enfance (Olson & Walsh 2002).

1.3. Neuritogenèse et Synaptogenèse

Au fur et à mesure que les neurones achèvent leur migration, ils étendent leurs prolongements, aussi appelés neurites, pour atteindre les neurones voisins et communiquer via l'établissement de connections synaptiques.

La neuritogenèse est un processus essentiel au bon fonctionnement cérébral. Le développement d'un neurite, qu'il s'agisse d'un axone ou d'une dendrite, nécessite une interaction complexe de signaux intra et extracellulaires. Les récepteurs situés le long de chaque neurite détectent les signaux de croissance positifs et négatifs afin de déterminer dans quelle direction le prolongement doit se développer (Valtorta & Leoni 1999). Les signaux les plus connus sont la nétrine, qui agit comme chimio attractant, la sémaphorine ou la collapsine, qui sont impliquées dans la guidance axonale et l'éphrine qui agit dans la répulsion. Le cytosquelette possède un rôle déterminant dans le processus neuritique. En effet, le neurite en formation est rempli de faisceaux de microtubules dont la croissance est stimulée par des facteurs neurotrophiques tels que le facteur de croissance nerveuse (NGF). La stabilisation des microtubules est rendue possible par l'action de la protéine Tau qui va se lier à elle pour les protéger des protéines qui pourraient les couper (Qiang et al. 2006). La croissance et l'élongation de l'axone reposent également sur la dynamique du cytosquelette. Les filaments d'actine viennent pousser les faisceaux de microtubules vers l'extérieur, permettant ainsi à un axone de s'allonger. Dans les dendrites, à l'inverse, les filaments d'actine sont stabilisés par la myosine pour éviter l'élongation (Xiao et al. 2013).

Même s'il diffère selon les régions cérébrales, le pic de synaptogenèse a lieu au cours de la 34^{ème} semaine de gestation chez l'Homme. A ce moment-là, près de 40 000 nouvelles synapses se forment chaque seconde (Levitt 2003).

Au cours de la synaptogenèse, l'axone d'un neurone A établit un contact avec les dendrites d'un neurone B. Au niveau de la synapse, le signal électrique acheminé par l'axone est transmis à la deuxième cellule grâce à la libération de neurotransmetteurs dont l'action est soit d'induire soit de bloquer l'initiation d'un nouveau signal dans la cellule réceptrice. La transmission synaptique rapide est permise par la libération et la réception des neurotransmetteurs et par l'alignement précis des structures pré et post-synaptiques au niveau de la jonction synaptique (Biederer et al. 2017). L'organisation synaptique repose sur le fonctionnement des molécules d'adhésion cellulaire (CAM). Puis d'autres molécules assurent la maturation de la synapse afin qu'elle puisse s'adapter aux changements structurels et comportementaux de l'organisme.

Chez l'Homme, la plupart des synapses s'assemblent pendant le développement prénatal et postnatal. Environ la moitié des synapses sont ensuite « élaguées » jusqu'à la fin de l'adolescence. Il est important de noter que, alors que la formation *in utero* des synapses est indépendante de l'activité, le processus d'élagage dépend beaucoup de l'activité neuronale.

1.4. Raffinement et apoptose

Les neurones sont fabriqués « en excès » au cours du développement embryonnaire. Nombre d'entre eux sont éliminés au cours de périodes dites de « raffinement » (Gohlke et al. 2007). La phase la plus importante d'élimination cellulaire débute après la dix-huitième semaine de gestation et continue dans les premières semaines

postnatales. Au cours du raffinement, les cellules dites « défailantes », car présentant des défauts structurels ou étant incapables de recevoir les signaux chimiques de survie, appelés facteurs trophiques, sont éliminées car considérées incapables de transmettre un signal électrique efficace et essentiel au bon fonctionnement cérébral.

L'apoptose est la forme principale de mort cellulaire programmée. Morphologiquement, elle se traduit par la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN suivie d'une fragmentation de la cellule (Kerr et al. 1972). Les principaux exécutants de l'apoptose sont une famille de protéases à cystéine : les protéines caspases. La famille des caspases comporte plusieurs membres, initiateurs ou exécutants. Les caspases exécutrices, telles que la protéine caspase 3 ou encore la protéine caspase 7 sont physiologiquement activées par des ligands de mort extrinsèques ou des signaux intrinsèques tels que les lésions de l'ADN, la privation de facteurs de survie, le stress réticulaire, les flux ioniques anormaux ou la surproduction d'oxygène réactif (Green et al. 2014).

La régulation de l'activité des protéines caspases est une étape essentielle dans le bon développement cérébral. Il est cependant également important de noter que les caspases ont aussi été identifiées comme ayant un rôle non apoptotique dans le système nerveux en développement (Hollville & Deshmukh 2018). Ainsi, la protéine caspase 3 semble également jouer un rôle dans la régulation de la formation des cônes de croissance, la croissance et la ramification des axones ainsi que dans la maturation des synapses.

1.5. Myélinisation

Dans le système nerveux central, la gaine de myéline, isolante, est synthétisée par les oligodendrocytes et recouvre les axones afin d'augmenter la vitesse à laquelle des signaux sont transmis d'un neurone à l'autre (Almeida & Lyons 2014; Stassart et al. 2018). Constituée de protéines et de nombreux lipides, la myéline est néanmoins absente au niveau des constriction, appelées nœuds de Ranvier. C'est en sautant d'un nœud à l'autre que le signal électrique se déplace, on parle alors de conduction saltatoire.

La myélinisation des axones est un processus dynamique à travers le développement qui continue à l'âge adulte afin d'entretenir la plasticité neuronale.

1.6. Développement postnatal

La période postnatale précoce représente une période de changements spectaculaires dans la structure et la fonction du cerveau. Comme évoqués précédemment, le développement de la matière grise et blanche, la synaptogenèse, la myélinisation, l'élagage et la maturation synaptique commencent *in utero* mais se poursuivent au début de la vie postnatale.

La neurogenèse se poursuit également après la naissance dans quelques régions bien spécifiques du cerveau humain (**Figure 3**). C'est le cas, à l'âge adulte, dans l'hippocampe, une zone du cerveau particulièrement importante pour les fonctions cognitives. C'est également le cas dans le striatum, une structure connue pour son rôle dans la coordination motrice, la motivation, le plaisir et la « flexibilité cognitive » (Ernst et al. 2014).

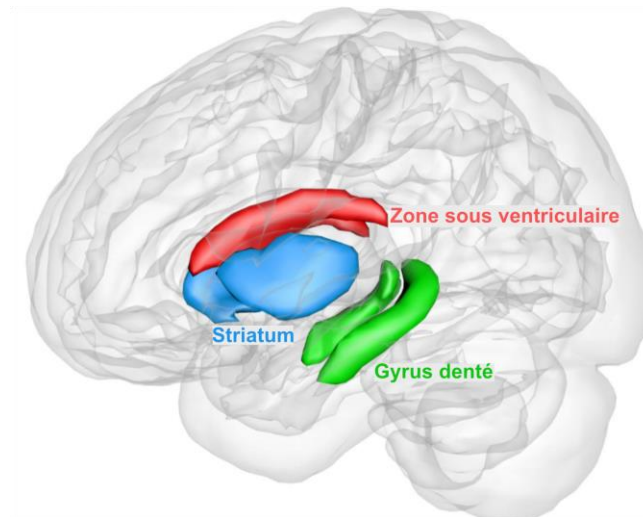


Figure 3 : Illustration schématisique des sites de neurogenèse dans le cerveau adulte humain.

Figure traduite de (Lei et al. 2019).

2. Structures cérébrales impliquées dans la cognition humaine

Cette partie de ce rapport bibliographique fera une description succincte de quatre régions cérébrales impliquées dans la cognition humaine : le cortex, le thalamus, l'hippocampe et le cervelet.

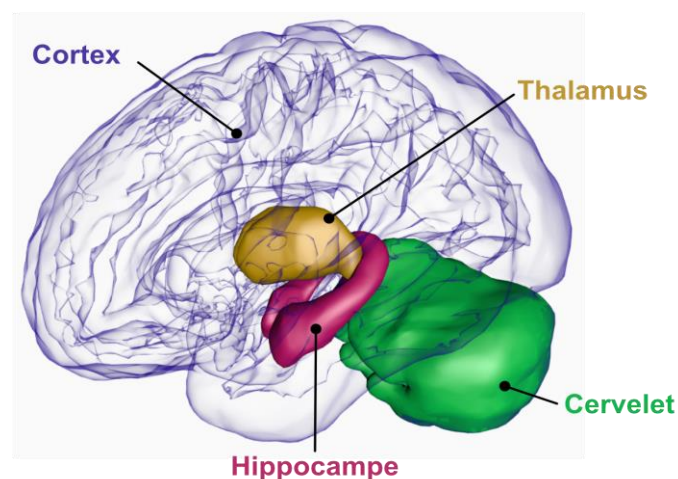


Figure 4 : Représentation schématique de la localisation du cortex, du thalamus, de l'hippocampe et du cervelet dans le cerveau humain.

Cette figure a été réalisée à l'aide de l'outil <https://scalablebrainatlas.incf.org>.

2.1. Cortex

Le cortex cérébral est une structure complexe du cerveau des mammifères qui désigne la couche externe supérieure de l'encéphale. Il est le siège de fonctions cognitives et motrices telles que le langage, la conscience, la mémoire, la sensibilité et la motricité volontaire.

2.1.1. Anatomie

Le cortex humain est divisé en quatre lobes, représentés en **Figure 5**. Chaque lobe est divisé en régions présentant des fonctions bien spécifiques. Ces aires fonctionnelles peuvent être regroupées en trois grands groupes (Jabaudon 2017) :

- Le cortex moteur, situé dans la partie postérieure du lobe frontal, participe au contrôle des mouvements volontaires du corps.
- Le cortex sensitif, situé dans les lobes pariétaux, temporaux et occipitaux, participe au contrôle des sensations.
- Le cortex associatif, situé dans les lobes frontaux et pariétaux, est impliqué dans le traitement de l'information et dans les fonctions cognitives complexes telles que la mémoire ou le langage.

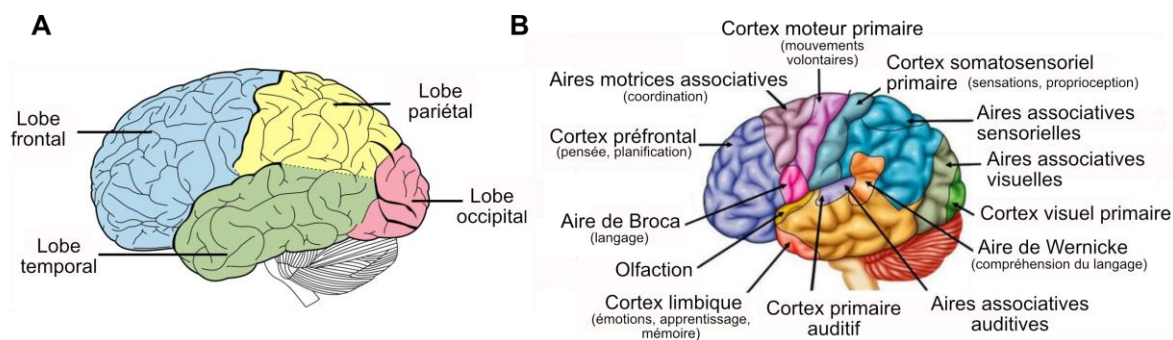


Figure 5 : Organisation du cortex cérébral humain

(A) Le cortex cérébral est divisé en 4 lobes. **(B)** Chaque aire du cortex possède une fonction précise. Du plus antérieur vers le plus postérieur, le lobe frontal est composé du cortex préfrontal, de l'aire de Broca, l'aire motrice associative et le cortex moteur primaire. Le lobe pariétal est constitué du cortex primaire somato-sensoriel et de l'aire somato-sensorielle associative. En position ventrale, le lobe temporal comporte le cortex auditif primaire, l'aire auditive associative. Le lobe occipital, le plus postérieur, contient le cortex visuel primaire et l'aire visuelle associative. *Figure adaptée de <http://www.teachmeanatomy.info> et <http://www.physio-pedia.com>*

Le cortex cérébral est composé de centaines de types différents de neurones et de cellules gliales.

Les cellules gliales peuvent être de trois types (Allen & Lyons 2018). Les oligodendrocytes, qui produisent la gaine de myéline, sont essentiels à la propagation de l'influx nerveux. Les astrocytes, quant à eux, assurent en grande partie l'approvisionnement en nutriments et le métabolisme énergétique des neurones. Enfin les cellules microgliales constituent les cellules de défense immunitaire du cerveau.

Les neurones corticaux sont divisés en 6 couches corticales (I-VI) distinguables par la taille des corps cellulaires des neurones, leur densité et leur organisation (**Figure 6**). Il existe deux types de neurones corticaux. Les neurones pyramidaux excitateurs, de type glutamatergique, représentent 70 à 80% des neurones présents dans le cortex, et sont indispensables à la transmission de l'information entre les régions corticales et

le reste du cerveau. Les interneurons, quant à eux, sont des neurones dits inhibiteurs car sécrétant l'acide gamma-aminobutyrique (GABA).

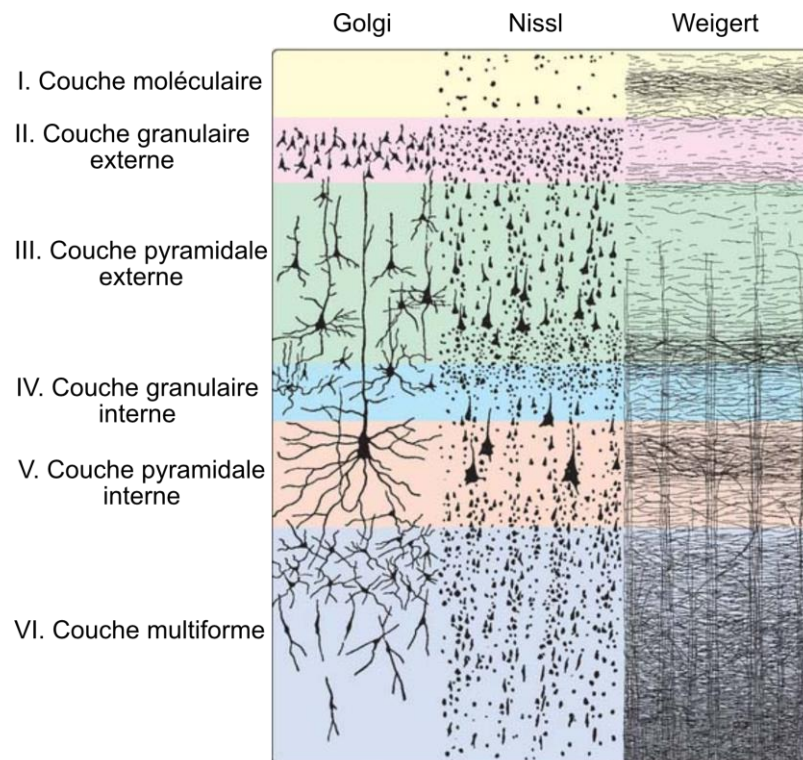


Figure 6 : Organisation histologique du cortex humain.

Les 6 couches corticales sont représentées. On retrouve, de la plus superficielle à la plus profonde, la couche moléculaire, la couche granulaire externe, la couche pyramidale externe, la couche granulaire interne, la couche pyramidale interne et la couche multiforme. Les trois colonnes représentent la disposition et la morphologie des cellules de chaque couche avec trois marquages histologiques différents. La coloration de Golgi permet la visualisation des neurones entier. La coloration au Nissl permet de visualiser les corps cellulaires. La coloration de Weigert permet la visualisation des fibres nerveuses. (Adaptée de <https://www.clinicalgate.com/cerebral-hemisphere>, consulté en mars 2023)

2.1.2. Connectivité

Chaque couche corticale possède une connectivité spécifique. La couche I, aussi appelée couche moléculaire, reçoit des afférences du tronc cérébral, des autres régions du cortex et du thalamus (M-type) (Rubio-Garrido et al. 2009). Les neurones de la couche I envoient des efférences vers le cortex. Les couches II et III, appelées respectivement couche granulaire externe et couche pyramidale externe, reçoivent également des afférences en provenance du tronc cérébral et des autres régions du cortex et émettent des efférences vers le cortex (Robles et al. 2020). Ce sont les axones de ces deux couches qui projettent vers le corps calleux. La couche IV, couche granulaire interne, reçoit des signaux en provenance du tronc cérébral, du cortex et du thalamus (C-type) (Miller 2003). La couche pyramidale interne, couche V, reçoit des afférences du tronc cérébral et envoie des efférences vers le tronc cérébral, la moelle épinière et le tectum (Moberg & Takahashi 2022). Enfin, la couche VI, aussi appelée couche multiforme, a la particularité de posséder une grande diversité de types de cellules neuronales (Thomson 2010). La plus grande population de neurones sont des neurones pyramidaux courts. Ces neurones excitateurs ciblent la couche IV avec leurs axes axonaux et dendritiques et envoient rarement des dendrites apicales plus haut que le bas de la couche III (Douglas & Martin 2004). Les neurones pyramidaux hauts ont, quant à eux, des dendrites apicales qui peuvent s'étendre jusqu'à la couche I et sont aussi appelés neurones à projection horizontale quand leurs axones projettent dans les couches VI et V. La couche VI contient également des neurones excitateurs non pyramidaux, appelés neurones étoilés épineux, qui projettent vers le thalamus. Les projections de la couche VI vers le thalamus ont la particularité d'à la fois exciter les neurones thalamiques mais également de les inhiber en activant en parallèle certains de leurs neurones inhibiteurs (Lam & Sherman 2010; Briggs 2010).

2.2. Thalamus

Le thalamus joue un rôle aussi bien essentiel dans la sensibilité, la motricité, l'excitation corticale (vigilance) que dans les circuits d'intégration de l'affectivité, de l'humeur et de la mémoire.

2.2.1. Anatomie

Le thalamus humain est composé d'environ 50 noyaux et sous-noyaux qui ne se connectent pas directement les uns aux autres et qui reçoivent les impulsions sensorielles en provenance des autres régions cérébrales (Behrens et al. 2003; Elias et al. 2012). Chaque noyau est responsable du traitement des différentes impulsions puis de l'envoi des informations sélectionnées via les fibres nerveuses à la zone correspondante du cortex pour interprétation (Alexander et al. 1986). Les principaux noyaux du thalamus sont présentés en **Figure 7**.

Le noyau antérieur intervient dans les processus de mémoire, d'émotions et de régulation du comportement. Il est connecté à l'hypothalamus et émet des projections sur le gyrus cingulaire. Le noyau dorsomédian intervient dans le comportement émotionnel, la mémoire, l'attention, l'organisation/planification et la pensée cognitive supérieur en projetant vers le cortex préfrontal et le système limbique. Le noyau postéro-latéral ventral fait remonter les informations sensorielles de douleur ou de température jusqu'au cortex somatosensoriel. Le noyau postéro-médial ventral projette également vers le cortex somatosensoriel mais pour transmettre les informations sensorielles du visage. Le noyau antérieur ventral et le noyau ventrolatéral transmettent les informations motrices sur les mouvements/tremblements

à la substance noire, au cortex prémoteur, au striatum et à la formation réticulaire. Le noyau postérieur latéral, le noyau pulvinaire et le géniculé latéral interviennent dans le traitement des informations visuelles en projetant vers le cortex visuel. Le noyau géniculé médial, quant à lui, traite les informations auditives et les envoie au cortex visuel. Enfin, le noyau réticulaire, constitue quant à lui, l'enveloppe externe du thalamus et influence l'activité des autres noyaux dans le thalamus sans projeter vers le cortex cérébral.

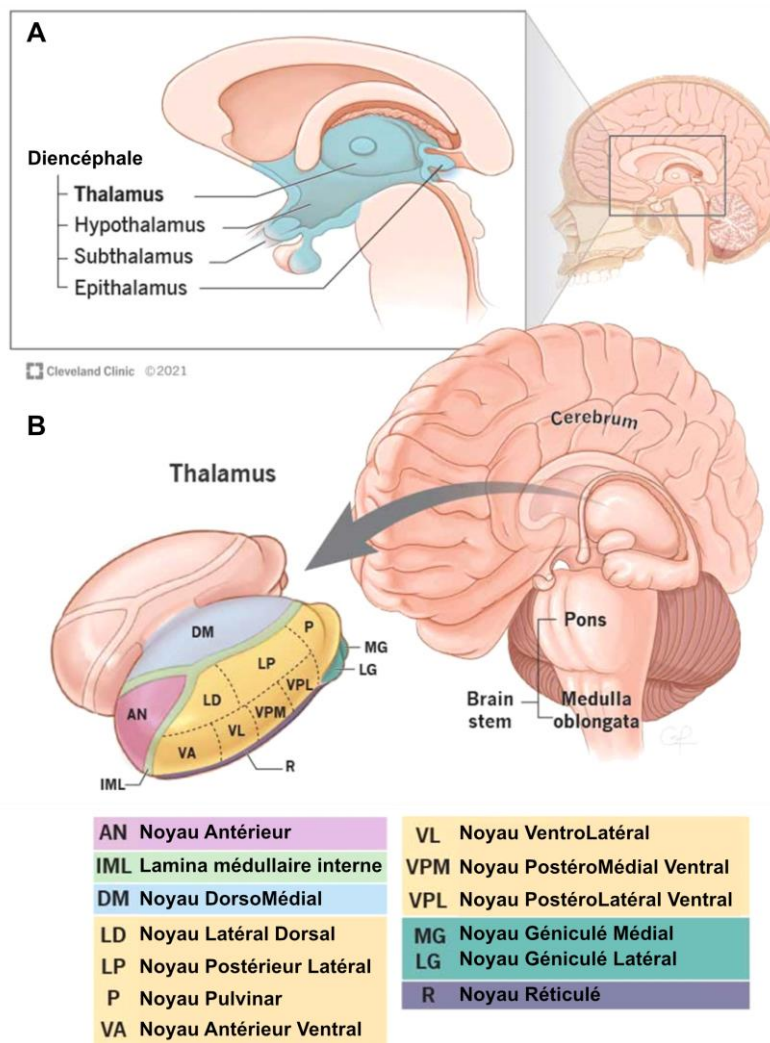


Figure 7 : Organisation du thalamus dans le cerveau humain.

(A) Localisation du thalamus dans le diencéphale. **(B)** Présentation des différents noyaux thalamiques. *Figure traduite de <http://www.my.clevelandclinic.org>.*

2.2.2. Connectivité

Une représentation schématique des connexions établies entre le cortex et le thalamus humains est proposée en **Figure 8**.

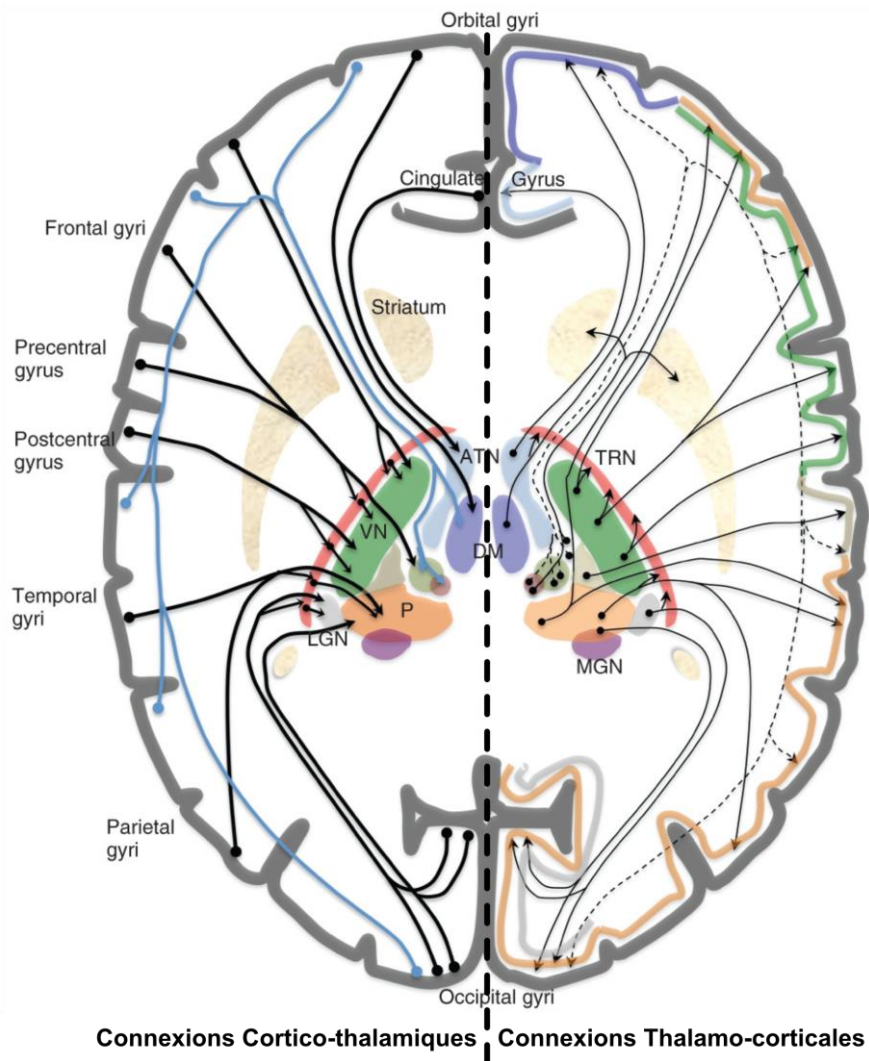


Figure 8 : Représentation schématique des connexions entre le cortex et le thalamus dans le cerveau humain.

Certains circuits du complexe thalamo-cortical sont représentés sur une coupe horizontale du cerveau humain. Les noyaux thalamiques sont représentés par les tâches colorées et les zones de projections corticales suivent le même code couleur. Abréviations : ATN = Noyaux Thalamiques Antérieurs ; DM = Noyau Dorso-Médial ; LGN = Noyau Géniculé Latéral ; MGN = Noyau Géniculé Médian ; RT = Noyau Réticulaire ; P = Noyau Pulvinaire ; VN = Noyaux Ventraux. *Figure tirée de (Ward 2011).*

Les noyaux thalamiques sont composés d'environ 70% de neurones excitateurs glutamatergiques et d'environ 30% d'interneurones inhibiteurs GABA-ergiques (Ward 2011). Les interneurones forment des connexions avec les neurones excitateurs voisins au sein d'un même noyau. En 2009, Jones a mis en évidence la présence de deux grands types de neurones thalamiques, les neurones centraux exprimant la parvalbumine et les neurones « matriciels » exprimant la calbindine (Jones 2009). Les neurones centraux projettent vers les neurones étoilés de la couche IV et les neurones pyramidaux des couches III, V et VI du cortex sensoriel et moteur. Les neurones « matriciels », quant à eux, projettent de manière diffuse vers les neurones étoilés dans les couches superficielles de plusieurs aires corticales, principalement dans les aires frontales. Les deux types de neurones thalamiques reçoivent des rétroprojections des neurones pyramidaux de la couche V et les neurones centraux reçoivent également des rétroprojections des neurones pyramidaux de la couche VI.

Notons que le thalamus est également fonctionnellement connecté à l'hippocampe pour les processus de mémoire spatiale et d'analyse des données sensorielles spatiales. Ces liaisons sont cruciales pour la mémoire épisodique (Koenig et al. 2019).

2.3. Formation hippocampique

L'hippocampe est une structure clef du processus cognitif. Bien qu'il ne soit pas le siège des souvenirs, il joue un rôle critique dans leur formation et plus précisément dans la mémoire des événements, dite mémoire explicite ou déclarative, par opposition à la mémoire de savoir-faire, appelée mémoire implicite ou procédurale, qui dépend d'autres structures telles que les ganglions de la base.

2.3.1. Anatomie

La formation hippocampique est composée de trois structures distinctes : le gyrus denté (GD), l'hippocampe, contenant la Corne d'Ammon (CA1, CA2, CA3) et le subiculum (**Figure 9**).

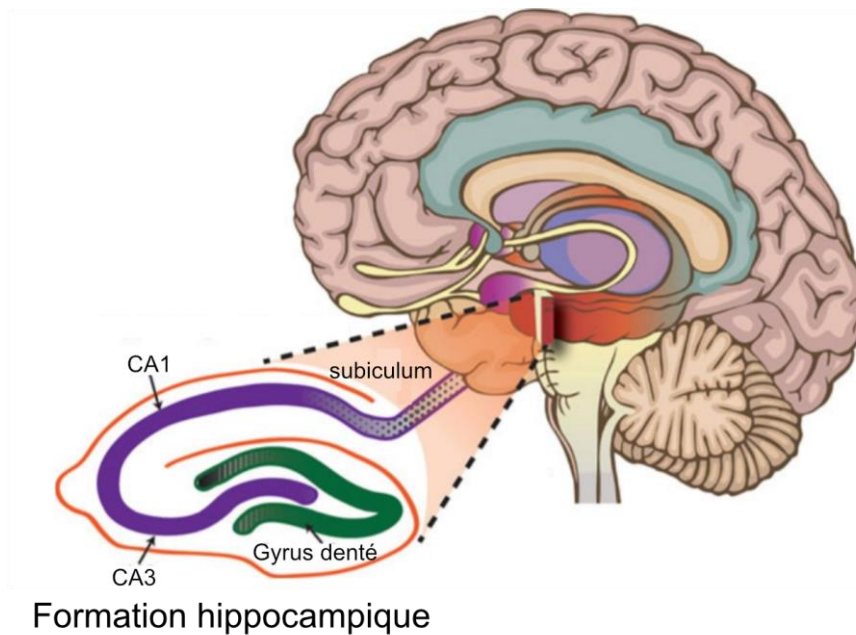


Figure 9 : Organisation de la formation hippocampique dans le cerveau humain.

Le subiculum (en violet pointillé), l'hippocampe (en bleu) et le gyrus denté (en vert) sont représentés. Adaptée de [https:// www.creative-diagnostics.com](https://www.creative-diagnostics.com).

L'hippocampe est composé de cinq couches cellulaires :

- L'alvéus contient les axones des cellules pyramidales dirigées vers la fimbria ou le subiculum.
- Le stratum oriens est situé entre l'alvéus et les cellules pyramidales des couches CA1, CA2 et CA3 et contient les dendrites basales de ces dernières ainsi que des cellules en corbeilles et des afférences du septum.

- Le stratum pyramidal contient les corps cellulaires des cellules pyramidales de la corne d'Ammon.
- Le stratum radiatum contient les segments proximaux de l'arbre dendritique apical de la corne d'Ammon
- Le stratum moléculaire contient les segments distaux de l'arbre dendritique apical de la corne d'Ammon.

En accord avec les différents résultats obtenus au cours de ma thèse, je fais le choix de recentrer ce rapport bibliographique sur le fonctionnement du gyrus denté sans m'attarder sur le reste de l'hippocampe et le subiculum.

Le gyrus denté est composé de trois couches cellulaires :

- La couche moléculaire est constituée des dendrites des cellules granulaires dentées, des fibres des voies perforantes qui proviennent du cortex entorhinal et d'un petit nombre d'interneurones
- La couche cellulaire granulaire est constituée en grande partie de cellules granulaires densément assemblées.
- La couche polymorphique est composée majoritairement de cellules moussues.

Alors qu'une partie des neurones granulaires est générée pendant l'embryogenèse, comme l'ensemble des autres populations neuronales, la plus grande partie de ces cellules est générée après la naissance (Altman & Bayer 1990). Comme évoqué précédemment, il a même été montré, de manière plus exceptionnelle, que la

neurogenèse continuait à l'âge adulte dans le cerveau des mammifères (Kornack & Rakic 1999; Kempermann et al. 1997; Eriksson et al. 1998). Le développement des neurones dans le gyrus denté adulte se déroule selon un schéma bien connu, illustré en **Figure 10** (Benarroch 2013). Les cellules souches neuronales sont produites dans la zone sous-granulaire du gyrus denté (SGZ), une niche neurogénique. Après prolifération, ces cellules donnent naissance à une population de cellules progénitrices (IPC) capables de proliférer abondamment et de se différencier en neuroblastes. Les cellules nouvellement formées migrent dans la partie interne de la couche granulaire où elles achèvent leur processus de maturation. Environ 75% d'entre elles s'intègrent aux réseaux préexistants et participent ainsi aux processus de formation de la mémoire (Lazarov & Hollands 2016) et plus particulièrement à la mémoire spatiale (Clelland et al. 2009). 15% des cellules se différencient en cellules GABAergiques et les 10% restants se différencient en cellules gliales, majoritairement des astrocytes.

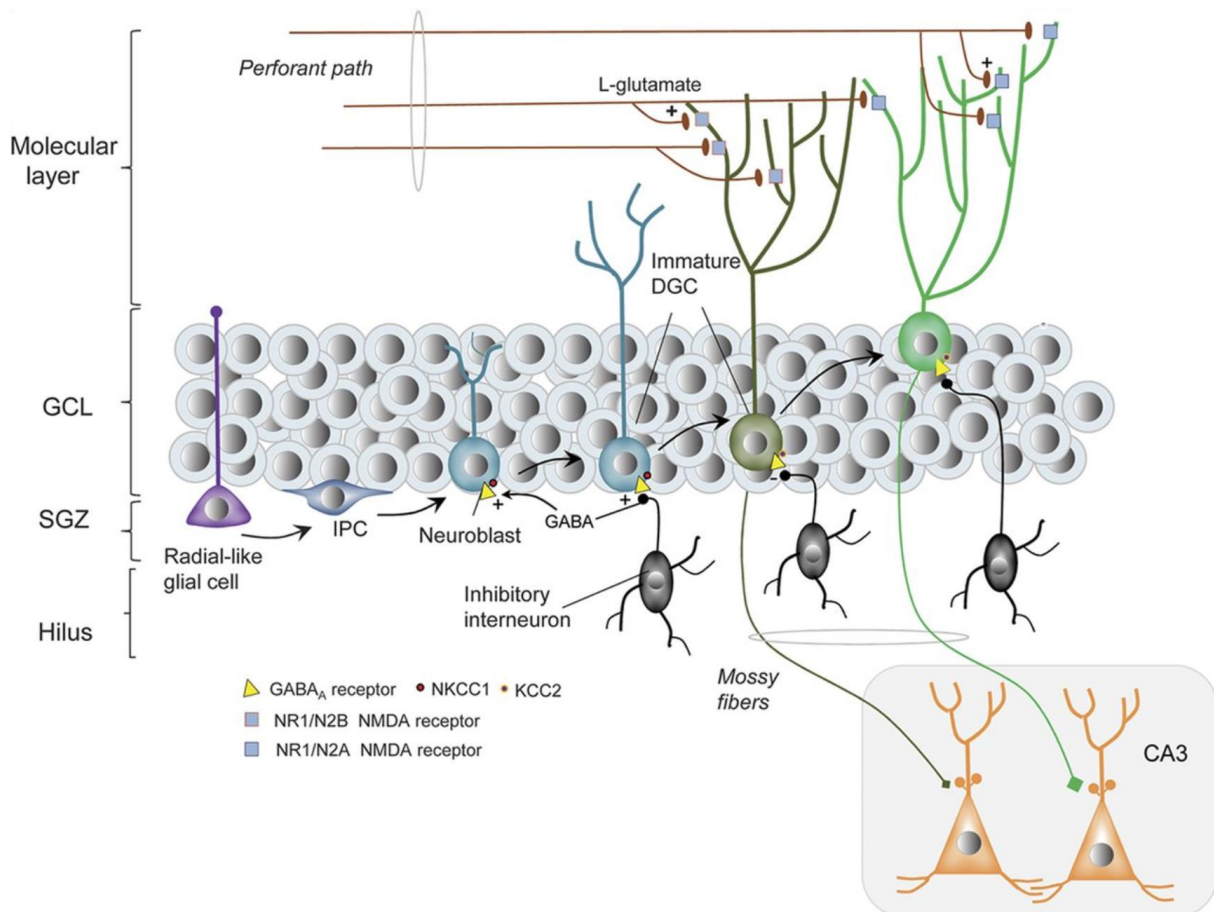


Figure 10 : La neurogenèse dans le gyrus denté humain adulte.

Les neurones nés dans la zone sous-granulaire (SGZ) subissent une courte migration radiale, s'intègrent dans le réseau local du gyrus denté et se différencient en cellules excitatrices du gyrus denté (DGC). Les cellules gliales radiales génèrent des précurseurs prolifératifs intermédiaires (IPC) qui se différencient en neuroblastes puis en neurones immatures. Les neurones se développent et mûrissent lorsqu'ils migrent radialement à travers la couche cellulaire granulaire. Le développement des axones et des dendrites coïncide avec la synaptogenèse. Les premières entrées sont GABAergiques puis, les DGC commencent à s'intégrer au réseau préexistant et développement des épines qui reçoivent des entrées glutamatergiques du cortex entorihnal. *Figure tirée de (Benarroch 2013).*

De la prolifération des cellules progénitrices jusqu'à la maturation et l'intégration fonctionnelle des nouveaux neurones au sein des réseaux existants, les différentes étapes de la neurogenèse adultes sont finement régulées (Egeland et al. 2015). L'environnement ou la condition générale d'un individu modulent directement la

neurogenèse. A titre d'exemple, il a été montré que l'exercice physique avait un effet sur l'activation des cellules quiescentes (Rolando & Taylor 2014).

2.3.2. Circuiterie

C'est le gyrus denté qui constitue la plus grosse partie réceptrice de signaux de la formation hippocampique et le subiculum qui est la partie émettrice. La connectivité de l'hippocampe est illustrée en **Figure 11** (Piatti et al. 2013).

Les fibres perforantes arrivent de la couche II du cortex entorhinal et établissent la première connexion de la boucle tri-synaptique avec les cellules granulaires du gyrus denté. Les voies perforantes se divisent en 2 dans la couche moléculaire du gyrus denté. A partir des cellules granulaires, les fibres moussues projettent vers l'intérieur de la couche polymorphique du GD et vers le CA3 constituant la deuxième connexion de la boucle. Les projections se divisent alors en deux branches : une branche forme les fibres commissurales qui projettent vers l'hippocampe controlatéral, pour synchroniser les deux hippocampes, et l'autre branche forme les collatérales de Schaffer (troisième connexion) qui se connectent avec les cellules du CA1. Les axones des cellules du CA1 projettent vers les neurones du subiculum et du cortex entorhinal. Les axones des neurones pyramidaux du subiculum projettent vers les noyaux sous-corticaux via la fimbria.

Il est important de noter qu'étant une boucle, cette circuiterie est une véritable région d'amplification du signal, ce qui la rend très sensible à l'épilepsie.

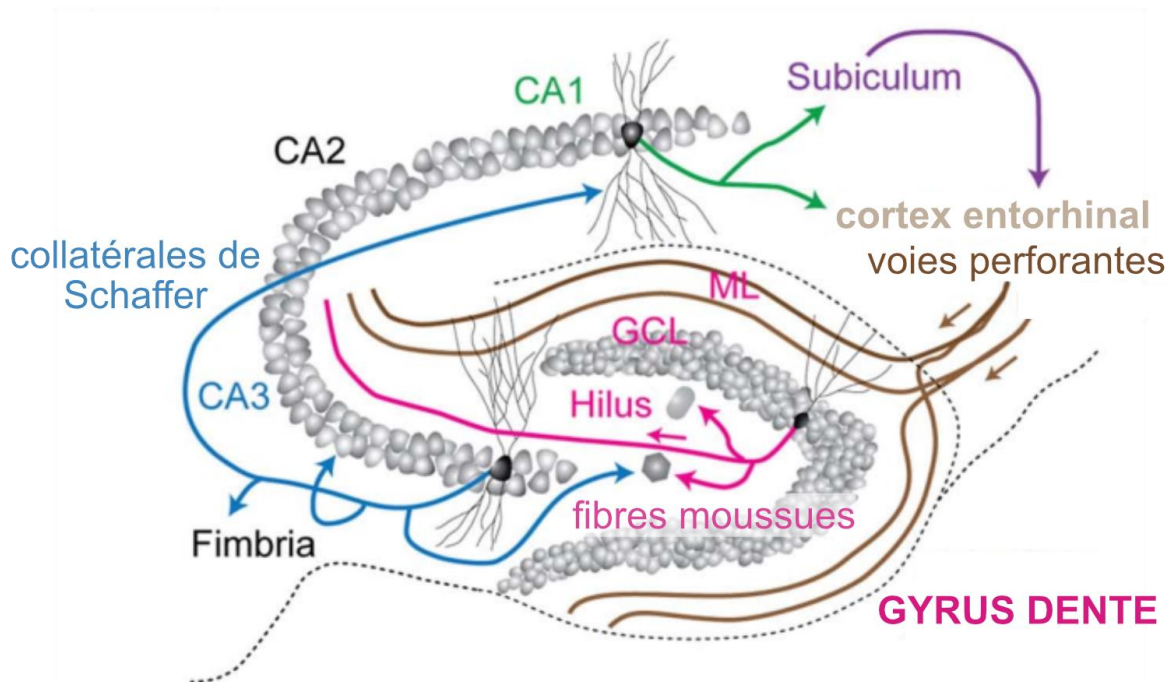


Figure 11 : La circuiterie hippocampique : la Boucle Tri-Synaptique.

Représentation des composants principaux de la connectivité de la formation hippocampique. Les voies perforantes, en provenance du cortex entorhinal, projettent vers les cellules granulaires du gyrus denté (GCL) en passant par la couche moléculaire (ML). Les fibres moussues issues des neurones granulaires contactent les cellules pyramidales du CA3. Les collatérales de Schaffer innervent les cellules pyramidales du CA1. Les axones du CA1 projettent ensuite dans le subiculum et le cortex entorhinal pour terminer la boucle. *Illustration adaptée de (Piatti et al. 2013).*

2.4. Cervelet

Le cervelet est une structure située en dessous des hémisphères cérébraux à l'arrière du cerveau. Initialement considérée comme une structure initiant le mouvement, il a en réalité été montré plus tard que le cervelet modifie les commandes motrices des voies descendantes pour rendre les mouvements plus adaptatifs et précis. Il est ainsi essentiel pour le maintien de l'équilibre et de la posture en réponse aux changements de position du corps. Le cervelet intervient également dans la coordination des mouvements volontaires initiés par les différents groupes musculaires afin de produire des mouvements fluides. La dernière fonction motrice du cervelet concerne

l'apprentissage. Par un processus d'essais/erreur, il joue un rôle majeur dans l'adaptation à réaliser un mouvement précis. Le cervelet est également impliqué dans certaines fonctions cognitives, telles que le langage (Mariën & Borgatti 2018), l'attention, la régulation des réactions de peur (Batsikadze et al. 2022) et de plaisir.

2.4.1. Anatomie

Le cervelet est anatomiquement composé de trois parties, représentées en **Figure 12** :

- Le cortex cérébelleux est lui-même divisé en trois couches. La couche la plus interne est composée de cellules granulaires, la couche intermédiaire de cellules de Purkinje et la couche externe, appelée couche moléculaire, renferme les axones des cellules granulaires et les dendrites des cellules de Purkinje. La couche moléculaire contient des cellules inhibitrices, en étoile et en corbeille, qui forment des synapses GABAergiques avec des cellules de Purkinje.
- La substance blanche interne, contenant des fibres nerveuses myélinisées
- Les noyaux cérébelleux profonds.

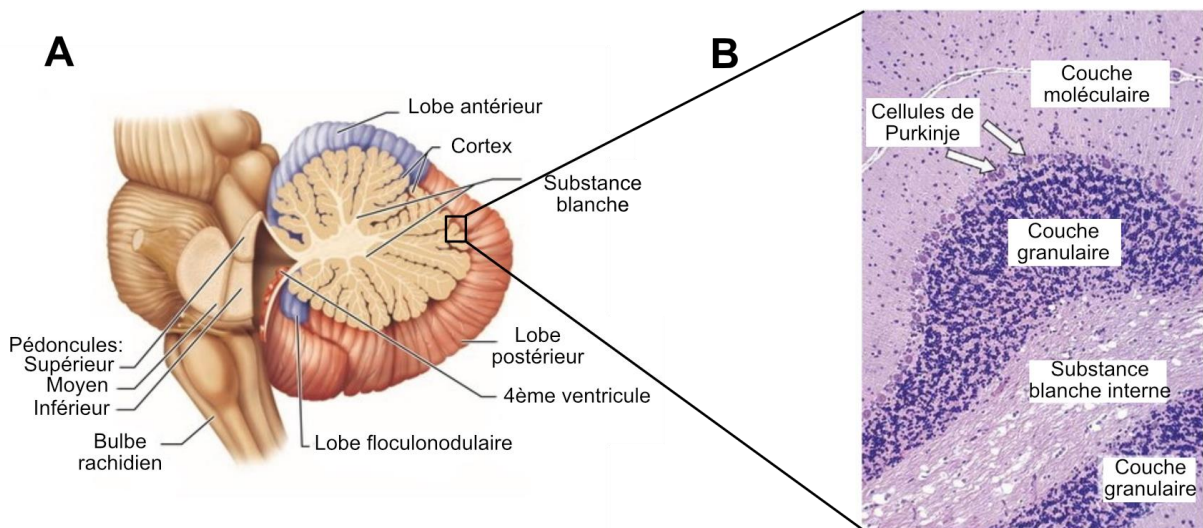


Figure 12 : Organisation du cervelet dans le cerveau humain.

(A) Les différents composants du cervelet sont représentés sur l'illustration. **(B)** Zoom de la région du cortex cérébelleux entourée en A. Coupe histologique de cervelet colorée au Nissl. Image du cervelet trouvée du <https://www.simplepharmanotes.com>

2.4.2. Circuiterie

La connectivité du cervelet s'organise autour de la cellule de Purkinje dont l'axone se projette sur les noyaux profonds. Il existe deux principaux systèmes afférents excitateurs représentés en **Figure 13** :

- Les fibres moussues proviennent des noyaux pontiques, de la moelle épinière, du tronc cérébral et des noyaux vestibulaires et établissent des synapses excitatrices avec les dendrites des cellulaires granulaires dont les axones (appelés alors fibres parallèles) forment à leur tour des synapses excitatrices avec les dendrites des cellules de Purkinje.
- Les fibres grimpantes proviennent de l'olive bulbaire et forment des synapses excitatrices avec les cellules de Purkinje.

Il existe également des systèmes inhibiteurs. Les fibres moussues et fibres parallèles excitent aussi les cellules de Golgi qui, elles, forment des synapses inhibitrices avec les cellules granulaires. Enfin, les cellules en panier et les cellules étoilées, excitées par les fibres parallèles, envoient aussi un signal inhibiteur sur les cellules de Purkinje.

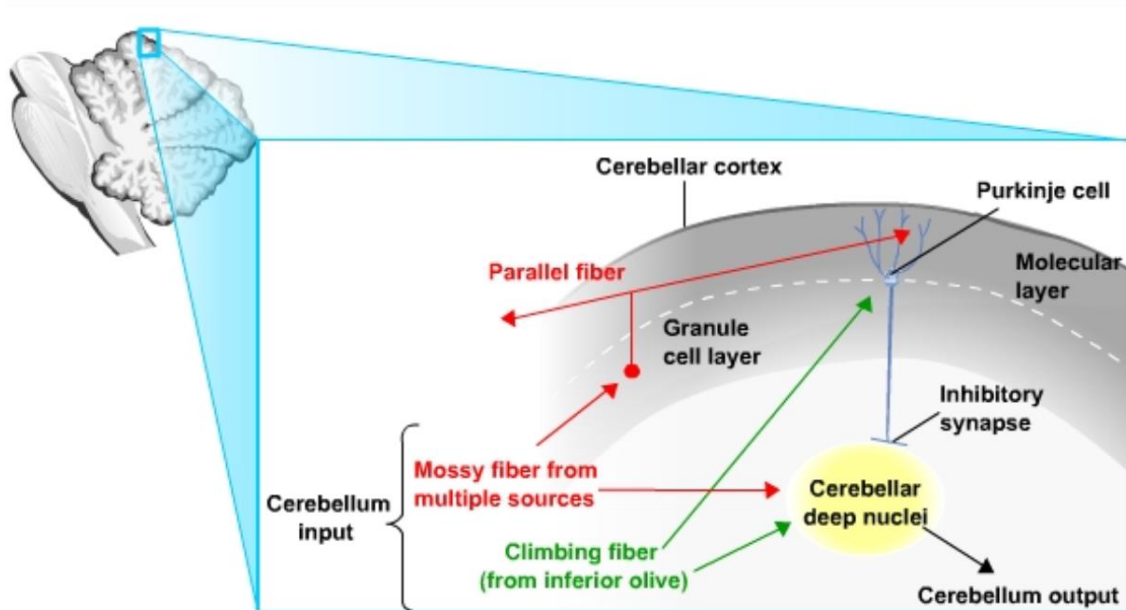


Figure 13 : La circuiterie cérébelleuse.

Représentation des principaux composants de la circuiterie du cervelet. Dans le cortex cérébelleux (Cerebellar cortex), les fibres moussues (Mossy fiber) projettent dans la couche granulaire (granule cell layer). Les fibres parallèles (Parallel fiber) forment des synapses excitatrices avec les cellules de Purkinje (Purkinje cell) localisées à la frontière entre couche granulaire et couche moléculaire (Molecular layer). Les fibres grimpantes (Climbing fiber) projettent également vers les cellules de Purkinje. Les cellules de Purkinje forment des synapses inhibitrices avec les cellules des noyaux profonds (Cerebellar deep nuclei). *Illustration empruntée à <https://nba.uth.tmc.edu>*

3. Rôles des lipides dans le développement cérébral et le maintien de l'homéostasie neuronale

Les lipides sont des composants essentiels de la physiologie humaine et sont donc indispensables, entre autres, au bon développement cérébral. Ils agissent comme des constituants clefs des membranes cellulaires, affectant la synthèse membranaire et la transduction du signal (Xu & Huang 2020). Ainsi, la compréhension des changements dans le métabolisme des lipides et leur trafic est essentiel pour comprendre les mécanismes de bon fonctionnement neuronal.

Après le tissu adipeux, le cerveau est le deuxième tissu humain possédant la plus haute teneur en lipides. Ils représentent 50% de son poids sec (Hornemann 2021). Les lipides cérébraux sont principalement constitués de cholestérol, de phospholipides et de sphingolipides (Naudí et al. 2015). Chaque famille de lipides possède un rôle précis dans le système nerveux central (**Figure 14**).

phospholipase C (PLC) et la phospholipase D (PLD) conduit à la génération de seconds messagers. Le développement neuronal nécessite la régulation des enzymes associées à la synthèse des lipides, telles que la céramide synthase 2 (CerS2), la céramide galactosyltransférase (CST), la céramide galactosyltransférase (CGT) et la N-acétyl- α -neuraminidase 3 (Neu3). Abréviations : PIP, phosphatidylinositol-phosphate ; GSL, glycosphingolipide ; GluCer, glucosylcéramide ; FFA, acide gras libre. *Source : Yoon et al. 2022.*

3.1. Le Cholestérol

Le cholestérol cérébral représente 25% du cholestérol total présent dans le corps humain. Les cholestérols sont principalement générés par les astrocytes et transférés aux neurones grâce, entre autres, à l'apolipoprotéine E (ApoE). Dans les neurones, le cholestérol intervient dans la croissance des dendrites et le maintien de la stabilité des microtubules (Fan et al. 2002; Ko et al. 2005). Il est également essentiel à la connectivité synaptique (Arenas et al. 2017). Etant donné que la formation des synapses implique la réorganisation des composants des structures cellulaires (Kelsch et al. 2010), plusieurs études suggèrent qu'elle repose sur des voies de signalisation faisant intervenir le cholestérol (Fester et al. 2009). Plus généralement, des changements dans la teneur en acides gras se produisent dans le cône de croissance avant la synaptogenèse (Martin & Bazan 1992) et une anomalie de formation des radeaux lipidiques à l'intérieur du neurone entraîne une diminution de la densité dendritique, perturbant ainsi la communication neuronale (Wang 2014). Il a également été montré qu'une altération d'ApoE était à l'origine de déficit de plasticité synaptique du développement de troubles du fonctionnement cognitif (Periyasamy et al. 2017). Enfin, le cholestérol est également un composant important de la gaine de myéline (Zhang & Liu 2015; Dimas et al. 2019).

3.2. Les Glycérophospholipides

Les glycérophospholipides, tels que les phosphatidylcholines et les phosphatidyléthanolamines, sont les principaux composants phospholipidiques des membranes des cellules neuronales et ont un rôle dans le contrôle de l'ancrage membranaire des protéines (Kosicek & Hecimovic 2013). Une modification de leur composition a une incidence directe sur la stabilité, la perméabilité et la fluidité des membranes neuronales (Farooqui et al. 2000). Il a été très tôt démontré que les phospholipides régulent la croissance des neurites (Schwarz et al. 1995) mais leur rôle principal demeure la génération de seconds messagers des voies de signalisation de la neuro-inflammation et de la neuroprotection (Dyall et al. 2022).

3.3. Les Sphingolipides

Les sphingolipides, composants essentiels des membranes cellulaires, sont très présents dans le système nerveux. Ils sont impliqués dans bon nombre de fonctions cérébrales (Hussain et al. 2019; Olsen & Færgeman 2017) telles que la neurogenèse et la synaptogenèse. En fonction de leur localisation, les sphingolipides possèdent des fonctions différentes. Au niveau des radeaux lipidiques, ils sont associés à l'activité des protéines transmembranaires (Piomelli et al. 2007) tandis que dans les membranes synaptiques, ils interagissent avec les récepteurs des neurotransmetteurs pour réguler leur activité (Fantini & Barrantes 2009).

La famille des sphingolipides est composée de sphingomyéline, gangliosides, cérébrosides et sulfatides, tous dérivés de céramides synthétisées dans le réticulum endoplasmique (van Kruining et al. 2020). De nombreuses études ont fait état d'un rôle important des sphingolipides dans la croissance des neurites et la formation des

synapses. En effet, la distribution correcte des protéines le long de l'axone nécessite la formation de microdomaines riches en sphingomyélines et la maturation de la membrane plasmique axonale nécessite une hausse de leur synthèse (Galvan et al. 2005). Les céramides sont également des composants essentiels à la survie neuronale. En effet, il a été montré que des concentrations élevées en céramides induisaient l'apoptose dans les cellules neuronales (Schwarz et al. 1995).

En conclusion, les lipides sont des composants cruciaux de la fonction cellulaire en raison de leur rôle dans la formation des membranes, la signalisation intercellulaire ou encore le maintien de l'homéostasie. Dans le cerveau, les dérégulations de l'homéostasie lipidique entraînent des dysfonctionnements du développement, de la croissance et du fonctionnement neuronal à l'intérieur des différentes structures cérébrales. Or, la quasi-totalité des régions cérébrales sont impliquées dans le processus cognitif. Une mauvaise homéostasie lipidique peut donc être à l'origine du développement de troubles cognitifs.

Chapitre 2 : Anomalies du développement cérébral et déficiences intellectuelles

Chaque étape du développement est essentielle au futur bon fonctionnement cérébral. L'apparition d'une anomalie au cours du développement du cerveau est à l'origine de l'apparition de défauts morphologiques et cognitifs. Le nouveau chapitre de cette thèse traitera des troubles du développement intellectuel et des différentes techniques d'études des anomalies cérébrales.

1. Anomalies du développement et malformations cérébrales

Les malformations cérébrales sont parmi les malformations congénitales les plus dévastatrices observées. Les nourrissons touchés peuvent présenter un retard de développement profond, des troubles convulsifs, une paralysie cérébrale, une cécité ou encore des difficultés d'alimentation et respiratoires.

1.1. Anomalies globales

Comme évoqué précédemment, le développement d'un cerveau fonctionnel dépend d'une séquence précise et complexe de prolifération, de migration et de maturation des cellules neuronales et gliales. La fenêtre d'apparition de l'anomalie conditionne sa manifestation clinique. Lorsque la morphologie globale du cerveau est altérée, on parle de malformations cérébrales macroscopiques : holoprosencéphalie lorsqu'il y a eu défaut de clivage du cerveau en deux hémisphères, schizencéphalie lorsque le cerveau possède des fentes anormales contenant du liquide céphalo-rachidien,

porocéphalie lorsque le cerveau présente une cavité intracérébrale circonscrite, hydrocéphalie quand il y a augmentation du volume de liquide céphalo-rachidien ou encore agénésie du corps calleux lorsqu'il n'y a pas de communication entre les deux hémisphères.

Une des anomalies cérébrales la plus fréquente et la plus connue est la microcéphalie, une affection se caractérisant par une tête anormalement petite. Or, souvent, la tête est petite car le cerveau est petit et anormalement développé. Avant la naissance, la microcéphalie peut être diagnostiquée lors de l'échographie prénatale réalisée à la fin du deuxième ou au début du troisième trimestre. Après la naissance, la circonférence de la tête du bébé est mesurée par le médecin lors de chaque examen clinique de routine. La microcéphalie est avérée lorsque le périmètre crânien du bébé est significativement inférieur à celle normalement enregistrée pour les bébés de même sexe, âge et ethnies. Le trouble inverse à la microcéphalie, plus rare, est la macrocéphalie. Dans ce cas, le périmètre crânien est significativement plus grand chez le patient. Dans les deux cas, le médecin réalise généralement une tomodensitométrie (TDM) ou une imagerie par résonance magnétique (IRM) de la tête, afin de détecter d'éventuelles anomalies cérébrales sous-jacentes.

1.2. Imagerie cérébrale

Lorsqu'un patient est référé pour une imagerie en raison d'une suspicion de malformation cérébrale, l'imagerie doit être orientée vers la mise en évidence d'une anomalie de structure. Les séquences d'imageries doivent maximiser le contraste entre la matière grise et la matière blanche et avoir une résolution spatiale élevée

(Osborn & Digre 2016). Plus la résolution de l'imagerie est élevée, plus la mise en évidence d'anomalies subtiles est possible.

L'analyse des résultats doit suivre un protocole ordonné. Les structures de la ligne médiane, le cortex cérébral (épaisseur corticale, motif des gyrus, jonction entre le cortex et la substance blanche), la substance blanche cérébrale (myélinisation, présence de fentes), les ganglions de la base, les ventricules (présence et forme), la fissure interhémisphérique et les structures du cerveau postérieur du mésencéphale (tronc cérébral et cervelet) doivent être examinés chez chaque patient (Osborn & Digre 2016).

Notons que, même en présence d'un cerveau morphologiquement normal, la connectivité neuronale peut être altérée par un dysfonctionnement de la glie ou par une malformation neuronale. C'est pour cela que, si une anomalie cérébrale est suspectée ou détectée, elle s'accompagne la plupart du temps par le développement de troubles intellectuels et cognitifs.

2. Trouble du développement intellectuel

2.1. Définition et prévalence

Le DSM-5 (Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux) définit les troubles neurodéveloppementaux comme « un ensemble d'affections qui débutent durant la période du développement [...] caractérisés par des déficits du développement et qui entraînent une altération du fonctionnement personnel, social, scolaire ou professionnel ». Ces troubles regroupent les troubles moteurs (troubles du développement de la coordination motrice), les troubles de déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité (TDAH), les troubles spécifiques du langage et des

apprentissages (TSLA), les troubles du spectre de l'autisme (TSA) et les troubles du développement intellectuel (TDI).

TROUBLES DU NEURODEVELOPPEMENT

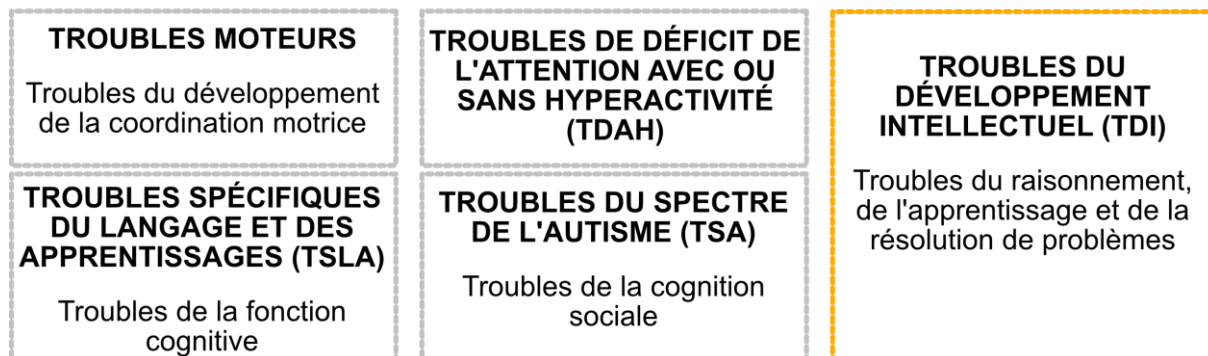


Figure 15: Les Troubles du Développement Intellectuel au sein des Troubles du Neurodéveloppement.

Adapté de <http://handiconnect.fr> (consulté en mars 2023)

Anciennement appelé « retard mental » ou « déficience intellectuelle », les TDI concernent les limitations d'aptitude aux activités cognitives telles que le raisonnement, l'apprentissage académique, l'apprentissage par l'expérience ou la résolution de problèmes. Le diagnostic se fait généralement, avant l'âge de 18 ans, chez des patients présentant les deux critères suivants :

- Un déficit général des capacités cognitives. Les patients présentent un quotient intellectuel inférieur à 70 points contre 90 à 110 de moyenne pour la population générale.
- Un fonctionnement social mal-adaptatif. Les limitations du fonctionnement intellectuel restreignent la participation du patient à la vie collective et quotidienne. Ces limitations sont autant sociales (altération de la

communication) que pratiques (manque d'autonomie pour les tâches quotidiennes).

Les TDI sont la plus fréquente des maladies cognitives et affectent entre 1 et 3% de la population générale (Harris,M.D & Harris,M.D 2005). En France par exemple, on estime à environ 1 million le nombre de personnes souffrant de TDI. Par sa prévalence et son impact sur la vie des patients et de leur famille, la prise en charge de la déficience intellectuelle représente un véritable coût de santé publique (43,3 milliards d'euros par an en Europe (Salvador-Carulla & Symonds 2016)) ce qui fait de la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la maladie un véritable défi pour la recherche.

Il existe quatre catégories de déficience intellectuelle, selon le niveau d'atteinte. Plus le QI est bas, plus les incapacités sont nombreuses :

- Déficience intellectuelle légère (QI entre 55 et 75) : la personne peut mener une vie autonome si elle y a été préparée.
- Déficience intellectuelle moyenne (QI entre 35 et 54) : la personne vit en milieu protégé et supervisé.
- Déficience intellectuelle sévère (QI entre 20 et 34) : la personne vit en milieu protégé et supervisé également.
- Déficience intellectuelle profonde (QI en dessous de 20) : la personne ne parle pas, n'a aucune autonomie, sa coordination physique et son développement sensoriel sont très atteints.

Enfin, cliniquement, il est utile de distinguer les formes syndromiques (ex : Syndrome de Cohen, syndrome de Rett, syndrome de Prader-Willi...), des formes non syndromiques de TDI, selon l'atteinte d'autres organes et la présence, ou non, de malformations faciales typiques.

2.2. Origines

Confirmation de diagnostic ne rime pas avec identification de la cause du TDI, ce qui limite la prise en charge, la compréhension et l'acceptation de la maladie par le patient et sa famille. De plus, même s'il n'existe que peu d'approches thérapeutiques, celles-ci sont impossibles quand l'origine exacte de la pathologie n'a pas été identifiée. L'étiologie du TDI se divise principalement en exposition environnementale et anomalies génétiques.

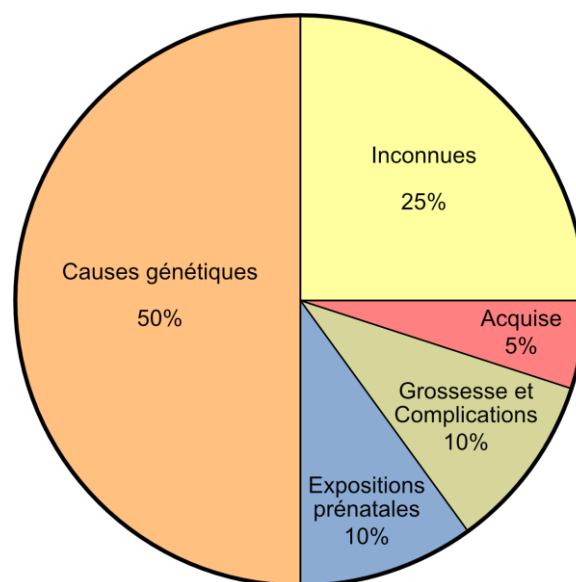


Figure 16: Etiologie de la déficience intellectuelle.

Adapté de (Marrus & Hall 2017). Les causes de la déficience intellectuelle et leurs pourcentages respectifs sont indiqués.

2.2.1. Facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux de risque de développement de TDI concernent aussi bien la période prénatale que la naissance.

L'état de santé de la mère pendant la grossesse exerce une influence sur le développement de l'enfant et sur ses futures capacités cognitives. Les études ont montré que l'hypertension pendant la grossesse, l'obésité, le diabète pré-gestationnel, les infections urinaires ou encore l'asthme augmentent le risque d'apparition de troubles du neurodéveloppement et notamment de déficience intellectuelle (Li et al. 2016; Mann et al. 2013).

L'exposition maternelle à des substances toxiques peut également affecter de manière significative le développement cérébral du fœtus et avoir ainsi un impact sur ses capacités cognitives. C'est le cas du tabac (Ekblad et al. 2015) mais aussi de l'alcool. L'exposition fœtale à l'alcool, appelée Syndrome d'Alcoolisation Fœtale, inhibe la production d'acide rétinoïque, molécule essentielle à la neurogenèse, à l'adressage neuronal et à la croissance des neurites (Denny et al. 2017; Petrelli et al. 2019). D'autres agents infectieux courants tels que la rubéole ou le VIH peuvent également entraîner des lésions neuronales. Enfin, il a également été montré que des complications lors de l'accouchement, la prématurité, le poids de naissance ou une hypoxie constituent des facteurs fortement associés au risque de TDI (Huang et al. 2016).

2.2.2. Facteurs génétiques

Des chercheurs estiment que 40 à 50% des déficiences intellectuelles modérées ou sévères sont d'origine génétique (Pavlovsky et al. 2012). Cependant, la grande

hétérogénéité génétique ainsi que l'absence d'un mode de transmission spécifique des anomalies peuvent entraver la détection du gène impliqué. Heureusement, les progrès technologiques des dernières années, la mise en place de nouvelles techniques de diagnostic moléculaire et de séquençage à « haut débit », tels que le séquençage du génome entier à haut débit (WGS) et le séquençage unicellulaire, ont conduit à l'identification de nouveaux gènes responsables de maladies humaines et impliqués dans les TDI. A ce jour, selon la base de données SysNDD, il existe 1564 gènes impliqués dans les troubles neurodéveloppementaux et 885 d'entre eux sont associés à la déficience intellectuelle. (<https://sysnidd.dmbr.unibe.ch> ; consulté le 25/01/2023) (Kochinke et al. 2016).

L'anomalie génétique peut être une anomalie cytogénétique, une aberration chromosomique, une variation du nombre de copies ou une mutation monogénique. Le premier test génétique utilisé dans l'étude des TDI est l'analyse du caryotype (Tjio & Levan 1956). Cette technique classique permet d'identifier les aneuploïdies telles que les trisomies ou les réarrangements structurels de grandes tailles. L'Analyse Chromosomique sur Puce à ADN (ACPA, ou CGH-array en anglais) permet de rechercher des anomalies chromosomiques de plus petite taille, non visibles sur un caryotype standard (Sanlaville et al. 2005). Bien qu'utilisée en première intention, cette technique présente quand même des limites telles que la non-détection des mutations dans les gènes. D'autres techniques prennent alors le relais. Le séquençage de l'exome entier (WES) examine la région codante de la protéine où l'on estime que 85% des mutations pathogènes se produisent (Choi et al. 2009). Cela a permis d'améliorer le diagnostic moléculaire des patients. Le séquençage du génome entier (WGS) permet quant à lui d'examiner les variants structuraux (SV), les variations du nombre de copies (CNV), les variations de séquences (indels) et les variants mononucléotidiques (SNV)

à la fois dans la partie codante et dans la partie non codante offrant ainsi une meilleure couverture à l'analyse et un meilleur diagnostic des troubles monogéniques.

Les troubles monogéniques sont regroupés en différents types selon leur mode de transmission. Bien qu'il ne représente qu'environ 5% du génome humain, il a été établi très tôt qu'un nombre considérable de maladies génétiques étaient associées au chromosome X. Dès 2005, une étude a montré qu'environ 10 à 12% des gènes du chromosome X étaient liés à la déficience intellectuelle (Ropers & Hamel 2005). C'est d'ailleurs la proportion de maladies liés à l'X qui est souvent mise en avant pour expliquer la distorsion du ratio hommes/femmes atteints par la déficience intellectuelle (excès d'environ 40% d'hommes atteints) (Stevenson & Schwartz 2002). L'exemple le plus connu de maladie cognitive liée à l'X est le syndrome de l'X fragile, une des causes les plus communes de déficience intellectuelle, causé par des mutations dans le gène *FMR1*, mais plus de 140 autres gènes peuvent également être impliqués (Neri et al. 2018). Lorsqu'elles ne sont pas liées à l'X ou à l'Y, les mutations génétiques sont dites autosomales. On parle de mutation à transmission autosomale dominante lorsque la présence d'une mutation sur un seul des allèles de l'individu suffit au développement de la maladie. La transmission est dite autosomale récessive quand les deux allèles du gène sont atteints.

Lorsqu'un gène est déclaré « candidat » pour être à l'origine des phénotypes observés chez les patients, des études fonctionnelles sont réalisées afin de comprendre la pathogénicité du variant et d'en prouver la causalité.

3. Analyse de l'implication des gènes dans le développement cérébral et la cognition

Différentes techniques biologiques sont utilisées afin d'évaluer l'implication d'un gène dans le développement cérébral et la cognition. Ces études peuvent être menées directement à l'échelle cellulaire (études *in vitro*) ou au niveau de l'organisme entier (études *in vivo*).

3.1. Etudes *in vitro*

L'un des avantages des études *in vitro* est la facilité avec laquelle les cellules peuvent être modifiées génétiquement afin d'invalider un gène d'intérêt. La technique d'inhibition par traitement aux siARN est illustrée en **Figure 17**.

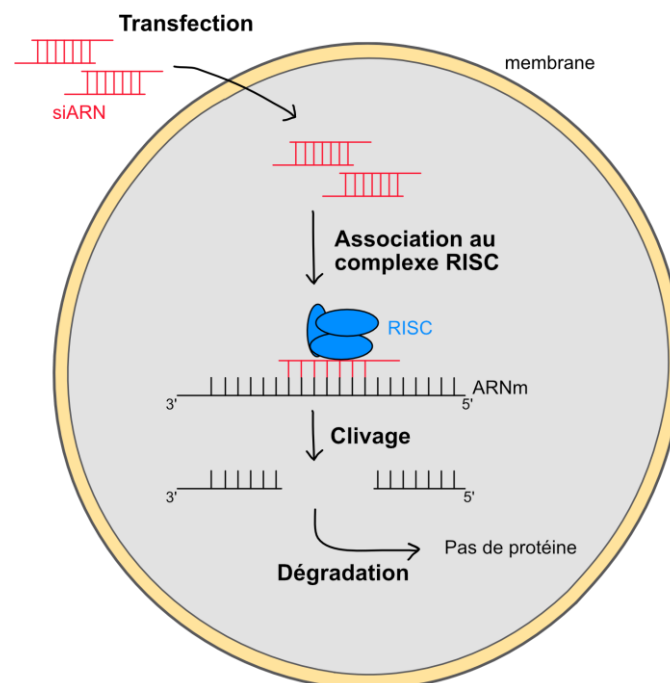


Figure 17: Inhibition de l'expression d'un gène par traitement aux siARN.

Schéma explicatif de la cascade de réactions intracellulaires induisant l'inactivation des ARNm en réponse à la transfection de siARN.

La transfection de siARN (petits ARN interférents) est une approche permettant d'inhiber l'expression des gènes et donc de réguler leur expression (Hammond et al. 2000; Chen et al. 2008). Les siARN sont des petits ARN double brin reconnus dans le cytoplasme de la cellule par un complexe protéique (RNA Induce Silencing Complex) qui va reconnaître le transcrit cible et le couper. Le transcrit ainsi clivé sera dégradé empêchant toute nouvelle traduction de la protéine codée. La technique de « ciseaux moléculaires » CRISPR/Cas9 peut également être utilisée dans les lignées cellulaires pour invalider l'expression d'un gène. Le principe de la technique est expliqué plus tard.

3.1.1. Lignées cellulaires commerciales

En neurobiologie, l'une des lignées cellulaires « commerciales » humaines la plus utilisée est SH-SY5Y. Ces cellules ont été dérivées d'une biopsie de moelle osseuse réalisée chez une fillette de quatre ans atteinte d'un neuroblastome (Biedler et al. 1973, 1978). Une lignée similaire, appelée Neuro-2A, a également été développée à partir d'un neuroblastome chez la souris. Qu'elles soient humaines ou murines, ces cellules possèdent une morphologie de cellules souches neuronales leur permettant de se différencier en réponse à des facteurs environnementaux tels que la privation de sérum ou le traitement à l'acide rétinoïque (Kunzler et al. 2017; Kumar & Katyal 2018).

En plus d'être faciles à entretenir en culture, ces cellules peuvent également être modifiées génétiquement afin d'invalider un gène d'intérêt.

3.1.2. Cellules dérivées de patients

L'utilisation de cellules directement dérivées de patients (fibroblastes, lymphocytes) constitue une alternative efficace pour s'affranchir d'un éventuel problème d'efficacité de transfection qui rendrait l'inactivation du gène non complète, ou du moins, trop variable. Cependant, bien que très efficaces pour permettre de mettre en lumière d'éventuels mécanismes moléculaires dérégulés, elles ne possèdent pas les caractéristiques des cellules cérébrales. De plus, le cerveau est un organe inaccessible pour un prélèvement chez l'Homme de son vivant et un prélèvement cellulaire post-mortem ne renseignerait que sur l'état du tissu au stade terminal de la maladie. Il était donc essentiel de développer des techniques permettant l'étude du rôle du gène candidat au moment du développement du tissu.

3.1.2.1. iPSC

Les cellules souches sont naturellement présentes chez l'embryon. Dans le cerveau en développement, les cellules souches embryonnaires sont à l'origine de la formation du neuroblaste, précurseur du neurone. Une cellule souche est dite « pluripotente » lorsqu'elle peut se différencier en n'importe quel type cellulaire de l'organisme. Chez l'adulte, on retrouve des cellules souches uniquement dans la moelle osseuse, ce qui les rend relativement difficilement accessibles. En 2006, une étude menée par l'équipe du Dr. Shinya Yamanaka (prix Nobel 2012) a montré que des cellules souches pluripotentes pouvaient être générées directement à partir de cellules somatiques, des fibroblastes issus d'une simple biopsie de peau (Takahashi & Yamanaka 2006). Ces cellules, appelées iPSC (induced Pluripotent Stem Cells), peuvent ensuite être reprogrammées à l'aide de facteurs de transcription (Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc) puis

différenciées en populations neuronales (Frega et al. 2017; Ardhanareeswaran et al. 2017; Fernando et al. 2020). L'utilisation de ce type cellulaire a déjà prouvé son efficacité dans la recherche médicale sur les syndromes de Rett, de l'X fragile, de Prader-Willi ou encore de l'ataxie de Friedreich (Sabitha et al. 2021).

Cependant, aussi bien pour les lignées commerciales que pour les iPSC, la limite de ce système cellulaire en « 2D » est qu'il ne reflète pas la nature réelle d'un environnement *in vivo* puisque les cellules isolées manquent d'interactions entre elles et avec la matrice extracellulaire (Segeritz & Vallier 2017). C'est pour cela que de nombreuses équipes sont passées à une culture « 3D » avec des organoïdes.

3.1.2.2. Organoïdes cérébraux

Un organoïde est une structure multicellulaire reconstruite dans un système de culture tridimensionnel censé reproduire la micro-anatomie d'un organe. Ces structures peuvent être formées à partir de cellules souches embryonnaires ou d'iPSC. En neurobiologie, la première utilisation d'organoïde cérébral remonte à 2013 (Lancaster & Knoblich 2014). Les cellules souches s'organisent d'abord en sphère (corps embryoïde) sur lequel pousse un tissu neuroectodermale. Les corps embryoïdes sont ensuite placés sur un support de croissance en présence d'un milieu de culture favorisant la différenciation neurale. L'avantage de la technique est que les différentes cellules neuronales interagissent directement entre elles pour former un réseau fonctionnel et s'organisent en « structures » (Chiaradia & Lancaster 2020; Guy et al. 2021). En revanche, en absence de vascularisation, leur croissance est limitée (environ 4 mm de diamètre au bout de 8 semaines), leur survie est altérée et des anomalies peuvent apparaître (Bhaduri et al. 2020).

Qu'elle soit bi ou tridimensionnelle, la culture de cellules neuronales *in vitro* présente de nombreux avantages pour étudier notamment la morphologie neuronale, la croissance axonale ou encore l'organisation intracellulaire des neurones. Cependant, le passage à un modèle animal plus intégratif est essentiel pour faire le lien entre processus nerveux et processus cognitif/comportemental.

3.2. Etudes *in vivo*

En neurosciences, les modèles animaux, ou organismes modèles, ont joué un rôle déterminant dans la découverte des principes de base de la fonction neuronale. C'est le cas de Hodgkin et Huxley qui, en 1952, ont mis en évidence la notion de potentiels d'actions à l'intérieur d'un axone de calamar (Hodgkin & Huxley 1952).

De nos jours, les scientifiques utilisent plus couramment le ver (*Caenorhabditis elegans*), le poisson zèbre (*Danio rerio*), la drosophile (*Drosophila melanogaster*), les rongeurs (souris *Mus musculus* et rats *Rattus norvegicus*) et les primates non humains (macaques *Macaca fascicularis*, babouins *Papio papio* ou encore marmousets *Callithrix jacchus*) pour comprendre les différents aspects du fonctionnement cérébral.

L'utilisation de chaque organisme présente des avantages et des inconvénients et le choix du modèle d'étude dépend de la thématique de recherche. Durant ma thèse, j'ai uniquement travaillé avec la souris, c'est pour cela que je ne parlerai, ici, que des modèles murins.

Chapitre 3 : Apport des modèles murins dans l'étude des anomalies du développement cérébral et de la cognition

1. Développement du cerveau de la souris

Les étapes clés du développement cérébral sont conservées chez les mammifères. Ainsi, le développement du cerveau des souris suit, globalement, les mêmes étapes que celui de l'Homme. La chronologie des principaux événements du développement du cerveau de souris est présentée en **Figure 18**. A titre d'exemple, la neurogenèse commence dans le cerveau des rongeurs aux alentours des stades embryonnaires E8-E10. La synaptogenèse a lieu pendant les trois premières semaines postnatales, avec un pic au cours de la deuxième semaine. Enfin, la myélinisation commence un à trois jours après la naissance du souriceau (Mira & Morante 2020).

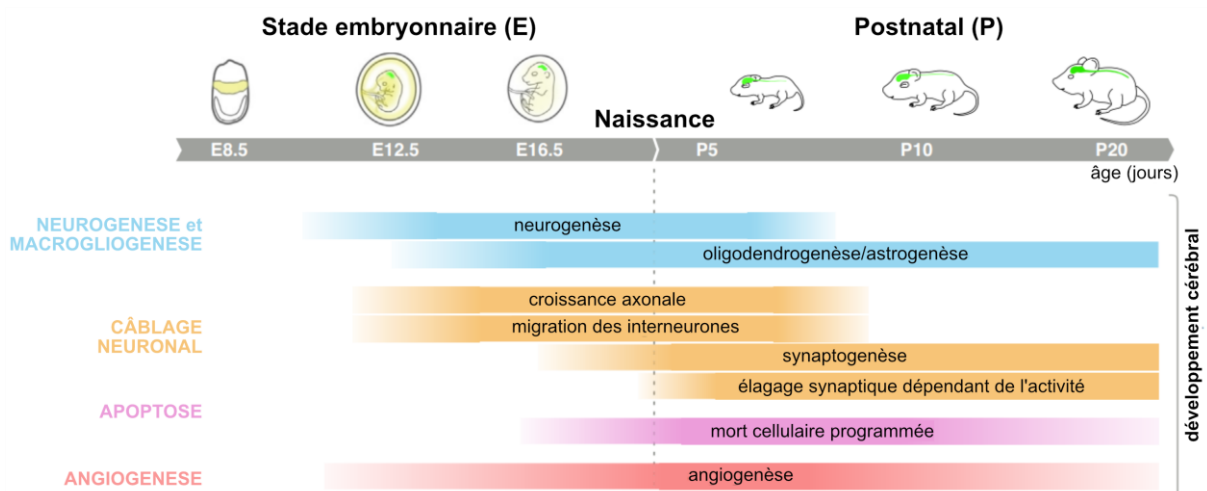


Figure 18 : Chronologie des principaux événements du développement du cerveau murin.

Le diagramme représente le développement du cerveau du stade embryonnaire E8.5 jusqu'à l'adolescence de la souris. Les étapes clés du développement cérébral y sont représentées : la neurogenèse, la macrogliogenèse, la croissance axonale et la synaptogenèse, l'apoptose et l'angiogenèse. *Figure adaptée de (Thion & Garel 2017).*

L'architecture cérébrale est également assez bien conservée de l'Homme à la souris (Beauchamp et al. 2022). La différence la plus notable entre le cerveau en développement humain et celui de la souris est la gyrfication. En effet, alors qu'une quantité considérable de repliements corticaux tapissent la surface du cerveau humain, celui des souris est totalement lisse. Une autre différence notable entre Homme et souris concerne les foyers de neurogenèse adulte. En effet, alors que, comme évoqué précédemment, la neurogenèse a lieu dans le gyrus denté et le striatum du cerveau humain adulte, dans le cerveau de souris, elle prend place dans le gyrus denté et le bulbe olfactif (Bordiuk et al. 2014).

2. Avantages de l'utilisation de modèles murins dans l'étude des maladies génétiques

L'utilisation de la souris (*Mus musculus*) en recherche biomédicale fondamentale présente de nombreux avantages parmi lesquels on retrouve sa courte durée de vie (environ 12 mois) et son rythme rapide de reproduction (gestation de 18 à 21 jours). L'Homme et la souris possèdent 99% de gènes homologues. De plus, l'existence de lignées consanguines (fonds génétiques identiques) ainsi que la bonne annotation bio-informatique de son génome font de la souris un modèle très utilisé pour mieux comprendre les mécanismes des maladies génétiques.

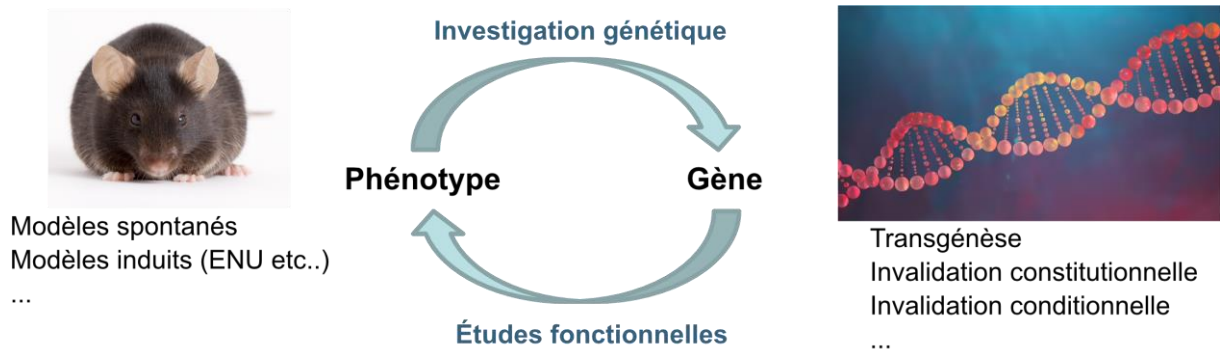


Figure 19 : Les approches d'investigation en génétique des modèles murins.

L'investigation génétique consiste à identifier la mutation génétique responsable d'un phénotype observé chez une souris dont le génome a été modifié par mutagenèse spontanée ou chimique. L'investigation inverse est également possible. La mutation d'un gène spécifique, qu'elle soit constitutionnelle ou conditionnelle d'un type cellulaire précis, est suivie par l'analyse du phénotype de l'animal. Cette approche permet alors d'étudier la fonction du gène muté et les voies de signalisation impliquées. *Photo de souris : Jackson Laboratory. Illustration de l'ADN : Stanislaw Pytel/Getty Images*

Il existe différentes approches d'investigation fonctionnelle du rôle des gènes (**Figure 19**). L'analyse la plus classique consiste à chercher le gène dont la mutation est à l'origine d'un phénotype observé. Cependant, ces dernières années, les évolutions des technologies génétiques ont permis de mettre au point des techniques de manipulation du génome de la souris. Les modifications d'expression de gènes d'intérêt (mutation, délétion, surexpression etc..) permettent de comprendre le rôle de ces gènes au niveau moléculaire, cellulaire, tissulaire et de l'organisme entier.

3. Techniques de génération de modèles murins

3.1. Modèles spontanés

Les mutations spontanées résultent d'événements naturels aléatoires. Elles peuvent provenir d'erreurs de réplication, d'altérations affectants les bases ou encore de glissements du cadre de lecture dans les secteurs contenant une répétition d'un nucléotide. Les souris porteuses de mutations spontanées ont beaucoup servi de modèles de maladies génétiques humaines contribuant ainsi à révéler de nouvelles fonctions pour des gènes connus ou encore à comprendre les mécanismes dérégulés dans les maladies et enrichir nos connaissances sur les voies biologiques de base (Davisson et al. 2012; Kitahara et al. 1978).

Un exemple de découverte rendue possible grâce à un modèle de mutation spontanée concerne le gène *Eml1*, un gène dont la mutation entraîne des anomalies dans les progéniteurs neuronaux engendrant des défauts de migration (Kielar et al. 2014). Les rapports cliniques de patients possédant des mutations dans *EML1* font état d'hétéropie sous-corticale (les neurones ne sont pas à la bonne position) et d'agénésie du corps calleux (absence de la structure). De manière intéressante, il a été montré que les modèles murins de cortex hétérotopique spontanées (HeCo) présentaient des mutations dans le gène *Eml1* et des phénotypes similaires, avec des cellules progénitrices mal positionnées, loin de la zone ventriculaire, confirmant ainsi le rôle de *Eml1* dans la corticogenèse.

3.2. Modèles induits

Depuis la fin des années 1970, le N-éthyl-N-nitroso-urée (ENU) est considéré comme un mutagène de choix pour générer des mutations aléatoires chez la souris (Russell

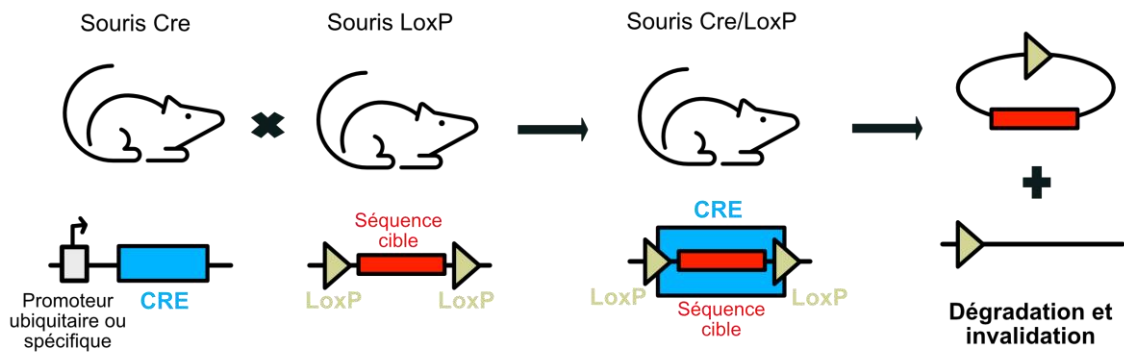
et al. 1979). L'ENU provoque des mutations par alkylation de l'ADN. Son groupement éthylique peut être transféré aux atomes d'oxygène et d'azote présents dans l'ADN ce qui a pour conséquence d'induire une erreur d'identification de la base lors de la réplication provoquant ainsi le mésappariement. D'abord peu utilisée, cette technique a connu un essor à partir des années 2000 en étant utilisée aussi bien dans des criblages à grande échelle (Hrabé de Angelis et al. 2000) que dans des études plus spécifiques, notamment sur les maladies génétiques et le neurodéveloppement (Herron et al. 2002; Buchovecky et al. 2013; Ha et al. 2015)

L'induction par ENU a été utilisée pour générer le modèle murin d'étude du gène *Tuba1*. Le phénotypage des souris a montré qu'elles présentaient une hyperactivité associée à des anomalies dans l'architecture laminaire de l'hippocampe et du cortex accompagnée de défauts de migration neuronale (Keays et al. 2007). Ces découvertes ont poussé les auteurs à analyser les mutations présentes chez des patients présentant des anomalies cérébrales, identifiant ainsi deux patients possédant des mutations de novo de TUBA3 (homologue humain de *Tuba1*) montrant ainsi l'utilité de la mutagenèse par ENU chez la souris comme moyen d'identification la cause des troubles du développement neurologique chez l'Homme (Keays et al. 2007).

3.3. Modèles knock-out

L'invalidation par knock-out (KO) consiste à remplacer un gène, dans le génome, par une version modifiée, ne permettant pas son expression et entraînant un phénotype perte de fonction. Chez la souris, deux techniques sont principalement utilisées : la recombinaison Cre/LoxP et la technique de CRISPR/Cas9. Le principe de ces deux techniques est schématisé en **Figure 20**.

RECOMBINAISON Cre/LoxP



ÉDITION DU GÉNOME PAR CRISPR/Cas9

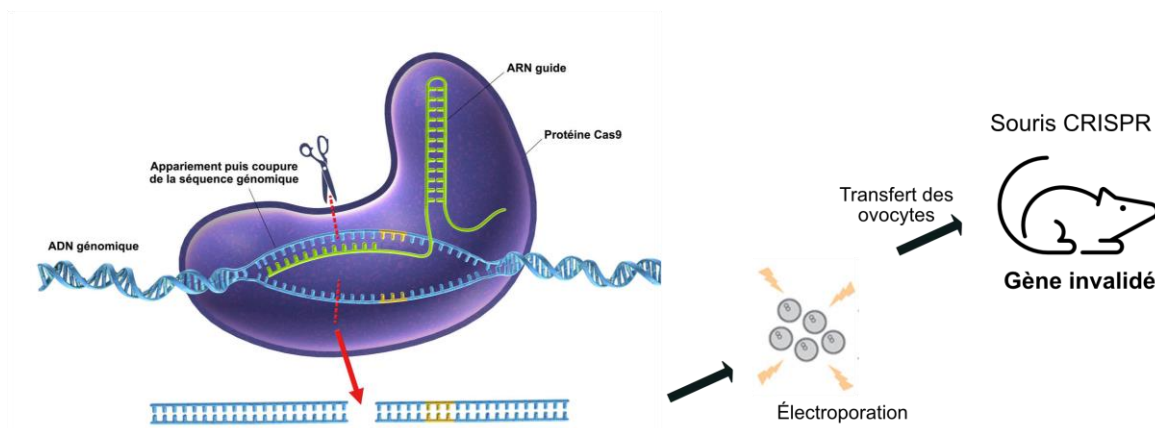


Figure 20 : Représentation schématique de l'édition du génome de la souris par recombinaison Cre/LoxP et CRISPR/Cas9.

© Gunilla Elam / Science Photo Library / Cosmos

3.3.1. Recombinaison Cre/LoxP

Le système de recombinaison Cre/LoxP, décrit pour la première fois en 2000 (Nagy 2000), consiste à croiser une souris exprimant l'enzyme Cre Recombinase avec une souris dans laquelle deux séquences LoxP ont été insérées dans une région d'intérêt du génome. Chez la souris issue du croisement, l'enzyme Cre Recombinase excise le fragment d'ADN situé entre les deux séquences LoxP. Cette technique, qui est la plus ancienne, a le net avantage de pouvoir être conditionnelle. En effet, l'expression de

l'enzyme Cre Recombinase peut être sous la dépendance d'un promoteur spécifique d'un type de cellules, permettant ainsi d'invalider le gène d'intérêt uniquement dans un type cellulaire ou une région spécifique. En revanche, le plus gros inconvénient de la technique est le temps nécessaire pour générer le modèle étant donné qu'il repose sur des croisements de souris.

3.3.2. CRISPR/Cas9

La technique du CRISPR/Cas9 permet de modifier la séquence d'un ou plusieurs gènes simultanément pour les inactiver, ou au contraire les réparer (Jinek et al. 2012). Pour générer une souris knock-out en utilisant la technique de CRISPR/Cas9, il y a d'abord prélèvement des ovocytes d'une souris puis injection de la protéine Cas9 avec un ARN guide de la séquence d'intérêt. L'ARN guide va alors s'apparier à l'ADN et l'enzyme Cas9 va couper l'ADN. On parle plus communément de « ciseaux moléculaires ». Le principal avantage de cette technique est sa rapidité d'exécution. De plus, il est également désormais possible de réaliser un knock-out conditionnel en utilisant le CRISPR/Cas9 (Nishizono et al. 2021).

Le Consortium International de Phénotypage de la Souris (ou IMPC pour « International Mouse Phenotyping Consortium) vise à identifier la fonction de chaque gène codant pour une protéine dans le génome de la souris. Pour y parvenir, chacun des quelques 20 000 gènes de la souris est invalidé et les souris knock-out subissent des tests physiologiques standardisés (suivi du poids, analyse du système cardiovasculaire, du système reproducteur, de la motricité, du comportement etc...)

afin de déduire la fonction des gènes. De manière intéressante, une étude a été menée par l'IMPC afin de calculer la similitude entre les phénotypes observés chez la souris mutante et les phénotypes humains associés aux gènes orthologues. Les résultats ont montrés que, sur 1484 lignées de souris knock-out pour un gène dont l'orthologue humain est associé à une pathologie, 9% des lignées ne présentent pas de phénotypes, 50% des lignées présentent des phénotypes qui ne sont pas communs à ceux de l'homme et 41% d'entre récapitulent les phénotypes de la maladie (Cacheiro et al. 2019). Ces résultats sont très importants et montrent bien que, quel que soit la technique de modification du génome utilisée, l'approche knock-out n'est pas forcément optimale car elle entraîne un phénotype nul. C'est pour cela qu'il convient, dans le cas où le modèle animal est généré pour étudier une pathologie humaine, de vérifier que l'animal présente les mêmes phénotypes que les patients ou que les patients présentent les mêmes phénotypes que les souris, on parle de « validation du modèle expérimental ».

4. Evaluation de la cognition chez la souris

4.1. Evaluation du comportement

Les troubles du développement intellectuel se caractérisent par un déficit général des capacités cognitives associé à un fonctionnement social mal-adaptatif. Afin d'analyser ces paramètres chez la souris, de nombreux tests comportementaux ont été mis en place et leur efficacité a été vérifiée au fil des années. Dans cette partie, j'introduirai les différents paradigmes utilisés pour analyser les grandes fonctions : anxiété, mémoire, apprentissage, sociabilité, fonctions motrices etc.. Les tests présentés sont ceux que j'ai utilisé au cours de ma thèse.

4.1.1. Anxiété et dépression

Chez la souris, le test le plus communément utilisé pour détecter un comportement anxieux est le test de l'Openfield. La souris est placée dans une arène illuminée avec une lumière intense. L'analyse de l'anxiété est alors basée sur la tendance naturelle de l'animal à explorer tout en se protégeant des situations anxiogènes. Le temps passé dans les recoins de l'arène est comparé à celui passé au centre (Hall & Ballachey 1932). Dans ce test, c'est le circuit neuronal de l'anxiété, liée à l'amygdale, qui est analysé.

Le labyrinthe surélevé est également utilisé pour évaluer le comportement lié à l'anxiété chez les rongeurs. Dans ce test, les régions limbiques, l'hippocampe, l'amygdale et le noyau du raphé dorsal sont analysées. L'appareil est un labyrinthe en croix, surélevé et présentant deux bras fermés opposés et deux bras ouverts. L'anxiété de la souris est analysé en comparant le temps passé dans les bras ouverts, plus anxiogène, et le temps passé dans les bras fermés, plus sécurisants (Pellow et al. 1985).

Afin d'évaluer la capacité du rongeur à montrer sa détermination et sa résistance aux situations dépressives, Porsolt *et al* ont mis au point le test de nage forcée (Porsolt et al. 1977). Ce test consiste à placer le rongeur dans un cylindre rempli d'eau et duquel il ne peut pas s'échapper. Le rongeur se met alors à nager pour éviter de se noyer, ce qui montre sa combativité. Plus le temps d'immobilité de l'animal est élevé, plus l'animal est considéré comme défaitiste et donc plus enclin à la dépression. Les régions cérébrales impliquées dans ces fonctions sont notamment l'hippocampe, le noyau accumbens, le cortex préfrontal médial, le septum latéral, l'hypothalamus et l'amygdale.

4.1.2. Traits autistiques : Stéréotypie et Sociabilité

Le trouble du spectre de l'autisme regroupe de nombreux phénotypes qui, la plupart du temps, sont communs aux autres troubles neurodéveloppementaux. C'est pour cela qu'une analyse comportementale complète de la souris passe très souvent par une analyse de sa sociabilité et une évaluation de son caractère stéréotypique.

La souris est un animal qui vit en groupe de plusieurs congénères, aussi c'est un animal qui est naturellement sociable. L'une des caractéristiques des troubles du spectre de l'autisme, un trouble neurodéveloppemental, est la difficulté à communiquer et à avoir des interactions sociales. Cela peut également être le cas en cas de déficience intellectuelle. Ainsi, les chercheurs ont développé des tests qui permettent de mesurer la capacité d'une souris à interagir avec ses congénères. Les stimuli sociaux font intervenir diverses régions cérébrales telles que l'amygdale et le cortex préfrontal ventromédial.

Le test le plus communément utilisé, et celui que j'ai moi-même utilisé durant ma thèse, est le paradigme des trois chambres, développé par Jacqueline Crawley (Crawley 2004). Ce test évalue la sociabilité générale ainsi que l'intérêt pour la nouveauté sociale. Dans un premier temps, la préférence que la souris a de passer du temps avec un autre rongeur plutôt que seule est évaluée (sociabilité). Puis, un nouvel individu est introduit dans la boîte afin de vérifier si la souris préfère passer du temps avec un nouvel individu plutôt qu'avec un individu familier (nouveauté sociale).

Une simple observation du comportement d'une souris dans sa cage au quotidien peut mettre en évidence un comportement répétitif et compulsif. Cependant, divers tests ont été mis au point afin de quantifier ce comportement. C'est le cas du test d'enfouissement des billes (Deacon 2006). La souris est placée dans une cage dans

laquelle des billes ont été disposées à la surface de la litière. La souris est libre de se balader dans sa cage et de toucher les billes. A la fin du test, l'état de la cage est analysé et le nombre de billes recouvertes de litière est compté. Plus le nombre de billes ensevelies est haut, plus la souris est considérée comme « stressée » par le changement et comme présentant un comportement stéréotypé de « nettoyage » de sa cage. On notera tout de même que l'interprétation de ce test reste très suggestive. Certains chercheurs critiquent le fait qu'une souris stressée resterait en fait immobile et ne s'approcherait pas des billes. D'autres soulignent le fait que les troubles obsessionnels compulsifs (TOC), caractéristiques de certains types d'autisme, ne peuvent pas être soignés par le traitement pharmacologique aux benzodiazépines. Or les souris traitées aux benzodiazépines présentent un pourcentage d'enfouissement de billes moins importants que les souris non traitées, laissant penser que si ce test mesurait les TOC, le traitement pharmacologique d'affecterait pas le comportement des rongeurs (Borsini et al. 2002). Ces controverses, tout à fait légitimes, montrent qu'il est important, pour chaque fonction cognitive étudiée, de réaliser plusieurs tests afin de vérifier que le phénotype observé est récurrent et non isolé.

4.1.3. Apprentissage et mémoire

Un autre aspect de la cognition est la capacité à recueillir une information, la stocker puis à s'en rappeler après un délai plus ou moins long. On parle alors d'apprentissage et de mémoire. Il existe différents types de mémoires qui peuvent être testées de différentes manières chez le rongeur.

La mémoire perceptive peut être évaluée dans la seconde partie du paradigme des trois chambres (présenté dans la section précédente), où la souris préfère passer du

temps avec un nouvel individu plutôt qu'avec l'individu qu'elle avait précédemment rencontré. Une souris qui ne fera pas de différence entre les deux individus peut être considérée comme ayant des problèmes de reconnaissance sociale. La mémoire de reconnaissance peut également être analysée dans le test de reconnaissance de nouvel objet (Ennaceur & Delacour 1988). Ce test est basé sur la tendance spontanée des rongeurs à passer plus de temps à explorer un objet nouveau plutôt qu'un objet familier, reflétant ainsi l'utilisation de la mémoire d'apprentissage et de reconnaissance. Notons également que ce test est intéressant car, en fonction du temps laissé entre deux présentations d'objets, il est possible d'analyser soit la mémoire à long terme du rongeur, soit sa mémoire à court terme.

Deux tests comportementaux étaient disponibles dans le laboratoire pour analyser la mémoire spatiale des souris. Le labyrinthe aquatique de Morris est le test le plus fréquemment utilisé pour analyser la reconnaissance spatiale (Morris 1984). La souris doit localiser, à l'aide de repères visuels, une plateforme cachée sous la surface de l'eau dans un bassin. Ce test repose sur la volonté des souris d'échapper à l'environnement aquatique le plus rapidement possible. Diverses sessions d'apprentissage sont réalisées pour entraîner la souris à repérer la plateforme (phase d'apprentissage) avant le test final dans lequel la latence d'évasion est mesurée. Le test évalue les fonctions de diverses régions cérébrales : l'hippocampe, le striatum, le cervelet et le cortex. Ce test est très efficace mais long à mettre en place. De plus, étant donné que les performances de la souris reposent également sur sa capacité à observer les repères disposés au mur, il faut s'assurer de l'acuité visuelle du rongeur avant le test.

Le test du labyrinthe en Y quant à lui, ne requiert pas forcément une excellente vue de l'animal. Utilisé pour évaluer la mémoire à court terme chez la souris, il repose sur la

curiosité du rongeur à explorer des zones auparavant non visitées (Kraeuter et al. 2019). Ainsi, une souris avec une mémoire de travail intacte aura tendance à alterner spontanément sa visite des trois différents bras du labyrinthe. Dans ce test, de nombreuses parties du cerveau telles que l'hippocampe, le gyrus denté et le cortex préfrontal sont analysées.

4.1.4. Fonctions motrices

Dans la quasi-totalité des tests effectués, l'activité locomotrice des souris est analysée. La distance parcourue par l'animal pendant la durée du test ainsi que sa vitesse sont enregistrées. Cependant, il existe également des tests spécifiques avec lesquels il est possible d'évaluer les fonctions motrices des animaux et ainsi avoir une idée du fonctionnement de leur cortex moteur.

Le test de force de préhension est un moyen facile de quantifier la force neuromusculaire des rongeurs. La souris est placée sur une grille reliée à un dynamomètre. Sa queue est alors tirée doucement pour inciter l'animal à s'agripper à la grille. Sa force de préhension maximale est alors enregistrée.

Le test de traction quant à lui est réalisé à l'aide d'un fil métallique tendu horizontalement. Les souris sont suspendues au fil au moyen de leurs pattes antérieures et le temps de latence avant la chute est enregistré.

L'analyse du comportement de la souris, par tous les tests présentés dans cette section, a encore plus de sens si les phénotypes observés peuvent être reliés à une anomalie cérébrale qui les explique.

4.2. Evaluation des paramètres neuroanatomiques

Bien que les rongeurs soient les principaux organismes modèles pour étudier la structure et la fonction du cerveau des mammifères, la petite taille de leur cerveau (0,5 cm³ pour la souris) peut faire penser qu'il est un véritable défi de les analyser. Cependant, bien que petits, ils peuvent être imagés en utilisant les techniques d'imagerie médicale de scanner à rayon X, de PET scan ou encore d'IRM. Ces techniques ont l'avantage de pouvoir être réalisées *in vivo* et donc de pouvoir mettre en évidence des grosses anomalies de structure chez l'animal vivant.

La plupart de ces études utilisent une approche qualitative, ce qui pose le problème de l'absence de certaines informations phénotypiques. Des études estiment à 90 le pourcentage d'anomalies légères à modérées non détectées par ces approches classiques. L'analyse plus spécifique d'une région cérébrale ou l'analyse à échelle cellulaire nécessite de sacrifier l'animal pour réaliser des coupes histologiques. Les analyses sont effectuées en 3 dimensions lorsque les coupes histologiques sont réalisées en série, scannées, et que le tissu est reconstitué informatiquement (Weninger et al. 2006). L'analyse est réalisée en 2 dimensions lorsque les mesures sont effectuées sur une seule coupe histologique. Trois protocoles de quantification et d'analyses neuroanatomiques en 2D ont été publiés par mon équipe d'accueil (Mikhaleva et al. 2016; Collins et al. 2018; Nguyen et al. 2022). Le protocole d'analyse en 3D du cerveau des souris n'a pas encore été publié. Etant donné que j'ai réalisé des études neuroanatomiques durant ma thèse, les techniques sont expliquées en section « **Méthodes** ».

4.3. Evaluation des paramètres électrophysiologiques

Le dernier niveau d'analyse de la cognition chez le rongeur est l'enregistrement des paramètres électrophysiologiques. De nombreuses techniques ont été développées pour enregistrer l'activité des circuits neuronaux. La technique traditionnelle utilisée est le patch-clamp. Cela consiste à faire un enregistrement intracellulaire sur une cellule isolée. Bien que le signal enregistré soit de bonne qualité, il ne permet pas de déchiffrer efficacement la fonction d'un réseau neuronal au sein du cerveau. Il était donc urgent de développer des techniques permettant d'enregistrer une activité neuronale physio-pathologique à un niveau où le neurone travaille en coopération avec les autres cellules qui l'entourent et donc de pouvoir enregistrer l'activité de plusieurs neurones en parallèle (Maccione et al. 2015).

Au cours de ma thèse, j'ai eu l'occasion d'utiliser brièvement la technique de « multi-electrode array ». Cela consiste à utiliser une puce recouverte de milliers d'électrodes qui permettent l'enregistrement simultané de l'activité des différents neurones présents sur une coupe organotypique. Cependant, le domaine de l'électrophysiologie est très complexe et cela ne concerne qu'une infime partie de mon travail de thèse, c'est pour cela que je ne développerai pas plus cette partie et focaliserai le troisième chapitre de mon rapport bibliographique sur la pathologie que j'ai étudié : le syndrome de Cohen.

Chapitre 4 : La neurobiologie de VPS13B dans le Syndrome de Cohen

La compréhension des mécanismes dérégulés dans les troubles neurodéveloppementaux, et notamment dans les troubles du déficit intellectuel, est un enjeu majeur de santé publique. La filière AnDDi-Rares, filière de santé nationale maladies rares dédiées aux maladies avec anomalie du développement somatique et cognitif, regroupe l'ensemble des acteurs français impliqués dans le diagnostic, la prise en charge et la recherche de ces maladies (<http://www.anddi-rares.org>). L'équipe GAD (Génétique des Anomalies du Développement), créée en 2011 est un des membres de la filière. L'un des axes d'études de l'équipe est le Syndrome de Cohen, une pathologie génétique rare. Au fil du temps, différents aspects de la maladie ont été étudiés : l'hématologie (Duplomb et al. 2019) , le métabolisme (Limoge et al. 2015), la reproduction (Da Costa et al. 2020), l'ophtalmologie (Lhussiez et al. 2020) ou encore la biologie osseuse (Duplomb et al. en préparation). En 2019, l'équipe GAD a accueilli une nouvelle équipe, émergente, de recherche spécialisée dans la neuroanatomie du modèle murin : NeuroGeMM (NeuroGénétique des Modèles Murins). Cette collaboration a permis la mise en place d'un nouvel axe de recherche : la compréhension des mécanismes neurobiologiques dérégulés dans le syndrome de Cohen. Ceci est l'objet de cette thèse. La suite de cet état des lieux de la littérature sera donc centrée sur les caractéristiques cliniques du syndrome de Cohen et sur la pathogénicité des mutations du gène *VPS13B*.

1. Le Syndrome de Cohen

Le syndrome de Cohen (SC) (OMIM 216550) est une maladie rare, décrite pour la première fois en 1973 chez deux frères et sœurs et un cas isolé (Cohen et al. 1973). A ce jour, on estime le nombre de patients à environ 500 à 1000 dans le monde. Le SC est un syndrome poly malformatif. Les patients présentent des phénotypes faciaux, immunitaires, ophtalmiques, métaboliques, musculaires et neurologiques.

1.1. Dysmorphie faciale typique

La dysmorphie faciale est absente à la naissance et se développe durant la petite enfance (**Figure 21**). Les traits caractéristiques sont l'hypertélorisme, les sourcils épais, les cheveux épais et touffus avec une racine de cheveux basse (El Chehadeh-Djebbar et al. 2013), des cils longs et épais, les fissures palpébrales inclinées vers le bas et en forme de vague, un philtrum très court, des incisives centrales supérieures proéminentes, une lèvre supérieure courte, une hypoplasie maxillaire, une micrognathie, un palais haut et étroit et des lobes d'oreilles anormaux (Kivitie-Kallio & Norio 2001; Goecke et al. 1982).

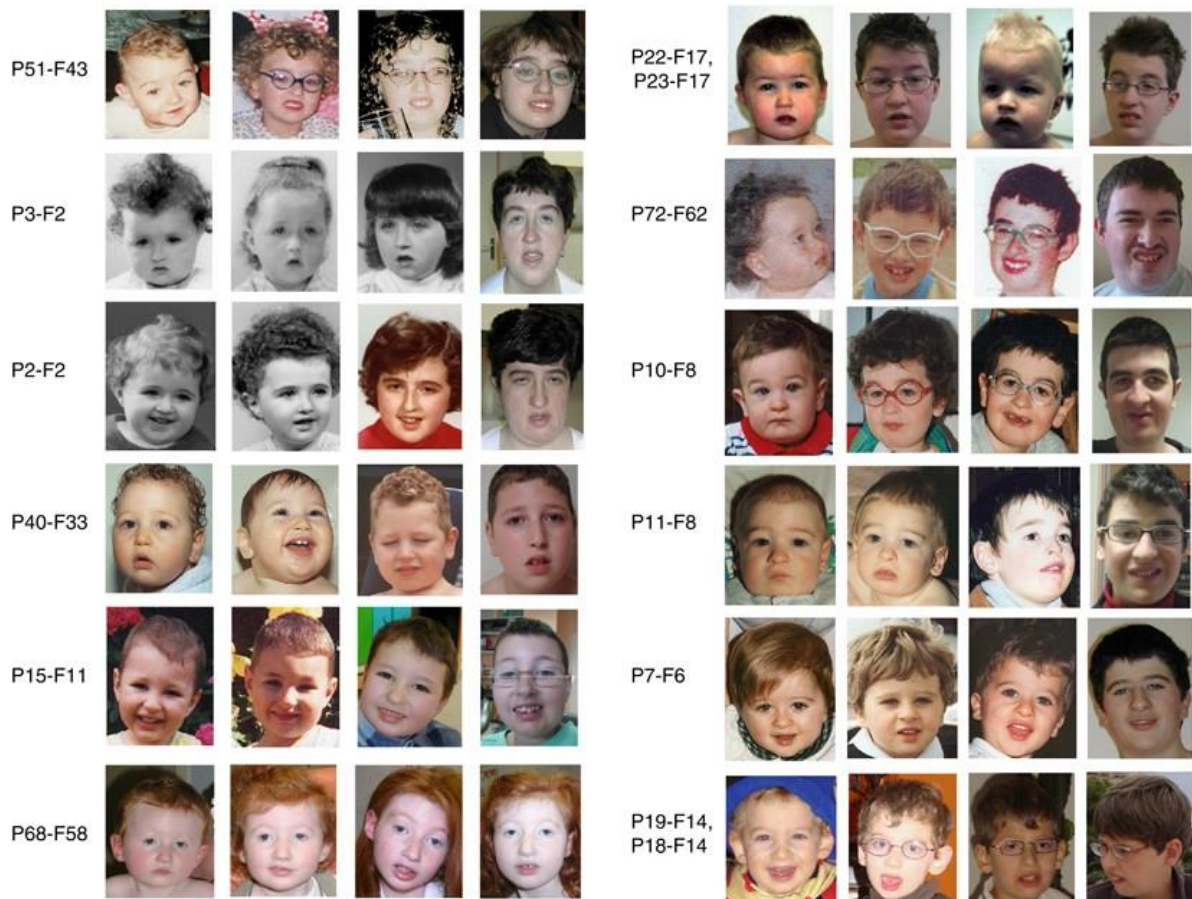


Figure 21 : Phénotype facial de patients atteints du syndrome de Cohen.

Les photographies ont été prises de la petite enfance (gauche) à l'âge scolaire ou adulte (droite). *Figure empruntée à El Chehadeh-Djebbar et al. 2013.*

1.2. Hématologie

La neutropénie est une pathologie caractérisée par une diminution du nombre de neutrophiles, globules blancs qui interviennent dans la destruction des bactéries. L'un des phénotypes majeur du SC est une neutropénie congénitale sévère, souvent présente depuis la naissance (Kiviti-Kallio et al. 1997). Les patients ont donc tendance à être sujets à des infections récurrentes. Ce phénotype a été expliqué dans une étude menée par une chercheuse du laboratoire GAD. En 2019, Duplomb et al. ont montré que les cellules de patients présentent une diminution du facteur de

transcription Serpin B1, induisant une augmentation de l'apoptose des neutrophiles responsables de la neutropénie (Duplomb et al. 2019).

1.3. Ophtalmologie

Les patients souffrant du SC présentent une détérioration progressive de la vision tout au long de leur vie avec apparition précoce d'une myopie progressive de haut grade nécessitant souvent des verres correcteurs dès l'âge de 24 mois. A l'âge adulte, de nombreux patients présentent une déficience visuelle importante sans forcément de cécité totale (Kivitie-Kallio & Norio 2001). Les symptômes des patients correspondent aux signes d'une rétinopathie pigmentaire (Summanen et al. 2002) et, dans plusieurs cas, dépendant de facteurs génétiques, le cristallin s'opacifie et des cataractes se développent (Lhussiez et al. 2020). La correction précoce des problèmes de vue, avec notamment la prescription de lunettes pour corriger les erreurs de réfraction ou le strabisme, a un effet positif sur l'évolution des troubles (Kivitie-Kallio & Norio 2001; Mrugacz et al. 2005).

1.4. Métabolisme

La première manifestation clinique du SC à apparaître est la difficulté à se nourrir pendant la période périnatale (Chandler et al. 2003; Katzaki et al. 2007; Murphy et al. 2007; Athanasakis et al. 2012; Dastan et al. 2016; Rejeb et al. 2017; Alipour et al. 2020; Momtazmanesh et al. 2020). Dans le rapport de Chandler et al., la proportion de patients présentant des difficultés alimentaires était de 82%. Deux patients ont même été nourri par tube nasogastrique et gastrostomie percutanée pendant les 18 premiers mois de leur vie (Chandler et al. 2003).

L'obésité tronculaire a longtemps été considérée comme une caractéristique commune à tous les patients Cohen (Wang et al. 2016). Cependant, une étude réalisée sur une cohorte de 14 patients, a montré que seuls 3 patients sur les 14 composant la cohorte, présentaient un IMC supérieur à 30 (obésité) et 1 patiente présentait un IMC compris entre 25 et 30 (surpoids) (Limoge et al. 2015). Ces données indiquent que le terme obésité n'est pas le plus approprié pour désigner la condition des patients qui présentent plutôt une répartition anormale des graisses au niveau du tronc. En effet, tous les patients de la cohorte présentaient un tour de taille supérieur à la « norme » (102 cm chez les hommes et 88 cm chez les femmes) indiquant ainsi un risque plus élevé de développer un syndrome métabolique (Grundy et al. 2004). De plus, alors que le bilan lipidique sanguin n'a révélé aucune anomalie dans le taux de triglycérides ou dans le taux de cholestérol total, 69% des patients de la cohorte présentaient des valeurs de HDL anormalement basses, augmentant leur risque de développer des maladies cardiovasculaires, et 73% présentaient un taux anormalement élevé de leptine, hormone intervenant dans la régulation du stockage des graisses (Limoge et al. 2015). Enfin, bien que la glycémie des patients à jeun était normale, le test de tolérance au glucose par voie orale a révélé une altération de la tolérance au glucose après 2h chez 50% des patients. (Limoge et al. 2015)

1.5. Développement et tonicité

Dans le premier rapport de Cohen et al., deux des trois patients présentaient une activité fœtale réduite (Cohen et al. 1973). La même observation a été faite chez d'autres patients (Dastan et al. 2016; Chandler et al. 2003; Falk et al. 2004).

Les signes d'hypotonie sont visibles chez les patients dès leur première année de vie. C'est d'ailleurs souvent le retard constaté dans le développement moteur qui pousse les parents à consulter leur médecin. Le maintien de la tête et la tenue en position assise seul sont retardés. De plus, la capacité à marcher de manière autonome est acquise chez les patients entre l'âge de 2 et 5 ans alors que c'est généralement le cas entre 10 et 18 mois chez les autres enfants. (Chandler et al. 2003; Kondo et al. 2005; Katzaki et al. 2007; Bugiani et al. 2008; Waite et al. 2010; Rivera-Brugués et al. 2011; Athanasakis et al. 2012; Rafiq et al. 2015; Rejeb et al. 2017; Koehler et al. 2020; Kaushik et al. 2020; Enomoto et al. 2020; Zhao et al. 2019; Hashmi et al. 2020; Boschann et al. 2020; Momtazmanesh et al. 2020; Huang et al. 2021; Razavi et al. 2021; Li et al. 2021; Ghzawi et al. 2021; Hu et al. 2021). Il est néanmoins important de noter, qu'une fois acquises, les capacités psychomotrices ne régressent pas.

En grandissant, en fonction des patients, l'hypotonie peut se caractériser par une spasticité, une hypermobilité articulaire, une hyper laxité ligamentaire, une hypotonie faciale, une cyphose ou une lordose ou encore une scoliose (Kivitie-Kallio & Norio 2001). Une étude a même rapporté une association entre le SC et le développement d'une polyarthrite rhumatoïde juvénile (De Ravel et al. 2002). Les caractéristiques communes aux patients sont l'incoordination motrice et la « maladresse » qui en résulte.

1.6. Neurologie et comportement

Au niveau neurologique, en plus de l'hypotonie, le SC entraîne le développement, chez tous les patients, d'une déficience intellectuelle et d'une microcéphalie postnatale.

La première manifestation du retard d'apprentissage concerne le langage. De nombreux rapports cliniques révèlent que les patients n'ont pas la capacité de réaliser des phrases complexes ou même, pour certains cas plus extrêmes, ne sont pas capables de dire plus que quelques mots. Les tests de QI pratiqués sur une cohorte de patients de la National Cohen Syndrome Database montrent des résultats inférieurs à 70 confirmants ainsi le diagnostic de déficit intellectuel.

Les personnes atteintes du SC sont également généralement décrites comme ayant une « disposition joyeuse et amicale » (Wang et al. 2016), un comportement affectueux et des traits amicaux excessifs (Chandler et al. 2003; Kivitie-Kallio & Norio 2001). L'étude publiée en 2003 par Chandler et al., et menée chez 16 patients montre que les résultats obtenus aux tests de communication et de sociabilisation, aux analyses des capacités à effectuer des tâches de la vie quotidienne, et à adapter son comportement étaient très bas par rapport à la population générale mais quand même plus élevés que chez d'autres patients avec des retards mentaux (Chandler et al. 2003).

Certaines évaluations psychologiques réalisées ont également identifié des comportements inadaptés de type autistique avec notamment stéréotypie et manque d'attention (Karpf et al. 2004; Falk et al. 2004; Bugiani et al. 2008; Rafiq et al. 2015; Rejeb et al. 2017).

Chez les patients, les phénotypes comportementaux sont associés à une microcéphalie postnatale. Même si quelques études font état d'un périmètre crânien inférieur à la norme à la naissance chez certains patients (Rakusiewicz et al. 2021; Athanasakis et al. 2012; Waite et al. 2010; Katzaki et al. 2007), les nouveaux nés atteints du syndrome de Cohen ont, en moyenne, une circonférence occipito-frontale

située dans le 50^{ème} centile. Ce n'est qu'au bout de quelques mois de vie que le phénotype microcéphalique est visible avec aggravation notamment au cours de la première année. A ce jour, aucune étude n'a rapporté une nette aggravation de la microcéphalie au cours de la vie des patients. De manière intéressante, dans un rapport clinique libanais, il a même été rapporté qu'après diminution de croissance de la circonférence de la tête durant sa première année, le périmètre crânien d'une patiente est revenu dans « les normes » à l'âge de 6 ans sans réelle explication (Koehler et al. 2020). Ce cas, bien qu'exceptionnel, semble quand même démontrer que l'apparition du phénotype est limitée à une fenêtre de temps précise après la naissance et dans l'enfance.

Afin d'expliquer les phénotypes neurologiques, des examens plus poussés ont été réalisés chez certains patients. Par exemple, un électroencéphalogramme réalisé chez un patient jordanien a mis en évidence des spasmes infantiles (Ghzawi et al. 2021). Les spasmes infantiles, ou convulsions de Salaam, sont caractérisés par « la flexion brusque des bras et du tronc en avant avec extension des jambes et une hypersyrythmie à l'EEG » (selon le manuel MSD). Bien que la physiopathologie de ce trouble soit encore inconnue, les spasmes infantiles peuvent refléter des interactions anormales entre le cortex et le tronc cérébral. L'examen par EEG a aussi mis en évidence des crises épileptiques chez des patients triplés (AbdelAleem et al. 2023).

Le scanner cérébral de deux patients issus d'une famille consanguine a révélé une hypoplasie du vermis et des deux hémisphères cérébelleux associées à une légère dilation du ventricule latéral (Waite et al. 2010). Le diagnostic a ensuite été confirmé par IRM (Imagerie à Résonance Magnétique).

Bien que cela ne soit pas systématique, l'examen par IRM a été également réalisé chez d'autres patients, révélant, tantôt, des élargissements du corps calleux (Mochida et al. 2004; Kivitie-Kallio & Norio 2001; Koehler et al. 2020; Rejeb et al. 2017) et, tantôt, une hypoplasie de la même structure (Alipour et al. 2020). Le cervelet est aussi affecté chez certains patients, avec une hypoplasie du vermis (Mochida et al. 2004; Waite et al. 2010) ou une atrophie ponto-cérébelleuse (Katzaki et al. 2007). Une étude fait également état d'une « atrophie cérébrale » sans plus de précision (Alipour et al. 2020). Un élargissement de l'espace sous-arachnoïdien a aussi été observé chez deux sœurs japonaises (Enomoto et al. 2020). Enfin, un rapport clinique récent fait état d'un amincissement du néocortex chez un patient (Hu et al. 2021). Ces diverses observations montrent que les atteintes cérébrales ne sont pas limitées à une seule structure et diffèrent selon les patients. Certains patients ne présentant même pas d'anomalies flagrantes, observables à l'IRM.

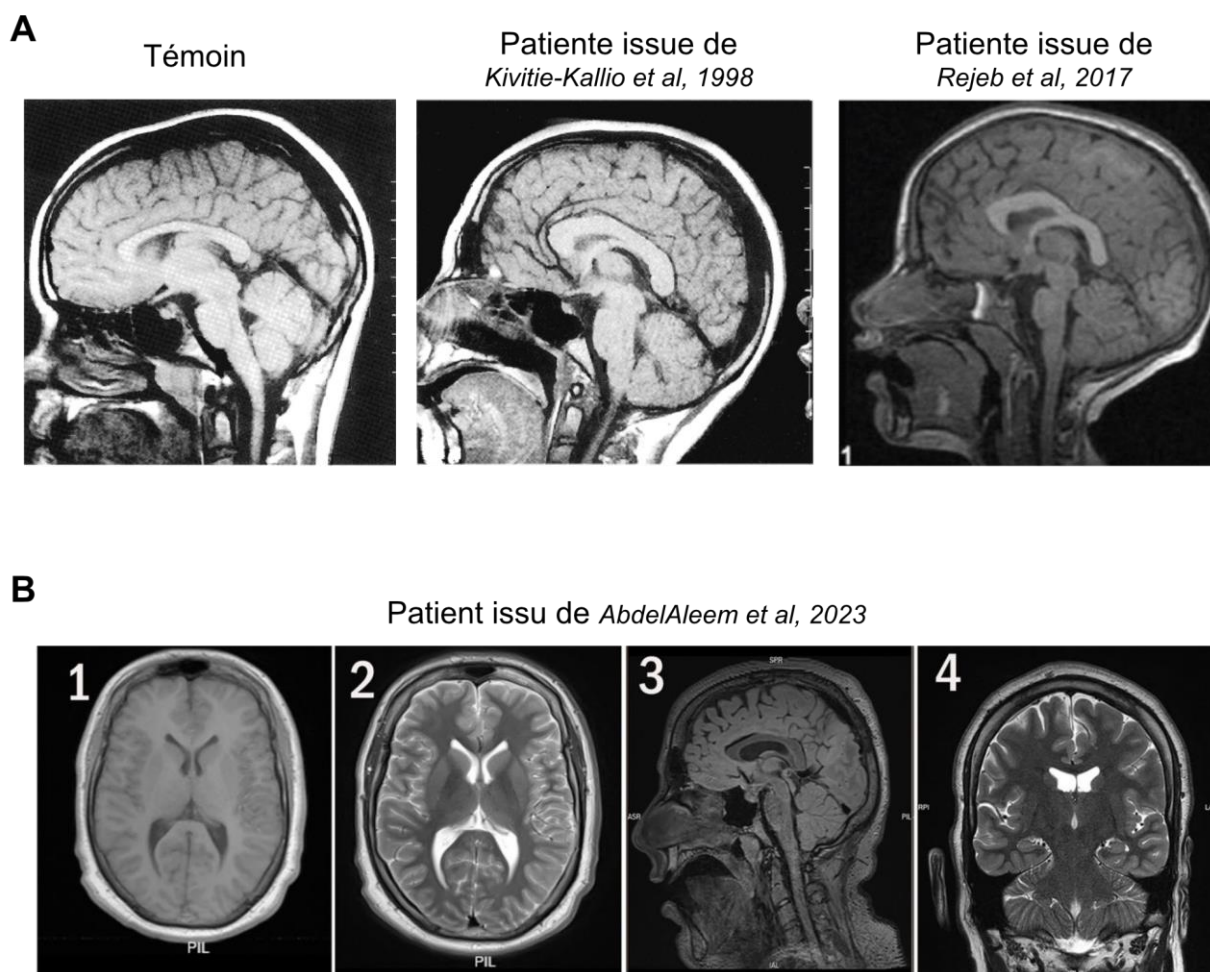


Figure 22 : Résultats d'imagerie cérébrale de 3 patients atteints du syndrome de Cohen.

(A) Images saggitales du cerveau d'une patiente de 15 ans dont le cas a été reporté dans *Kivitie-Kallio et al, 1998* et d'une patiente de 12 ans dont le cas a été reporté dans *Rejeb et al, 2017* comparées à un témoin féminin de 15 ans. Les images des deux patientes montrent un élargissement du corps calleux. **(B)** Images d'IRM à différents segments (axial T1 (1), T2 (2), Sagittal FLAIR (3) et coronal T2 (4)) d'un patient de 23 ans dont le cas a été reporté dans *AbdelAleem et al, 2023*. Les images ne montrent aucune anomalie dans la taille du corps calleux ou de l'hippocampe.

Pour conclure, le syndrome de Cohen est une maladie multi-systémique. Les atteintes sont multiples et, bien que certains phénotypes tels que la dysmorphie faciale typique, la neutropénie, la rétinopathie, la microcéphalie et la déficience intellectuelle soient communs à tous les patients, il existe quand même une hétérogénéité en fonction des cas. L'origine neurobiologique de la plupart des troubles observés demeure à ce jour

encore inconnue. De plus, l'apparition retardée des phénotypes rend le diagnostic du Syndrome de Cohen tardif. Dans la prochaine partie de cette introduction, nous parlerons de l'origine génétique du syndrome de Cohen.

1.7. Génétique

Pendant longtemps, le diagnostic du SC était confirmé si une personne avec déficience intellectuelle présentait 2 des 3 signes distinctifs suivants : dysmorphie faciale caractéristique, rétinopathie pigmentaire et neutropénie (Kivitie-Kallio & Norio 2001; Chandler et al. 2003). Après 2003, et l'identification d'une corrélation entre mutations du gène *VPS13B* et signes cliniques (Kolehmainen et al. 2003), de nouveaux critères diagnostiques ont été mis en évidence. Ainsi, un patient est désormais considéré comme susceptible d'être atteint du SC s'il présente 6 ou plus des 8 signes suivants : Dystrophie rétinienne et/ou myopie forte ; Retard de développement ; Microcéphalie ; Hypermobilité articulaire ; Obésité tronculaire avec des extrémités effilées ; Comportement hypersociable ; Dysmorphie faciale typique ; Neutropénie.

Le diagnostic est ensuite confirmé par l'analyse moléculaire. Il repose sur la mise en évidence, par recherche de grands réarrangements par CGH-array ou par séquençage complet, de deux mutations (ou d'une mutation à l'état homozygote) du gène *VPS13B* (El Chehadeh et al. 2010).

A ce jour, 203 mutations ont été identifiées dans le gène *VPS13B* dont 170 directement identifiées chez des patients atteints du SC (The Human Gene Mutation Database ; <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php> ; consulté le 04 mars 2023). Ces mutations sont réparties à divers endroits du gène sans « hot spot ». Elles peuvent affecter aussi

bien le codon 146 dans l'exon 5 (El Chehadeh et al. 2010) que le codon 3772 dans l'exon 59 (Hennies et al. 2004a). Le plus souvent, ce sont des mutations non-sens (57/203). La répartition des différentes mutations faux et non-sens reportées le long du transcrits sont représentés en **Figure 23**. Mais il peut également s'agir de petites délétions (45/203), de grosses délétions (40/203), des indels (6/203), des insertions (31/203) ou encore des erreurs d'épissage (23/203) ou des réarrangements complexes (1/203).

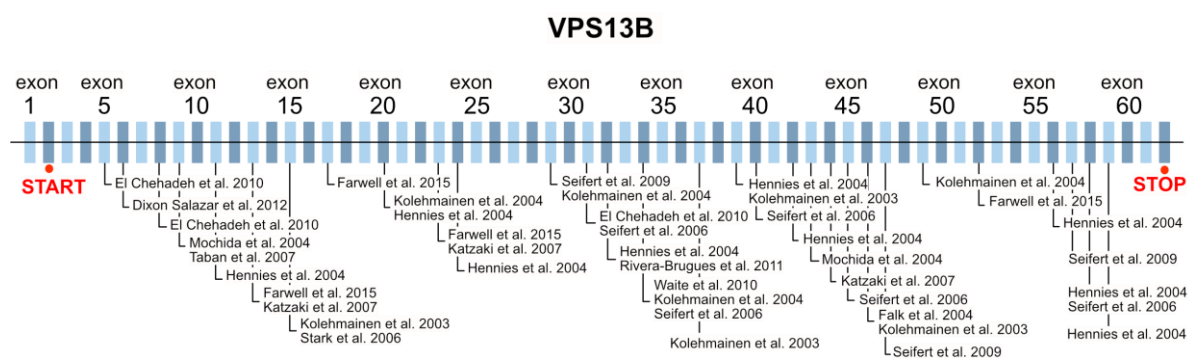


Figure 23 : Localisation des différentes mutations faux-sens et non-sens retrouvées chez les patients atteints du Syndrome de Cohen.

Les 62 exons du transcrit de VPS13B sont représentés. Les codons START et STOP, présents respectivement dans les exons 2 et 62, sont indiqués en rouge. Les mutations représentées sont celles reportés dans les articles cliniques suivants : (El Chehadeh et al. 2010; Dixon-Salazar et al. 2012; Mochida et al. 2004; Taban et al. 2007; Hennies et al. 2004; Farwell et al. 2015; Katzaki et al. 2007; Kolehmainen et al. 2003; Stark et al. 2016; Kolehmainen et al. 2004; Seifert et al. 2009, 2006; Rivera-Brugués et al. 2011; Waite et al. 2010; Falk et al. 2004).

2. La protéine VPS13B

2.1. Généralités sur les protéines VPS13

VPS13 (Vacuolar Protein Sorting 13) est une famille de protéines membranaires hautement conservées chez les eucaryotes. Chez l'Homme, il existe 4 membres, VPS13A, VPS13B, VPS13C et VPS13D qui présentent tous les quatre, de fortes

similitudes avec un orthologue retrouvé chez la levure : *Vps13p* (Velayos-Baeza et al. 2004). L'analyse comparative des séquences suggère que les duplications ont joué un rôle important dans l'évolution de cette famille de gènes.

Au niveau structural, plusieurs domaines protéiques sont conservés au sein de la famille des VPS13 (**Figure 24**). Le domaine PH permet aux protéines de se lier aux phosphoinositides, leur permettant ainsi de cibler les membranes (Lemmon 2007). Les domaines APT1 et ATG2_C sont connus pour permettre aux protéines de transférer des lipides du réticulum endoplasmique jusqu'au phagophore, dans le processus d'autophagie (Kotani et al. 2018). Le domaine VAB/WD40-like permet l'interaction avec des membranes associées à des protéines contenant des motifs proline-X-proline (PxP). Enfin, le domaine choréine, bien que peu étudié, semble être également un domaine de ciblage des membranes.

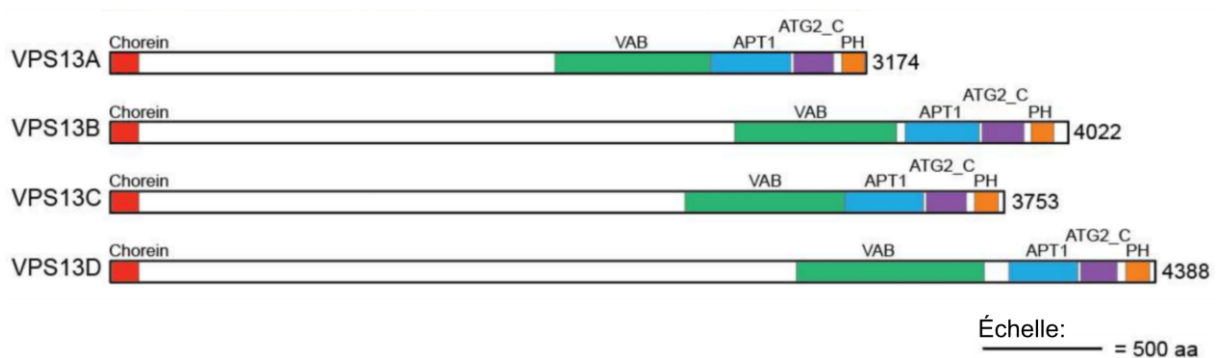


Figure 24 : Domaines protéiques conservés dans les protéines humaines de la famille des VPS13.

Les domaines et leurs abréviations sont les suivants : Chorein = Domaine choréine ; VAB = Vps13 Adaptor Binding = Domaine WD40 like ; APT1 = Domaine APT1 ; ATG2_C = Autophagy-related protein 2 C-terminal domain ; PH = Pleckstrin Homology domain. *Figure empruntée à (Dziurdzik & Conibear 2021).*

Au niveau clinique, chacun des 4 gènes VPS13 est associé à une maladie génétique. En effet, alors que VPS13B est associé au Syndrome de Cohen (Kolehmainen et al. 2003), des mutations dans le gène VPS13A entraînent le développement de la chorée

acanthocytose (OMIM #200150), un trouble neurologique qui affecte à la fois le mouvement dans de nombreuses parties du corps mais également la morphologie des globules rouges (Rampoldi et al. 2001). VPS13C est quant à lui impliqué dans le développement d'une forme de parkinsonisme précoce avec progression rapide et sévère de la maladie (OMIM #616840) (Lesage et al. 2016). Enfin des mutations de VPS13D sont à l'origine du développement d'une ataxie spino-cérébelleuse (OMIM #607317) (Seong et al. 2018).

De manière intéressante, des études récentes ont montré que trois des gènes VPS13 régulent l'homéostasie des lipides par le biais de transports au niveau des sites de contact des membranes (Bean et al. 2018; Guillén-Samander & De Camilli 2022; Cai et al. 2022; Guillén-Samander et al. 2021; Lees & Reinisch 2020; Dall'Armellina et al. 2023). Les chercheurs pensent que VPS13A agit comme un pont intermembranaire pour le transfert des lipides au niveau des sites de contact entre le réticulum endoplasmique et la mitochondrie, entre les mitochondries et les endosomes et entre les gouttelettes lipidiques et le réticulum endoplasmique (Kumar et al. 2018; Li et al. 2020; Muñoz-Braceras et al. 2019). De plus, il a été montré que l'inactivation de VPS13A dans des cellules entraînait l'augmentation du nombre de gouttelettes lipidiques à l'intérieur de la cellule suggérant ainsi que VPS13A possède un rôle dans l'homéostasie lipidique (Yeshaw et al. 2019). VPS13C est également localisé au niveau des sites de contact du réticulum endoplasmique avec les gouttelettes lipidiques et avec le système endosomes/lysosome (Kumar et al. 2018). Le lien entre VPS13C et lipide a également été mis en évidence dans le tissu adipeux brun dans lequel l'extinction de VPS13C entraîne la réduction de la taille des gouttelettes lipidiques (Ramseyer et al. 2018). Enfin, il a été montré que VPS13D sert de pont entre le réticulum endoplasmique et la mitochondrie et a un rôle de coordination dans le

transfert des acides gras vers les sites de contacts des mitochondries avec les gouttelettes lipidiques (Wang et al. 2021)

2.2. VPS13B

En 1994, une analyse de liaison a montré que les phénotypes observés chez des patients souffrant du syndrome de Cohen étaient attribués à des mutations dans une région spécifique du bras long du chromosome 8 (Tahvanainen et al. 1994). Une dizaine d'années plus tard, une analyse d'haplotype, publiée par Juha Kolehmainen, a permis d'affiner la région critique sur le chromosome 8q22 et de découvrir un nouveau gène, *COH1*, muté chez les patients (Kolehmainen et al. 2003). Ce gène a, par la suite, été rebaptisé *VPS13B*.

2.2.1. Structure

VPS13B (*Vacuolar Protein Sorting 13 homolog B*) est un gène qui possède 24 transcrits annotés chez l'Homme (GRCh38.p13). Le transcrit principal (NM_017890.5), couvre une région génomique d'environ 864 kb, fait 14 086 pb et est composé de 62 exons. Le cadre ouvert de lecture correspondant code pour une protéine de 4022 acides aminés, avec un codon d'initiation de traduction dans l'exon 2. Quatre autres transcrits alternatifs codent également pour une protéine mais de plus petite taille (respectivement 3997, 415 et 155 acides aminés). La première analyse de structure génomique de *VPS13B* a montré que le gène était alternativement épissé au niveau des exons 8, 17, 28 et 31 entraînant la formation de formes tronquées de la protéine ou uniquement de formes alternatives sans décalage du cadre ouvert de lecture (Kolehmainen et al. 2003). Chez la souris, l'orthologue de *VPS13B*, appelé également

Vps13b, est localisé sur le chromosome 15 et possède 7 transcrits dont deux codants pour des protéines de respectivement 3993 et 46 acides aminés.

Par Northern blot, une technique d'analyse moléculaire qui consiste à mesurer le niveau d'expression d'un gène dans un ARNm spécifique, il a été montré que *VPS13B* était largement exprimé dans les différents tissus analysés. Cependant, le niveau d'expression du gène et de ses différents transcrits diffèrent selon les tissus. Dans le cerveau, les poumons, le foie et les reins du fœtus, deux transcrits d'environ 2 et 5 kb ont été identifiés. Ces transcrits étaient également présents dans les tissus adultes analysés. Un transcrit plus grand, d'environ 12 à 14 kb a également été observé dans la prostate, les testicules, les ovaires et le côlon chez l'adulte. Il est important de noter, que bien que les transcrits de *VPS13B* étaient exprimés dans le cerveau et le poumon du fœtus, il n'étaient que très faiblement exprimés dans les mêmes tissus chez l'adulte (Kolehmainen et al. 2003). De plus, une autre étude a également mis en évidence un épissage alternatif spécifique dans le cerveau humain (Seifert et al. 2009) Cette différence d'expression de *VPS13B* en fonction des organes et du stade de développement peut expliquer la diversité des phénotypes observés chez les patients et la différence de temporalité d'apparition des symptômes.

VPS13B est une très grosse protéine de 448 kDa chez l'Homme. Une analyse d'hydrophobicité a révélé la présence de 10 potentiels domaines transmembranaires. De plus, la présence d'un signal de rétention du réticulum endoplasmique en région C-terminal semble confirmer la localisation membranaire de la protéine. Peu d'études ont fait état d'une analyse de l'expression tissulaire de la protéine chez l'Homme ou chez la souris. En 2004, Mochida et al., ont montré, par la technique d'hybridation *in situ* sur le cerveau d'une souris adolescente (P21), que *VPS13B* était largement exprimée dans le système nerveux central et notamment dans la couche granulaire

interne et les cellules de Purkinje du cervelet ainsi que dans le cortex et le gyrus denté (Mochida et al. 2004). Un pattern d'expression similaire a été observé dans le cerveau murin adulte. De manière intéressante, et contrairement à ce qui avait été observé par Northern blot dans l'étude de Kolehmainen, Mochida et al., ont énoncé que le niveau d'expression de VPS13B était bas, voire indétectable, dans le cerveau embryonique de souris. Suggérant ainsi que VPS13B exerce ses fonctions dans les neurones post mitotiques et non dans les cellules progénitrices de neurones.

2.2.2. Fonctions

Au sein de la cellule, il a été montré que VPS13B colocalisait avec GM130, un marqueur du cis-Golgi. De plus, après digestion de la membrane, VPS13B se retrouve dans la phase aqueuse, suggérant que la protéine n'est pas localisée dans la bicouche lipidique mais dans la membrane périphérique de l'appareil de Golgi (Seifert et al. 2011). Aussi, le traitement de cellules avec des siARN dirigés contre VPS13B entraîne la fragmentation sévère de l'appareil de Golgi prouvant que VPS13B joue un rôle critique dans le maintien de l'intégrité de l'organite intracellulaire.

L'appareil de Golgi intervient dans le transport et la maturation des protéines. Il est notamment le lieu de modifications post traductionnelles telles que la glycosylation des protéines nouvellement synthétisées. L'analyse de l'état de glycosylation des protéines sériques de patients Cohen a montré un schéma de glycosylation inhabituel démontrant un défaut majeur de maturation des glycanes en absence de VPS13B (Duplomb et al. 2014). De plus, la même étude a révélé un changement de morphologie des lysosomes, anormalement agrandis, et une diminution du nombre d'endosomes précoces dans les fibroblastes de patients, mettant ainsi en lumière un

rôle de VPS13B dans le trafic entre endosomes et lysosomes (Duplomb et al. 2014). Des immunomarquages réalisés sur des cellules HeLA ont montré que VPS13B colocalise avec RAB6, une protéine impliquée dans le trafic vésiculaire. Il a ensuite été montré que RAB6 participe au recrutement de VPS13B à l'appareil de Golgi. (Seifert et al. 2015). Plus tard, Koike et Jahn ont confirmé ce rôle en démontrant que VPS13B intervient dans le trafic vésiculaire en servant de protéine d'attache entre endosomes précoces et endosomes de recyclages (Koike & Jahn 2019).

Au niveau cérébral, en 2015, Seifert et al ont montré, en utilisant des cultures primaires d'hippocampe de rat traitées avec un siARN, que les neurones dans lesquels Vps13b avait été invalidé présentaient une longueur axonale nettement inférieure aux neurones contrôles montrant ainsi que VPS13B est essentielle au bon développement des neurites (Seifert et al. 2015). En 2020, une dérégulation des gènes associés à l'organisation de l'autophagosome entraînant une hausse du flux autophagique a été mis en évidence dans des cellules où VPS13B avait été invalidé. Le nombre d'autophagosome était significativement plus important dans les neurones dérivés de cellules souches de patients Cohen (Lee, Lee, et al. 2020). La même équipe a également mis en évidence une modification de l'expression des gènes associés aux synapses glutamatergiques et une régulation négative de l'expression des gènes associés aux processus de développement neuronal (Lee, Hwang, et al. 2020). La taille des neurosphères obtenues à partir de cellules de patients était réduite, probablement en raison de la prolifération réduite des cellules souches neuronales SOX2 positives. Enfin, la baisse d'expression de SV2B, une protéine essentielle présente dans les vésicules synaptiques, a suggéré un dysfonctionnement synaptique dans ces mêmes neurones issues d'iPSC de patients (Lee, Hwang, et al. 2020).

Ensemble, ces données montrent que VPS13B semble exercer un rôle primordial au sein de la cellule, notamment au niveau de l'appareil de Golgi. Cependant, il n'a pas encore été clairement établi, et VPS13B demeure le gène le moins étudié de la famille des VPS13. Ces dernières années, deux modèles murins *Vps13b* knock-out ont été générés. Le premier modèle, *Vps13b^{em1(IMPC)Tcp}* a été généré par l'IMPC en délétant les exons 2 à 4 du gène par la technique de CRISPR/Cas9. Les données de phénotypages publiées par le consortium montrent que les souris mutantes présentent notamment un retard de croissance, une baisse de leur poids corporel associé à une diminution de leur masse grasse, des problèmes visuels et une baisse d'activité locomotrice dans le test de l'openfield. Le second modèle, *Vps13b^{2-/-}* a été généré, en utilisant la technique de CRISPR/Cas9, par une équipe coréenne (Kim et al. 2019). Les résultats publiés ont mis en évidence des déficits moteur avec, notamment, une baisse d'activité dans le test de l'openfield et une hypotonie mise en évidence par le test de rotarod. L'équipe a également constaté que les souris mutantes présentaient des déficits d'apprentissage spatial dans le test de la piscine de Morris et un comportement normal dans les autres tests effectués. Ces études, purement descriptives, n'ont pas aboutis à la découverte de pistes mécanistiques dérégulées. C'est l'objectif de cette thèse.

Objectifs de la thèse

L'objectif principal de ce projet de thèse était de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires dérégulés, côté cerveau, dans le syndrome de Cohen en utilisant un nouveau modèle murin *Vps13b^{tm1.ICS}*, généré par délétion de l'exon 4 du gène.

Dans cette perspective, mon travail de thèse s'est axé autour de quatre grands axes principaux de recherche.

Le premier objectif de cette étude était d'établir le patron d'expression complet de *Vps13b* dans le cerveau de la souris. Le second objectif était d'effectuer le phénotypage des souris *Vps13b^{tm1.ICS}* afin de vérifier la validité du modèle murin dans l'étude du syndrome de Cohen. Cela a commencé par réaliser une étude comportementale complète des souris puis une analyse de leurs caractéristiques neuroanatomiques. L'analyse neuroanatomique a été réalisée selon deux méthodes. La première a consisté à réaliser une analyse en 3D du cerveau des souris adulte et la seconde à réaliser une analyse longitudinale en 2D à différents âges. Ces deux études ont révélé des phénotypes neuroanatomiques sévères et nous ont permis d'évaluer leur fenêtre d'apparition.

Ainsi, le troisième objectif de cette thèse était de mettre en évidence les causes des phénotypes neuroanatomiques et comportementaux observés.

La dernière partie de mon travail de thèse a été d'effectuer une revue complète de la littérature clinique du Syndrome de Cohen afin de relier les phénotypes observés chez la souris à ceux rapportés chez les patients, en me focalisant sur les aspects neurologiques. Cette étude clinique a été complétée par une analyse de l'évolution de la microcéphalie chez dix-sept patients non publiés.

Méthodes

1. Animaux

1.1. Permis éthique

Les procédures expérimentales relatives au soin des animaux ont été réalisées conformément aux politiques institutionnelles de l'Université de Bourgogne Franche-Comté et en respectant le principe des 3 R (Remplacement, Réduction et Raffinement). L'étude a été autorisée par le ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation sous le permis éthique APAFIS#28630-202012141020471.

1.2. Génération du modèle murin *Vps13b^{tm1.ICS}*

Le modèle murin a été généré à l'Institut Clinique de la Souris (ICS ; Illkirch-Graffenstaden) par recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires (ES).

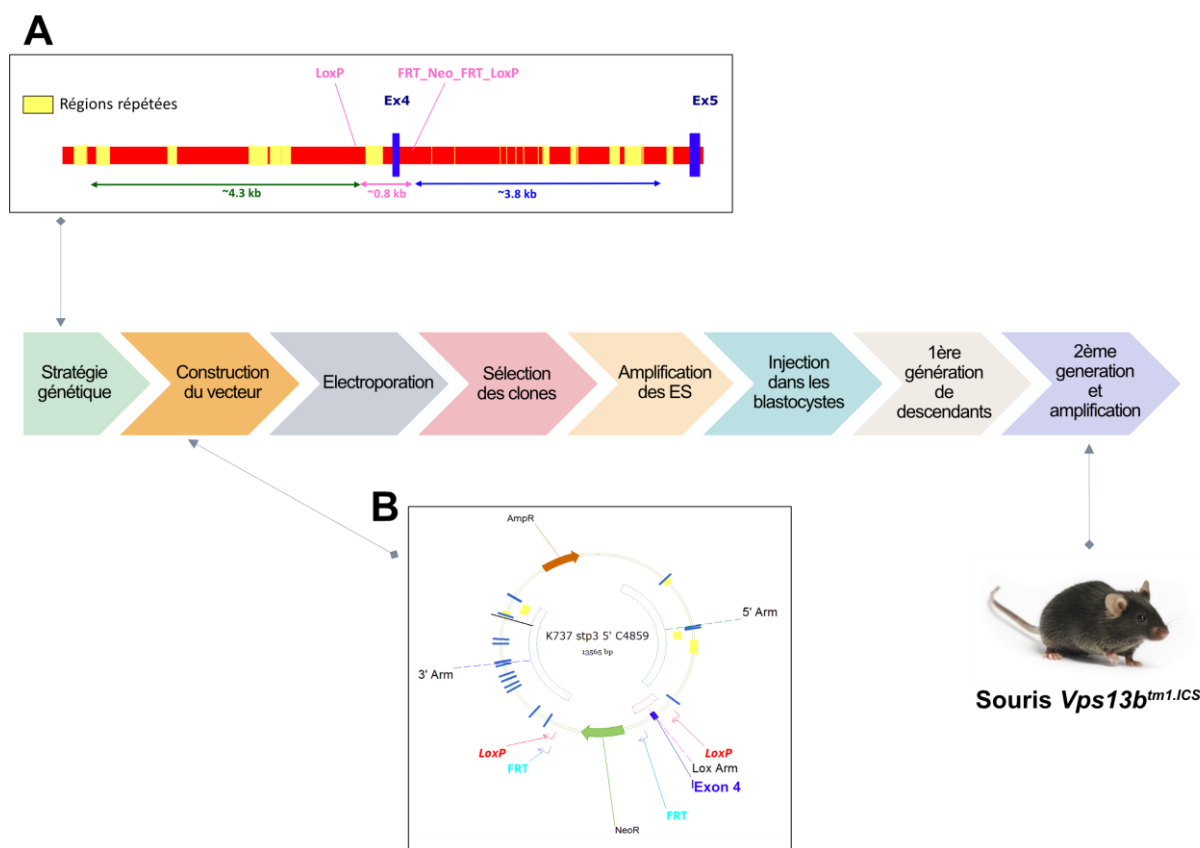


Figure 25 : Schéma récapitulatif des différentes étapes de génération du modèle murin *Vps13b^{tm1.ICS}*.

(A) Stratégie génétique utilisée pour flanquer l'exon 4 de *Vps13b* avec les sites LoxP et le site de résistance à la néomycine. **(B)** Représentation schématique de la structure du vecteur de ciblage électroporé dans les cellules souches embryonnaires (ES).

Un vecteur de ciblage portant deux sites LoxP de part et d'autre du 4^{ème} exon de *Vps13b* (exon critique) et une cassette d'auto-sélection de résistance à la néomycine ont été électroporés dans une lignée C57BL/6NTac (souris au pelage noir). Les clones ES transfectés ont été sélectionnés par leur résistance à la néomycine et 93 d'entre eux ont ainsi été isolés. Ils ont ensuite été soumis à un processus de criblage permettant l'identification de ceux présentant les événements de recombinaison à la fois en 5' et en 3' du vecteur. Les clones ciblés ont été identifiés par PCR et confirmés par analyse par Southern Blot en utilisant une sonde interne et une sonde externe en 5'. L'intégration aléatoire de la construction dans le génome a également été vérifiée.

Les cellules souches utilisées pour l'électroporation étaient issues de souris de souche C57BL/6 qui ont un pelage noir. Les clones sélectionnés ont été injectés dans des blastocystes de souris de souche BALB/cN qui, elles, ont un pelage blanc. Les souris issus de ce croisement possédaient donc deux types cellulaires : des cellules dérivées des cellules souches embryonnaires injectées et d'autres dérivées du blastocyste rendant leur pelage à la fois blanc et noir. Pour la suite de l'expérience, seules les souris mâles possédant un pourcentage de pelage noir supérieur à 85%, signe d'un pourcentage élevé de cellules dérivées des cellules ES, ont été sélectionnées puis croisées avec des femelles C57BL/6NCrI wild-type afin d'obtenir une première génération de descendants transgéniques. Les petits issus de ce croisement ont ensuite été accouplés avec la lignée Cre délétère FlpO lignée 31 pour obtenir des animaux hétérozygotes knock-out constitutifs et croisés avec des souris C57BL/6J pour obtenir une colonie outbred sur un fond génétique mixte (Birling et al. 2012). La nomenclature internationale donnée à cette lignée est *Vps13b^{tm1.ICS}*. Tm1 désigne une mutation ciblée avec un allèle de délétion marqué par un rapporteur et une cassette de sélection ; ICS désigne l'Institut Clinique de la Souris.

1.3. Hébergement des animaux et maintien de la colonie

Les souris ont été hébergées dans l'annexe de l'animalerie centrale de Dijon, dans le bâtiment B3 de l'université de Bourgogne (Dijon, France). Les souris ont été élevées selon une alternance jour/nuit de 12h. La température ambiante était de 21±2°C et l'humidité était de 45±10%. L'état de santé global et le bien-être des animaux a été vérifié quotidiennement ainsi qu'avant et après chaque procédure expérimentale. Les souris ont été élevées dans des cages de stockage de 425 x 265 x 175 mm (Longueur

x Largeur x Hauteur) pouvant contenir jusqu'à 10 animaux. Chaque cage contenait de la litière, 1 à 2 morceaux de cotons pour permettre aux souris de se fabriquer un nid et un petit tunnel en plastique ou un petit récipient en verre pour occuper les animaux et diminuer ainsi l'ennui et l'agressivité.

L'amplification de la colonie a été réalisée en adoptant une stratégie d'accouplement « hétérozygote x hétérozygote » afin de s'affranchir des problèmes d'infertilité des souris homozygotes (Da Costa et al. 2020). Toutes les expérimentations ont été réalisées, de manière indépendante, sur les souris mâles et femelles. A la fin du protocole expérimental, les souris ont été euthanasiées par dislocation cervicale.

1.4. Génotypage

L'identification des animaux a été réalisée par poinçon à l'oreille au moment du sevrage. L'ADN génomique a été extrait à partir de l'échantillon récolté. L'amplification d'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction) a été réalisée en utilisant la GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega) en suivant les instructions du fabricant. Les amorces utilisées pour confirmer l'excision de l'exon 4 étaient 5'-GCTAGATTGGCTGTCATGAAGCAC-3' (amorce sens) en amont de l'exon délété et 5'-CTAACAGTTGACTGAGGAAGCAGCAATG-3' (amorce antisens) en aval de la délétion. La réaction de PCR a été lancée dans un thermocycleur Eppendorf en utilisant le programme suivant : 94°C pendant 5 min; [94°C pendant 30 s puis 62°C pendant 1 min et 72°C pendant 2 min] x 35 cycles; 72°C pendant 7 min. Les produits de PCR ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5% et les images acquises en utilisant le système GelDoc XR Imaging System (Bio-Rad). La taille

attendue des fragments de PCR pour l'allèle muté est de 307 paires de base (pb) et de 923 pb pour l'allèle wild-type.

2. Biologie moléculaire

2.1. Annotation du génome au niveau du locus

La version du génome de *Mus musculus* utilisée dans cette étude est GRCm38.p6 (Genome Reference Consortium Mouse Build 38 patch release 6). Les annotations des différents transcrits de *Vps13b* ont été extraits du « navigateur de génome » Ensembl (<https://www.ensembl.org>).

Chez la souris, le gène *Vps13b* est localisé sur le brin sens du chromosome 15. Ses coordonnées génomiques sont 35,371,160-35,931,229 pb et il possède 7 transcrits annotés. Le transcrit principal, le plus long, (*Vps13b-201*), aussi appelé transcrit canonical, code pour la protéine ENSMUSP00000045490. Le second plus long transcrit (*Vps13b-202*) ne possède pas de cadre ouvert de lecture. *Vps13b* possède également 4 transcrits issus d'épissages alternatifs dans lesquels un intron est retenu en fin de transcription (*Vps13b-203*, *Vps13b-205*, *Vps13b-206* et *Vps13b-207*). Enfin, une petite protéine codante ENSMUSP00000153856 de 46 acides aminés est codée par un petit transcrit de 2 exons (*Vps13b-204*).

2.2. Sur cellules Neuro2A

2.2.1. Culture et différenciation cellulaire

La lignée cellulaire issue de neuroblastome murin, Neuro2A (N2A) a été utilisée pour étudier la différenciation neuronale. Les cellules N2A ont été cultivées dans du milieu MEM (Minimum Essential Media Eagle) contenant 2,4 g de bicarbonate de sodium (SRL, 36328), 10 mL d'une solution de 1M HEPES (Gibco, 15630080), et 100 µL de HCl 35% (Amplura, 1.94501.0521) supplémenté par 10% de Sérum de Veau Foetal (FBS, Gibco, 10270-106) et 1% (v/v) d'antibiotiques ; pénicilline et streptomycine 5000 unit/mL (Gibco, 15070-063). Les cellules ont été maintenues dans un incubateur à 37°C et 5% CO₂ en atmosphère humide et ont été passées deux fois par semaine.

Afin d'induire leur différenciation en cellules neuronales, 1,5 x 10⁶ cellules N2A ont étéensemencées dans des places de 35 mm (Tarsons, 460035). La différenciation a été induite pendant 24 heures en utilisant du milieu MEM supplémenté par 1% de FBS (Gibco, 10270-106), 1% (v/v) d'antibiotiques et 20 µM d'acide rétinoïque (Sigma, 302-79-4). Après 24 heures, les cellules ont été observées au microscope à contraste de phase (DEBRO, DSZ-55) afin de vérifier leur changement de morphologie et leur croissance axonale.

2.2.2. Extraction d'ARN et RT-qPCR

L'isolation d'ARN et la synthèse d'ADN complémentaire des cellules Neuro2A contrôles et traitées ont été réalisées en utilisant, respectivement, les kits AURUM total RNA mini (Bio-Rad, 732-6820) et iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, 1708891). L'amplification de 500 ng/µL d'ADNc a été réalisée en utilisant le kit iTaq SYBR Green Supermix (Bio-Rad, 1725121), avec 1 µM d'amorces Vps13b sens (5'-

TGGATTCTGCACCAGGGCAAT-3') et antisens (5'-AGCATCGGTACTGGGCATCT-3'). L'amplification par qPCR a été lancée en utilisant le programme suivant : une dénaturation initiale à 90°C pendant 20 s, suivie de 40 cycles à 95°C pendant 30 s et 60°C pendant 30 s puis d'une élongation finale à 70°C pendant 10 min.

2.3. Sur tissus murins

2.3.1. Extraction d'ARN

Les différents tissus ont été placés dans l'azote liquide directement après leur prélèvement puis conservés à -80°C afin d'éviter leur dégradation avant utilisation.

Les tissus ont été broyés à l'aide d'un mixeur plongeant (ultraturax) dans 1 mL de Trizol (Sigma-Aldrich) et les ARN ont été extraits en utilisant la technique d'extraction au phénol-chloroforme. Ce procédé de séparation repose sur la différence de solubilité des acides nucléiques et des protéines dans une émulsion à deux phases, aqueuse et organique. Après ajout de 200 µL de chloroforme, la phase aqueuse, contenant les ARN, a été séparée de la phase organique, contenant les protéines dénaturées, par centrifugation (15 min, 4°C, 12 000 g). Les ARN ont ensuite été précipités par ajout de 500 µL d'isopropanol suivie de 10 min d'incubation et d'une nouvelle centrifugation (10 min, 4°C, 12 000 g). Après double rinçage à l'éthanol 75% suivie d'une centrifugation de 5 min à 4°C et 7 500 g, l'éthanol a été aspiré et les culots mis à sécher avant d'être resuspendus dans 20 µL d'H₂O sans nucléase.

La concentration en ARN a été mesurée par spectrophotométrie grâce au Multiskan GO (ThermoScientific) et la pureté de chaque échantillon déterminée grâce aux ratios DO_{260/280} et DO_{260/230}. Les échantillons ont été considérés comme purs lorsque ces ratios étaient supérieurs à 1,8 pour le premier et 2 pour le second. Pour chaque

organe, deux échantillons d'ARN aléatoires ont subi un contrôle de leur qualité par Bioanalyser (Agilent 2100). Les échantillons ont été considérés de bonne qualité lorsque leur RNA integrity number (RIN) était supérieur à 8.

2.3.2. Transcription inverse, PCR et qPCR

L'ADN complémentaire a été synthétisé à partir de 100 ng d'ARN totaux grâce au kit iScript Reverse Transcription Supermix (Bio-Rad).

Les PCR qualitatives ont été réalisées dans un volume final de 11,5 µL contenant 5 ng d'ADN complémentaires selon les instructions du fabricant de la GoTaq Flexi polymerase (Promega).

Les PCR quantitatives ont été réalisées dans un volume final de 20 µL contenant 2,5 ng d'ADNc, 300 nM d'amorces sens et antisens et du tampon iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Les réactions ont été effectuées en triplicat dans une plaque 96 puits en suivant le programme d'amplification suivant dans un thermocycler CFX96 de Bio-Rad: 95°C pendant 3 min suivies de 40 cycles à 95°C pendant 10 s et 60°C pendant 30 s, puis 65°C pendant 5 s et 95°C pendant 5 min. L'expression des différents gènes a été établie en utilisant la méthode d'analyse du cycle seuil (Ct). L'équation utilisée était la suivante : $(\Delta Ct \text{ gène-cible}) - (\Delta Ct \text{ gène-ménage}) = \Delta \Delta Ct \text{ gène-cible}$.

2.3.2.1. Expression longitudinale de *Vps13b*

Afin de réaliser une étude d'expression longitudinale de *Vps13b*, les ARN totaux ont été extraits à partir du cerveau entier de souris à différents âges. Les amorces utilisées étaient 5'-GGAAGACCCTGCCCGAAG-3' (amorce sens) et 5'-AGGCTTTGATACATCCAAGTAGA-3' (amorce antisens). L'expression de *Vps13b* a été normalisée par rapport au gène de ménage *Gnas* (amorce sens: 5'-AGAACATCCGCCGTGTCTTC-3' et antisens: 5'-CCTTCTTAGAGCAGCTCGTATTGG-3'). Le choix de ce gène de ménage a été effectué sur la base de sa stabilité d'expression au cours de la vie de la souris.

2.3.2.2. Expression relative de *Vps13b*

Dans l'étude d'expression relative de *Vps13b* dans les différents tissus, les ARN totaux ont été extraits à partir de 11 tissus cérébraux et périphériques (cortex, hippocampe, cervelet, pont de Varole, hypothalamus, cœur, foie, rein, tissu adipeux blanc, muscle et poumon). Les amorces ont été designées pour couvrir la jonction entre les exons 1 et 2 (exons 1/2), les exons 35 et 36 (exons 35/36) et les exons 61 et 62 (exons 61/62) du transcrit canonical *Vps13b-201*. Les séquences de ces différentes amorces sont indiquées en **Tableau 1**. Les amorces des exons 35/36 et 61/62 étaient spécifiques du transcrit *Vps13b-201* tandis que les amorces des exons 1/2 couvraient une séquence commune aux transcrits *Vps13b-202*, *Vps13b-203* et *Vps13b-206*. L'expression de *Vps13b* a été normalisée par rapport au gène de ménage *Hprt* : 5'-TCATTATGCCGAGGATTTGGA-3' (amorce sens) et 5'-CAGAGGGCCACAATGTGATG-3' (amorce antisens).

Exons	Séquence sens	Séquence antisens
1/2	5'-TCTCTGCCTACTCCTCGTCAG-3'	5'-CTGTTCCAGAACGTCCAAC-3'
35/36	5'-GGAAGACCCTGCCCCGAAG-3'	5'-AGGCTTTGATACATCCAAGTAGA-3'
61/62	5'-GCACAGGACACCAAGCAAAA-3'	5'-GGCCAGGTGACAAGATGTTT-3'

Tableau 1 : Séquences des amorces utilisées dans l'étude d'expression relative de *Vps13b* dans les différents tissus murins.

2.3.2.3. Expression spécifique du transcrit codant pour la petite protéine codante

Dans l'étude d'expression spécifique du transcrit codant pour la petite protéine (*Vps13b-204*), les amorces de qPCR ont été désignées pour couvrir une séquence uniquement présente dans l'ARN messager du transcrit d'intérêt. Les amorces utilisées, 5'-CTGCGCTAGGGATCTGACTT-3' (amorce sens) et 5'-GTTTGCTGAGAACCACGTCC-3' (amorce antisens) couvraient une séquence présente à la jonction entre les exons 1 et 2 de la petite protéine codante. Dans le transcrit canonical, 78 nucléotides supplémentaires sont situés au milieu de cette séquence, empêchant ainsi son hybridation correcte et rendant les amorces utilisées purement spécifiques du transcrit *Vps13b-204* (**Tableau 2**). L'expression du transcrit a été normalisée par rapport au gène de ménage *Hprt*: 5'-TCATTATGCCGAGGATTTGGA-3' (amorce sens) et 5'-CAGAGGGCCACAATGTGATG-3' (amorce antisens).

Transcrit	Exon	Séquence nucléotidique
Petite protéine <i>Vps13b-204</i>	1	[...]CCGCCTCTGGCTGGG CTGCGCTAGG
	2	GATCTGACTT CGACGCTTAAATTTGAAG ATG CTGGAGTCGT ACGTA ACTCCAATTTTAATGAGTTATGTGAATCGCTATATCA AGAACTTAAA A CCTTCAGATCTCCAGCTTTC ACTATGGGGTG GGGACGTGGTTCTCAGCAAAC TCGAGTTAAAGTTGGACGT T
Transcrit canonical <i>Vps13b-201</i>	1	[...]CCGCCTCTGGCTGGG CTGCGCTAGGG TAGGAGTGAAGC AGGACGTGCTGTCCTCCCACGCCCGGGGGCCGGCCGCCT CCAGCCTCTCTGCCTACTCCTCGTCAG
	2	GATCTGACTT CGACGCTTAAATTTGAAG ATG CTGGAGTCGTA CGTA ACTCCAATTTTAATGAGTTATGTGAATCGCTATATCAAG AACTTAAACCTTCAGATCTCCAGCTTTC ACTATGGGGTGGG GACGTGGTTCTCAGCAAAC TCGAGTTAAAGTTGGACGTTCT GGAACAG

Tableau 2 : Design du couple d'amorce spécifique au transcrit de la petite protéine codante.

La séquence de l'amorce sens est présentée en **rouge** et celle de l'amorce anti-sens en **bleu**. Dans le transcrit canonical, 78 nucléotides, présentés en **vert**, se retrouvent au milieu de la séquence de l'amorce sens, rendant son hybridation difficile. Par soucis de simplification, le [...] a été utilisé pour représenter les nucléotides présents en amont de la région qui nous intéresse pour le design des amorces.

2.3.2.4. Expression des gènes voisins de *Vps13b* dans le locus

L'effet de l'inactivation de *Vps13b* sur l'expression de ses gènes voisins dans le locus a été analysée. Les ARN totaux ont été extraits à partir de tissus prélevés chez des souris wild-type (testicule, cœur, rein, foie, muscle et cerveau). Afin de déterminer si les deux transcrits des gènes voisins étaient exprimés dans le cerveau de souris, une RT-PCR a été réalisée en utilisant la GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega). Les amorces utilisées pour évaluer l'expression de *Osr2* étaient 5'-GGCCATACACCTGTGACATC-3' (amorce sens) et 5'-AGTTTTGTGAACTGCTAGGGT-3' (amorce antisens). Les amorces utilisées pour

évaluer l'expression de *Cox6c* étaient 5'-GTCTTCTGGCCAAGCGTCT-3' (amorce sens) et 5'-GCATACGCCTTCTTTCTTGG-3' (amorce antisens). Le gène de ménage utilisé était *Hprt*. Etant donné que seul *Cox6c* était exprimé dans le cerveau des souris, nous avons quantifié son expression par RT-qPCR en utilisant les mêmes amorces.

2.3.2.5. Expression des gènes de la famille des *Vps13*

Les différentes amorces utilisées pour évaluer l'expression des gènes de la famille des *Vps13* dans le cerveau des souris wild-type et mutantes étaient les suivantes :5'-GAGAGTTTACGACCTCCCAGA-3' (amorce sens) et 5'-TGCAAATCTTCCATTTTCCATGA-3' (amorce antisens) pour *Vps13a*, 5'-CGGGCTCTCTCTGGTTAACA-3' (amorce sens) et 5'-TTCGAATAGGCCTGCTCCAG-3' (amorce antisens) pour *Vps13c* et 5'-GAACCTCAAGATCAGCATCCC-3' (amorce sens) et 5'-CCGAGTGAAGGGATCCAGAT-3' (amorce antisens) pour *Vps13d*. Le gène de ménage utilisé était *Hprt*.

3. Séquençage d'ARN

3.1. Séquençage d'ARN sur population cellulaire (Bulk RNA sequencing)

Cette partie a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr. Muhammad Ansar à Lausanne.

Des bibliothèques de séquençage d'ARN ont été générées à partir de 200 ng d'ARN total provenant de tissus d'hippocampe et de cervelet de souris à l'aide du kit NEBNext

RNA Ultra II (NEB), conformément aux instructions du fabricant. Brièvement, après purification à l'aide de billes magnétiques fixées à l'oligo d(T)₂₅, l'ARNm a été fragmenté à l'aide de cations divalents à 80°C pendant 2 minutes. Les fragments d'ARN clivés ont été transformés en ADNc premier brin à l'aide de transcriptase inverse et d'amorces aléatoires. La spécificité du brin a été obtenue en remplaçant le dTTP par le dUTP pendant la synthèse du deuxième brin d'ADNc en utilisant l'ADN polymérase I et la RNase H. Après l'ajout d'une seule base "A" et la ligature ultérieure de l'adaptateur sur les fragments d'ADNc double brin, les produits ont été purifiés et amplifiés par PCR (30 secondes à 98°C ; [10 secondes à 98°C, 75 secondes à 65°C] x 12 cycles ; 5 minutes à 65°C) pour créer la librairie d'ADNc. Les amorces PCR excédentaires ont été éliminées par purification à l'aide de billes AMPure XP (Beckman-Coulter, Villepinte, France), et la qualité des bibliothèques d'ADNc finales a été vérifiée et quantifiée par électrophorèse capillaire. Ces bibliothèques ont été séquencées au département de science et d'ingénierie des biosystèmes (D-BSSE) de l'ETH Zürich à Bâle (Suisse), à l'aide d'un Illumina NovaSeq6000 avec un mode de lecture Single-End de 50 bases.

L'analyse du séquençage de l'ARN et l'appel des bases ont été effectués à l'aide de RTA 2.7.3 et de bcl2fastq 2.17.1.14. La qualité des données brutes a été évaluée par le logiciel FastQC version 0.11.4 (disponible en ligne à l'adresse : <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Les lectures ont été prétraitées à l'aide de Trimmomatic version 0.39 afin d'éliminer les adaptateurs, les polyA et les séquences de faible qualité (score de qualité Phred inférieur à 30). Les lectures de moins de 40 bases ont été écartées de toute analyse ultérieure. Les lectures ont ensuite été mises en correspondance avec l'assemblage mm10 du génome de *Mus musculus* à l'aide de STAR34 version 2.5.2b (--twopassMode Basic).

Les nombres de lectures ont également été collectés à l'aide de STAR2. Les lectures cartographiées de manière unique ont été comptées en ne chevauchant qu'un seul gène. L'expression des gènes a également été quantifiée à l'aide de htseq-count 0.6.1p135 et des annotations de gènes de 102 d'Ensembl. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide de la version 4.2.0 de R et de la bibliothèque DESeq2 1.26.0 de Bioconductor.

3.2. Séquençage d'ARN sur cellule unique

Le séquençage d'ARN sur cellule unique a été réalisé et publié par l'Allen Brain Institute (Yao et al. 2021). En bref, 1,3 million de cellules de l'isocortex et de la formation hippocampique de souris adultes ont été profilées et regroupées en 388 clusters. Au total, 584 souris C57BL/6J mâles et femelles ont été utilisés pour collecter des cellules à différents âges (531 animaux âgés de 53 à 59 jours, 7 animaux de 50-52 jours et 46 animaux de 60 à 121 jours). Les données brutes de séquençage ont été téléchargées à partir de l'URL suivant <https://portal.brain-map.org/atlas-and-data/rnaseq>. L'expression de *Vps13b* dans trois types de cellules différentes (neurones glutamatergiques, neurones GABAergiques et astrocytes) a été analysée et le pourcentage de cellules exprimant *Vps13b* dans chaque type cellulaire a été calculé.

4. Test de viabilité

Au stade embryonnaire E18.5, 69 fœtus ont été isolés par césarienne de 13 femelles gestantes. Après avoir été extrait de leurs sacs embryonnaires, les fœtus ont été placés sur une plaque chauffée à 37°C et gentiment roulés sur eux même pour stimuler

leur première respiration. Ils ont été observés attentivement pendant 30 min. Leur respiration, leur mouvement, leur sensibilité et leur circulation sanguine ont été vérifiés et quantifiés en utilisant une stratification à plusieurs niveaux présentées dans le

Tableau 3.

Respiration	0 : aucune respiration 1 : uniquement si stimulation intense ou stoppée 2 : seul mais très lent > 20 s 3 : seul mais lent 5 à 20 s 4 : seul et régulier < 5 s
Mobilité	0 : aucune mobilité 1 : légers mouvements avec stimulation 2 : petits mouvements sans stimulation 3 : beaucoup de mouvements sans stimulation
Sensibilité	0 : aucune sensibilité 1 : sensible > 25 min 2 : sensible entre 20 et 25 min 3 : sensible entre 15 et 20 min 4 : sensible < 15 min
Circulation sanguine	0 : gris 1 : violet 2 : rose clair 3 : rose vif
Mort	0 : mort in utéro 1 : mort avant 15 min 2 : mort entre 15 et 20 min 3 : mort entre 20 et 25 min 4 : mort après 25 min 5 : vivant à 30 min

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des paramètres observés dans le test de viabilité.

Les différents niveaux de scorage des paramètres sont indiqués dans la deuxième colonne.

Les souris vivantes après 30 min ont été anesthésiées sur glace et euthanasiées par décapitation avec des ciseaux chirurgicaux. Des morceaux de queue ont été collectés pour génotypage et sexage. Les embryons ont été placés dans une solution de fixation au Bouin (Thermoscientific) pendant 96 h puis les cerveaux ont été processé pour des analyses neuroanatomiques (Nguyen et al. 2022).

5. Analyses neuroanatomiques

5.1. Analyses morphométriques du crâne des souris

Cette partie a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr. Nicolas Navarro à l'Université de Bourgogne.

La tomographie micro-informatique à rayons X (μ CT) du crâne a été acquise à l'aide d'un scanner Bruker Skyscan 1174 avec les spécifications suivantes (tension : 50 kV, courant : 800 μ A, temps d'exposition : 3500 ms, pas de rotation : 0,700 degrés, moyenne des images : 2, filtre aluminium : 0,5, résolution spatiale : 29,35 μ m). La surface 3D a été segmentée à l'aide de la version 2019.4 d'Avizo à une valeur de gris comprise entre 22 et 255 à l'aide de l'outil baguette magique. En plus des repères du visage initialement enregistrés (Bonfante et al. 2021), dont un repère situé à l'intersection entre l'os nasal et l'os frontal a été conservé, 17 repères ont été numérisés à l'aide de 3D Slicer-5.0.2 (Fedorov et al. 2012) par deux expérimentateurs de manière indépendante. Après avoir vérifié la cohérence et les erreurs grossières dans le placement des points de repère, la moyenne des deux sessions a été calculée. La taille du basicranium (la base du crâne) a été calculée comme la taille du centroïde, la racine carrée de la somme des carrés des distances euclidiennes de chaque repère au centroïde (Rudemo 2000), de sept repères (en orange dans la figure 2K). La taille du neurocrâne (surface extérieure du crâne) a été calculée comme la taille du centroïde de 18 repères (repères orange et noirs dans la figure 2K). Le volume de l'endocrâne (la surface intérieure du crâne) a été obtenu automatiquement à partir du volume du crâne en 3D à l'aide de l'extension SlicerMorph (Rolfe et al. 2021) de 3D Slicer en utilisant les paramètres de lissage du noyau de 0,5 mm et de taille du trou de 1,5 mm. Deux modèles linéaires ont été calculés : 1) reliant la taille du neurocrâne au

génotype *Vps13b* après avoir contrôlé la taille générale du crâne à l'aide de la taille du centroïde du basicrâne, et 2) reliant le volume de l'endocrâne au génotype *Vps13b* après avoir contrôlé la taille du neurocrâne. Les moyennes marginales attendues pour les tailles moyennes du basicrâne ou du neurocrâne ont été calculées à l'aide du package R emmeans version 1.7.0 (Lenth 2021).

Une analyse Procrustes généralisée complète avec symétrie de l'objet (Klingenberg et al. 2002) a été réalisée à partir des repères du neurocrâne à l'aide du progiciel Morpho R version 2.9 (Goodall 1991). Une analyse en composantes principales a été calculée à partir des coordonnées tangentes symétriques. L'effet du génotype a été évalué sur les coordonnées tangentes symétriques à l'aide d'une ANOVA de Procrustes (Goodall 1991) avec le paquetage R geomorph version 4.0.0 (Adams et al. 2016) et le paquetage R RRPP version 1.0.0 (Collyer & Adams 2018). Les formes marginales moyennes attendues pour chaque génotype ont été estimées à l'aide du progiciel RRPP, les modèles de forme 3D correspondants ont été déduits à l'aide de splines à plaques minces, et les distances signées entre les modèles 3D ont été calculées à l'aide du progiciel Morpho R.

5.2. Analyse 2D

5.2.1. Analyse globale du cerveau

Les souris de différents âges (juvénile, jeune adulte, adulte et âgée) ont été euthanasiées par dislocation cervicale soigneuse afin de ne pas endommager les tissus. Le cerveau a été disséqué et fixé 48 h en paraformaldéhyde 4% (PFA 4%). Les échantillons ont ensuite été transférés dans l'éthanol 70%. Les deux hémisphères cérébraux ont été séparés et inclus en paraffine sur la plateforme d'histologie

CellmaP, INSERM LNC-UMR1231 (Dijon, France). Les cerveaux ont été coupés à une épaisseur de 5 µm à l'aide d'un microtome (HM 450, Microm France) au niveau de la section critique (latéral +0.60 mm). Les coupes ont été colorées avec 0,1% de Luxol -Solvent Blue 38, Sigma-Aldrich) pour marquer la myéline et 0,1% de Cresyl violet acétate (Sigma-Aldrich) pour marquer les cellules. Les lames ont été scannées informatiquement en utilisant le scanner Nanozoomer 2.0HT C9600 series (Hamamtsu Photonics, Shizuoka, Japan) de la plateforme d'anatomopathologie du CHU de Dijon. Chaque image a subi un contrôle qualité pour vérifier que la section était à la bonne position, qu'elle était symétrique, que la coloration était de bonne qualité et que l'image était de bonne qualité. Ce contrôle qualité est essentiel pour la détection des petites modifications neuroanatomiques, c'est pour cela que les images qui n'ont pas validé le contrôle qualité ont été exclues des analyses. Afin d'éviter les biais expérimentaux, j'ai effectué toutes les mesures.

Pour chaque échantillon, un total de 40 paramètres morphologiques, constitués d'aire et de longueur, ont été mesurés sur 22 structures cérébrales. Les régions mesurées étaient l'aire totale du cerveau, le cortex moteur, le cortex cingulaire, l'hippocampe, le gyrus denté, le corps calleux, le thalamus, la fimbria, la commissure antérieure, la strie médullaire, le fornix, l'hypothalamus, la substance noire, les noyaux du pont, le subiculum dorsal, le colliculus inférieur, le colliculus supérieur, le pont de Varole, les fibres transverses du pont, le cervelet et le ventricule latéral. Pour chaque région, le nombre et la densité des cellules ont été analysés. D'autres paramètres tels que les ectopies cellulaires (neurones mal places) ont été recherchés.

La liste et la description des paramètres mesurés dans le cerveau du nouveau-né et de l'adulte sont présentés en **Tableau 4** et **Tableau 5**.

Acronyme	Description	Unité
4_TB_area	Aire totale du cerveau	cm ²
4_LV_area	Aire du ventricule latéral	cm ²
4_TCTX_area	Aire totale du cortex moteur	cm ²
4_TCTX_length_T	Longueur de la partie haute de l'aire corticale	cm
4_TCTX_length_B	Longueur de la partie basse de l'aire corticale	cm
4_Cxne_area	Aire de la couche neuroépithéliale du cortex	cm ²
4_SubVCx_area	Aire de la couche sous ventriculaire du cortex	cm ²
4_ICx_area	Aire de la couche corticale intermédiaire	cm ²
4_CxP_low_area	Aire de la couche basse de la plaque corticale	cm ²
4_CxP_up_area	Aire de la couche haute de la plaque corticale	cm ²
4_Cxne_height	Hauteur de la couche neuroépithéliale	cm
4_SubVCx_height	Hauteur de la couche sous ventriculaire	cm
4_ICx_height	Hauteur de la couche corticale intermédiaire	cm
4_CxP_low_height	Hauteur de la couche basse de la plaque corticale	cm
4_CxP_up_height	Hauteur de la couche haute de la plaque corticale	cm
4_HP_area	Aire de l'hippocampe	cm ²
4_TILpy_area	Aire de la couche de cellules pyramidales	cm ²
4_TILpy_length	Longueur de la couche de cellules pyramidales	cm
4_Cg_area	Aire du cortex cingulaire	cm ²
4_Cg_height	Hauteur du cortex cingulaire	cm
4_M2_length	Longueur du cortex moteur secondaire	cm
4_CPu_area	Aire du noyau caudé	cm ²
4_Th1_area	Aire du noyau thalamique 1	cm ²
4_Th2_area	Aire du noyau thalamique 2	cm ²
4_fi_area	Aire de la fimbria	cm ²
4_aca_area	Aire de la commissure antérieure	cm ²
4_f_area	Aire du fornix	cm ²
4_sm_area	Aire de la strie médullaire	cm ²
4_och_area	Aire du chiasma optique	cm ²
4_TB_height_CS1	Hauteur 1 du cerveau total	cm
4_TB_height_CS2	Hauteur 2 du cerveau total	cm
4_TB_width	Largeur du cerveau total	cm
4_TMB_area	Aire totale du mésencéphale	cm ²
4_TC_area	Aire totale du cervelet	cm ²
4_infC_area	Aire du colliculus inférieur	cm ²
4_supC_area	Aire du colliculus supérieur	cm ²
4_mRt_area	Aire de la formation réticulaire mésencéphalique	cm ²
4_Pn_area	Aire du noyau du pont de Varole	cm ²
4_pons_height	Hauteur du pont de Valeur	cm
4_Folia	Nombre de folia cérébelleux	nombre

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des paramètres neuroanatomiques mesurés dans le cerveau de la souris nouveau-né.

Acronyme	Description	Unité
4_TB_area	Aire totale du cerveau	cm ²
4_TB_width	Largeur totale du cerveau	cm
4_TB_height_CS1	Hauteur 1 du cerveau total	cm
4_TB_height_CS2	Hauteur 2 du cerveau total	cm
4_TCTX_area	Aire du cortex total	cm ²
4_M2_length	Longueur du cortex moteur secondaire	cm
4_M1_length	Longueur du cortex moteur primaire	cm
4_Pons_height	Hauteur du pont de Varole	cm
4_TC_area	Aire totale du cervelet	cm ²
4_IGL_area	Aire de la couche granulaire interne du cervelet	cm ²
4_Folia	Nombre de folia cérébelleux	nombre
4_Med_area	Aire du noyau cérébelleux médial	cm ²
4_LV_area	Aire du ventricule latéral	cm ²
4_cc_area	Aire du corps calleux	cm ²
4_cc_length	Longueur de la couche externe du corps calleux	cm
4_cc_height	Epaisseur du corps calleux	cm ²
4_TTh_area	Aire totale du thalamus	cm ²
4_HP_area	Aire de l'hippocampe	cm ²
4_Rad_length	Epaisseur de la couche radiatum de l'hippocampe	cm
4_Or_length	Epaisseur de la couche oriens de l'hippocampe	cm
4_TILpy_area	Aire de la couche de cellules pyramidales	cm ²
4_TILpy_length	Longueur de la couche de cellules pyramidales	cm
4_Mol_length	Epaisseur de la couche moléculaire de l'hippocampe	cm
4_DG_area	Aire du gyrus denté	cm ²
4_DG_length	Longueur du gyrus denté	cm
4_fi_area	Aire de la fimbria	cm ²
4_aca_area	Aire de la commissure antérieure	cm ²
4_sm_area	Aire de la strie médullaire	cm ²
4_f_area	Aire du fornix	cm ²
4_VMHvl_area	Aire du noyau ventromédial de l'hypothalamus	cm ²
4_Pn_area	Aire du noyau du pont	cm ²
4_SN_area	Aire de la substance noire	cm ²
4_fp_area	Aire des fibres du pont de Varole	cm ²
4_Cg_area	Aire du cortex cingulaire	cm ²
4_Cg_height	Hauteur du cortex cingulaire	cm
4_DS_area	Aire du subiculum dorsal	cm ²
4_InfC_area	Aire du colliculus inférieur	cm ²
4_SupC_area	Aire du colliculus supérieur	cm ²

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des paramètres neuroanatomiques mesurés dans le cerveau de la souris adulte.

5.2.2. Analyses approfondies de régions cérébrales spécifiques

Un protocole d'analyse approfondie a été développé pour évaluer des caractéristiques neuroanatomiques précises de la formation hippocampique, du cortex et du cervelet. Dans l'hippocampe, l'aire de différentes couches CA1, CA2 et CA3 de la corne d'Ammon a été mesurée. Dans le gyrus denté, les deux bras, haut et bas, de la couche granulaire ont été analysés indépendamment et l'aire des couches moléculaires et polymorphiques a été mesurée. Dans le cortex, la lamination en six couches a été évaluée (aire et épaisseur de chaque couche) sur une portion de même largeur. Cette largeur a été déterminée en mesurant la distance entre l'apex du corps calleux et l'apex du ventricule latéral chez toutes les souris d'un groupe expérimental. La plus petite distance a ensuite été reportée sur les autres cerveaux pour évaluer la lamination sur une portion de même largeur. Les paramètres cellulaires des couches moléculaires et polymorphiques du gyrus denté ainsi que de chacune des couches corticales ont été enregistrés. Dans le cervelet, la densité des cellules de Purkinje a été mesurée en calculant le nombre de cellules de Purkinje présente sur une portion définie de la couche granulaire. La liste des différents paramètres mesurés dans cette analyse approfondie est présentée en **Tableau 6** et le protocole d'analyse que j'ai développé est disponible en **Méthodes Annexes**.

Abréviations	Description	Unité
Hippocampe		
4_CA1_area	Aire de la couche CA1 de la corne d'Ammon	cm ²
4_CA2/3_area	Aire des couches CA2 et CA3 de la corne d'Ammon	cm ²
4_DGupp_area	Aire du bras haut de la couche granulaire du gyrus denté	cm ²
4_DGlow_area	Aire du bras bas de la couche granulaire du gyrus denté	cm ²
4_DGlow_length	Longueur du bras bas de la couche granulaire du gyrus denté	cm
4_DGmol_area	Aire de la couche moléculaire du gyrus denté	cm ²
4_DGpoly_area	Aire de la couche polymorphique du gyrus denté	cm ²
Cortex		
4_TCTX_area_lay1	Aire de la couche I du cortex	cm ²
4_TCTX_area_lay2-3	Aire des couches II et III du cortex	cm ²
4_TCTX_area_lay5	Aire de la couche V du cortex	cm ²
4_TCTX_area_lay6a	Aire de la couche Via du cortex	cm ²
Cervelet		
4_TC_distance	Longueur de la portion de cervelet sur laquelle les cellules de Purkinje ont été comptées	cm
4_TC_Purkinje_count	Nombre de cellules de Purkinje	nombre
4_TC_Purkinje_density	Densité de cellules de Purkinje	nombre/cm

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des régions anatomiques évaluées dans l'étude neuroanatomique approfondie de l'hippocampe, du cortex et du cervelet.

5.3. Analyse 3D

Mon équipe a mis en place un protocole d'analyse du cerveau des souris en 3 dimensions reposant sur la technique d'histologie 3D par microscopie épiscopique à haute résolution (HREM).

5.3.1. Préparation des échantillons

Les souris adultes ont été euthanasiées par dislocation cervicale et les échantillons de cerveau ont été soigneusement disséqués pour ne pas endommager les tissus mous et fixés pendant 48 heures dans du paraformaldéhyde à 4 %. La méthodologie HREM a été décrite précédemment (Weninger et al. 2006). En bref, les échantillons ont été déshydratés en utilisant une série croissante de 11 concentrations d'éthanol (10 à 90%, 95 et 100%) pendant 2 heures chacune. Après la déshydratation, les échantillons ont été infiltrés à 4°C avec un léger balancement pendant 12 jours dans une résine plastique de méthacrylate JB-4 (Polysciences Europe GmbH, Allemagne) contenant le colorant fluorescent éosine B (Sigma-Aldrich), ce qui a entraîné un marquage non spécifique des structures cérébrales, augmentant ainsi le contraste dans l'ensemble du cerveau. Après l'ajout d'un catalyseur conformément aux instructions du fabricant (Polysciences Europe GmbH, Allemagne), les blocs ont été laissés à polymériser pendant une nuit à température ambiante et cuits à 95°C pendant 48 heures, puis refroidis pendant plusieurs heures à 4°C pour assurer une texture dure avant le sectionnement sur un microtome avec optique et caméra (Dual HREM Imaging, Indigo Scientific Ltd). Le sectionnement en série de la face a été effectué en utilisant des sections de 3 µm. L'imagerie séquentielle de la face du bloc pendant le processus de sectionnement a permis d'acquérir une pile complète de milliers d'images alignées avec précision, documentant la structure 3D de l'échantillon.

5.3.2. Segmentation et analyse

Les données ont été analysées sans tenir compte du génotype. Les voxels isotropes ont été calculés à l'aide d'ImageJ version 1.53 sur la base de la résolution X-Y, qui

était en moyenne de 3,4 mm. La segmentation manuelle a été réalisée à l'aide de 3D Slicer-5.0.239 et de la méthode itérative "Grow from seeds" pour interposer des segments entre les images en utilisant les trois axes (coronal, axial et sagittal). Nous avons défini et segmenté 23 segments uniques non chevauchants couvrant l'ensemble du cerveau murin et correspondant au cortex, à l'amygdale, au corps calleux, au striatum, au gyrus denté, à l'hippocampe (sans le gyrus denté), à la région rétrohippocampique, à la fimbria de l'hippocampe, aux tracts de fibres, la commissure antérieure, le fornix, le fascicule rétroflexe, l'habénula médiale, l'habénula latérale, le thalamus, l'hypothalamus, le mésencéphale, le pons, le bulbe rachidien, la couche arborescente vitale du cervelet, la couche granulaire du cervelet, la couche moléculaire du cervelet et les ventricules. Le volume cérébral total (VCT) a été obtenu en additionnant le volume de chacun des 23 segments. 19/24 (80 %) points de données volumétriques ont une mesure de surface correspondante dans le plan sagittal 2D, ce qui facilite la comparaison des données entre les formes 2D et 3D.

Sur la base des intersections des sous-structures externes et internes du cerveau, 65 points de repère appariés et 27 points de repère non appariés (c'est-à-dire situés dans le plan sagittal) ont été numérisés par un expérimentateur à l'aide de 3D Slicer-5.0.2 (Fedorov et al. 2012). Une analyse Procrustes généralisée complète avec symétrie d'objet (Klingenberg et al. 2002) a été calculée à l'aide du progiciel Morpho R version 2.9. Les moyennes marginales attendues pour chaque génotype ont été calculées à l'aide du progiciel RRPP R version 1.0.0 (Collyer & Adams 2018). Les modèles de forme 3D correspondants ont été déduits à l'aide de splines à plaques minces et les distances signées entre les modèles 3D ont été calculées à l'aide du progiciel Morpho R.

6. Histologie

6.1. Marquage Golgi-Cox

Le marquage Golgi-Cox, aussi appelée coloration au nitrate d'argent, est une technique de coloration permettant de visualiser et de distinguer les différents types de neurones d'un tissu nerveux. Dans cette étude, la coloration a été réalisée en utilisant le kit FD Rapid GolgiStain (FD NeuroTechnologies) sur des cerveaux fraîchement extraits de la boîte crânienne, en suivant les instructions du fabricant. Après 3 semaines d'imprégnation, les cerveaux entiers ont été inclus dans un bloc à 3% d'agarose à point de fusion bas (Sigma-Aldrich) et le tissu a été sectionné dans la solution C du kit. Les coupes, d'une épaisseur de 105 μm , ont été réalisées à l'aide du vibratome semi-automatique (Leica Vibratome VT1200S) à une vitesse de coupe de 0,38 mm/s et une amplitude de 0,60 mm. Les coupes ont ensuite été déposées sur des lames recouvertes de gélatine puis placées à l'obscurité pendant 2 jours pour les faire sécher avant la coloration. La coloration a été effectuée en suivant les instructions du fabricant. L'acquisition des images a été réalisée avec le microscope inversé Nikon Eclipse Ti de la plateforme DlmaCell (Université de Bourgogne, Dijon, France) en mode multicouche d'une épaisseur de 0,2 μm à un grossissement de 100X. Les épines dendritiques ont été analysées et comptées sur les dendrites secondaires (d'en moyenne 30 μm de long) des cellules granulaires du gyrus denté. La densité des épines a été calculé en divisant le nombre d'épines par la longueur de la section mesurée. Toutes les mesures ont été réalisées manuellement par le même expérimentateur en utilisant le logiciel NDPviewer 2.0.

6.2. Marquage TUNEL

Le marquage TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labelling) est une technique, basée sur le marquage des cassures des brins d'ADN, utilisée pour détecter et quantifier la mort cellulaire programmée (apoptose). Dans notre étude, le marquage a été réalisé sur des coupes de cerveaux de souris, nouveaux-nés ou adulte, inclus en paraffine en utilisant les kits *in situ* cell death detection kit Fluorescein (Roche Applied Science, cat # 11684795910) et TMR red (Roche Applied Science, cat # 12156792910) en suivant les recommandations du fabricant.

6.3. Marquages immunohistochimiques

Après dissection, les cerveaux ont été fixés pendant 48 h dans du PFA 4% puis préservés dans de l'éthanol 70% avant d'être inclus en paraffine. Des coupes sagittales de 5 µm d'épaisseur ont été réalisées en utilisant un microtome (HM 450, Microm France) puis montées sur lame avant de réaliser le marquage immunohistochimique.

6.3.1. Marquage des neurones matures et des astrocytes

Des marquages immunohistochimiques ont été réalisés pour marquer les neurones matures et les astrocytes. Les coupes histologiques ont été déparaffinées par bains successifs de xylène (2 fois 10 min), d'éthanol (100% puis 90%, 70%, 50% et 30%, 10 aller/retour dans chaque bain) et d'eau. Le démasquage des épitopes a été réalisé en utilisant une solution de citrate (H-3300, Vector Laboratories) pendant 20 min dans un

bain-marie à 95°C. Après rinçage dans une solution de PBS 1%, les coupes ont été incubées pendant 1h à 37°C dans une solution de blocage au PBS contenant 10% de Serum d'âne (NDS). Après saturation, les anticorps primaires Anti-NeuN (GTX132974, 1/250ème, GeneTex) ou anti-GFAP (GTX108711, 1/250ème, GeneTex) ont été ajoutés. Après une nuit d'incubation à 4°C, les coupes ont été lavées au PBS1X pendant 3 h pour retirer tous les résidus d'anticorps primaires. Les anticorps secondaires (Donkey anti-rabbit Alexa Fluor™ 568 A#10042, Invitrogen, 1/1000ème et Hoechst 33342, Invitrogen 1/2000ème) ont été incubés pendant 1h à l'obscurité à température ambiante. Après lavage au PBS 1%, les coupes ont été montés entre lames et lamelles dans un milieu de montage aqueux (Aqua-Poly/Mount, Polysciences). Les acquisitions ont été réalisées, en mosaïque, en utilisant le microscope à fluorescence Axiozoom (Zeiss) pour le marquage NeuN et le microscope Cell Observer (Zeiss) pour GFAP.

6.3.2. Marquage des différentes couches corticales et vérification de la prolifération

Cette partie a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr. Shilpi Minocha en Inde pour marquer les différentes couches corticales et vérifier la prolifération dans les cerveaux des souris.

Les coupes de cerveaux des souris, nouveau-nés et adulte (25 semaines), ont été déparaffinées par chauffage à 60°C pendant 10 min suivie d'une nuit dans un bain de xylène. Les sections ainsi déparaffinées ont été réhydratées par bain successifs d'éthanol de moins en moins concentré suivi d'un rinçage au PBS 1X. Le démasquage d'épitopes a été réalisé en immergeant les coupes dans une solution de 0,1M de citrate

de sodium (pH 6.0) chauffée 10 min au four à micro-ondes à 750W. Après refroidissement, les coupes ont été rincées deux fois au PBS 1X, bloquées dans une solution à 1% de sérum de chèvre (NGS) pendant 30 minutes puis incubées une nuit avec les anticorps primaires à 4°C. Les anticorps primaires utilisés étaient : rabbit anti-Ph3S10 (Cell Signaling Technology), anti-Tbr1 (Abcam) et anti-Reelin (cadeau du Dr. Cécile Lebrand). Le lendemain, les sections ont été lavées trois fois au PBS 1X puis incubées avec l'anticorps secondaire goat anti-rabbit A488 (Invitrogen, A11008) pendant 1h. Après trois nouveaux rinçages au PBS 1X, les noyaux des cellules ont été marqué au DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Le montage des lames a été réalisé en utilisant une solution de montage au Mowiol (Sigma-Aldrich, CAS # 9002-89-5).

7. Tests comportementaux

Les tests comportementaux ont été conduits dans le bâtiment B3 de l'Université de Bourgogne, par le même expérimentateur sans connaître le génotype des souris. Une batterie de neuf tests a été réalisée, sur une période de 9 semaines, sur 62 souris adultes réparties en deux cohortes indépendantes (cohorte 1 : 6 mâles *Vps13b^{HOM}* vs 10 mâles *Vps13b^{WT}* et 6 femelles *Vps13b^{HOM}* vs 8 femelles *Vps13b^{WT}*; cohorte 2 : 10 mâles *Vps13b^{HOM}* vs 6 mâles *Vps13b^{WT}* et 8 femelles *Vps13b^{HOM}* vs 8 femelles *Vps13b^{WT}*). Le planning des différents tests effectués est présenté en **Figure 26**.

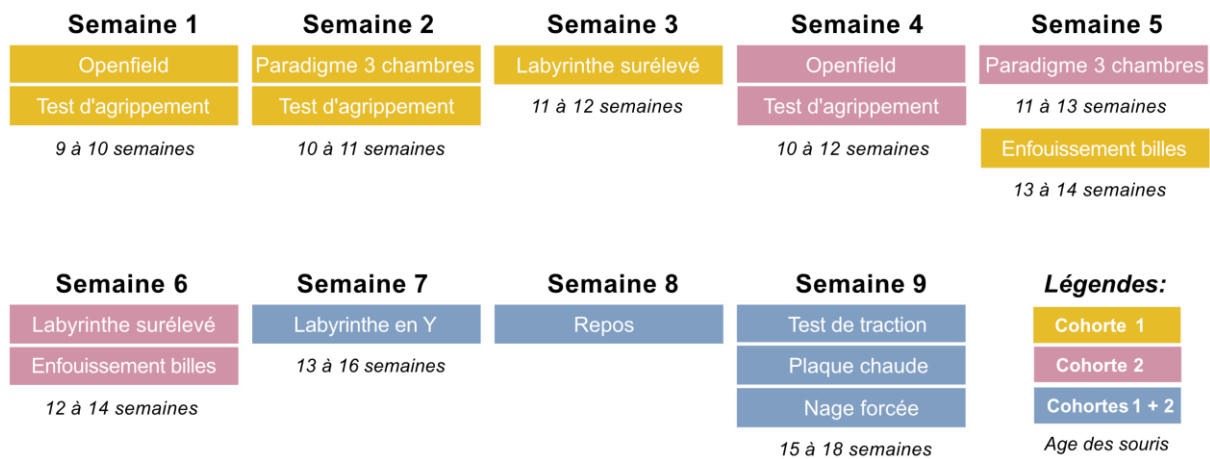


Figure 26 : Déroulement chronologique des différents tests de comportement.

Les tests ont été effectués sur une période de neuf semaines consécutives sur 2 cohortes de souris distinctes.

Les tests comprenaient le test de l'openfield, le test de force de préhension, le paradigme des 3 chambres, le labyrinthe surélevé, le test d'enfouissement de bille, le labyrinthe en Y, le test de la plaque chaude, le test de suspension et enfin le test de nage forcée. Les souris testées ont bénéficié de quelques jours à deux semaines de repos entre chaque expérience. A noter que pour chaque test, un temps d'acclimatation d'au moins 30 minutes a été accordé aux souris transférées dans la salle de test. L'éclairage général de la pièce était de 90 Lux. Toutes les boîtes et appareils ont été nettoyés à l'éthanol 70% entre chaque animal testé. Les souris étaient toutes âgées de 10 ± 1 semaine au début des expériences et de 17 ± 1 semaine à la fin du protocole. Tous les comportements ont été enregistrés à l'aide d'un système de suivi vidéo (Ethovision 14 ; Noldus) à l'exception du test d'enfouissement des billes où 2 expérimentateurs ont compté manuellement les billes enfouies.

7.1. Test de l'openfield

Le test de l'openfield est utilisé pour étudier le comportement exploratoire, l'activité locomotrice de base, l'hyperactivité et l'anxiété chez la souris (Hall & Ballachey 1932). Les souris ont été placées dans une arène de 40 x 40 x 40 cm (Largeur x Longueur x Hauteur), fabriquée en PVC (Noldus) et éclairée à 320 Lux. L'activité des souris a été enregistrée pendant 10 min à l'aide d'un système de suivi vidéo (Ethovision 14, Noldus). La distance parcourue par les souris ainsi que le temps passé dans le centre de l'arène ont été quantifiés.

7.2. Test de force d'agrippement

Le test de force d'agrippement (grip strength) est généralement utilisé pour évaluer la force musculaire des membres postérieurs et antérieurs des rongeurs. Les souris se sont agrippées à une grille fixée à un dynamomètre (Ugo Basile) et tirées en arrière par leur queue. La force de préhension a été calculée par un rapport entre la force de préhension (grammes) et le poids de la souris (grammes). Chaque souris a été testée deux fois dans un intervalle d'au moins 2 semaines et la force maximale enregistrée a été retenue pour les analyses.

7.3. Paradigme des trois chambres de Crawley

Le paradigme des trois chambres évalue la cognition des souris de deux manières : le comportement social et l'intérêt pour un nouveau rongeur (Crawley 2004). Fabriquée en plexiglas, l'appareil est une boîte composée de 3 chambres (60 x 39,5 x 21,5 cm) (Largeur x Longueur x Hauteur) : une chambre centrale et deux autres chambres

contenant des emplacements à barreaux pour y placer les intrus. L'animal peut passer de la chambre centrale aux autres chambres au moyen d'une petite ouverture dans la cloison.

Le test s'est déroulé en trois sessions. La première séance de 10 min était un temps d'habituation au cours de laquelle la souris pouvait explorer librement les 3 chambres. Immédiatement après l'habituation, la souris a été ramenée gentiment dans la chambre centrale et un individu naïf (appelé intrus 1, du même sexe et n'ayant eu aucun contact préalable avec la testée) a été introduit dans le compartiment à barreau de l'une des chambres. La cloison de séparation entre les chambres a été enlevée permettant un accès libre à la souris sujet pour explorer chacune des trois chambres et les différents paramètres ont été mesurés. Après 5 minutes, la souris sujet a été ramenée dans la chambre central et un nouvel individu naïf (intrus 2) a été introduit dans le deuxième compartiment à barreaux, du côté opposé. De même, la cloison a été enlevée permettant un accès libre à la souris pour explorer chacune des trois chambres. Les différents comportements ont été mesurés pendant 5 minutes. Pour chaque séance, la distance parcourue, le temps passé dans chaque chambre, la latence avant le premier reniflement et le temps total passé à renifler l'intrus ont été enregistrés.

7.4. Labyrinthe surélevé

Le labyrinthe surélevé est utilisé pour évaluer le comportement anxiogène chez la souris (Pellow et al. 1985). L'arène est composée de quatre bras : deux bras ouverts sans mur (35 x 6 cm) (Longueur x Largeur) et deux bras fermés (35 cm x 6 cm x 15 cm) (Longueur x Largeur x Hauteur) et est situé à une hauteur de 60 cm du sol. La

luminosité au bout des bras ouverts était de 60 Lux. La souris testée a été placée dans le labyrinthe avec la tête dirigée vers un bras ouvert et autorisée à explorer librement les différents bras pendant une période de 5 minutes. La distance parcourue, le pourcentage de temps passé dans les bras ouverts, la fréquence de visite de chaque bras et les événements d'exploration du vide ont été quantifiés.

7.5. Test de l'enfouissement des billes

Le test d'enfouissement des billes est utilisé pour évaluer les comportements répétitifs, anxieux et compulsifs chez la souris (Deacon 2006). Vingt billes ont été disposées en 5 rangées de 4 billes chacune sur la surface d'une litière propre. La souris testée a été placée dans la cage recouverte de son couvercle pendant 15 minutes. Le nombre de billes enterrées a été noté par deux expérimentateurs indépendant et moyenné. Une bille était considérée comme enterrée lorsque les 2/3 de sa surface étaient recouverts.

7.6. Labyrinthe en Y

Le test de comportement d'alternance spontanée est utilisé pour évaluer la mémoire à court terme de travail (Kraeuter et al. 2019). Le test a été réalisé à l'aide d'un labyrinthe en Y à trois bras où les trois bras ont la même aille (35 x 15 cm ; Noldus) et éclairés sous une luminosité de 55 Lux. La souris a été placée sur le labyrinthe en Y, la tête dirigée vers un bras ouvert et autorisée à explorer librement les différents bras pendant une période de 6 minutes. Une alternance était considérée comme réussie si l'animal visitait trois bras différents à la suite. Le pourcentage d'alternance a été calculé en utilisant la formule : $\text{pourcentage alternance (\%)} = \frac{\text{nombre d'alternances correctes}}{\text{nombre de triades (nombre de triades = nombre de bras visités - 2)}}$.

7.7. Test de la plaque chaude

Le test de la plaque chaude est utilisé pour évaluer la sensibilité thermique des souris (Menéndez et al. 2002). Les souris ont été placées sur une plaque chauffée à 52°C et la latence avant leur première réaction (secousse, saut ou léchage de la patte) a été enregistrée.

7.8. Test de suspension

Le test de suspension est utilisé pour évaluer la fonction motrice des souris. La souris testée était suspendue par ses membres antérieurs sur une barre horizontale à une hauteur de 20 cm. La latence avant la chute de l'animal a été enregistrée. Si l'animal ne tombait pas après 5 minutes, le test était arrêté et la latence enregistrée était de 300 secondes.

7.9. Test de nage forcée

Le test de nage forcée est utilisé pour évaluer le comportement dépressif chez la souris. Elle a été réalisée en utilisant la méthode originale décrite par (Porsolt et al. 1978). Le test a eu lieu dans un vase en verre de 11 cm de diamètre rempli d'eau à 23°C jusqu'à une profondeur de 20 cm. Le comportement de la souris testée a été enregistré par vidéo pendant une période de 6 minutes. La latence avant le premier arrêt et la durée d'immobilité au cours des 4 dernières minutes ont été analysées manuellement.

8. Analyses lipidomiques

Cette partie a été réalisée en collaboration avec la plateforme lipidomique de l'U1231 de Dijon, dirigée par le Dr. Jean-Paul Pais-de-Barros.

Des tissus hippocampiques (8-21 mg) ont été prélevés et suspendus dans une solution saline froide à une concentration finale de 0,02 mg/μl. Les tissus ont été broyés dans un appareil Omni Bead Ruptor 24 (Omni International, Kennesaw, USA) avec environ dix billes d'oxyde de zirconium de 1,4 mm de diamètre extérieur (S = 6,95 m/s, T = 30 s, C = 3 ; D = 10 s). 0,4 mg, 0,5 mg et 2 mg de tissu déchiqueté ont été utilisés pour doser, respectivement, le cholestérol total, les acides gras totaux et les lipides complexes.

Le cholestérol total a été quantifié par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) fonctionnant en mode d'impact électronique positif en utilisant 4,4 μg de cholestérol-d7 comme étalon interne. La méthode de dilution isotopique a été appliquée pour les calculs. Pour la quantification des acides gras totaux, les homogénats de tissus ont été dopés avec 25 μL de mélange standard d'acides gras contenant 1300 ng d'acide myristique-d3, 5640 ng d'acide palmitique-d3, 4200 ng d'acide stéarique-d3, 3600 ng d'acide linoléique-d4, 52 ng d'acide arachidique-d3, 2160 ng d'acide arachidonique-d8, 54 ng d'acide béhénique-d3, 540 ng de DHA-d5, 26 ng d'acide lignocérique-d4 et 20 ng d'acide cérotique-d4. L'analyse a été effectuée par GC-MS en mode d'ionisation chimique négative comme décrit précédemment (Blondelle et al. 2017).

Tous les autres lipides ont été analysés comme suit. Les homogénats (complétés jusqu'à 200 μL avec une solution saline) ont été dopés avec 10 μL d'un mélange standard interne contenant, respectivement, 50 ng, 4000 ng, 500 ng, 800 ng, 50 ng,

400 ng, 500 ng et 50 ng de 14:0 LPC (lysophosphatidylcholines), (19 : 0)₂ PC (phosphatidylcholines), (21:0)₂ PC, 18:1/12:0 SM (sphingomyélines), 14:0 LPE (lysophosphatidyléthanolamines), (14:0)₂ PE (phosphatidyléthanolamines), (17:0)₂ PS (phosphatidylsérines), d18:1/12:0 Cer (céramides). Les lipides ont ensuite été extraits avec du chloroforme/méthanol 2/1 (900 µL) pendant 2 heures en mélangeant doucement. La séparation des phases a été induite avec 120 µL de solution saline. La phase organique a finalement été récupérée après centrifugation pendant 5 minutes à 4°C et évaporée sous vide. Les extraits séchés ont été dissous avec 100 µL d'un mélange chloroforme/méthanol/eau 60/30/4,5, transférés dans des flacons d'injection et conservés à -20 °C jusqu'à l'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).

Les glycérophospholipides et les sphingomyélines ont été analysés sur un spectromètre de masse triple quadripôle (6490 Agilent technologies) fonctionnant en mode de contrôle de réaction unique comme décrit précédemment (Blondelle et al. 2017). Les céramides ont été analysés sur un système UHPLC Vanquish couplé à un spectromètre de masse triple quadripôle Altis plus (ThermoScientific) équipé d'une source chauffée-électrospray (H-ESI). En résumé, les échantillons (2µL) ont été injectés sur une colonne Poroshell C8 2.1x100 mm, 2.7 µm (Agilent technologies) à un débit de 0.3 ml/min, 50°C, et la séparation a été réalisée avec un gradient linéaire de (solvant A) acide formique / formiate d'ammonium (0.2% /1mM concentrations finales) et (solvant B) méthanol contenant de l'acide formique / formiate d'ammonium 1mM comme suit : 80% B pendant 1 min, jusqu'à 100% B en 8 min, et maintenu à 100% pendant 3 min. L'acquisition a été réalisée en mode SRM (Single Reaction Monitoring) positif (tension de pulvérisation 3500 V, gaz de gaine 50, gaz auxiliaire 10, gaz de balayage 1, température du tube de transfert d'ions 325°C, température du

vaporisateur 350°C). La transition utilisée pour la quantification du d16:1/22:0-céramide, des d18:2-céramides et des d18:1-céramides était respectivement [M-18]⁺→236,2, [M-18]⁺→262,2, [M-18]⁺→264,2 (énergie de collision 25 V). La transition utilisée pour la quantification des d18:2-hexosyl-céramides, d18:1-hexosyl-céramides était respectivement [M-18]⁺→262.2, [M-18]⁺→264.2 (énergie de collision 30 V). La quantification relative des composés liés aux céramides a été réalisée en calculant le rapport de réponse de chaque molécule au d18:1/12:0 céramide utilisé comme étalon interne.

Les lipides utilisés comme étalons internes ont tous été obtenus auprès d'Avanti Polar Lipids (Coger SAS, Paris, France). Les acides gras saturés et insaturés utilisés comme étalons internes ont été achetés respectivement à CDN Isotopes (Cluzeau Info Lab, Sainte Foy La Grande, France) et à Cayman (Bertin Pharma, Montigny-le-Bretonneux, France). Les produits chimiques de la plus haute qualité disponible provenaient de Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Les solvants de qualité LC-MS/MS ont été achetés à Fischer Scientific (Illkirch, France).

9. Revue systématique de la littérature

Une revue systématique de la littérature reportant des cas cliniques du syndrome de Cohen a été réalisée en utilisant les mots clefs « Cohen Syndrome » et « Vps13b » sur Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>). Un total de 47 publications cliniques pertinentes ont été identifiées et lues, entièrement, par la même personne. Les informations systématiquement enregistrées comprenaient l'origine, l'âge et le sexe du patient, le type de mutation, la réalisation ou non d'une imagerie cérébrale avec son résultat, la présence ou l'absence de microcéphalie ainsi que toute autre

information relative à la déficience intellectuelle, aux troubles du comportements (tels que le comportement joyeux ou répétitif), aux anomalies crâniofaciales et à l'hypotonie.

10. Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8.0.2. Pour chaque expérience, la détection des valeurs aberrantes a été effectuée en utilisant le test ROUT 1%. La normalité de la distribution des données a été vérifiée à l'aide d'une combinaison de 4 tests (test de D'Agostino & Person, test de Shapiro-Wilk, test de Kolmogorov-Smirnov et test d'Anderson-Darling). Le test de normalité a été déclaré réussi si au moins 3 des 4 tests affirmaient que la répartition des données suivait la loi normale. Les données normalement distribuées ont été analysées à l'aide du test t de Student en bilatéral, tandis que les données non normalement distribuées ont été analysées à l'aide du test non paramétrique de Mann-Whitney. Les tests utilisés sont indiqués dans les légendes des figures. Les résultats sont présentés sous forme d'histogramme représentés par la moyenne \pm l'erreur standard de l'échantillon et présentant les valeurs individuelles sous forme de points ou de triangles. La significativité des différences a été rapportée comme suit : *P < 0,05, ** P < 0,01 et *** P < 0,001.

Résultats

1. *Vps13b* est un gène ubiquitaire qui possède une diversité et une spécificité de ses transcrits pour chaque tissu étudié.

Le premier objectif de ma thèse a été d'établir le patron d'expression complet de *Vps13b* au niveau de l'organisme entier de souris puis de me focaliser sur l'expression du gène dans les tissus cérébraux.

A l'heure actuelle, les bases de données prêtent à *Vps13b* sept transcrits différents dans le génome murin (ensembl.org GRCm38.p6) (Frankish et al. 2021) (**Figure 27**) : un transcrit canonical (*Vps13b-201*) de 13757 pb codant pour une protéine de 3993 acides aminés, un transcrit de 339 pb (*Vps13b-204*) codant pour une petite protéine de 46 acides aminés, un « processed transcript » (*Vps13b-202*), qui ne contient pas de cadre ouvert de lecture, de 4568 pb et quatre « rétentions d'introns » de 4254, 2634, 2076 et 1539 pb, issus d'épissages alternatifs.

Le transcrit canonical de *Vps13b* comporte 62 exons. C'est sept fois plus que le nombre moyen d'exons des gènes du génome de la souris qui s'établit à 8,4 (Chinwalla et al. 2002). Nous avons donc décidé de quantifier l'expression de *Vps13b* à trois positions différentes du transcrit. Afin de s'affranchir des éventuelles contaminations génomiques, j'ai utilisé des couples d'amorces couvrant les jonctions entre deux exons : au début (exons 1/2), au milieu (exons 35/36) et à la fin (exons 61/62) (**Tableau 1**). Le premier couple était commun à quatre transcrits tandis que les couples couvrant le milieu et la fin du transcrit étaient spécifiques du transcrit canonical (**Figure 27**).

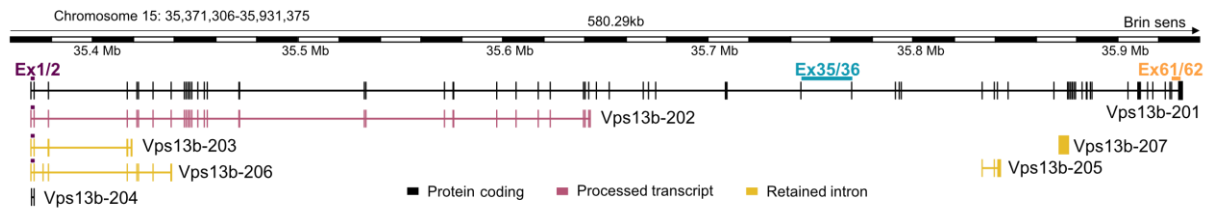


Figure 27 : Représentation schématique du locus et des différents transcrits de *Vps13b* annotés chez la souris.

Version du génome : GRCm38.p6. La position des couples d'amorces utilisés dans l'étude d'expression sont indiqués en violet (exons 1/2), bleu (exons 35/36) et orange (exons 61/62).

L'expression du transcrit a été analysée par RT-qPCR, sur de l'ADNc issus de l'extraction d'ARN de 11 tissus (cortex, hippocampe, cervelet, pont de Varole, hypothalamus, cœur, foie, rein, tissus adipeux blanc, muscle et poumon), prélevés indépendamment chez 5 souris mâles et 6 souris femelles. Les résultats sont présentés en **Figure 28**.

Dans l'ensemble, j'ai montré que *Vps13b* est exprimé dans tous les tissus étudiés, sans différence notable entre les souris mâles et les souris femelles. La plus forte expression de *Vps13b* a été retrouvée dans le foie, les poumons et le cervelet. En examinant l'expression de *Vps13b* au niveau des trois positions marquées, j'ai identifié une distribution différentielle des différents transcrits au niveau périphérique. Par exemple, dans le poumon des souris mâles, la portion du gène correspondant aux exons 1/2 est deux fois plus exprimée que celle correspondant au milieu et à la fin du transcrit (exons 1/2 vs exons 35/36, $P = 0.0002$ et exons 1/2 vs exons 61/62, $P = 0.00005$) (**Figure 28A**). Cela peut s'expliquer par le fait que cette séquence est également retrouvée dans trois transcrits secondaires. Le même profil est observable, en moindre mesure, dans le cœur, le foie et le tissu adipeux blanc des souris mâles et dans le cœur et le muscle des souris femelles (**Figure 28B**).

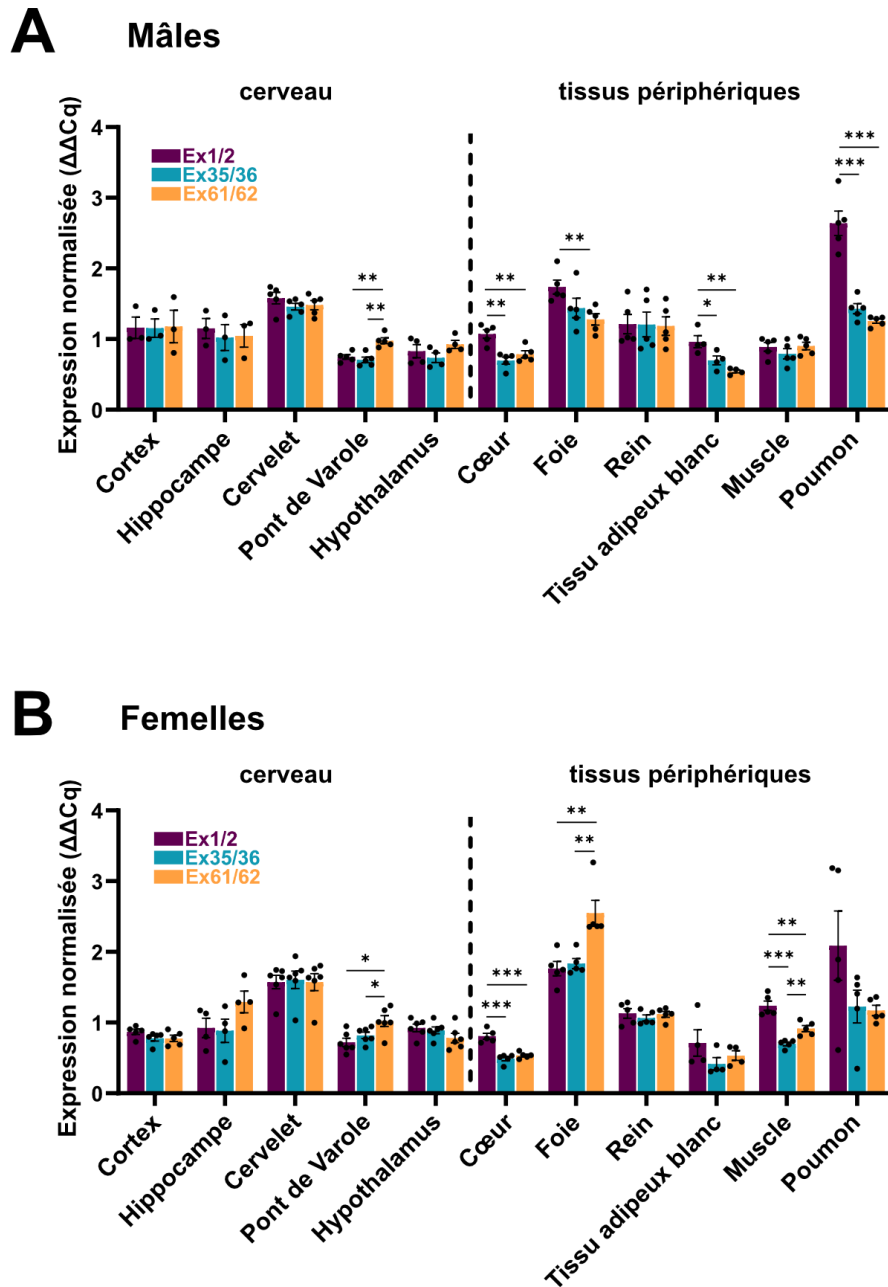


Figure 28 : Expression du transcrit canonique de *Vps13b* dans les différents tissus de la souris.

(A) Mâles. Expression relative de *Vps13b* par RT-qPCR dans 11 tissus de souris mâles wild-type âgées de 19 semaines. Cortex et hippocampe (n=3), hypothalamus et tissu adipeux blanc (n=4), tous les autres tissus (n=5). **(B)** Femelles. Expression relative de *Vps13b* par RT-qPCR dans 11 tissus de souris femelles wild-type âgées de 19 semaines. Hippocampe et tissu adipeux blanc (n=4), cervelet, pont de Varole et hypothalamus (n=6), tous les autres tissus (n=5). Les mesures ont été réalisées en triplicat. La normalisation de l'expression du gène a été effectuée par rapport à celle du gène de ménage *Hprt* (*Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase*). Chaque histogramme représente la moyenne \pm SEM. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du test t de Student (two-tailed). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Dans le cerveau, le transcrit canonique semble être le principal transcrit exprimé. Dans le cortex, l'hippocampe, le cervelet et l'hypothalamus, il n'y a pas de différence d'expression entre les positions 1/2, 35/36 et 61/62. En revanche, de façon intéressante, j'ai observé, dans le pont de Varole, que la portion correspondant à la fin du transcrit était significativement plus exprimée que les autres portions (chez les mâles, exons 1/2 vs exons 61/62 : $P = 0.002$ et exons 35/36 vs exons 61/62 : $P = 0.001$). Cette observation, d'un potentiel transcrit non encore annoté dans le génome de la souris est compatible avec un transcrit, ENST00000493587.1, existant dans le locus humain correspondant (**Figure 29**).

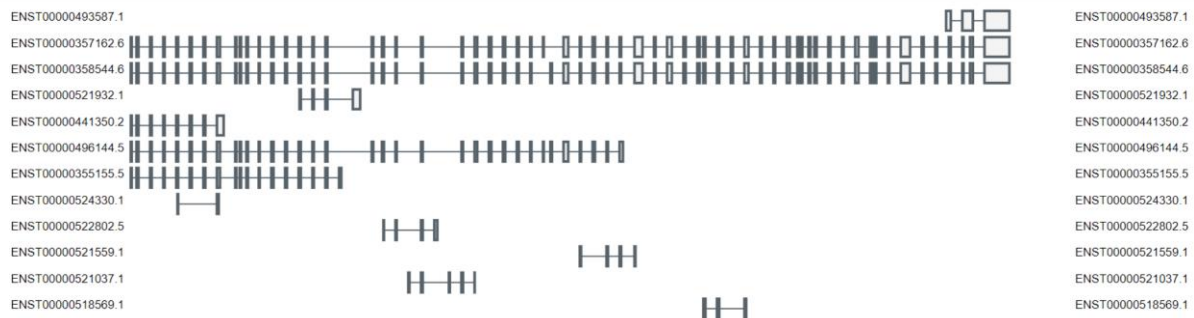


Figure 29 : Représentation schématique des différents transcrits de *VPS13B* annotés dans le génome humain.

Image tirée de <http://www.gtexportal.org>

J'ai également analysé le profil d'expression, chez les mêmes animaux, du transcrit correspondant à la petite protéine codante (*Vps13b-204*) (**Figure 30**). Aucune grosse différence de niveau d'expression de ce transcrit entre les tissus périphériques et les tissus cérébraux n'a été mise en évidence. A noter que je n'ai pas été en mesure d'analyser l'expression spécifique des autres transcrits (*Vps13b-202*, *Vps13b-203*,

Vps13b-205, *Vps13b-206* et *Vps13b-207*) en raison d'un manque de spécificité de leurs séquences.

Ensemble, ces résultats montrent que *Vps13b* est un gène ubiquitaire de l'organisme, bien qu'il soit légèrement plus exprimé dans le poumon, le foie et le cervelet.

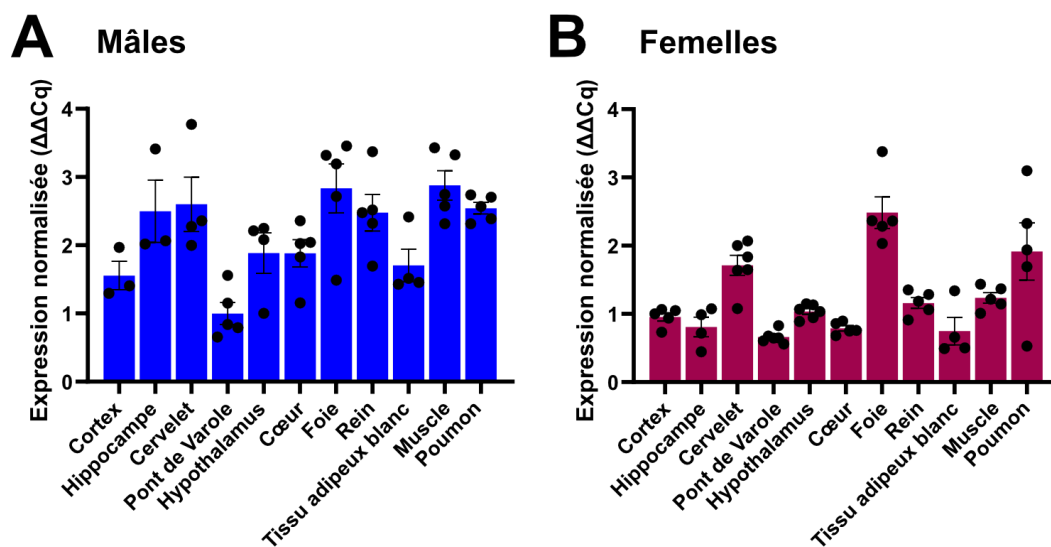


Figure 30 : Expression du transcrite correspondant à la petite protéine codante *Vps13b* dans les différents tissus de la souris.

(A) Mâles. Expression relative de *Vps13b* par RT-qPCR dans 11 tissus de souris mâles wild-type âgées de 19 semaines. Cortex et hippocampe (n=3), hypothalamus et tissu adipeux blanc (n=4), tous les autres tissus (n=5). **(B)** Femelles. Expression relative de *Vps13b* par RT-qPCR dans 11 tissus de souris femelles wild-type âgées de 19 semaines. Hippocampe et tissu adipeux blanc (n=4), cervelet, pont de Varole et hypothalamus (n=6), tous les autres tissus (n=5). Les mesures ont été réalisées en triplicat. La normalisation de l'expression du gène a été effectuée par rapport à celle du gène de ménage *Hprt* (*Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase*). Chaque histogramme représente la moyenne \pm SEM. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du test t de Student (two-tailed).

2. *Vps13b* est exprimé dans les neurones du stade embryonnaire au stade adulte, avec un pic postnatal.

La fenêtre d'expression d'un gène dans l'organisme peut être un premier indicateur de sa fonction. J'ai donc évalué l'expression de *Vps13b* à huit stades du développement du cerveau de la souris, du jour embryonnaire 18.5 (E18.5) au jour postnatal 126 (P126), indépendamment chez les souris wild-type mâles et femelles. L'étude a été réalisée par RT-qPCR à partir d'ADNc issu de cerveaux entiers de souris, sans le cervelet, en utilisant le couple d'amorce s'hybridant au milieu du transcrit canonique de *Vps13b* (exons 35/36). Les résultats sont présentés en **Figures 31A-B**. J'ai montré que *Vps13b* est exprimé à tous les stades examinés mais présente un pic d'expression au jour postnatal P35 chez les souris mâles et femelles. Ces résultats sont en adéquation avec ceux disponibles dans une étude précédemment menée et qui visait à analyser l'expression des différents gènes dans les différents tissus des mammifères en développement (Cardoso-Moreira et al. 2019) (**Figure 31C**). L'étude du profil d'expression de *Vps13b*, dans différents organes de la souris, avait également révélé un pic d'expression postnatal du gène à P28.

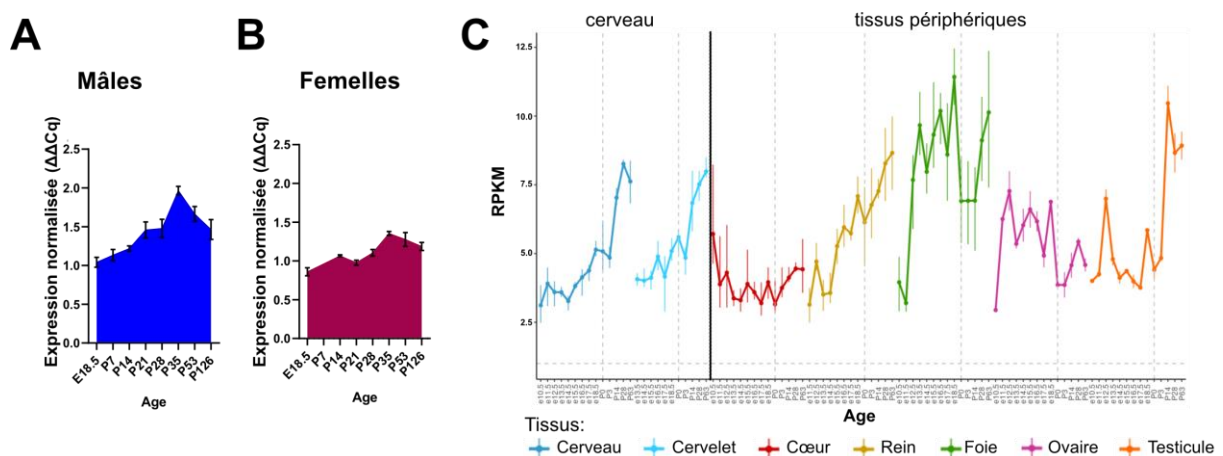


Figure 31 : Expression longitudinale de *Vps13b* chez la souris.

(A) Mâles. Expression longitudinale de *Vps13b* par RT-qPCR sur le cerveau de souris wild-type. E18.5 (n=5 souris mâles) ; P7 (n=4) ; P14 (n=5) ; P21 et P28 (n=4) ; P35 et P53 (n=3) ; P126 (n=4). **(B)** Femelles. Expression longitudinale de *Vps13b* par RT-qPCR sur le cerveau de souris wild-type. E18.5, P7, P14, P21, P28 et P35 (n=3 souris femelles) ; P53 (n=2) ; P126 (n=3). La normalisation a été réalisée par rapport au gène de ménage *Gnas* (*Guanine nucleotide-binding protein, alpha-stimulating*) pour les mâles et les femelles. **(C)** Expression longitudinale de *Vps13b* dans 7 tissus (cerveau, cervelet, cœur, rein, foie, ovaire et testicule) de souris wild-type du stade embryonnaire E10.5 au jour postnatal P63. Les données sont issues de Cardoso-Moreira et al. 2019.

Pour compléter ces résultats tissulaires, des collaborateurs indiens, travaillant dans le laboratoire du Dr. Shilpi Minota, ont examiné l'expression de *Vps13b* dans des cellules neuronales (**Figure 32A**). La différenciation des cellules Neuro2A en cellules neuronales a été induite en associant la baisse de nutriments (diminution de la quantité de sérum de 10% à 1%) au traitement à l'acide rétinoïque (20 μ M). Les ARN totaux ont été extraits après 24 h de différenciation et l'expression de *Vps13b* a été analysée par RT-qPCR. Les résultats de cette collaboration mettent en évidence une augmentation de 44% ($P = 0.027$) de l'expression de *Vps13b* après différenciation des cellules en neurones. Conformément à ces résultats, les données publiées dans l'atlas transcriptomique unicellulaire du cortex de souris en développement ont également montré une expression plus élevée de *Vps13b* dans les neurones nouveau-nés et matures par rapport aux cellules progénitrices (**Figure 32B**) (Telley et al. 2016).

Étant donné ces évidences d'un rôle prédominant dans les neurones matures, j'ai ensuite pensé à déterminer le pourcentage de cellules neuronales et d'astrocytes exprimant *Vps13b* dans le cortex et l'hippocampe des souris adultes. Cette analyse a été réalisée en utilisant des données issues du séquençage d'ARN sur cellules uniques de l'Allen Brain Institute (Yao et al. 2021 + **Méthodes**). Le pourcentage le plus élevé de cellules exprimant *Vps13b* a été observé dans les neurones excitateurs (92% et 82%) et inhibiteurs (85% et 81%), du cortex et de l'hippocampe, respectivement

(Figure 32C). Par rapport aux neurones, le pourcentage d'astrocytes exprimant *Vps13b* est relativement réduit, avec seulement 56% des cellules dans le cortex et 29% dans l'hippocampe (Figure 28F).

L'ensemble de ces résultats indique que le transcrit *Vps13b* codant pour la protéine canonique est exprimé dans les tissus neuronaux de la fin du stade embryonnaire à l'âge adulte et qu'il est impliqué dans la différenciation neuronale, conformément au pic d'expression postnatal.

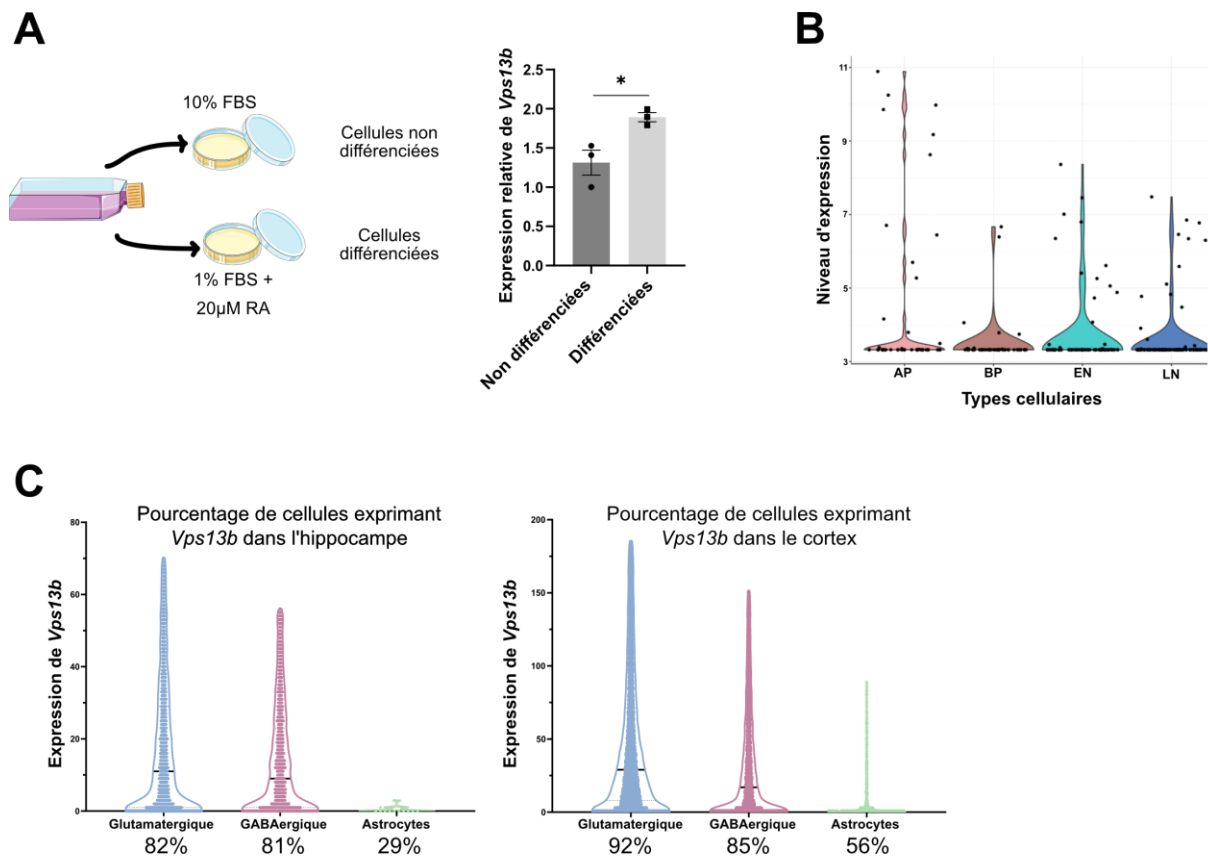


Figure 32 : Expression de *Vps13b* dans la cellule neuronale.

(A) Variation du niveau d'expression relative de *Vps13b* lors de l'induction de la différenciation des cellules Neuro2A par traitement, pendant 24 h, à 20µM d'acide rétinoïque associé à une privation de sérum. L'histogramme représente la moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le test t de Student (two-tailed). * $P < 0,05$. (B) Expression de *Vps13b* dans les cellules du néocortex de souris au stade de développement E14.5, 6 à 48h après la mitose. L'analyse

transcriptomique a été réalisée sur cellule unique. Les données sont issues de Telley et al. 2016 et ont été récupérées sur <https://genebrowser.unige.ch>. Abréviations : AP = Progéniteurs apicaux ; BP : Progéniteurs basaux ; EN : Neurones précoces ; LN : Neurones tardifs. **(C)** Violin plot montrant l'expression de *Vps13b* dans l'hippocampe et le cortex des souris. Les données ont été récupérées sur la base de données de séquence d'ARN sur cellules uniques de l'Allen Brain Institute (Yao et al. 2021). Le pourcentage de cellules exprimant *Vps13b* pour chaque catégorie de cellules est indiqué sur le graphique.

3. La mutation de l'exon 4 de *Vps13b* dans le modèle murin *Vps13b^{tm1.ICS}* n'entraîne pas de dégradation des ARNm non-sens.

Afin de comprendre la fonction de *Vps13b* dans le système nerveux central, j'ai utilisé un modèle murin de souris C57BL/6JN knock-out, appelé *Vps13b^{tm1.ICS}*, dans lequel l'exon quatre de *Vps13b* a été supprimé par recombinaison homologue. Les souris ont été élevées en utilisant une stratégie d'accouplement « hétérozygote par hétérozygote » (**Figure 33A**) pour obtenir des souris de type sauvage (WT), mutantes hétérozygotes (HET) et mutantes homozygotes (HOM). Etant donné que le syndrome de Cohen est une maladie à transmission autosomale récessive, la caractérisation phénotypique des souris a été réalisée en comparant les souris WT et les souris HOM.

Le modèle murin a été validé en vérifiant la correcte délétion de l'exon quatre de *Vps13b* par PCR classique de génotypage sur l'ADN génomique extrait à partir d'une biopsie d'oreille (**Figure 33A**) mais également en utilisant la technique de séquençage haut-débit d'ARN sur des ARN issus de l'hippocampe et du cervelet des souris (**Figure 33B**).

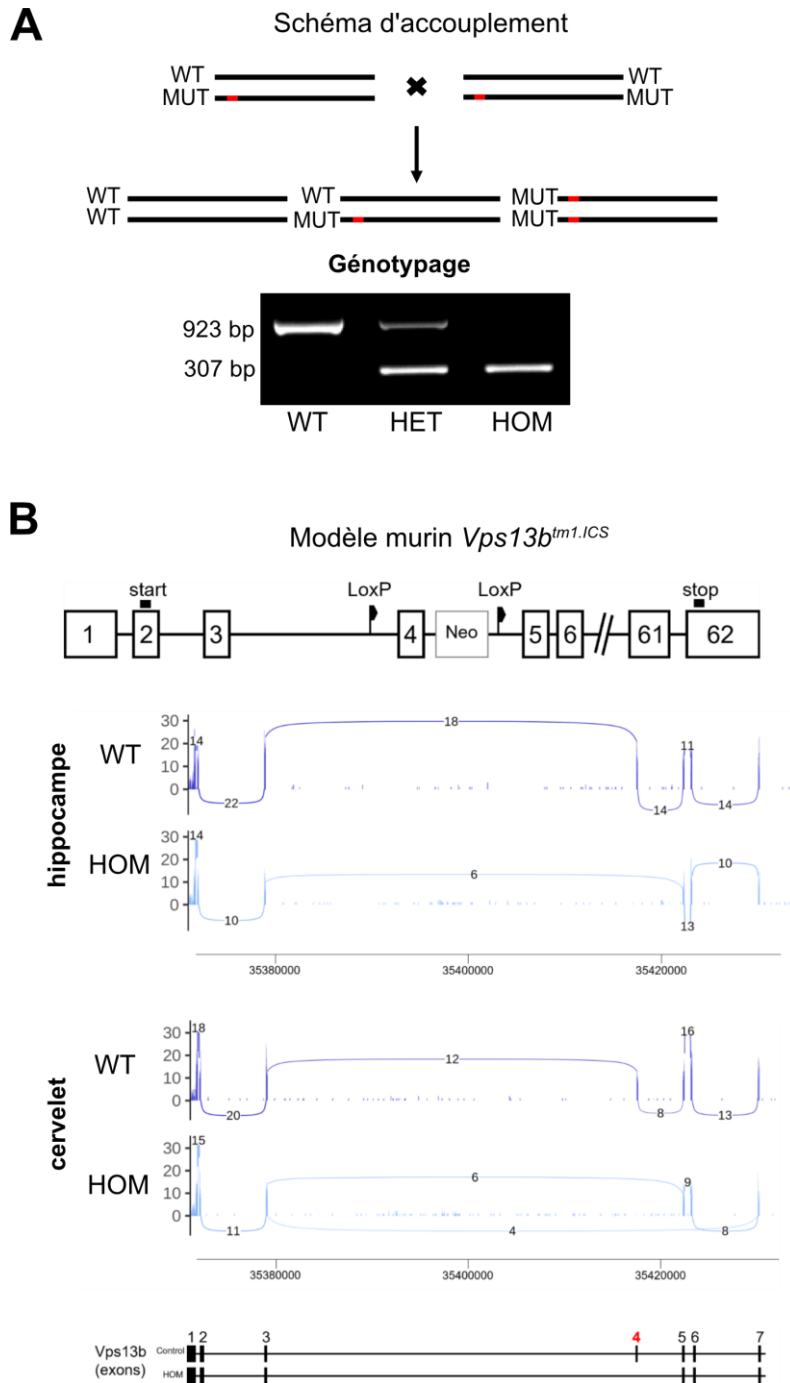


Figure 33 : Vérification de la correcte délétion de l'exon 4 de *Vps13b* dans le modèle *Vps13b^{tm1.ICS}*.

(A) Représentation schématique de la stratégie d'accouplement utilisée pour générer les cohortes de souris *Vps13b*. Résultat d'une PCR de génotypage réalisée en utilisant des couples d'amorces situés de part et d'autre de l'exon 4. (B) Représentation schématique de la construction allélique à l'origine de la génération du modèle *Vps13b^{tm1.ICS}*. Vérification, par bulk séquençage d'ARN, de la correcte délétion de l'exon 4 chez les souris mutantes homozygotes (HOM) mâles âgées de 12 à 16 semaines. Les résultats dans l'hippocampe (n = 3 vs 2) et dans le cervelet (n = 3 vs 2) sont représentés par Sashimi plots.

Je me suis également assurée que la mutation de *Vps13b* n'avait pas d'effet sur l'expression cérébrale de ses gènes voisins dans le locus (*Cox6c* et *Osr2*) et sur celle des autres membres de la famille des *Vps13* (*Vps13a*, *Vps13c* et *Vps13d*). Par RT-PCR, j'ai montré qu'*Osr2*, le gène situé en amont de *Vps13b* sur le chromosome 15, n'était pas exprimé dans le cerveau des souris (**Figure 34A**). Le gène situé en aval, *Cox6c*, quant à lui exprimé dans le cerveau, n'a pas vu son expression affectée par la mutation de *Vps13b* (**Figure 34A**). De façon similaire, aucune expression différentielle des autres membres de la famille de gènes *Vps13* n'a été mise en évidence par RT-qPCR (**Figure 34B**).

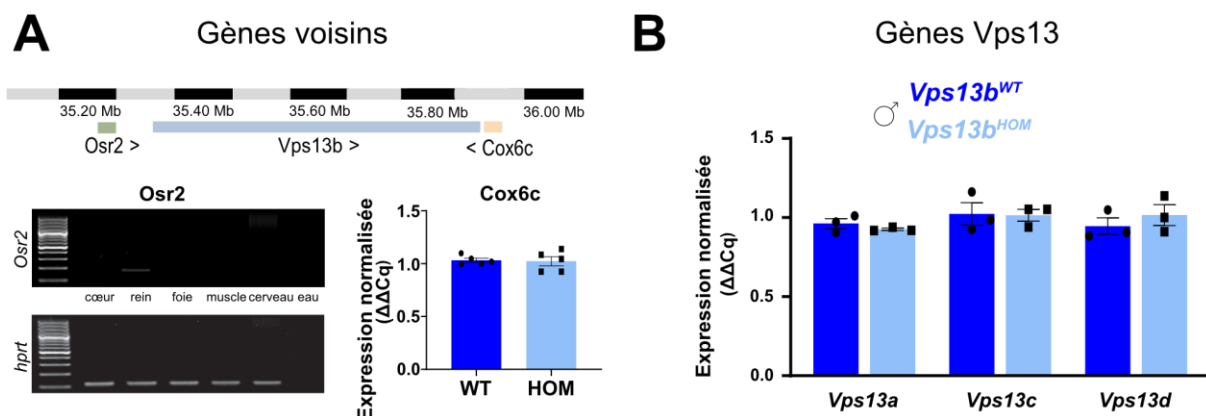


Figure 34 : Effet de la mutation de *Vps13b* sur l'expression de ses gènes voisins dans le locus et des autres gènes *Vps13*.

(A) Vérification de l'effet de la mutation de *Vps13b* sur ses gènes voisins dans le locus. **Haut** : Représentation schématique du locus chez la souris (GRCm38.p6). **Bas gauche** : RT-PCR de l'expression de *Osr2* dans l'ADN complémentaire issu de cœur, de rein, de foie, de muscle et de cerveau de souris mâles WT de 19 semaines. **Bas droite** : Quantification de l'expression de *Cox6c* dans le cerveau par RT-qPCR. Les souris (n = 5 vs 5) étaient âgées de 19 semaines. **(B)** Vérification de l'effet de la mutation de *Vps13b* sur l'expression des autres gènes de la famille *Vps13* par RT-qPCR réalisée sur des cerveaux de souris mâles de 19 semaines (n = 3 vs 3). Chaque mesure a été réalisée en triplicat. L'expression des différents gènes a été normalisée par rapport à celle du gène de ménage *Hprt* (*Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase*). Chaque histogramme représente la moyenne ± SEM. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du test t de Student (two-tailed). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Une étude récente menée sur les modèles murins « perte de fonction » a montré que le mécanisme de dégradation des ARN messagers non-sens (NMD), qui dégrade les transcrits non traduits, n'est pas systématique lorsque la mutation génétique est ciblée sur un exon critique (Lindner et al. 2021). J'ai donc décidé de le vérifier dans notre modèle. L'étude a été menée par RT-qPCR sur l'hippocampe, le cervelet, le cortex, l'hypothalamus et le pont de Varole des souris mâles et femelles. Les résultats sont présentés en **Figure 35**. En ciblant les trois mêmes positions que dans l'étude d'expression (**Figure 28**), j'ai confirmé que le NMD n'avait pas lieu dans l'hippocampe, le cortex et l'hypothalamus des souris mutantes HOM. En revanche, j'ai remarqué un NMD marginal dans le cerveau postérieur des souris. A titre d'exemple, la portion représentant la fin du transcrit (exons 61/62) était 33% moins exprimée dans le pont de Varole chez les souris HOM mâles ($P < 0,00001$) (**Figure 35A**) et 36% moins exprimée chez les souris HOM femelles ($P = 0.006$) (**Figure 35B**). Dans le cervelet, j'ai constaté que le NMD marginal était potentiellement accompagné d'une baisse d'efficacité de la transcription qui reste à démontrer. Chez les souris mâles HOM, l'expression de la portion représentant le milieu du transcrit (exons 35/36) était 27% plus faible que chez les souris WT ($P = 0,0001$) et celle représentant la fin du transcrit (exons 61/62) était 38% plus faible ($P = 0,00007$) (**Figure 35A**). Le même profil a été observé dans le cervelet des souris femelles, avec une baisse d'expression de 30% ($P = 0.01$) et 43% ($P = 0,001$) pour, respectivement, le milieu et la fin du transcrit.

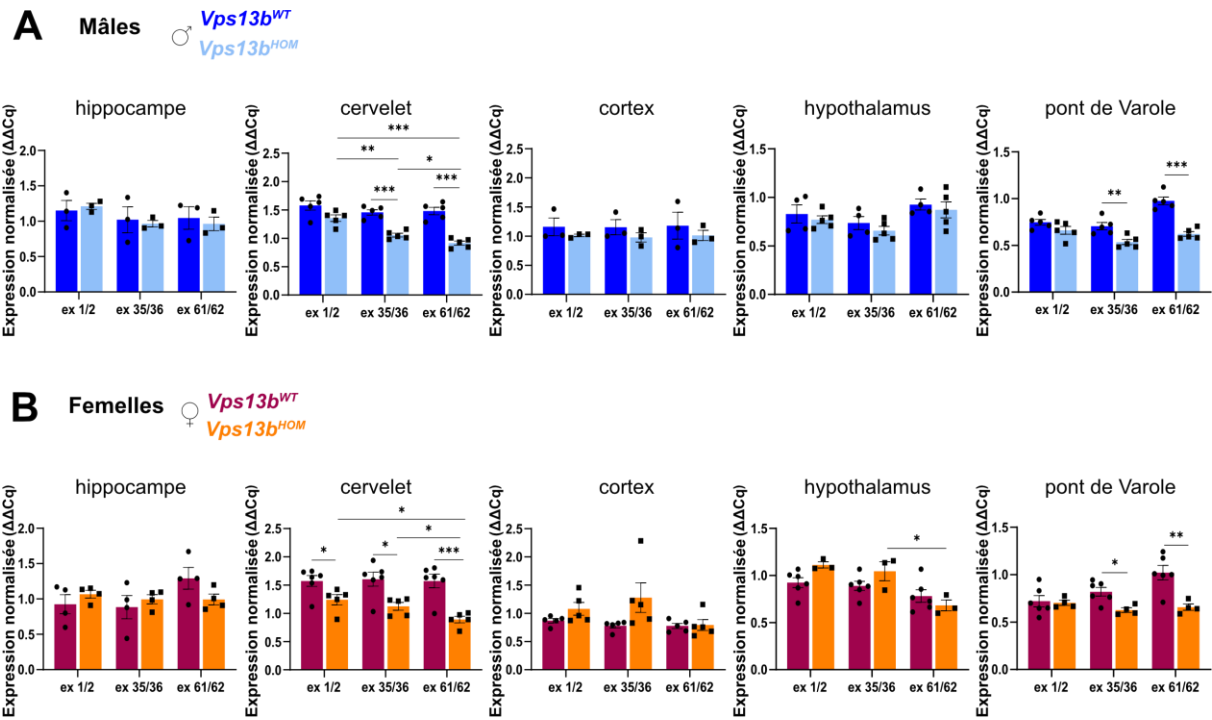


Figure 35 : Effet de la mutation de *Vps13b* sur l'expression de son transcrit canonique dans le cerveau des souris.

(A) Analyse de l'expression du transcrit de *Vps13b* par RT-qPCR dans différentes régions cérébrales de souris mâles de 19 semaines. (WT vs HOM) : Hippocampe (n = 3 vs 3), cervelet (n = 5 vs 5), cortex (n = 3 vs 3), hypothalamus (n = 4 vs 5) et pont de Varole (n = 5 vs 5). **(B)** Analyse de l'expression du transcrit de *Vps13b* par RT-qPCR dans différentes régions cérébrales de souris femelles de 19 semaines. (WT vs HOM) : Hippocampe (n = 4 vs 5), cervelet (n = 6 vs 5), cortex (n = 5 vs 5), hypothalamus (n = 6 vs 3) et pont de Varole (n = 6 vs 4). **(C-F)** Chaque mesure a été réalisée en triplicat. L'expression des différents gènes a été normalisée par rapport à celle du gène de ménage *Hprt* (*Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase*). Chaque histogramme représente la moyenne ± SEM. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du test t de Student (two-tailed). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Dans l'ensemble, ces expériences suggèrent que le modèle mutant *Vps13b^{tm1.ICS}* est caractérisé par un transcrit *Vps13b* tronqué, dépourvu de l'exon 4, qui entraîne soit la non-production d'une protéine soit la production d'une protéine tronquée qui a perdu sa fonction. Je n'ai malheureusement pas pu le démontrer expérimentalement. En effet, pour les deux anticorps testés (Proteintech #24505-1-AP et « fait-maison » Covalab), aucun signal n'a été détecté en western blot et aucune différence de

marquage entre WT et HOM n'a été constatée en immunohistochimie suggérant un manque de spécificité de ces anticorps.

4. *Vps13b* est essentiel pour la survie, la croissance et l'homéostasie cérébrale

Les lois mendéliennes de la transmission héréditaire indiquent que le croisement de deux souris hétérozygotes (HET) doit engendrer une descendance composée de 25% d'individus WT, 50% d'individus HET et 50% d'individus HOM. Si ces proportions ne sont pas respectées et que la proportion de souris mutantes HET ou HOM est bien inférieure, le génotype est considéré comme « subviable ».

Lors de l'amplification de notre lignée *Vps13b^{tm1.1CS}*, en utilisant la stratégie d'accouplement HET x HET, j'ai observé, qu'au moment du sevrage (au jour postnatal 21 : P21), le ratio mendélien attendu n'était pas respecté dans ma population de 779 souris (26% WT, 62% HET et 12% HOM), ce qui indique une léthalité d'environ 50% chez les souris mutantes HOM (**Figure 36**). Afin de déterminer si la mort survenait au moment de la naissance, j'ai réalisé des césariennes sur 14 femelles au stade de gestation E18.5 et ai surveillé les 69 nouveaux-nés pendant 30 min après leur naissance. Après génotypage, j'ai constaté que le ratio mendélien était respecté au stade E18.5 (**Figure 36**). A l'issue des 30 min de surveillance, les nouveau-nés HOM ne présentaient pas de surmortalité et aucune différence dans leur capacité à respirer après stimulation, s'oxygéner, bouger ou ressentir la douleur n'a été remarqué (**Tableau 7**). A la suite de ces observations, et afin de déterminer la fenêtre de léthalité des souris, j'ai génotypé les souris à P1 (n=62), P2 (n=93), P3 (n=62), et P7 (n=51). Alors que le ratio mendélien était respecté à P1 (24% HOM), j'ai constaté qu'il diminuait

progressivement, passant de 18% à P2 à 14% à P7, et 12% à P21 (**Figure 36**). A partir de ce stade, le ratio est resté stable tout au long de la vie, suggérant une létalité progressive pendant la période néonatale.

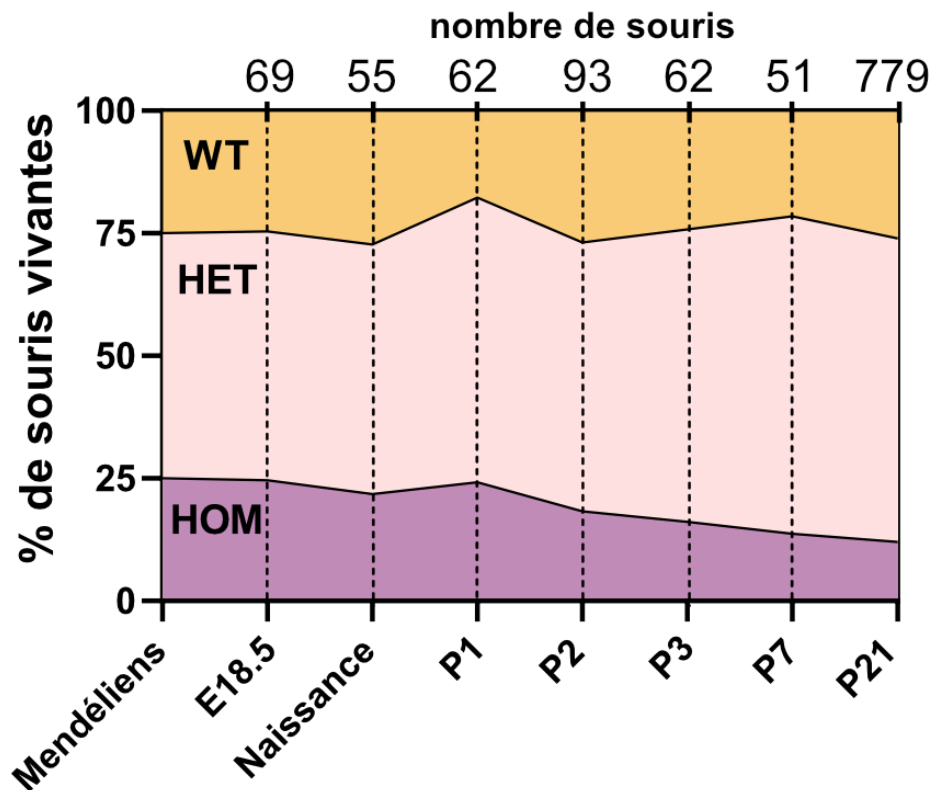


Figure 36 : Evolution de la viabilité des souris mutantes mâles et femelles.

Répartition en % de la proportion de chaque génotype à différents âges (E18.5, naissance, P1, P2, P3, P7 et P21). Les âges sont représentés en abscisse inférieur et le nombre d'individu génotypés en abscisse supérieur. Le ratio mendélien attendu est de 25% WT, 50% HET et 25% HOM.

ID	Sexe	Génotype	Respiration	Mobilité	Sensibilité	Circulation sanguine	Mort	Poids (g)
	M: mâle F: femelle	WT: +/+ HET: +/- HOM: -/-	0: aucune respiration 1: uniquement si stimulation intense ou stoppée 2: seul mais très lent > 20 sec 3: seul mais lent 5 à 20 sec 4: seul et régulier < 5sec NR: non renseigné	0: aucune mobilité 1: légers mouvements avec stimulation 2: petits mouvements sans stimulation 3: bcp mouvements sans stimulation NR: non renseigné	0: aucune sensibilité 1: sensible > 25 min 2: sensible entre 20 et 25 min 3: sensible entre 15 et 20 min 4: sensible < 15 min NR: non renseigné	0: gris 1: violet 2: rose clair 3: rose vif NR: non renseigné	0: mort in utéro 1: mort avant 15 min 2: mort entre 15 et 20 min 3: mort entre 20 et 25 min 4: mort après 25 min 5: vivant à 30 min	
1.1	F	HET	4	2	NR	3	5	1.412
1.2	M	WT	4	3	NR	3	5	1.381
1.3	M	HET	4	2	NR	3	5	1.315
1.4	M	HOM	4	2	NR	3	5	1.33
1.5	M	WT	4	2	NR	3	5	1.259
1.6	F	HOM	4	2	NR	3	5	1.15
2.1	F	HET	2	1	0	1	5	1.11
2.2	F	HET	1	1	0	1	3	1.143
2.3	M	WT	1	1	0	1	3	0.961
2.4	M	HET	4	2	NR	2	5	1.175
3.1	M	WT	1	1	0	0	2	1.038
3.2	F	HET	1	1	0	0	2	1.09
3.3	F	HOM	1	1	0	0	2	0.874
3.4	M	HET	3	2	4	2	5	1.055
3.5	M	HET	3	2	4	2	5	1.22
3.6	F	HET	3	2	4	2	5	1.139
3.7	M	HET	1	1	0	0	3	0.94
3.8	F	WT	3	3	4	3	5	0.947
5.1	F	HET	2	2	4	1	5	1.095
5.2	M	HET	4	3	4	3	5	1.306
5.3	M	WT	4	3	4	2	5	1.285
7.1	M	HOM	4	3	4	2	5	1.169
8.1	F	HET	4	3	4	2	5	1.43
10.1	F	HET	4	3	4	3	5	1.268
10.2	M	HET	0	0	0	0	0	0.536
10.3	M	HET	3	1	4	1	5	1.102
10.4	M	HOM	4	2	3	2	5	1.037
10.5	F	HOM	1	0	0	1	5	0.984
10.6	M	HET	4	2	2	2	5	1.2
10.7	F	WT	1	0	0	1	5	1.146
11.1	M	WT	3	1	2	2	5	1.068
11.2	F	WT	1	0	0	1	5	1.02
11.3	F	WT	4	2	2	2	5	1.032
11.4	M	WT	1	0	0	1	5	1.057
11.5	F	HET	4	1	4	1	5	1.007
11.6	M	HOM	1	0	0	1	3	0.839
11.7	F	HOM	1	0	0	1	2	0.725
11.8	F	HET	1	0	0	1	2	0.926
11.9	F	HOM	1	0	0	1	3	0.92
11.1	F	HOM	3	1	2	2	5	1.073
12.1	M	HOM	2	0	2	2	5	1.147
12.2	F	WT	4	3	3	3	5	1.129
12.3	M	HET	4	2	3	2	5	1.216
12.4	F	HOM	4	NR	3	2	5	1.18
12.5	M	WT	4	NR	3	2	5	1.154

12.6	F	HET	2	0	0	2	5	1.204
12.7	F	HET	4	NR	3	2	5	1.184
12.8	M	HOM	4	NR	3	2	5	1.207
14.1	F	HET	4	3	4	3	5	1.277
14.2	M	HET	4	1	1	2	5	1.255
15.1	F	WT	4	NR	1	3	5	1.109
15.2	F	WT	1	NR	0	1	5	1.094
15.3	F	WT	4	NR	0	2	5	1.107
15.4	M	HOM	2	NR	1	2	5	0.951
15.5	F	HOM	1	NR	1	1	5	0.944
15.6	M	HET	2	NR	1	2	5	1.14
16.1	M	HET	3	2	NR	2	5	1.414
16.2	F	HOM	1	0	0	1	3	1.185
16.3	F	HET	3	1	NR	2	5	1.405
16.4	F	HOM	4	1	4	3	5	1.127
16.5	M	HET	3	1	NR	2	5	1.399
16.6	F	HET	3	1	4	2	5	1.37
17.1	F	HET	4	2	3	3	5	1.164
17.2	F	WT	4	2	3	3	5	1.133
17.3	F	HET	4	1	0	1	5	1.114
17.4	M	HET	4	2	2	3	5	1.14
17.5	F	WT	1	0	0	1	4	1.11
17.6	M	HET	1	0	0	1	4	1.129
17.7	M	HET	1	0	0	1	4	1.177
17.8	F	HET	3	1	2	2	5	1.196

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des différentes observations faites sur les nouveaux nés pendant le test de viabilité

Les souris mutantes HOM qui ont survécu ont fait l'objet d'un suivi du poids du corps et du cerveau à plusieurs moments postnataux (naissance, P1, P2, P3, P7, P21, P63, P77 et P129), indépendamment chez les souris mâles et femelles. Les différences de poids corporel entre les HOM et les WT appariés se sont progressivement aggravées au cours de la première semaine de vie et ont atteint un maximum à P7 avec une réduction soudaine de 47 % ($P = 0,01$) chez les souris HOM mâles et de 40 % ($P = 0,00003$) chez les souris HOM femelles (**Figures 37A-B**). À partir de l'âge du sevrage, le poids corporel n'était pas aussi gravement diminué que pendant la période néonatale ; à titre d'exemple, à P129, les souris HOM mâles étaient plus petites de 27 % ($P < 10^{-4}$) et les souris HOM femelles de 13 % ($P < 10^{-4}$), ce qui suggère des mécanismes de récupération partielle au fil du temps, les souris femelles mutantes étant moins affectées. Les différences de taille étaient légères, les souris mutantes

mâles étant plus petites de 12 % ($P < 0,0001$) et les souris HOM mutantes femelles de 8 % ($P = 0,002$) (Figures 37C-D).

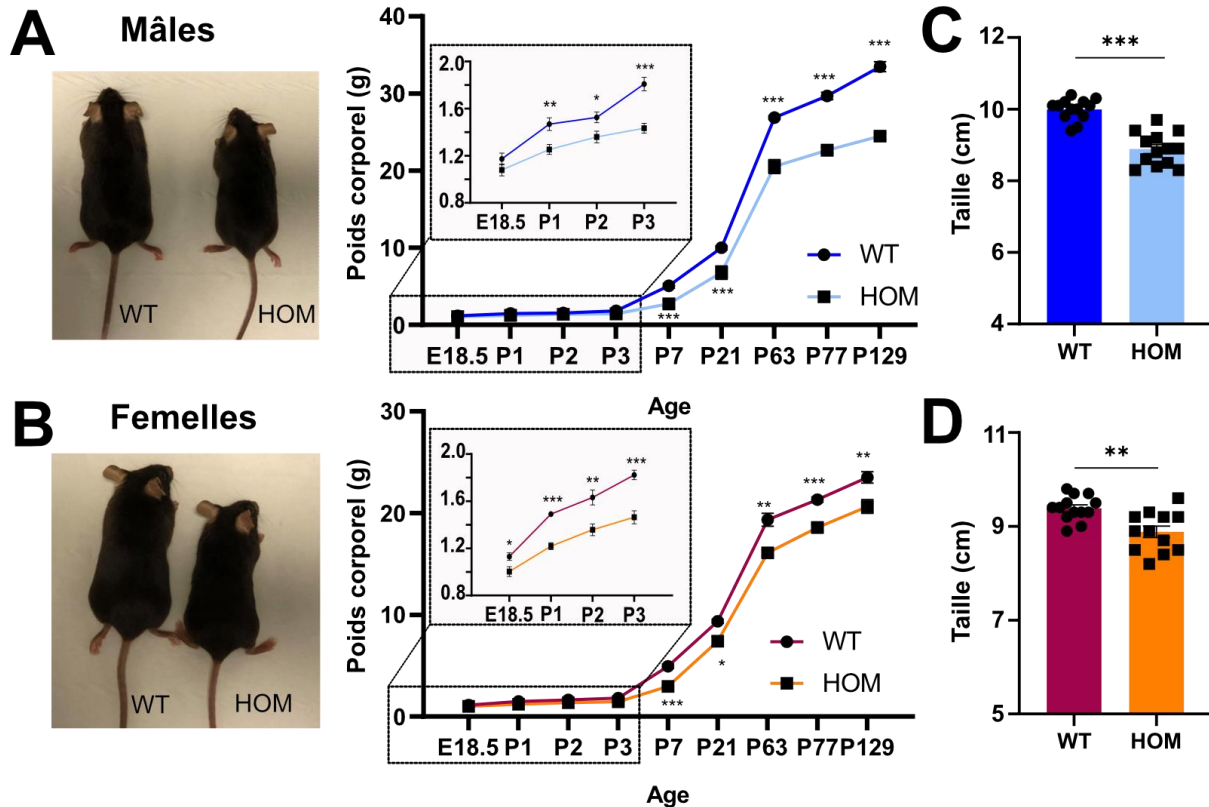


Figure 37 : Evolution de la croissance corporelle des souris mutantes mâles et femelles.

(A) Mâles. Gauche : Photographie comparative de deux souris mâles, WT et HOM, âgées 19 semaines. **Droite** : Graphique représentant l'évolution du poids corporel des souris mâles WT et HOM à 9 âges (E18.5 : $n = 9$ vs 9 ; P1 : $n = 6$ vs 10 ; P2 : $n = 11$ vs 6 ; P3 : $n = 7$ vs 7 ; P7 : $n = 5$ vs 2 ; P21 : $n = 19$ vs 5 ; P63 : $n = 5$ vs 4 ; P77 : $n = 15$ vs 12 et P129 : $n = 11$ vs 7). **(B) Femelles. Gauche** : Photographie comparative de deux souris femelles, WT et HOM, âgées de 19 semaines. **Droite** : Graphique représentant l'évolution du poids corporel des souris femelles WT et HOM à 9 âges (E18.5 : $n = 13$ vs 12 ; P1 : $n = 5$ vs 4 ; P2 : $n = 12$ vs 11 ; P3 : $n = 10$ vs 3 ; P7 : $n = 6$ vs 5 ; P21 : $n = 23$ vs 8 ; P63 : $n = 4$ vs 4 ; P77 : $n = 17$ vs 11 et P129 : $n = 10$ vs 10). **(C)** Histogramme de la taille des souris mâles WT et HOM à 19 semaines ($n = 13$ vs 13). **(D)** Histogramme de la taille des souris femelles WT et HOM à 19 semaines ($n = 13$ vs 12).

Chaque graphique représente la moyenne \pm SEM. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du test t de Student (two-tailed). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Les différences de poids du cerveau n'étaient pas apparentes à la naissance mais ont commencé à être visibles dès le premier jour postnatal, avec une réduction de 12% chez les souris HOM mâles et femelles par rapport aux souris WT appariées (**Figure 38**). Contrairement au poids corporel, la progression a été régulière de P1 à P7 (sans changement soudain à P7) et a été légèrement plus rapide chez les mâles mutants qui ont atteint une réduction de 23% du poids du cerveau à P7 ($P = 0,002$) contre 16% ($P = 0,0005$) chez les souris HOM femelles. A l'âge adulte, le poids du cerveau était globalement constant à P63 et P129 par rapport à P7 (**Figure 38**), suggérant que l'homéostasie cérébrale est principalement altérée au cours de la première semaine de vie chez les souris.

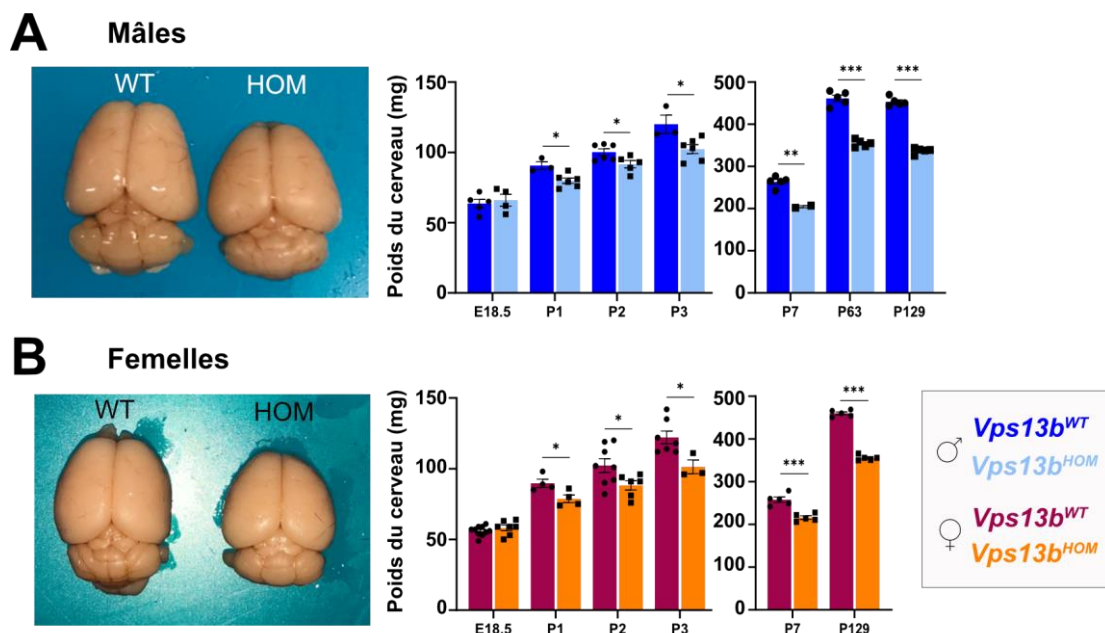


Figure 38 : Evolution de la croissance du cerveau des souris mutantes mâles et femelles.

(A) Mâles. Gauche : Photographie comparative du cerveau de deux souris mâles, WT et HOM, âgées de 19 semaines. **Droite :** Histogrammes représentant le poids du cerveau des souris mâles à 7 âges (WT vs HOM. E18.5 : $n = 5$ vs 4 ; P1 : $n = 3$ vs 6 ; P2 : $n = 6$ vs 5 ; P3 : $n = 3$ vs 6 ; P7 : $n = 5$ vs 2 ; P63 : $n = 5$ vs 5 et P129 : $n = 5$ vs 5).

(B) Femelles. Gauche : Photographie comparative du cerveau de deux souris femelles, WT et HOM, âgées de 19 semaines. **Droite :** Histogrammes représentant le poids du cerveau des souris femelles à 6 âges (WT vs HOM. E18.5 : $n = 10$ vs 7 ; P1 : $n = 4$ vs 4 ; P2 : $n = 8$ vs 6 ; P3 : $n = 7$ vs 3 ; P7 : $n = 5$ vs 2 et P129 : $n = 5$ vs 5).

Chaque graphique représente la moyenne \pm SEM. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du test t de Student (two-tailed). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

À titre de contrôle, le poids du corps et du cerveau a également été évalué chez les souris mutantes HET aux mêmes moments (naissance, P1, P2, P3, P7 et P21), indépendamment chez les souris mâles et femelles, et aucune différence n'a été observée (**Figure 39**).

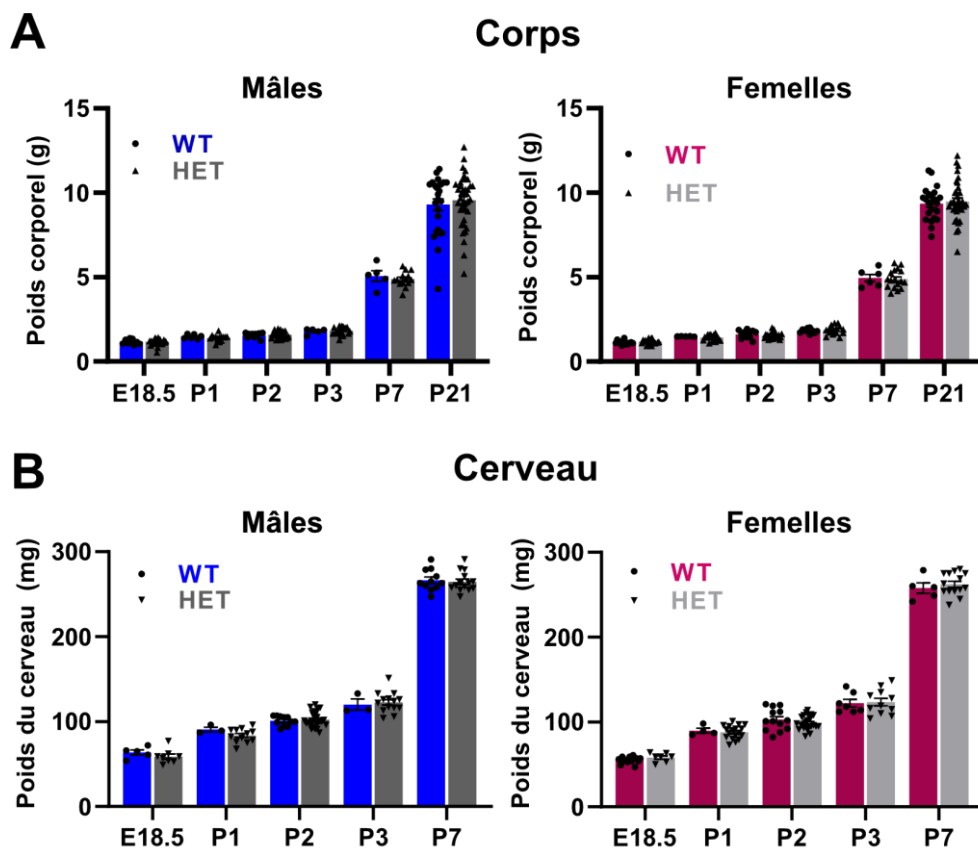


Figure 39 : Comparaison du poids corporel et du poids du cerveau des souris WT et HET mâles et femelles.

(A) Poids corporel des souris mâles WT et HET à 6 âges (E18.5 : $n = 9$ vs 28 ; P1 : $n = 6$ vs 15 ; P2 : $n = 11$ vs 25 ; P3 : $n = 5$ vs 22 ; P7 : $n = 5$ vs 4 et P21 : $n = 25$ vs 40) et des souris femelles WT et HET aux mêmes âges (E18.5 : $n = 13$ vs 19 ; P1 : $n = 5$ vs 20 ; P2 : $n = 13$ vs 24 ; P3 : $n = 10$ vs 15 ; P7 : $n = 6$ vs 17 et P21 : $n = 23$ vs 36).

(B) Poids cérébral des souris mâles WT et HET à 5 âges (E18.5 : $n = 5$ vs 8 ; P1 : $n = 3$ vs 12 ; P2 : $n = 11$ vs 27 ; P3 : $n = 3$ vs 14 et P7 : $n = 11$ vs 14) et des souris femelles WT et HET (E18.5 : $n = 13$ vs 7 ; P1 : $n = 4$ vs 18 ; P2 : $n = 13$ vs 23 ; P3 : $n = 7$ vs 11 ; P7 : $n = 5$ vs 14). Chaque graphique représente la moyenne \pm SEM. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du test t de Student (two-tailed).

Les souris HOM adultes qui ont survécu ont également été examinées pour leurs caractéristiques crâniofaciales. Cette étude a été réalisée en collaboration avec le Dr. Andres Ruiz-Linares et les analyses cranio-faciales ont été réalisées par l'équipe du Dr. Nicolas Navarro. Les données de morphologie faciale ont été publiées dans Bonfante et al. 2021 (article disponible en section « Publications annexes »). Je présente ici les analyses effectuées sur la morphologie du crâne des souris.

Les souris HOM ont été examinées pour la taille et la forme de leur crâne en utilisant 19 points de repère pour étudier le basicrâne (la base du crâne), le neurocrâne (la surface extérieure du crâne) et l'endocrâne (la surface intérieure du crâne). L'analyse géométrique par tomographie à densité microscopique (μ -CT), sans tenir compte de la taille généralement plus petite du crâne des souris mutante, a révélé une diminution de la taille du basicrâne (- 6%), cohérente avec la diminution de la taille du neurocrâne (- 7%). La taille du volume calculé de l'endocrâne était, quant à elle, réduite de 20,7% chez les souris HOM comparées aux souris WT. Ces défauts sont restés significatifs même après avoir pris en compte la taille généralement plus petite du crâne des souris mutantes (**Résultats annexes 1**). L'analyse procustéenne du crâne des souris a révélé un changement de forme de la voûte du crâne, qui subit un rétrécissement associé à une expansion concomitante des parties antérieure et postérieure du neurocrâne (**Figure 40**).

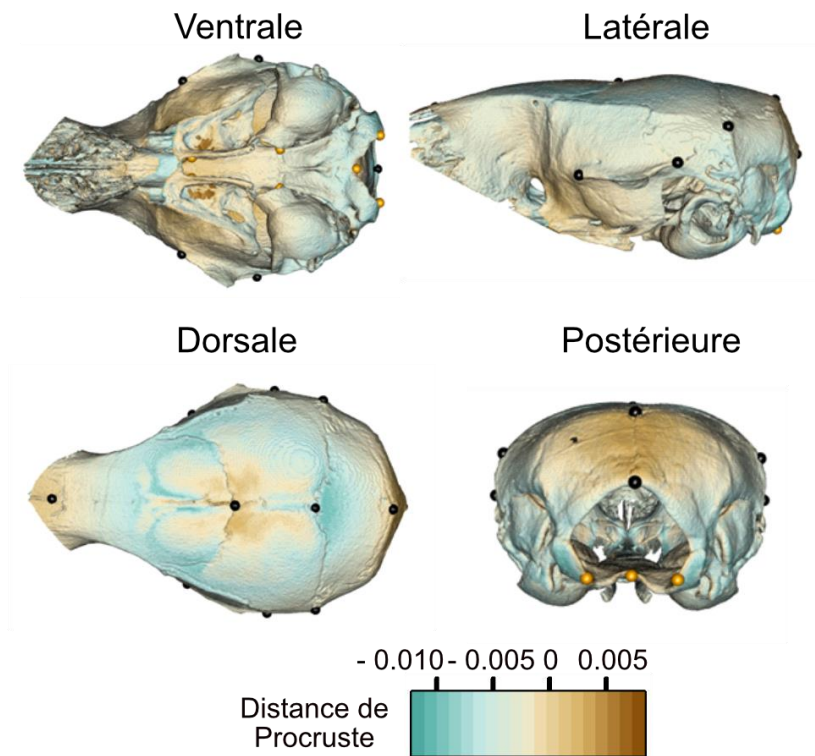


Figure 40 : Analyse de la morphologie du crâne des souris mutantes.

Analyse, par μ CT scanner, de la forme du crâne des souris HOM mâles et femelles ($n = 9$) comparée à celle des souris WT ($n = 9$). Sur la heat map, les couleurs sombres représentent une forte expansion (bleu) ou contraction (marron) de la structure par rapport aux souris WT. Les valeurs sont exprimées en distance de Procruste.

Pris ensemble, ces résultats impliquent *Vps13b* dans de multiples phénotypes qui apparaissent au cours de la première semaine de vie des souris. Ces phénotypes sont caractérisés par une progression distincte des tailles d'effet suggérant une pléiotropie de *Vps13b* dans divers contextes développementaux régulant la survie, la croissance, la taille du cerveau et du crâne de la souris, les femelles étant moins affectées que les souris mutantes *Vps13b* mâles.

5. *Vps13b* est impliqué dans la résilience à l'anxiété et à la dépression, l'exacerbation de la sociabilité, l'altération de la mémoire, l'hyperactivité et l'hypotonie.

Afin de compléter la première étude rapportant des déficits comportementaux chez des souris *Vps13b* mutantes (déficit de mémoire spatiale et latence de chute plus courte dans le test de mobilité « rotarod ») (Kim et al. 2019), j'ai entrepris d'évaluer d'autres fonctions cognitives de nos souris. Le déroulement des expériences et le principe de chaque paradigme est expliqué en section **Méthodes**. En bref, j'ai évalué les fonctions motrices et sensorielles (test d'agrippement, test de traction, plaque chauffante), l'apprentissage et la mémoire à court terme (labyrinthe en Y), la sociabilité et la reconnaissance sociale (paradigme des 3 chambres), l'anxiété et la dépression (labyrinthe surélevé, nage forcée, openfield) et la stéréotypie (test d'enfouissement de billes) de 62 souris, indépendamment chez des mâles ($n = 32$) et des femelles ($n = 30$). Ces tests ont été choisis en fonction des anomalies comportementales les plus fréquemment rapportées chez les patients : déficience intellectuelle, hypotonie et humeur joyeuse.

Les souris mâles mutantes HOM étaient moins anxieuses car elles passaient trois fois plus de temps ($P < 0,0001$) dans les bras ouverts du labyrinthe plus surélevé que les souris WT (**Figure 41A**). Elles présentaient également un comportement d'exploration plus marqué que les souris WT en passant plus de temps à plonger la tête dans le vide dans le labyrinthe surélevé ($P = 0,002$) (**Figure 41A**). Ceci a été confirmé par le test d'enfouissement des billes, qui a montré un nombre significativement réduit de billes enfouies ($P = 0,01$) par les mâles HOM, montrant leur résilience à l'anxiété et leur absence de comportements stéréotypés (**Figure 41B**). Dans le test de nage forcée, les souris mâles mutantes HOM ont montré une réduction significative de 8 % ($P =$

0,001) du temps d'immobilité par rapport aux souris WT (**Figure 41C**), ce qui indique également un certain degré de résilience aux comportements dépressifs.

Le paradigme de Crawley à trois chambres a révélé une motivation sociale accrue, les souris HOM mutantes passant 22% ($P = 0,015$) de temps en plus dans la chambre contenant la souris naïve (Inconnu 1) par rapport aux souris WT (**Figure 41D**), alors qu'elles n'avaient pas montré de préférence pour un côté ou l'autre pendant la phase d'habituation (**Résultats annexes 2A**). Étonnamment, dans la partie reconnaissance sociale du test, les souris mutantes HOM mâles n'ont pas passé plus de temps avec la souris nouvellement rencontrée (Inconnu 2) qu'avec la souris familière (Connu) (**Figure 41E**), ce qui suggère une altération de la mémoire de reconnaissance sociale. Dans le labyrinthe en Y, les souris mâles HOM mutantes ont également montré un déficit de la mémoire de travail. Le pourcentage d'alternance correcte était significativement plus faible chez les souris mâles HOM mutantes que chez les souris WT (55 % contre 63 %, $P = 0,049$) (**Figure 41F**). Il est intéressant de noter que les souris mâles HOM mutantes étaient 33 % ($P = 0,003$) plus actives que les souris WT dans le labyrinthe en Y (**Figure 41G + Résultats annexes 2B**). L'hyperactivité a également été observée dans le test du labyrinthe surélevé dans lequel les souris mâles mutantes ont couvert 19 % ($P = 0,009$) de distance en plus par rapport à la souris WT (**Figure 41H**). De façon étonnante, les souris mâles HOM mutantes ont montré une faiblesse musculaire (-14%, $P = 0,002$) lors du test de force de préhension des membres antérieurs et postérieurs (**Figure 41I**). Ceci a été confirmé par le test de traction, où la latence de chute était 2,5 fois plus faible ($P < 10^{-4}$) chez les souris mâles HOM que chez les souris WT (**Figure 41J**). Les souris mâles HOM mutantes n'ont pas montré de différence de résistance à la chaleur lors du test de la plaque chauffante (**Résultats annexes 2C**).

Les phénotypes comportementaux sont moins prononcés chez les souris femelles. Contrairement aux mâles, les souris femelles HOM mutantes n'ont pas montré de déficit de la mémoire de travail (**Figure 41F**) ni de résilience à l'anxiété (**Figure 41A**). Mais il est intéressant de noter qu'elles étaient toujours résistantes aux comportements dépressifs puisqu'elles ont montré une réduction significative de 16% ($P = 0,009$) du temps d'immobilité dans le test de nage forcée (**Figure 41C**) et de la latence à la première immobilisation par rapport aux souris WT (**Résultats annexes 2D**). L'hyperactivité n'a été observée que dans le labyrinthe surélevé où les souris femelles HOM mutantes ont parcouru 24 % de distance en plus ($P = 0,02$) que les souris WT (**Figure 41G**). Les souris femelles HOM mutantes étaient également hypotoniques. Elles ont montré une force de préhension inférieure à celle de la souris WT aussi bien pour les membres antérieurs (-20%, $P = 0,007$) que pour les membres antérieurs et postérieurs (-14%, $P = 0,006$) (**Figure 41I**). Ceci a été confirmé dans le test de traction, où la latence de chute était quatre fois plus faible ($P = 0,028$) chez les souris femelles HOM mutantes par rapport aux souris WT appariées (**Figure 41J**). Il est intéressant de noter que seules les souris femelles HOM ont montré une diminution ($P = 0,007$) du temps passé au centre de l'arène pendant le test de l'openfield (**Résultats annexes 2E**).

En résumé, les souris HOM mutantes mâles et femelles présentent une hyperactivité, une hypotonie et une résilience à la dépression, mais seules les souris HOM mutantes mâles présentent une altération significative de la mémoire, une sociabilité accrue et une résilience à l'anxiété.

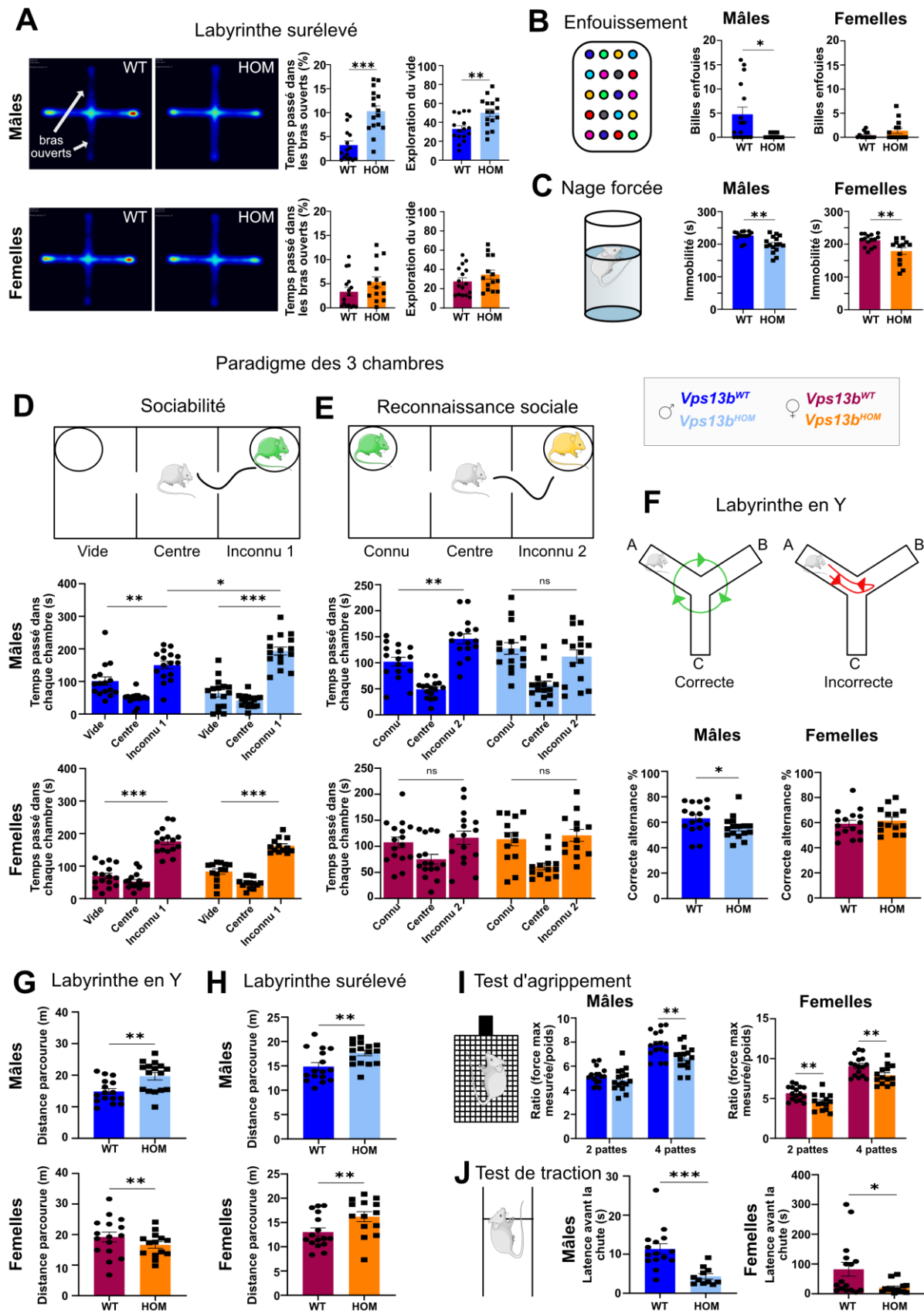


Figure 41 : L'évaluation du comportement des souris *Vps13b* mutantes HOM montre une hypotonie, une altération de la mémoire et une hausse de la sociabilité.

(A) Labyrinthe surélevé. **Gauche** : Heat map du temps passé dans chaque bras du labyrinthe. **Milieu** : Pourcentage du temps passé dans les bras ouverts. **Droite** : Nombre d'exploration du vide. Mâles WT (n = 16) vs mâles HOM (n = 16) ; Femelles WT (n = 16) vs femelles HOM (n = 14). **(B)** Test d'enfouissement des billes. Nombre de billes enfouies (/20) après 15 minutes. Mâles WT (n = 16) vs mâles HOM (n = 16) ; Femelles WT (n = 14 ; 2 souris retirées après observation de valeurs aberrantes) vs femelles HOM (n = 14). **(C)** Nage forcée. Temps d'immobilité durant les 4 dernières minutes du test de nage forcée. Mâles WT (n = 16) vs mâles HOM (n = 16) ; Femelles WT (n = 15) vs femelles HOM (n = 13). **(D-E)** Paradigme des 3 chambres de Crawley. **(D)** Temps passé dans chaque chambre (vide, centre ou chambre contenant l'inconnu 1) lors du test de sociabilité. Mâles WT (n = 16) vs mâles HOM (n = 16) ; Femelles WT (n = 16) vs femelles HOM (n = 13). **(E)** Temps passé dans chaque chambre (contenant la souris connue, centre ou contenant l'inconnu 2) lors du test de reconnaissance sociale. Mâles WT (n = 16) vs mâles HOM (n = 16) ; Femelles WT (n = 16) vs femelles HOM (n = 13). **(F)** Labyrinthe en Y. Pourcentage d'alternance correcte des trois couloirs du labyrinthe. Mâles WT (n = 16) vs mâles HOM (n = 16) ; Femelles WT (n = 16) vs femelles HOM (n = 14). **(G)** Distance (en m) parcourue dans le labyrinthe en Y. Mâles WT (n = 16) vs mâles HOM (n = 16) ; Femelles WT (n = 16) vs femelles HOM (n = 14). **(H)** Distance (en m) parcourue dans le labyrinthe surélevé. Mâles WT (n = 16) vs mâles HOM (n = 16) ; Femelles WT (n = 16) vs femelles HOM (n = 14). **(I)** Test d'agrippement. Ratio de la force maximale enregistrée par rapport au poids de l'animal. La mesure a été effectuée sur les membres antérieurs seuls puis sur les quatre membres ensemble. Mâles WT (n = 16) vs mâles HOM (n = 16) ; Femelles WT (n = 16) vs femelles HOM (n = 14). **(J)** Test de traction. Latence avec la chute dans le test de suspension par traction. Mâles WT (n = 15) vs mâles HOM (n = 12) ; Femelles WT (n = 16) vs femelles HOM (n = 13). Tous les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Le test t de Student pour données non appariées a été le principal test statistique utilisé pour détecter les différences entre les groupes de souris, sauf pour les panels B-C et J, pour lesquels le test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé à la place.

6. Les souris *Vps13b* mutantes présentent une mosaïque de défauts neuromorphologiques

Afin de corrélérer les anomalies de comportement observées avec la diminution du poids du cerveau précédemment mise en évidence, j'ai réalisé une analyse morphologique du cerveau des souris mutantes *Vps13b*.

Dans cette étude, mon équipe a développé un nouveau pipeline basé sur le HREM (High-Resolution Episcopic Microscopy) (**Figure 42A** et **Méthodes**), une technique

d'histologie en 3D (trois dimensions) produisant une superposition complète de milliers d'images du cerveau, afin de corréler l'anatomie du cerveau à la cognition et au comportement. Vingt-quatre segments uniques, couvrant l'ensemble du cerveau, ont été analysés chez des souris mâles âgées de 18 semaines (WT n = 5 vs HOM n = 5). Les résultats sont présentés en **Figure 42** et les données brutes sont disponibles dans le **Tableau 8**.

L'analyse a mis en évidence une diminution du volume pour la majorité des segments (21/24), y compris le volume total du cerveau (-28%, $P = 2,9 \times 10^{-5}$), le volume cortical total (-28%, $P = 0,00023$), le volume total de la couche arbor vitae du cervelet (-30%, $P = 8,4 \times 10^{-4}$), le volume total du bulbe rachidien (-31%, $P = 0,0068$), le volume total de l'amygdale (-32%, $P = 0,0005$) et le volume total du mésencéphale (-32%, $P = 4,0 \times 10^{-4}$) (**Figure 42B**). Il est intéressant de noter que tous les segments couvrant les faisceaux de substance blanche n'étaient pas plus petits. Alors que le volume total du corps calleux était plus petit de 31 % ($P = 1,8 \times 10^{-5}$) et le volume total de la commissure antérieure de 38 % ($P = 4,53 \times 10^{-5}$), le fornix et le fasciculus rétroflexus n'étaient pas altérés (**Figure 42B**). Le volume des ventricules n'a pas non plus été modifié. Le volume total de l'hippocampe était le segment le plus sévèrement réduit en taille de 39% ($P = 8 \times 10^{-5}$). Après avoir pris en compte le faible volume total du cerveau des souris mâles mutantes HOM, l'analyse de la forme de Procrustes, réalisée une nouvelle fois par l'équipe du Dr. Nicolas Navarro, a montré un basculement des régions postérieures, comme le cervelet glissant vers le bas sous le cerveau tandis que la base postérieure du cerveau subissait une expansion ventrale (**Figure 42C**).

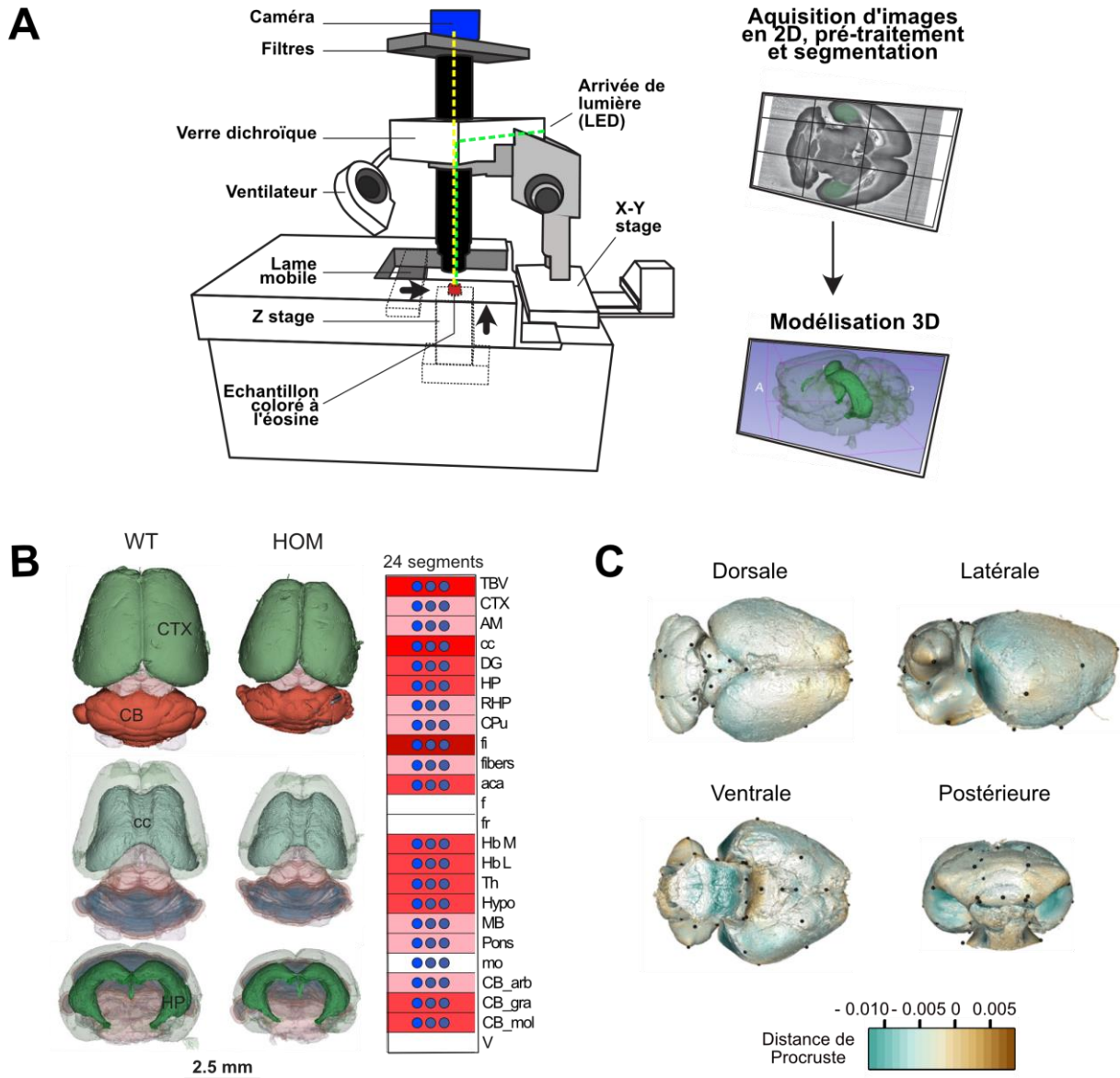


Figure 42 : Caractérisation morphologique, en 3 dimensions, du cerveau des souris *Vps13b* mutantes.

(A) L'instrument HREM se compose d'un microscope Leica fluorescent (Z16APO), d'une caméra microscopique 20 MPix et d'une platine de montage X-Y (Indigo Scientific UK). L'échantillon de cerveau (représenté en rouge) enrobé dans une résine dure est maintenu dans un porte-échantillon sous l'objectif, ce qui permet de couper automatiquement les sections à l'aide d'une lame mobile. L'échantillon de cerveau est éclairé par une lampe dotée de filtres d'excitation et d'émission séparés pour l'imagerie à double longueur d'onde. L'imagerie séquentielle de l'échantillon de cerveau pendant la coupe permet d'acquérir une pile de milliers d'images 2D, de les prétraiter et de les segmenter dans le modèle 3D de l'échantillon. (B) Post-traitement HREM : l'équipe a développé une procédure opérationnelle standardisée pour la segmentation de 24 régions cérébrales dans 10 échantillons de cerveau (5 WT vs 5 HOM) provenant de souris mâles âgées de 19 semaines. À gauche : image d'un rendu 3D représentatif d'un cerveau WT et d'un cerveau HOM. L'échelle est de 2,5 mm. À droite : Les cercles bleus indiquent $P < 0,001$ à l'aide du test t de Student (bilatéral). Les rectangles roses

indiquent des z-scores de 4-6, et les rectangles rouges de 6-11. Abréviations : TBV = Volume total du cerveau ; CTX = Cortex ; AM = Amygdale ; cc = Corps calleux ; DG = Gyrus denté ; HP = Hippocampe (sans le gyrus denté) ; RHP = Région rétro-hippocampale ; Cpu = Striatum ; fi = Fimbria de l'hippocampe ; fibers = fibres de matière blanche ; aca = Commissure antérieure ; f = Fornix ; fr = Fasciculus retroflexus ; Hb M = Habénula médiale ; Hb L = Habénula latérale ; Th = Thalamus ; Hypo = Hypothalamus ; MB = Mésencéphale ; Pons = Pont de Varole ; mo = Bulbe rachidien ; CB_arb = Couche arbor vitae du cervelet ; CB_gra = Couche granulaire du cervelet ; CB_mol = Couche moléculaire du cervelet et V = Ventricules. **(C)** Analyse de la forme du cerveau à l'aide des segmentations HREM du panel B. Les couleurs bleues représentent les déviations positives (expansion) et les couleurs brunes les déviations négatives (rétrécissement) par rapport aux souris WT, données en distance de Procrustes.

Structure cérébrale	9402	9401	9395	9082	8955	9405	9404	9403	9081	8941	Taille de l'effet (% WT)	p-value
	WT	WT	WT	WT	WT	KO	KO	KO	KO	KO		
TBV	303.5	299.4	324.2	333.5	328.9	203.7	231.6	220.2	254.1	226.9	-28.493	2.93E-05
CTX	93.85	92.79	86.17	99.56	99.64	56.50	69.26	70.35	76.91	68.60	-27.623	2.34E-04
AM	1.561	1.642	1.899	1.917	2.066	1.129	1.352	1.237	1.164	1.316	-31.779	5.01E-04
cc	9.39	9.63	10.08	10.64	10.66	7.31	7.35	6.21	7.23	6.49	-31.358	1.81E-05
DG	34.35	33.16	40.34	39.47	36.96	23.71	26.40	25.89	28.85	25.50	-29.269	1.61E-04
HP	3.283	3.151	4.067	3.794	3.733	1.983	2.096	2.105	2.492	2.298	-39.129	8.01E-05
RHP	11.09	9.95	12.75	12.49	12.29	7.18	8.15	8.25	9.45	8.40	-29.263	6.65E-04
Cpu	12.44	12.88	14.65	15.38	15.43	8.88	9.88	10.15	11.66	9.69	-28.987	7.49E-04
fi	2.120	2.018	2.216	2.311	2.293	1.478	1.463	1.400	1.642	1.505	-31.668	7.27E-06
fibers	4.122	3.621	4.226	4.368	4.086	2.637	3.131	3.656	2.375	2.396	-30.488	1.96E-03
aca	0.518	0.484	0.446	0.453	0.438	0.236	0.292	0.337	0.306	0.267	-38.471	4.53E-05
f	0.171	0.156	0.194	0.281	0.230	0.136	0.154	0.169	0.150	0.168	-24.793	0.058336
fr	0.073	0.057	0.076	0.073	0.104	0.086	0.053	0.051	0.049	0.058	-22.520	0.128405
Hb M	0.294	0.254	0.270	0.252	0.271	0.182	0.167	0.188	0.199	0.203	-29.835	4.25E-05
Hb L	0.228	0.254	0.242	0.293	0.267	0.170	0.156	0.176	0.188	0.175	-32.622	1.37E-04
Th	11.69	11.67	14.51	14.03	14.14	7.50	8.47	8.22	9.76	8.88	-35.148	2.20E-04
Hypo	10.93	11.60	13.42	13.17	13.06	7.39	8.39	8.22	9.32	8.65	-32.505	1.22E-04
MB	23.77	22.47	27.36	28.62	27.38	15.72	17.23	16.85	20.45	17.99	-31.918	4.00E-04
Pons	16.38	16.31	20.31	16.99	16.45	12.10	12.55	12.11	13.94	12.46	-26.926	5.34E-04
mo	23.09	22.17	24.44	22.90	22.53	16.62	18.88	11.03	21.10	12.35	-30.532	6.86E-03
CB_arb	7.562	7.285	8.381	8.259	7.714	4.746	5.134	4.783	6.640	6.294	-29.602	8.44E-04
CB_gra	10.72	11.04	11.14	11.52	11.33	8.16	8.81	8.54	9.65	9.36	-20.135	7.35E-05
CB_mol	21.10	21.02	21.63	21.69	20.46	17.03	17.69	17.34	19.32	17.56	-16.020	7.59E-05
V	0.485	0.525	0.627	0.813	0.837	0.727	0.449	0.503	0.960	0.780	4.028	0.828343

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des différentes mesures prises dans l'étude de la neuroanatomie des souris en 3 dimensions.

Les abréviations sont les mêmes que celles utilisées et décrites en **Figure 42**.

Afin d'examiner les caractéristiques neuro-morphologiques à une résolution à l'échelle cellulaire, j'ai analysé le cerveau des souris mutantes en utilisant une approche d'histologie de précision en deux dimensions (2D) développée pour l'évaluation de 40 paramètres cérébraux morphologiques dans 22 régions différentes (Collins et al. 2018). Cela a consisté en une quantification systématique de la même section cérébrale sagittale au repère latéral +0.60mm chez l'adulte (**Figure 43A**) et à son équivalent chez l'embryon au stade E18.5 (**Figure 43B**).

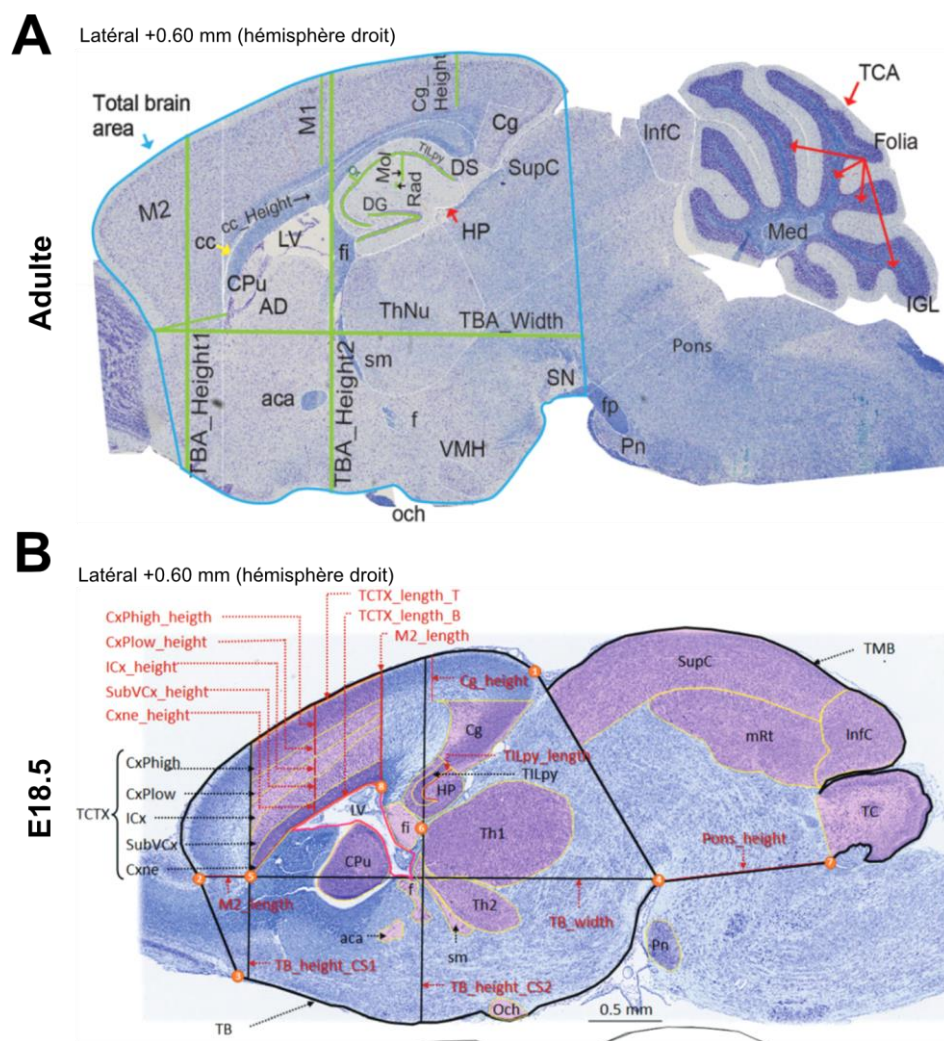


Figure 43 : Quantification des caractéristiques neuroanatomiques des souris adultes et nouveau-nés.

(A) Illustration des régions cérébrales quantifiées sur une coupe sagittale à la section critique (Latérale +0.60 mm) chez la souris adulte en utilisant le logiciel ImageJ. (B) Illustration des régions cérébrales quantifiées selon la même méthode, chez l'embryon au stade E18.5 et chez le nouveau-né.

Un total de 82 souris a été analysé à cinq stades, de la naissance à 5, 7, 18 et 33 semaines d'âge, indépendamment chez 38 souris mâles et 44 souris femelles. Chaque coupe histologie a subi un contrôle qualité afin de vérifier si elle était bien située à la section critique et si la coloration était de bonne qualité.

La surface totale du cerveau (TBA) indique une taille normale du cerveau à la naissance chez les souris HOM mâles et femelles (**Figure 44**). De même, aucun autre phénotype neuroanatomique n'a été détecté à la naissance (**données non présentées**). À l'âge de 5 semaines, l'aire cérébrale totale au niveau latéral +0,60 mm était diminuée de 22 % chez les mâles ($P = 0,01$) et de 17 % chez les femelles ($P = 0,01$), sans aggravation jusqu'à l'âge de 33 semaines.

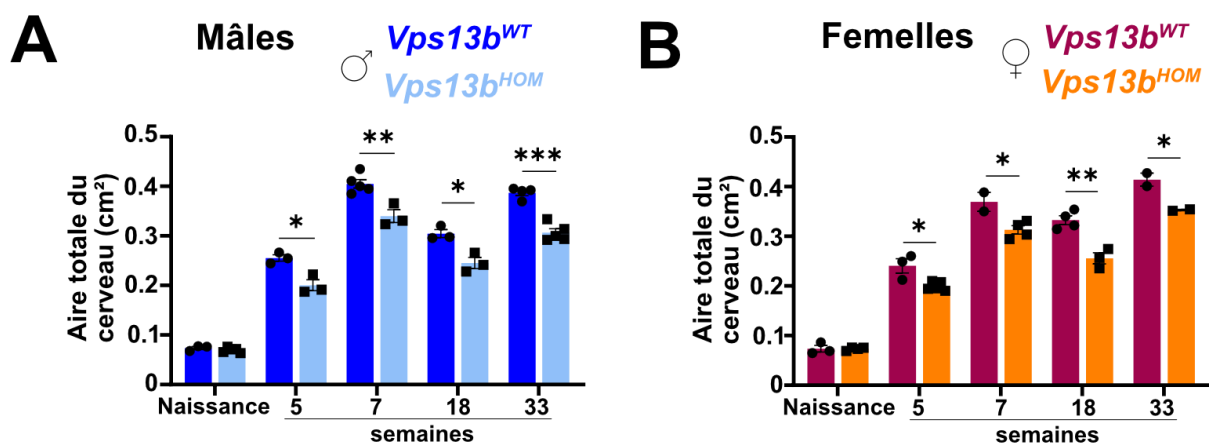


Figure 44 : Evolution de l'aire totale du cerveau des souris mutantes mâles et femelles.

Les études neuroanatomiques ont été réalisées à la naissance ainsi qu'à l'âge de 5, 7, 18 et 33 semaines chez 38 souris mâles et 44 souris femelles, 40 paramètres ont été mesurés à chaque âge. Je montre ici l'évolution d'un des 40 paramètres, l'aire totale du cerveau (TBA). **(A)** Mâles WT vs HOM (naissance : $n = 3$ vs 4 ; 5 semaines : $n = 3$ vs 3 ; 7 semaines : $n = 3$ vs 2 ; 18 semaines : $n = 3$ vs 3 et 33 semaines ($n = 4$ vs 5)). **(B)** Femelles WT vs HOM (naissance : $n = 3$ vs 4 ; 5 semaines : $n = 3$ vs 5 ; 7 semaines : $n = 2$ vs 4 ; 18 semaines : $n = 4$ vs 3 et 33 semaines : $n = 2$ vs 2). Chaque graphique représente la moyenne \pm SEM. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du test t de Student (two-tailed). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

La plupart des autres paramètres quantifiés dans cette étude étaient également significativement plus petits chez les souris HOM mutantes par rapport aux souris WT appariées, sans progression apparente entre 5 et 33 semaines d'âge (**Figure 45**).

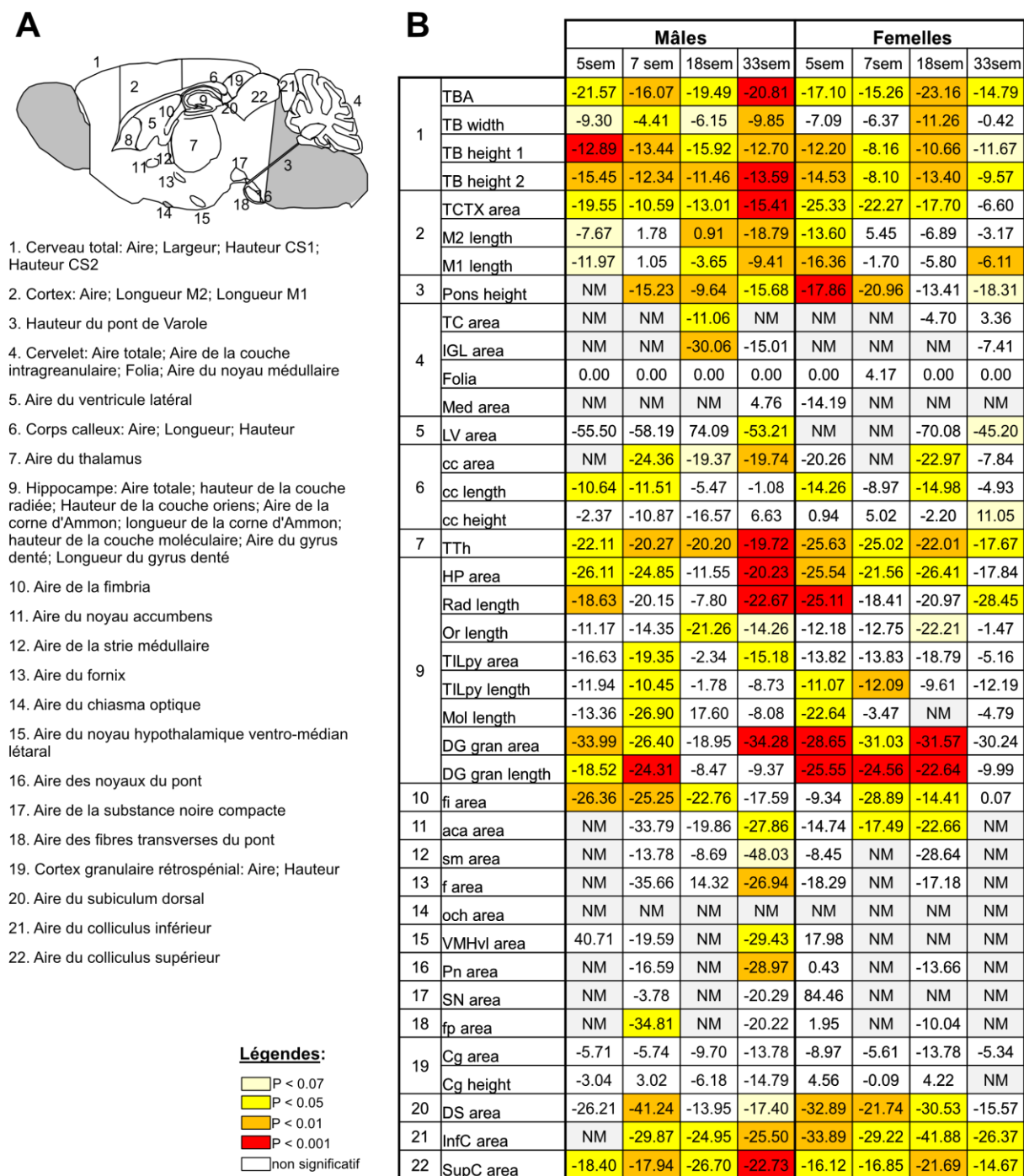


Figure 45 : Tableau récapitulatif des tailles d'effet (en % par rapport aux souris WT) enregistrés dans l'étude neuroanatomique 2D des souris mutantes.

(A) Schéma représentatif du cerveau de souris adulte avec le contour des différentes régions mesurées. La correspondance de la numérotation avec les différentes régions

cérébrales est indiquée. **(B)** Tableau récapitulatif des tailles d'effet (en % par rapports aux souris WT) des analyses morphologiques des souris mâles et femelles à 5, 7, 18 et 33 semaines. Chaque couleur représente la significativité des analyses statistiques réalisées en utilisant le test t de Student non appariées. NM signifie que le paramètre n'était pas mesurable.

A titre d'exemple, à l'âge de 7 semaines, la surface du thalamus était réduite de 20 % ($P = 0,002$) chez le mâle et de 25 % ($P = 0,003$) chez la femelle, la surface du colliculus inférieur était réduite de 30 % chez les mâles ($P = 0,03$) et de 30 % ($P = 0,005$) chez les femelles, et la surface du colliculus supérieur était réduite de 18 % chez les mâles ($P = 0,005$) et de 17 % ($P = 0,02$) chez les femelles HOM mutantes (**Figures 46A-B**). Conformément à ce qui avait été observé en histologie 3D, le paramètre le plus gravement affecté concernait la formation hippocampique, la taille du subiculum dorsal ayant diminué de 41 % ($P = 0,005$) chez les mâles et de 29 % ($P = 0,0005$) chez les souris HOM mutantes femelles (**Figures 46A-B**). La surface du corps calleux a diminué de 24 % ($P = 0,02$) chez les souris HOM mutantes mâles, mais pas chez les souris HOM mutantes femelles (**Figures 46A-B**). Le cortex cingulaire n'a pas été modifié chez les deux sexes.

Profitant de la résolution au niveau cellulaire de cette approche histologique 2D, j'ai compté manuellement les cellules colorées au Nissl dans les quatre stades adultes, ce qui a révélé une diminution du nombre de cellules dans la plupart des régions affectées (**Figures 46C-D-E**). Cependant, à la naissance, les souris HOM ne présentaient aucune différence dans le nombre de cellules dans les régions analysées (la couche inférieure de la plaque corticale, le noyau thalamique 1, le noyau thalamique 2 et le colliculus inférieur) (**Figure 46F**), ce qui suggère que les défauts neuro-morphologiques proviennent de la perte de cellules après la naissance. De manière cohérente, la quantification du marqueur de prolifération Ph3S10 dans l'hippocampe

et dans le cortex n'a montré aucun changement entre les souris WT et HOM (**Figures 46G-H**) (données issues de la collaboration avec l'équipe du Dr. Shilpi Minocha).

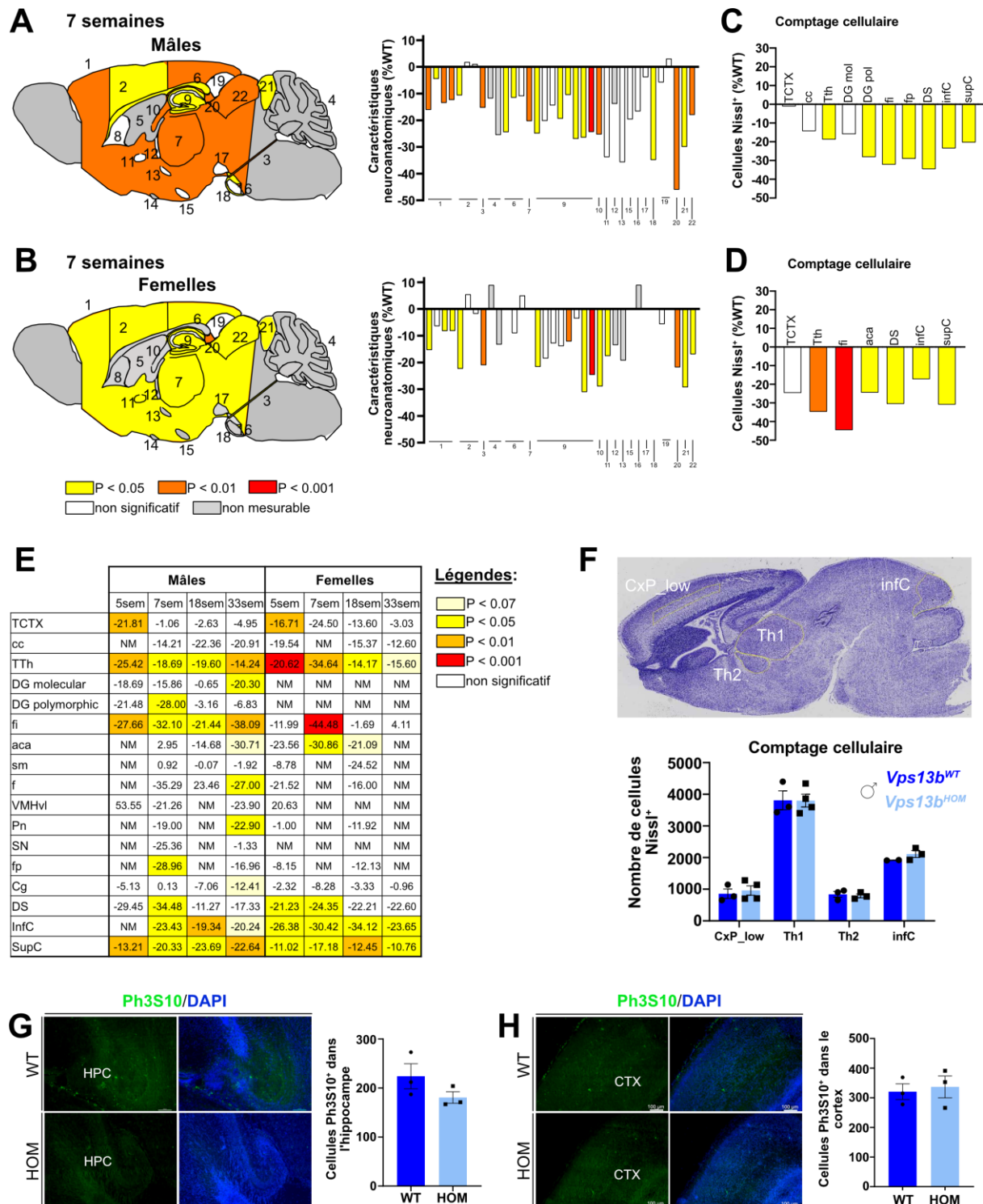


Figure 46 : Caractérisation morphologique, en 2 dimensions, du cerveau des souris *Vps13b* mutantes.

(A) Mâles. Gauche : Heat map représentant les 22 régions cérébrales quantifiées à la section critique (Latérale +0.60 mm) chez les souris mâles à l'âge de 7 semaines. **Droite** : Histogramme des caractéristiques neuroanatomiques des souris mâles HOM exprimées en % par rapport aux souris WT. **(B) Femelles. Gauche** : Heat map représentant les 22 régions cérébrales quantifiées à la section critique (Latérale +0.60 mm) chez les souris femelles à l'âge de 7 semaines. **Droite** : Histogramme des caractéristiques neuroanatomiques des souris femelles HOM exprimées en % par rapport aux souris WT. **(A-B)** La correspondance de la numérotation avec les différentes régions cérébrales est disponible en **Figure 45**. **(C) Mâles**. Histogramme représentant la différence du nombre de cellules colorées au Nissl dans le cerveau des souris mâles HOM de 7 semaines exprimé en pourcentage par rapport aux souris WT. **(D) Femelles**. Histogramme représentant la différence du nombre de cellules colorées au Nissl dans le cerveau des souris femelles HOM de 7 semaines exprimé en pourcentage par rapport aux souris WT. **(E)** Tableau récapitulatif des tailles d'effet (en % par rapports aux souris WT) du comptage cellulaire réalisé dans le cerveau des souris mâles et femelles à 5, 7, 18 et 33 semaines. Chaque couleur représente la significativité des analyses statistiques réalisées en utilisant le test t de Student non appariées. NM signifie que le paramètre n'était pas mesurable. **(F) Haut** : Coupe histologique d'un cerveau de souris nouveau-né coloré au Luxol-Nissl. Les régions cérébrales dans lesquelles le comptage cellulaire a été effectué sont entouré en jaune. **Bas** : Histogramme présentant le nombre de cellules colorées au Nissl dans la couche basse de la plaque corticale (CxP_low), les deux noyaux thalamiques (Th1 et Th2) et dans le colliculus inférieur des souris mâles WT et HOM à la naissance. **(G-H) Gauche** : Immunomarquage de l'hippocampe (HPC) **(G)** et du cortex (CTX) **(H)** à l'aide du marqueur de prolifération Ph3S10 sur des coupes de cerveau, inclus en paraffine, de souris à la naissance. **Droite** : Quantification du signal Ph3S10 par comptage manuel des cellules dans l'hippocampe **(G)** et le cortex **(H)**. Mâles à la naissance n = 3 vs 3. **(A-D)** La significativité des différences mesurées est représentée par le code couleur suivant : Jaune $P < 0,05$; Orange : $P < 0,01$; Rouge : $P < 0,001$; Blanc : non significatif ; Gris : non mesurable. **(F-G-H)** Tous les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Le test t de Student pour données non appariées a été le principal test statistique utilisé pour détecter les différences entre les groupes de souris.

Abréviations utilisées : TCTX = cortex moteur secondaire ; cc = corps calleux ; TTh = thalamus ; DG molecular = couche moléculaire du gyrus denté ; DG polymorphic = couche polymorphique du gyrus denté ; fi = fimbria ; aca = commissure antérieure ; sm = strie médullaire ; f = fornix ; VMHvl = noyau ventro-médian de l'hypothalamus ventro-latéral ; Pn = noyau du pont ; SN = substance noire compacte ; fp = fibres du pont de varole ; Cg = gyrus cingulaire ; DS = subiculum dorsal ; infC = colliculus inférieur et supC = colliculus supérieur

Aucune différence n'a été observée entre les cerveaux des souris WT et des souris HET mutantes *Vps13b* de 27 jours, ce qui confirme le caractère récessif des troubles **(Tableau 9)**.

	% WT	p value
TB area	-4.512	0.1661
TB width	-2.137	0.0867
TB height_CS1	-4.186	0.1261
TB height_CS2	-3.705	0.1437
TCTX area	-6.751	0.2180
M2 length	-6.563	0.4627
M1 length	-7.658	0.2036
Pons height	-26.366	0.2163
TC area	-1.681	0.4752
IGL area	-21.124	0.3959
TTh area	-7.268	0.4501
HP area	7.418	0.6146
Rad length	6.708	0.6468
Or length	16.785	0.3526
TILpy area	18.011	0.2489
TILpy length	18.931	0.0778
Mol length	15.723	0.5173
DG area	-1.015	0.9206
DG length	-6.841	0.6815
fi area	15.273	0.3540
aca area	11.431	0.5013
sm area	-27.756	0.2927
f area	-1.906	0.9288
Cg area	-3.490	0.7404
Cg height	-5.981	0.6032
DS area	15.251	0.4294
InfC area	6.889	0.4839
SupC area	3.055	0.6529

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des tailles d'effet (en % par rapport aux souris WT) enregistrés dans l'étude neuroanatomique des souris HET.

Les analyses ont été réalisées chez des souris mâles de 27 jours (WT n = 4 vs HET n = 3).

Ensemble, ces résultats histologiques 2D et 3D indiquent que *Vps13b* est un régulateur important du maintien de l'homéostasie cérébrale après la naissance, montrant une mosaïque d'implications neuro-morphologiques. La formation hippocampique est l'une des régions cérébrales les plus touchées, tandis que quelques régions, dont le fornix, le fascicule rétrofle et le cortex cingulaire, ne sont pas affectées et pourraient expliquer la dichotomie entre les dispositions positives et négatives observées dans les manifestations comportementales.

7. *Vps13b* favorise la survie des neurones après la naissance

La formation hippocampique étant l'une des principales régions cérébrales affectées par la mutation de *Vps13b*, j'ai décidé de caractériser davantage les phénotypes neuroanatomiques sous-jacents et ai développé un nouveau protocole à échelle plus fine pour l'analyse des différentes couches de la formation hippocampique aux quatre stades déjà utilisés pour l'analyse générique (5, 7, 18 et 33 semaines d'âge) chez les souris mâles (**Méthodes annexes** et **Figure 47A**). Alors que les couches pyramidales CA2/CA3 de l'hippocampe ne sont pas altérées, la plupart des défauts hippocampiques proviennent du gyrus denté, l'effet le plus radical étant observé dans la couche granulaire (délimitée en rouge dans la **Figure 47C**). En effet, le bras inférieur du gyrus denté semble plus affecté avec une réduction de 44 % de sa taille ($P = 0,001$) à l'âge de 33 semaines par rapport au bras supérieur plus petit, lui, de 25 % ($P = 0,003$) au même âge (**Figure 47C**). La couche moléculaire du gyrus denté était plus petite de 31 % ($P = 3,10 \times 10^{-5}$) et la surface de la couche polymorphe avait diminué de 17 % ($P = 0,03$) à l'âge de 33 semaines. Ces phénotypes neuroanatomiques à plus petite échelle ne se sont pas aggravés entre 5 et 33 semaines, conformément aux observations neuro-morphologiques précédentes (**Figure 47B**). En me concentrant sur le gyrus denté, j'ai quantifié les cellules NeuN⁺ et GFAP⁺, ce qui a révélé une diminution spécifique du nombre de neurones (**Figure 47D**) mais pas des astrocytes (**Figure 47E**). Des résultats similaires ont été observés dans le thalamus (résultats non présentés). Je me suis ensuite concentrée sur la voie perforante qui relie le cortex entorhinal à toutes les zones de la formation hippocampique, y compris les cellules granuleuses du gyrus denté où l'impact est le plus fort, et j'ai analysé la morphologie neuronale et plus particulièrement la densité des épines dendritiques. Les analyses ont montré une réduction de la densité des épines chez les souris HOM mutantes

mâles de 15 % ($P = 0,0002$) par rapport aux souris WT appariées (**Figure 47F**), ce qui indique un problème potentiel de connectivité du réseau cortico-hippocampique.

Étant donné l'absence de phénotypes neuroanatomiques chez les embryons, j'ai ensuite émis l'hypothèse que les changements structurels de l'hippocampe étaient dus à de la mort cellulaire après la naissance. Pour vérifier cette hypothèse, j'ai utilisé des tests TUNEL à la naissance, au troisième jour postnatal et à l'âge de 25 semaines, et ai montré que l'apoptose était limitée aux premiers jours de vie dans l'hippocampe (+41% de cellules positives TUNEL à la naissance, $P = 0,005$; +47% au troisième jour postnatal, $P = 0,002$) (**Figures 47G-H**), sans indication apoptotique claire à l'âge adulte (**Figure 47I**). C'est donc une mort neuronale post-natale qui est à l'origine des défauts neuroanatomiques observés à l'âge adulte. Afin d'identifier les voies moléculaires potentielles sous-jacentes à la pathologie, nous avons collaboré avec l'équipe du Dr. Muhammad Ansar (Lausanne) pour effectuer un séquençage de l'ARN dans l'hippocampe de souris mâles âgées de 13 semaines. L'analyse des données a révélé qu'aucun gène n'était exprimé différemment entre les HOM mutants et les souris de type sauvage appariées, ce qui suggère que *Vps13b* n'a pas d'impact majeur sur la régulation transcriptionnelle qui pourrait expliquer les phénotypes.

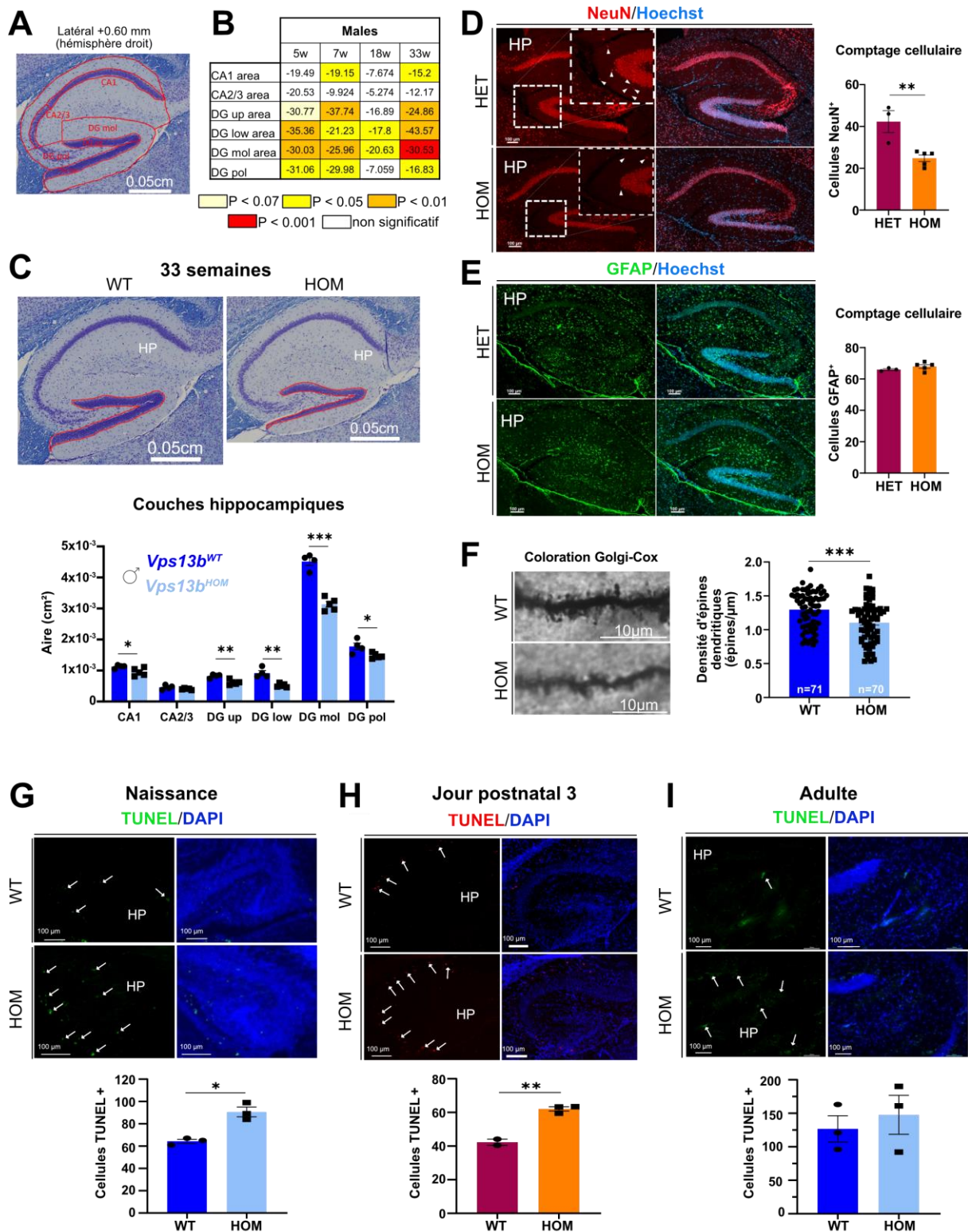


Figure 47 : Analyse approfondie des caractéristiques morphologiques de la formation hippocampique des souris *Vps13b*.

(A) Délimitation des différentes couches hippocampiques quantifiées à l'aide du logiciel ImageJ à la position stéréotaxique latérale +0,60mm. (B) Tableau récapitulatif des tailles d'effets chez les souris mâles à 5 semaines (n = 3 vs 3), 7 semaines (n = 3 vs 2), 18 semaines (n = 3 vs 3) et 33 semaines (n = 4 vs 5). Chaque couleur représente

la significativité de la différence contrôle vs HOM en utilisant le test t de Student non apparié. **(C) Haut** : Image d'une coupe sagittale à la position latérale +0.06mm doublement colorée au Nissl-Luxol montrant la couche granulaire du gyrus denté entourée en rouge. **Bas** : Histogramme de l'aire des différentes couches hippocampiques (n = 3 souris WT vs n = 5 souris HOM mâles âgées de 33 semaines). Abréviations : CA1 = couche 1 de la corne d'Ammon; CA2/3 = couches 2 et 3 de la corne d'Ammon; DG up = bras supérieur de la couche granulaire du gyrus denté ; DG low = bras inférieur de la couche granulaire du gyrus denté ; DG mol = couche moléculaire du gyrus denté ; DG pol = couche polymorphique du gyrus denté. La délimitation de chaque zone est présentée en (A). **(C) Gauche** : Immunomarquage de l'hippocampe à l'aide du marqueur neuronal NeuN sur coupe de cerveau de souris femelles de 5 semaines inclus en paraffine (HET n = 3 vs HOM n = 5). Le nombre de cellules positives a été compté dans la couche moléculaire du gyrus denté à l'aide du logiciel ImageJ. **Droite** : Histogramme montrant le nombre de cellules NeuN⁺ dans la couche moléculaire du gyrus denté (HET vs HOM). Les souris HET sont utilisées comme contrôles. La barre d'échelle indique 100µm. **(E) Gauche** : Immunomarquage de l'hippocampe à l'aide du marqueur d'astrocytes GFAP sur coupe de cerveau de souris femelles de 5 semaines inclus en paraffine (HET n = 3 vs HOM n = 5). Le nombre de cellules positives a été compté dans la couche moléculaire du gyrus denté à l'aide du logiciel ImageJ. **Droite** : Histogramme montrant le nombre de cellules GFAP⁺ dans la couche moléculaire du gyrus denté (HET vs HOM). Les souris HET sont utilisées comme contrôles. La barre d'échelle indique 100µm. **(F) Gauche** : Coloration de Golgi-Cox (WT n = 4 vs HOM n = 4 souris mâles de 13 semaines). Les images ont été acquises à l'aide du microscope Nikon Eclipse Ti à un grossissement de 100X en mode multicouches de 0,2µm. **Droite** : Histogramme de la densité des épines dendritiques le long des cellules granulaires du gyrus denté. **(G-I)** Marquage TUNEL dans l'hippocampe de souris à la naissance **(G)** (souris mâles WT n = 3 vs HOM n = 3), au jour postnatal 3 **(H)** (souris femelles WT n = 2 vs HOM n = 3) et à l'âge adulte de 25 semaines **(I)** (souris mâles WT n = 3 vs HOM n = 3). **Haut** : Immunomarquage. La barre d'échelle indique 100µm. **Bas** : Histogramme représentant la quantification manuelle des cellules positives. Tous les histogrammes représentent la moyenne ± SEM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

J'ai utilisé une approche similaire pour le cervelet et le cortex en développant des protocoles pour l'analyse approfondie des différentes couches qui composent ces structures. Dans le cervelet, au niveau latéral +0,60 mm, les souris mâles HOM (âgées de 18 semaines) présentaient une réduction de la surface totale du cervelet de 11 % ($P = 0,02$), un amincissement de la couche granulaire interne de 30 % ($P = 0,001$) et une réduction de la densité des cellules de Purkinje de 17 % ($P = 0,04$) (**Figure 48A**). Les tests TUNEL ont montré une augmentation spectaculaire des cellules

apoptotiques de 220 % ($P = 0,0004$) limitée à la naissance, sans indication de mort cellulaire à l'âge adulte (**Figures 48B-C**). Comme dans l'hippocampe, le séquençage haut-débit de l'ARN dans le cervelet n'a pas révélé de gènes exprimés de manière différentielle.

Dans le cortex, j'ai examiné chaque couche indépendamment (**Figure 48D**) et ai constaté que seules les couches corticales I et VIa étaient affectées avec un amincissement de 18% ($P = 0,008$) dans la couche I et de 24% dans la couche VIa ($P = 0,011$) chez les souris mâles HOM à l'âge de 33 semaines (**Figure 48E**). Ces observations ont été confirmées en utilisant des marqueurs spécifiques de la couche I (Reelin) et de la couche VI (Tbr1), sur les cerveaux mâles adultes, montrant une réduction des cellules Reelin⁺ de 54% ($P = 0,006$) et des cellules Tbr1 de 77% ($P = 0,0001$) (**Figures 48F-G**). Il est intéressant de noter que, dès la naissance, le nombre de cellules Reelin⁺ et Tbr1⁺ étaient réduits dans le cerveau des souris mutantes (données issues de la collaboration avec l'équipe du Dr. Shilpi Minocha). Comme pour l'hippocampe et le cervelet, l'analyse de mort cellulaire par TUNEL a révélé une hausse spectaculaire (quatre fois) du nombre de cellules TUNEL⁺ ($P < 0,0001$) à la naissance mais pas à l'âge adulte (**Figures 48H-I**).

Il est intéressant de noter que lorsque nous avons réanalysé les données transcriptomiques spatiales existantes de 21 zones distinctes du cerveau de la souris (Zimmerman et al. 2022), nous avons trouvé une expression plus élevée de *Vps13b* dans le segment délimitant la couche corticale VI et le gyrus denté, ce qui montre un lien étroit entre le modèle d'expression spatiale de *Vps13b* et son profil neuroanatomique à petite échelle lorsqu'il est muté dans le cerveau de la souris.

L'ensemble de ces résultats indique que *Vps13b* favorise la survie neuronale pendant la petite enfance dans les principales structures et circuits cérébraux impliqués dans la cognition et le contrôle moteur, y compris le gyrus denté, la région d'entrée de l'hippocampe par la voie perforante, le cervelet et la couche corticale VI impliquée dans les boucles cortico-thalamo-corticales et l'intégration de l'information motrice.

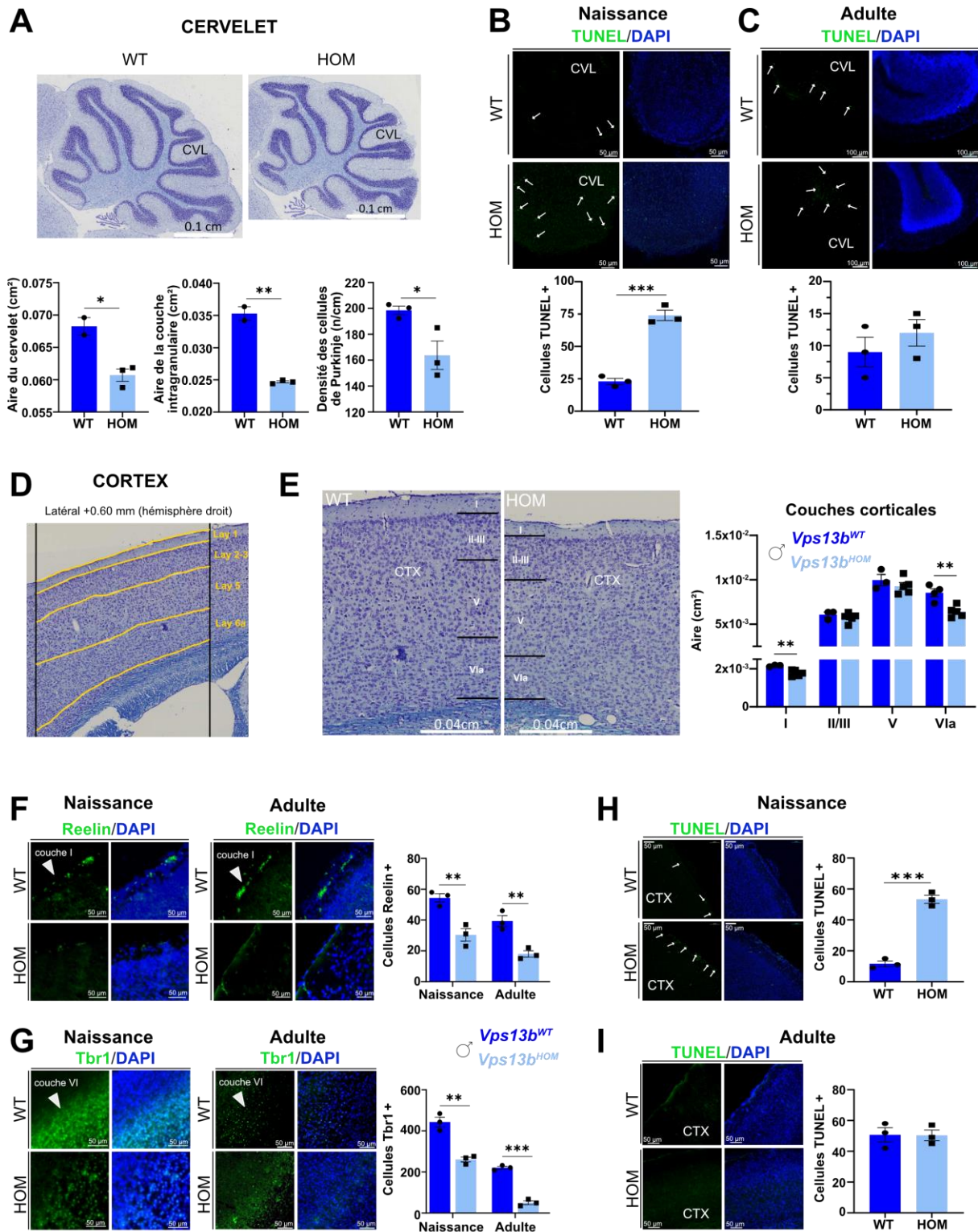


Figure 48 : Analyse approfondie des caractéristiques morphologiques du cervelet et du cortex des souris *Vps13b*.

(A) Haut: Image sagittale du cervelet de souris mâles WT et HOM, âgées de 19 semaines, à la position stéréotaxique Latérale +0.60 mm colorée au Nissl-Luxol. **Bas :** Histogramme montrant l'aire totale du cervelet (WT n = 2 vs HOM n = 3 souris mâles de 19 semaines). Histogramme montrant l'aire de la couche intragranulaire du cervelet (WT n = 2 vs HOM n = 3 souris mâles de 19 semaines). Histogramme de la densité

des cellules de Purkinje (nombre/cm) de 3 souris mâles WT vs 3 souris mâles HOM à 19 semaines. **(B)** Analyse TUNEL sur le cervelet de souris mâles à la naissance (WT n = 3 vs HOM n = 3) avec quantification manuelle des cellules positives. La barre d'échelle indique 50 μ m. **(C)** Analyse TUNEL à l'âge de 25 semaines (souris mâles WT n = 3 vs HOM n = 3) avec quantification manuelle des cellules positives. La barre d'échelle indique 100 μ m. **(D)** Délimitation des différentes couches corticales quantifiées à l'aide du logiciel ImageJ tracées sur l'image représentative du cerveau adulte à la position Latérale +0.60 mm. **(E) Gauche** : Image sagittale du cortex des souris mâles WT et HOM, âgées de 33 semaines, au niveau Latéral +0.60 mm colorés au Nissl-Luxol. **Droite** : Histogramme représentant l'aire des différentes couches corticales (WT n = 3 vs HOM n = 5 souris mâles de 33 semaines). **(F)** Immunomarquage du cortex à l'aide du marqueur de la couche I Reelin sur coupe de cerveau de souris mâles à la naissance (n = 3 WT vs 3 HOM) et à l'âge adulte 25 semaines (n = 3 WT vs 3 HOM). Histogramme représentant la quantification manuelle du signal à l'aide du logiciel ImageJ. **(G)** Immunomarquage du cortex à l'aide du marqueur de la couche VI Tbr1 sur coupe de cerveau de souris mâles à la naissance (n = 3 WT vs 3 HOM) et à l'âge adulte 25 semaines (n = 3 WT vs 3 HOM). Histogramme représentant la quantification manuelle du signal à l'aide du logiciel ImageJ. **(H)** Analyse TUNEL sur le cortex de souris mâles à la naissance (WT n = 3 vs HOM n = 3) avec quantification manuelle des cellules positives. La barre d'échelle indique 50 μ m. **(I)** Analyse TUNEL à l'âge de 25 semaines (souris mâles WT n = 3 vs HOM n = 3) avec quantification manuelle des cellules positives. La barre d'échelle indique 50 μ m. Chaque graphique représente la moyenne \pm SEM. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du test t de Student (two-tailed). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

8. *Vps13b* est impliqué dans la régulation de l'homéostasie lipidique de l'hippocampe

Compte tenu des études récentes établissant un lien entre les gènes *VPS13A*, *VPS13C* et *VPS13D* et l'homéostasie lipidique (Guillén-Samander & De Camilli 2022; Kumar et al. 2018; Cai et al. 2022) et de l'absence de résultats dans nos études transcriptomiques, j'ai voulu étudier la composition lipidique du cerveau, en émettant l'hypothèse que le gène *VPS13B* pourrait jouer un rôle similaire à celui des autres gènes *VPS13*. L'analyse lipidomique a été réalisée par les membres de la plateforme de lipidomique de l'INSERM U1231.

L'analyse a été réalisée en se concentrant sur l'hippocampe, qui est l'une des régions cérébrales les plus touchées. Un total de 286 espèces lipidiques, comprenant notamment le cholestérol, les acides gras, les céramides, les sphingomyélines et les glycérophospholipides, ont été extraits et quantifiés dans le cerveau de souris mutantes HOM et de souris WT appariées en utilisant la chromatographie (gazeuse ou liquide) couplée à la spectrométrie de masse (**Figure 49A**). La méta-analyse qui a consisté à additionner les espèces lipidiques au sein de chaque catégorie principale a révélé des quantités accrues de sphingomyélines totales (+13 %, $P = 0,04$) et d'acides gras totaux (+5 %, $P = 0,008$) (**Figure 49B**). Il est intéressant de noter qu'il y avait systématiquement plus de lipides dans les extraits hippocampiques dérivés des souris HOM par rapport aux souris WT appariées, avec 32/286 (11 %) espèces évaluées dont les concentrations étaient toutes augmentées, ce qui indique une signature de l'accumulation de lipides dans l'hippocampe (**Figure 49C**). Les trois principales espèces de lipides moléculaires modifiées sont les céramides d18:2/18:0 (+53 %, $P = 0,0063$), les sphingomyélines d18:2/18:0 (+40 %, $P = 0,041$) et l'acide palmitique gras C16:0 (+8 %, $P = 0,0052$) (**Figure 49C**).

L'ensemble de ces profils lipidomiques indique des altérations de la voie sphingolipide-céramide et, plus généralement, relie les lipides à la pathogenèse de *Vps13b* et à la toxicité induite par les lipides comme explication potentielle de la mort neuronale, ce qui reste à démontrer.

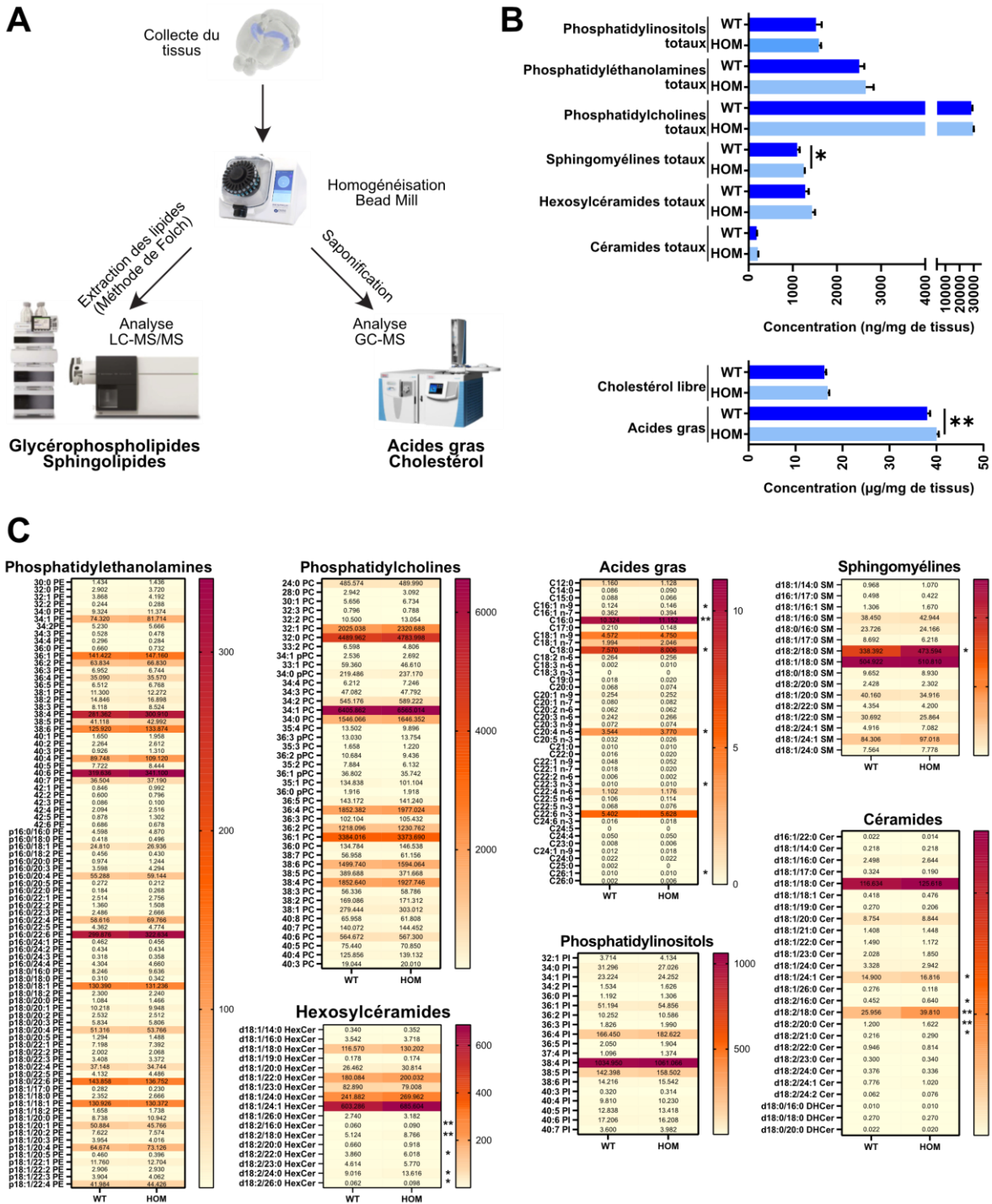


Figure 49 : Les souris mutantes *Vps13b* présentent des altérations de la composition lipidique dans l'hippocampe.

(A) Schéma récapitulatif de la méthode utilisée pour extraire et analyser les lipides à partir d'une dissection d'hippocampe de souris. (B) Histogrammes montrant la composition totale en lipides dans l'hippocampe de souris mâles de 9 semaines (WT n = 5 vs HOM n = 5). Les graphiques représentent la moyenne ± SEM. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. (C) Heat map de la composition en lipides dans les différentes familles.

9. L'analyse des caractéristiques neurologiques du syndrome de Cohen confirme les altérations infantiles sans aggravation plus tard, et les filles sont moins touchées.

Afin de transposer les résultats murins *Vps13b^{tm1.ICS}* à la clinique du syndrome de Cohen, j'ai effectué une revue exhaustive de la littérature en me concentrant sur les manifestations relatives à la taille de la tête, à la neuroanatomie du cerveau, à la cognition, au comportement, à la sociabilité et aux fonctions motrices et j'ai répertorié les données de 96 hommes et 71 femmes qui ont reçu un diagnostic moléculaire pour le VPS13B. La plupart des patients étant des enfants, j'ai constaté un enrichissement des cas de 10 ans ou moins, ce qui explique pourquoi j'ai divisé les données par catégorie d'âge en cinq tranches (0, 0-1, 1-3, 3-5, 5-10 ans) (**Figures 50A-B**). Chez les souris mutantes *Vps13b*, la taille du cerveau et les défauts neuroanatomiques apparaissent progressivement après la naissance dans la première semaine de vie, à partir de laquelle un plateau est atteint sans aggravation jusqu'à l'âge adulte et le vieillissement, les souris femelles étant moins affectées que les souris mâles. De façon intéressante, j'ai trouvé une équivalence à cette observation chez les Hommes. En effet, alors que peu de patients hommes avaient une circonférence occipito-frontale (OFC) anormale à la naissance (19%), l'intégralité d'entre eux (soit 100%), présentaient une microcéphalie à l'âge de 3 ans (**Figure 50A**). Chez les filles, 6 % étaient microcéphales à la naissance, 62 % entre 1 et 3 ans et 87 % à partir de 3 ans (**Figure 50B**), ce qui semble refléter un impact moins important sur la taille de la tête chez les femmes.

Pour compléter la revue de la littérature sur la taille de la tête, qui ne permet pas de suivre longitudinalement l'OFC pour un même patient à différents âges, j'ai suivi l'évolution du phénotype de la microcéphalie dans une cohorte de 17 (14 garçons et 3

filles) patients Cohen non rapportés auparavant, diagnostiqués avec des mutations de perte de fonction de VPS13B (**Figures 50C-D**). L'ensemble de ces 17 cas suggère que la taille de la tête est globalement normale à la naissance, mais qu'elle diminue rapidement en dessous du 3^{ème} percentile après 2 mois de vie jusqu'à 18 mois, âge à partir duquel elle reste relativement stable.

Alors que la microcéphalie est assez bien documentée dans la littérature sur le syndrome de Cohen, les résultats de la neuro-imagerie ne sont pas systématiques et nécessiteront des réévaluations minutieuses à l'avenir. Cependant, j'ai pu identifier 20 patients (sur les 235 déjà publiés) dont les techniques d'imagerie cérébrales avaient mis en évidence des anomalies structurales. Comme chez la souris, le cervelet est signalé comme hypoplasique chez 6 patients (**Figure 50E**). Les autres régions cérébrales signalées comme présentant des altérations structurales sont le corps calleux (hypoplasie ou élargissement), la fosse postérieure (malformation), l'espace sous-arachnoïdien (dilatation), les zones périventriculaires (augmentation de la densité de la matière blanche), l'espace sous-entorhinal (dilatation) et le lobe préfrontal et temporal (sous-développement) (**Figure 50E**).

Enfin, j'ai examiné les données comportementales lorsqu'elles étaient disponibles (**Figure 50F**), et comme chez les souris, la déficience intellectuelle est une caractéristique clinique très fréquente chez les patients (100% des patients masculins contre 97% des patients féminins atteints). Des comportements stéréotypés sont rapportés chez 67% des patients mâles et 77% des patients femelles. L'humeur joyeuse est plus présente chez les hommes (93 % des patients masculins atteints contre 79 % des patients féminins atteints), ce qui est cohérent avec les résultats obtenus chez la souris où les mutantes *Vps13b* mâles présentaient une sociabilité accrue, mais pas les souris mutantes *Vps13b* femelles. L'hypotonie est présente chez

100 % des hommes et 75 % des femmes (ce dernier chiffre manque de puissance statistique car il n'y a eu que quatre rapports).

En résumé, les résultats cliniques et murins sont cohérents et confirment la force de l'utilisation du modèle murin dans la compréhension des phénotypes associées à la maladie. Les données enregistrées chez la souris et celles rapportées en clinique ont fournis de nouvelles informations sur la neurobiologie de VPS13B et ont permis de mettre en évidence des caractéristiques neuropathologiques inédites qui incitent à catégoriser le syndrome de Cohen comme une pathologie de neurodégénérescence infantile non progressive.

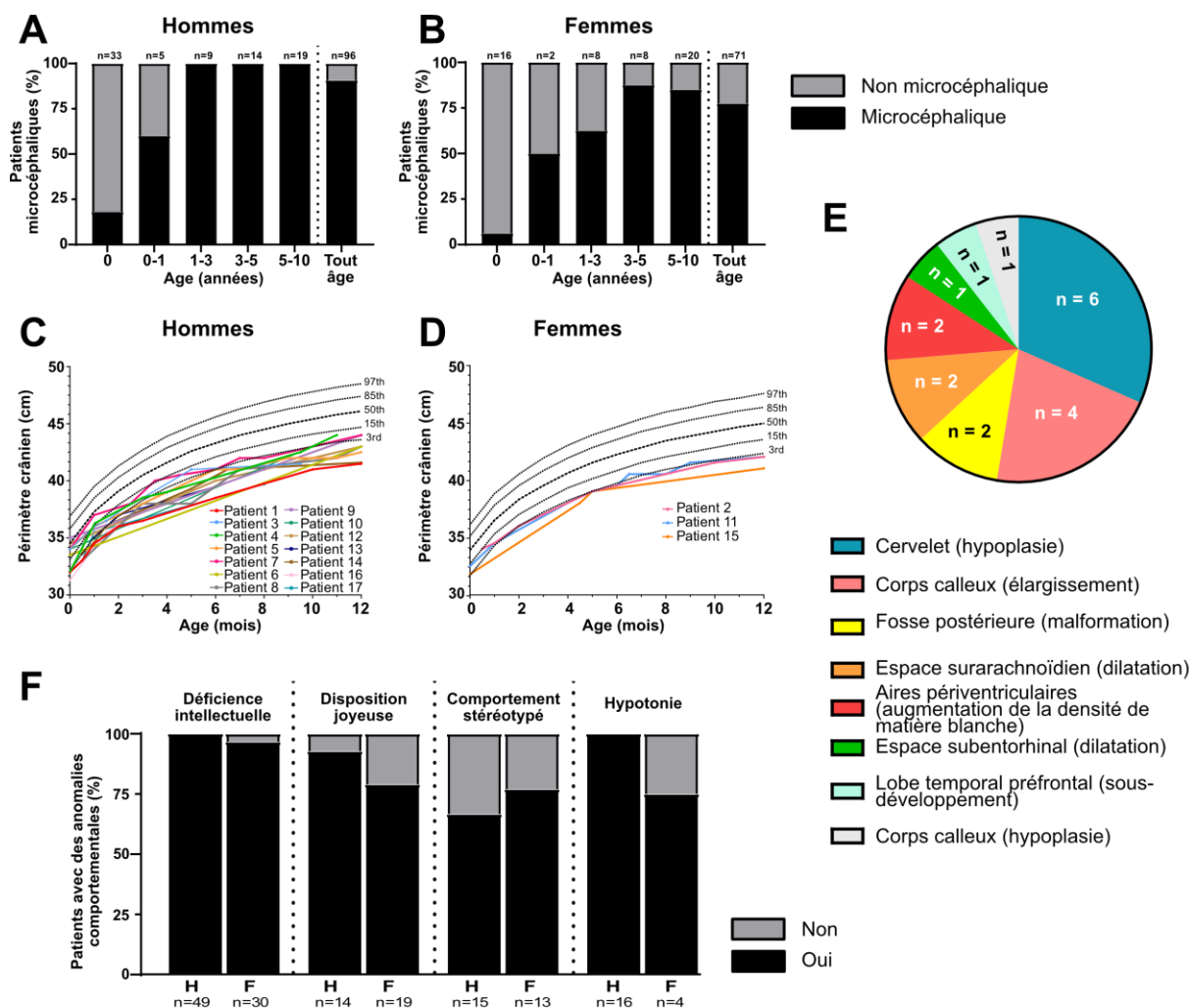


Figure 50 : Revue de la littérature sur les caractéristiques cérébrales du syndrome de Cohen.

(A) Proportion de patients de sexe masculin, selon les données disponibles, présentant ou non un cerveau microcéphale. Les données de 96 patients de sexe masculin ont été examinées et classées en six groupes d'âge allant de la naissance à 10 ans. (B) Proportion de patients de sexe féminin présentant ou non une microcéphalie. Les données de 71 patientes ont été examinées pour déterminer le phénotype de la taille de la tête. (C) Évolution du périmètre crânien chez 14 patients masculins non publiés souffrant du syndrome de Cohen diagnostiqués avec des mutations *VPS13B*. (D) Évolution de la taille de la tête chez 3 femmes souffrant du syndrome de Cohen et présentant des mutations du gène *VPS13B*. (E) Diagramme circulaire de la répartition des données disponibles sur les changements structuraux cérébraux chez les patients Cohen, obtenues par imagerie cérébrale (20/235). (F) Proportion de patients masculins et féminins présentant des caractéristiques neurologiques (déficience intellectuelle, humeur joyeuse, comportement stéréotypé et hypotonie).

Discussion

L'objectif principal de mon travail de thèse était de déterminer le rôle de la protéine VPS13B dans le cerveau afin de comprendre l'origine des défauts neurologiques et comportementaux rapportés chez les patients souffrant du syndrome de Cohen. Etant donné la très faible prévalence du syndrome de Cohen (500 à 1000 patients dans le monde entier) (Wang et al. 2016), mon travail a consisté à caractériser de façon détaillée les phénotypes neurobiologiques observés chez les souris mutantes homozygotes du modèle *Vps13b^{tm1.ICS}*. Cette étude a mis en évidence, chez la souris, un retard de croissance, une microcéphalie postnatale, des anomalies crâniofaciales, une hypotonie et des comportements similaires à ceux observés chez les patients, validant ainsi l'utilisation du modèle murin dans la compréhension des mécanismes dérégulés dans le syndrome de Cohen. De façon intéressante, les résultats obtenus ont également permis de mettre en évidence des phénotypes jusqu'alors non rapportés tels que la sub-viabilité des souris homozygotes, l'altération de l'homéostasie des lipides dans l'hippocampe, la mort des cellules neuronales ou encore la caractérisation précise des défauts neuroanatomiques.

1. Quelle est la conséquence de l'absence de *Vps13b* sur la survie des souris ?

Aucune étude ne fait état d'une surmortalité des patients atteints du syndrome de Cohen et les cas rapportés dans la littérature, bien que fortement dépendants de leur entourage, ne semblent pas non plus présenter de modification de leur espérance de vie (Kiviti-Kallio & Norio 2001).

Au cours de ma thèse, nos observations ont montré que les souris possédant la mutation homozygote de *Vps13b* présentaient une surmortalité. En effet, alors qu'au

moment de la naissance, le ratio mendélien de 25% de souris HOM est respecté, nous avons constaté que les souris HOM mourraient progressivement entre les jours postnataux 2 et 7, âge à partir duquel seules 50% d'entre elles étaient encore vivantes. Ces résultats laissent penser que des difficultés rencontrées par les souris mutantes dans les jours suivants leur naissance entraînent leur mort.

Les patients atteints du syndrome de Cohen présentent une hypotonie et des difficultés pour s'alimenter pendant la période périnatale. En effet, de nombreux rapports cliniques font état de mauvaise succion des nouveaux-nés (Rejeb et al. 2017; Athanasakis et al. 2012; Alipour et al. 2020). Au cours de mon étude de la littérature, je n'ai trouvé aucune donnée sur la durée de ces troubles, à l'exception de deux rapports qui indiquent que les difficultés d'alimentation ont duré jusqu'à l'âge de 8 mois pour un patient chinois (Hu et al. 2021) et jusqu'à l'enfance pour une patiente iranienne qui n'arrive toujours pas à manger de nourriture solide à l'âge de 4 ans (Momtazmanesh et al. 2020).

Chez l'Homme, un nouveau-né présentant des troubles à l'alimentation est directement pris en charge, cela peut aller de la simple aide à l'allaitement maternel jusqu'à la mise en place d'une sonde nutritive, dans les cas les plus extrêmes, afin d'éviter sa dénutrition et son décès. Cela a été le cas chez un patient (non publié) pour lequel la nutrition par sonde gastrique a été mise en place. Au cours d'une discussion, sa maman a rapporté que le sevrage de la sonde a été un processus très difficile pendant 6 mois ce qui a nécessité un suivi par des équipes étrangères spécialisées. Aucun cas si extrême n'a été rapporté chez d'autres patients Cohen mais, étant donné la faible prévalence du trouble, la recherche de mutations dans le gène *VPS13B* ne fait pas partie des analyses réalisées en premières intentions en cas de mort périnatale.

Chez la souris, un nouveau-né présentant des défauts de succion se voit, malheureusement, destiné à mourir du fait de la non prise en charge par sa mère, qui doit déjà s'occuper de ses autres bébés (5 à 12 par portée). Ceci peut expliquer la différence de mortalité observée entre patients Cohen et souris mutantes. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en analysant la capacité des souris mutantes à se nourrir ou non. Pour cela, il faudrait vérifier régulièrement la présence de lait dans l'estomac des nouveaux nés. Cette observation est possible à travers la peau très fine et transparente du bébé. S'il s'avère que les nouveaux nés mutants ne possèdent pas de lait dans l'estomac, il conviendrait de leur faire passer un test de succion. La technique (Dragatsis et al. 2004), consiste à anesthésier la souris femelle 2 à 6h après l'accouchement, à la placer sur un coussin chirurgical chauffé à 37°C et à tester individuellement chaque nouveau-né sur sa capacité à trouver et saisir l'un des mamelons de sa mère et à téter efficacement le lait.

2. Quelle est la conséquence de l'absence de *Vps13b* sur la croissance des souris ?

Au cours de ma thèse, j'ai également constaté que les souris HOM qui survivaient présentaient un retard de croissance. Bien qu'il soit présent dans les deux sexes, un léger dimorphisme sexuel a quand même été observé. Alors que le retard de croissance est visible dès le stade embryonnaire E18.5 chez les femelles, il l'est seulement dès le jour postnatal P1 chez les mâles. Les souris HOM femelles semblent être légèrement moins affectées.

Il est intéressant de noter que ces phénotypes ont également été rapportés dans un autre modèle murin *Vps13b* de l'IMPC, appelé *Vps13b^{em1(IMPC)Tcp}*, et généré par délétion des exons 2 à 4 du gène. La viabilité des souris HOM *Vps13b^{em1(IMPC)Tcp}* est altérée, avec seulement 16% de souris mutantes HOM génotypées à l'âge du sevrage contre les 25% attendus par le ratio mendélien. La même différence entre les sexes en termes de poids corporel et de taille a été mise en évidence dans ce deuxième modèle. Les femelles HOM ont un poids corporel inférieur de 31% (contre 41% pour les mâles) au moment du sevrage, ce qui témoigne d'une grande reproductibilité des phénotypes observés entre les différents modèles murins disponibles.

Aussi, des études sont en cours afin de déterminer le rôle de VPS13B dans la croissance et la biologie osseuse. Un cas clinique publié en 1991 a rapporté un déficit en hormone de croissance chez une patiente avec le syndrome de Cohen (Massa et al. 1991). Plus récemment, une étude d'association de variation du nombre de copies à l'échelle du génome a associé *VPS13B* comme gène causant l'ostéoporose dans la population caucasienne (Deng et al. 2010). Les analyses menées sur la cohorte dijonnaise ont également montré que 7 patients sur 9 développaient une ostéopénie avant l'âge de 40 ans. Ce déficit osseux a également été vérifié chez nos souris *Vps13b^{HOM}* (Duplomb et al. en préparation). Au cours de ma thèse, j'ai eu l'occasion de participer à ce projet de recherche en réalisant une étude de la sécrétion pulsatile de l'hormone de croissance chez les souris. Malheureusement, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les souris WT et HOM.

3. Quelle est la conséquence de l'absence de *Vps13b* sur la mise en place et le maintien de l'architecture cérébrale ?

L'un des objectifs de mon travail de thèse était d'établir le patron d'expression complet de VPS13B chez la souris. Premièrement, cette étude d'expression a montré que *Vps13b* était exprimé dans le cerveau des souris depuis le stade embryonnaire E18.5 jusqu'à l'âge adulte. J'ai également montré que la délétion de l'exon 4 de *Vps13b* n'entraînait pas de dégradation des ARNm non-sens chez les souris mutantes. En effet, un long transcrit auquel il ne manque que l'exon 4 s'exprime chez les souris HOM. Ce transcrit, délesté d'un de ses exons, perd toute la fin de son domaine choréine, le domaine commun à toutes les protéines de la famille des VPS13. Malheureusement, je n'ai pas été en mesure d'établir le patron d'expression de la protéine dans le cerveau de la souris. Les divers marquages immunohistochimiques que nous avons réalisés ont révélés un manque de spécificité des anticorps en notre possession. Cependant, chez l'Homme, 203 mutations ont été identifiées chez les patients et ces mutations concernent toutes les parties du transcrit,, elles peuvent affecter aussi bien les premiers codons (El Chehadeh et al. 2010) que les finaux (Hennies et al. 2004). Ainsi, tous les patients possèdent une « version » plus ou moins longue de la protéine tronquée mais présentent des phénotypes semblables. Cela confirme la légitimité de l'utilisation de notre modèle murin, uniquement dépourvu de l'exon 4 du gène, même sans certitude d'une expression nulle de la protéine.

Une autre partie de ce travail de thèse a consisté à analyser le cerveau des souris HOM. En pesant le cerveau des souris à plusieurs âges, j'ai montré que, comme c'est le cas chez les patients Cohen, les souris mutantes HOM présentent une

microcéphalie postnatale, les défauts apparaissant dès le jour postnatal 1. Encore une fois, un léger dimorphisme sexuel a été constaté sur ce point avec les femelles HOM qui ont un cerveau plus léger de 16% par rapport aux WT du même âge (P7) contre 23% de diminution enregistrée pour les mâles HOM.

Par la suite, afin de caractériser la microcéphalie, j'ai réalisé une analyse neuroanatomique du cerveau des souris HOM à différents âges en utilisant les techniques histologiques existantes de microscopie à haute résolution, en 2 dimensions (Collins et al. 2018; Nguyen et al. 2022) et 3 dimensions (Weninger et al. 2006). Grâce à une évaluation minutieuse de l'anatomie cérébrale postnatale, j'ai pu identifier qu'à la naissance, le cerveau des souris HOM mutantes était normal, sans anomalie structurelle apparente. Ce résultat confirme le caractère postnatal de la microcéphalie constaté en pesant le cerveau des souris. En revanche, après la naissance, les souris HOM, mâles et femelles, présentent des anomalies majeures sur la quasi-totalité des régions cérébrales évaluées. Il est intéressant de noter que le degré de sévérité des différences observées varie selon les régions cérébrales, mettant alors en lumière une diversité et un mosaïcisme des atteintes, jusqu'alors jamais évoqué. Cela démontre que les différentes régions du cerveau ne se développent pas comme un tout et sont libres de répondre individuellement à la mutation de *Vps13b*. Ce résultat prouve également que la petite taille du cerveau des souris mutantes n'est pas uniquement dû au retard de croissance de la souris. La diminution de taille du cerveau n'est pas non plus due à une diminution commune des diverses régions cérébrales comme cela a pu être supposé dans le passé (Finlay & Darlington 1995).

Les principaux résultats neuroanatomiques mis en évidence dans cette étude sont la dégénérescence de l'ensemble du thalamus (-35%), de l'hippocampe (-34%) et du

cervelet (-21%). Plusieurs rapports cliniques confirment ces résultats. Pour le thalamus, une étude d'association pangénomique (GWAS) menée sur 10 000 souris du panel BXD de souches consanguines recombinante a rapporté une association entre le poids du thalamus et le locus à proximité du gène *Vps13b* dans le chromosome 15 (Hager et al. 2012). Notons que la force de cette étude repose sur le fait que la famille BXD se compose d'environ 100 lignées dérivées de souches parentales qui diffèrent d'environ 5 millions de polymorphismes nucléotidiques simples (SNP), d'indels ou de variations du nombre de copie, ce qui confère à ce modèle une variation génétique naturelle à un niveau se rapprochant de celui des populations humaines. Pour l'hippocampe, un polymorphisme nucléotidique simple (SNP) rs959695 situé dans le gène *VPS13B* a été associé de manière significative à la dégénérescence hippocampique mesurée par IRM dans une vaste étude d'association pangénomique humaine influençant le risque de maladie d'Alzheimer (Melville et al. 2012). Enfin, en ce qui concerne le cervelet, il constitue la région cérébrale la plus fréquemment rapportée comme étant atteinte chez les patients Cohen qui ont subis des examens d'imagerie cérébrale (Mochida et al. 2004; Waite et al. 2010; Katzaki et al. 2007). Sur la base de ces données, nous pensons que les anomalies structurelles du cerveau sont très fréquentes dans le syndrome de Cohen, mais difficiles à détecter. Il pourrait ainsi être intéressant de recommander aux médecins d'effectuer des examens d'imagerie cérébrale à plus haute résolution lorsque cela est possible, afin d'améliorer la description clinique du syndrome.

4. Quelle est la conséquence de l'absence de *Vps13b* sur cognition et le comportement ?

C'est l'hippocampe, et notamment le gyrus denté qui est la structure cérébrale la plus affectée par la mutation de *Vps13b* (-44% de l'aire du bras bas du gyrus denté chez les souris mâles HOM de 33 semaines comparées aux souris WT). Cette observation corrélée à notre étude de l'expression du gène dans le cerveau des souris confirme l'idée selon laquelle un seul transcrit principal est exprimé de manière ubiquitaire dans la plupart des régions cérébrales évaluées et que la mutation de ce transcrit entraîne le développement de déficits d'apprentissage qui peuvent être expliqués par des problèmes de connectivité du réseau cortico-hippocampique dus à la mort cellulaire et à la densité réduite des épines dendritiques des cellules granulaires du gyrus denté qui ont survécu. Cela se traduit notamment par un défaut de mémoire spatiale de travail mis en évidence dans le test du labyrinthe en Y. Cette étude n'est pas la première à établir un lien entre VPS13B et fonctions cognitives et motrices chez la souris. En effet, une étude comportementale menée par une équipe coréenne sur une lignée de souris dans laquelle l'exon 2 de *Vps13b* a été délété, a mis en évidence des troubles moteurs, une hypoactivité et des troubles d'apprentissage spatial chez les souris mutantes (Kim et al. 2019). Mes résultats valident également les déficits de la fonction motrice, qui impliquent très probablement les connexions des cellules pyramidales de la couche VI du cortex, établies par les axones vers le thalamus via la boucle cortico-thalamique (Lam & Sherman 2010). La disposition joyeuse étant la deuxième caractéristique la plus fréquente chez les patients atteints du syndrome de Cohen après la déficience intellectuelle, j'ai exploré la sociabilité des souris et ai constaté que les souris mutantes *Vps13b* présentaient également un schéma clair de sociabilité accrue.

5. Quelle est la conséquence de l'absence de *Vps13b* sur la morphologie et la survie neuronale ?

Dans toutes les structures cérébrales atteintes, à l'exception du corps calleux, cette étude a montré que c'était une perte cellulaire qui était à l'origine du développement des anomalies morphologiques. Les différents marquages immunohistochimiques réalisés ont permis de montrer que ce sont les neurones qui sont déficitaires dans le cerveau des souris mutantes HOM, le nombre d'astrocytes n'étant pas modifié dans les régions dans lesquelles il a été quantifié. Ce résultat est en adéquation avec les analyses de séquençage d'ARN qui montrent que ce sont les cellules neuronales qui ont la plus forte proportion d'expression de *Vps13b* (Telley et al. 2016; Yao et al. 2021).

Ce travail de thèse a également permis de mettre en évidence une accumulation de lipides dans l'hippocampe des souris mutantes HOM, ce qui donne une piste potentielle de la mécanistique dérégulée dans le syndrome de Cohen.

Cette piste mécanistique avait déjà été évoquée dans une étude précédemment publiée dans laquelle un polymorphisme (SNP rs7841688) identifié dans le gène *VPS13B* avait été associé à la modulation de la lipoprotéine de basse densité qui permet le transport du cholestérol au sein de l'organisme (Foulkes et al. 2013). Bien qu'initialement décrit pour son rôle de facteur de risque de développement d'une maladie cardiovasculaire, de précédentes études ont également montré que le transport du cholestérol est également essentiel au bon fonctionnement neuronal (Fan et al. 2002; Ko et al. 2005). En outre, bien que l'hyperlipidémie soit un facteur de risque bien connu de troubles neurodégénératifs progressifs à apparition tardive chez l'Homme (Huynh et al. 2020; Yoon et al. 2022), le lien entre l'accumulation de lipides

dans l'hippocampe et l'induction de l'apoptose neuronale a été récemment établi dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer (Zhao et al. 2017).

Aussi, de manière intéressante, des études cellulaires ont montré que les trois autres membres de la famille des VPS13, VPS13A, VPS13C et VPS13D étaient des protéines de transport de lipides permettant le flux de lipides du réticulum endoplasmique vers diverses autres membranes cellulaires (Guillén-Samander et al. 2021; Kumar et al. 2018; Cai et al. 2022). La fonction de transport des lipides du gène *VPS13B* n'a pas encore été démontrée. Cependant, compte tenu de sa colocalisation avec l'appareil de Golgi (Seifert et al. 2015, 2011), il est tentant d'émettre l'hypothèse selon laquelle VPS13B pourrait être impliqué dans le transfert de lipides du réticulum endoplasmique à l'appareil de Golgi, où les céramides sont converties en sphingolipides (Liu et al. 2017). En absence d'une protéine VPS13B fonctionnelle, les contacts membranaires et le transfert de céramides pourraient être réduits, ce qui pourrait potentiellement conduire à des mécanismes de compensation excessifs mis en place par les autres protéines VPS13, entraînant une accumulation de lipides.

L'analyse lipidomique a révélé que ce sont les sphingomyélines et les céramides qui sont directement affectées par la mutation de *Vps13b* avec une hausse de respectivement 40 et 53% dans l'hippocampe des souris mâles. Or, il a très tôt été démontré que les céramides sont des inhibiteurs de la croissance axonale (de Chaves et al. 2001). Ces résultats peuvent être directement mis en relation avec une étude publiée par Seifert *et al.*, dans laquelle l'inhibition de *Vps13b* par siARN dans une culture neuronale primaire d'hippocampe de rat, a entraîné la diminution de la croissance des neurites des neurones (Seifert et al. 2015). Une piste mécanistique envisagée serait donc, qu'en absence de *Vps13b*, la désorganisation de l'appareil de Golgi empêche le transport correct des lipides et notamment des céramides (Madison & Howard 1996),

ce qui entraîne une diminution de la croissance axonale qui engendre, par la suite, une élimination du neurone par l'organisme qui le considère alors comme non fonctionnel ou, du moins, pas assez efficace. Afin de valider cette piste mécanistique, il conviendrait d'analyser la composition en lipides de la cellule neuronale au moment de sa mort, soit, entre les jours postnataux P1 et P3. C'est une des perspectives de cette étude.

Conclusions & Perspectives

En conclusion, mes travaux de thèse mettent en évidence la neurodégénérescence infantile non progressive comme cause du phénotype de microcéphalie dans les modèles murins du syndrome de Cohen. Plusieurs pistes mécanistiques ont été avancées pour expliquer la mort neuronale et plusieurs expérimentations peuvent être envisagées pour les tester.

Au cours de cette thèse, j'ai effectué diverses expérimentations, *in vitro*, afin d'étudier les causes du phénotype de mort neuronale. Etant donné que ces expérimentations sont restées au stade de test, j'ai fait le choix de ne pas les présenter dans ce manuscrit mais je considère que la poursuite de ces expérimentations pourrait constituer une perspective intéressante à ce projet. En bref, j'ai d'abord commencé à travailler avec des cultures primaires hippocampiques et corticales, mais celles-ci se sont révélées difficiles à entretenir rendant la suite des expérimentations de mort cellulaire impossibles à réaliser. C'est pour cela que j'ai ensuite travaillé avec des cultures de cellules Neuro2A dans lesquelles j'ai invalidé *Vps13b* par CRSIPR/Cas9. Malgré une bonne extinction de l'expression du gène (91% en moyenne), aucune surmortalité n'a été mise en évidence dans les cellules knock-out. Une hausse de 95% de la viabilité des cellules mutées comparées aux cellules non mutées a même été mise en évidence. Une des explications possibles à cette observation est qu'il est très difficile pour une cellule en culture de mourir étant donné que les conditions de culture et l'apport de nutriments sont optimales pour favoriser leur survie. Une perspective à ce projet serait alors de réaliser les mêmes expérimentations mais en challengeant les cellules, en les mettant dans les mêmes conditions environnementales que le corps du nouveau-né (par exemple : privation de nutriment, utilisation d'inducteur d'apoptose etc...).

Les analyses lipidomiques ont indiquées que la toxicité induite par les lipides pouvait être une explication possible de la mort neuronale que nous observons après la naissance des souris. Cependant, ces analyses ont été réalisées sur des tissus de cerveaux adultes. Il conviendrait donc de tester la composition lipidique des cellules au moment de leur mort, à P1 ou P3, pour voir si les mêmes résultats sont obtenus.

Enfin, une des perspectives de ce projet de thèse serait d'étudier les conséquences électrophysiologiques des anomalies neuroanatomiques mises en évidence. La technique d'électrophysiologie par MEA (Multi Electrode Array) est une bonne alternative aux techniques d'électrophysiologie classique comme le patch-clamp. J'ai essayé de mettre en place cette technique durant ma thèse mais, malheureusement, je n'ai pu faire que de la mise au point faute de temps et de cohorte de souris disponible. Etant donné les résultats neuroanatomiques et comportementaux obtenus, il serait intéressant de tester trois circuits neuronaux : i) la boucle tri-synaptique de l'hippocampe ; ii) l'activité spontanée des cellules de Purkinje du cervelet (technique que j'ai mis au point et pour laquelle j'ai eu l'occasion d'enregistrer quelques courants électriques tests au cours de ma thèse) et iii) la circuiterie cortico-thalamique.

Pour conclure, de manière globale, mon travail de thèse a contribué à déterminer le rôle essentiel de VPS13B dans la survie postnatale des neurones. Ce travail aura aussi permis de confirmer la puissance d'une caractérisation détaillée et minutieuse des modèles murins de troubles neurodéveloppementaux humains pour permettre une meilleure classification des caractéristiques neuroanatomiques et neurobiologiques des maladies, ici le syndrome de Cohen, ouvrant ainsi de nouvelles voies de recherches précliniques des pathologies.

Bibliographie

- AbdelAleem A, Haddad N, Al-Ettribi G, Crunk A, Elsotouhy A. 2023. Cohen syndrome and early-onset epileptic encephalopathy in male triplets: two disease-causing mutations in VPS13B and NAPB. *Neurogenetics*. doi: 10.1007/s10048-023-00710-2.
- Adams DC, Collyer M, Kaliontzopoulou A, Sherratt E. 2016. geomorph: Software for geometric morphometric analyses. <https://rune.une.edu.au/web/handle/1959.11/21330> (Accessed March 29, 2023).
- Alexander GE, DeLong MR, Strick PL. 1986. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci*. 9:357–381. doi: 10.1146/annurev.ne.09.030186.002041.
- Alipour N et al. 2020. Mutations in the VPS13B Gene in Iranian Patients with Different Phenotypes of Cohen Syndrome. *J Mol Neurosci*. 70:21–25. doi: 10.1007/s12031-019-01394-w.
- Allen NJ, Lyons DA. 2018. Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science*. 362:181–185. doi: 10.1126/science.aat0473.
- Almeida RG, Lyons DA. 2014. On the resemblance of synapse formation and CNS myelination. *Neuroscience*. 276:98–108. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.08.062.
- Altman J, Bayer SA. 1990. Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. *J Comp Neurol*. 301:365–381. doi: 10.1002/cne.903010304.
- Ardhanareeswaran K, Mariani J, Coppola G, Abyzov A, Vaccarino FM. 2017. Human induced pluripotent stem cells for modelling neurodevelopmental disorders. *Nat Rev Neurol*. 13:265–278. doi: 10.1038/nrneurol.2017.45.
- Arenas F, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. 2017. Intracellular Cholesterol Trafficking and Impact in Neurodegeneration. *Front Mol Neurosci*. 10:382. doi: 10.3389/fnmol.2017.00382.
- Athanasakis E et al. 2012. Two Novel COH1 Mutations in an Italian Patient with Cohen Syndrome. *MSY*. 3:30–33. doi: 10.1159/000338816.
- Batsikadze G et al. 2022. The cerebellum contributes to context-effects during fear extinction learning: A 7T fMRI study. *NeuroImage*. 253:119080. doi: 10.1016/j.neuroimage.2022.119080.
- Bean BDM et al. 2018. Competitive organelle-specific adaptors recruit Vps13 to membrane contact sites. *J Cell Biol*. 217:3593–3607. doi: 10.1083/jcb.201804111.
- Beauchamp A et al. 2022. Whole-brain comparison of rodent and human brains using spatial transcriptomics. Fornito, A, Wassum, KM, & Misic, B, editors. *eLife*. 11:e79418. doi: 10.7554/eLife.79418.
- Behrens TEJ et al. 2003. Non-invasive mapping of connections between human thalamus and cortex using diffusion imaging. *Nat Neurosci*. 6:750–757. doi: 10.1038/nn1075.
- Benarroch EE. 2013. Adult neurogenesis in the dentate gyrus: General concepts and potential implications. *Neurology*. 81:1443–1452. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182a9a156.
- Bhaduri A et al. 2020. Cell stress in cortical organoids impairs molecular subtype specification. *Nature*. 578:142–148. doi: 10.1038/s41586-020-1962-0.
- Biederer T, Kaeser PS, Blanpied TA. 2017. Transcellular Nanoalignment of Synaptic Function. *Neuron*. 96:680–696. doi: 10.1016/j.neuron.2017.10.006.

- Biedler JL, Helson L, Spengler BA. 1973. Morphology and Growth, Tumorigenicity, and Cytogenetics of Human Neuroblastoma Cells in Continuous Culture¹. *Cancer Research*. 33:2643–2652.
- Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS. 1978. Multiple Neurotransmitter Synthesis by Human Neuroblastoma Cell Lines and Clones. *Cancer Research*. 38:3751–3757.
- Birling M-C, Dierich A, Jacquot S, Hérault Y, Pavlovic G. 2012. Highly-efficient, fluorescent, locus directed cre and FlpO deleter mice on a pure C57BL/6N genetic background. *Genesis*. 50:482–489. doi: 10.1002/dvg.20826.
- Blondelle J, Pais de Barros J-P, Pilot-Storck F, Tiret L. 2017. Targeted Lipidomic Analysis of Myoblasts by GC-MS and LC-MS/MS. *Methods Mol Biol*. 1668:39–60. doi: 10.1007/978-1-4939-7283-8_4.
- Bonfante B et al. 2021. A GWAS in Latin Americans identifies novel face shape loci, implicating VPS13B and a Denisovan introgressed region in facial variation. *Sci Adv*. 7:eabc6160. doi: 10.1126/sciadv.abc6160.
- Bordiuk OL, Smith K, Morin PJ, Semënov MV. 2014. Cell Proliferation and Neurogenesis in Adult Mouse Brain. *PLoS One*. 9:e111453. doi: 10.1371/journal.pone.0111453.
- Borsini F, Podhorna J, Marazziti D. 2002. Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? *Psychopharmacology*. 163:121–141. doi: 10.1007/s00213-002-1155-6.
- Boschann F et al. 2020. An intronic splice site alteration in combination with a large deletion affecting VPS13B (COH1) causes Cohen syndrome. *Eur J Med Genet*. 63:103973. doi: 10.1016/j.ejmg.2020.103973.
- Briggs F. 2010. Organizing Principles of Cortical Layer 6. *Front Neural Circuits*. 4:3. doi: 10.3389/neuro.04.003.2010.
- Buchovecky CM et al. 2013. A suppressor screen in Mecp2 mutant mice implicates cholesterol metabolism in Rett syndrome. *Nat Genet*. 45:1013–1020. doi: 10.1038/ng.2714.
- Bugiani M et al. 2008. Cohen syndrome resulting from a novel large intragenic COH1 deletion segregating in an isolated Greek island population. *Am J Med Genet A*. 146A:2221–2226. doi: 10.1002/ajmg.a.32239.
- Cacheiro P, Haendel MA, Smedley D. 2019. New models for human disease from the International Mouse Phenotyping Consortium. *Mamm Genome*. 30:143–150. doi: 10.1007/s00335-019-09804-5.
- Cai S et al. 2022. In situ architecture of the lipid transport protein VPS13C at ER-lysosome membrane contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 119:e2203769119. doi: 10.1073/pnas.2203769119.
- Cardoso-Moreira M et al. 2019. Gene expression across mammalian organ development. *Nature*. 571:505–509. doi: 10.1038/s41586-019-1338-5.
- Chandler KE et al. 2003. Diagnostic criteria, clinical characteristics, and natural history of Cohen syndrome. *Journal of Medical Genetics*. 40:233–241. doi: 10.1136/jmg.40.4.233.
- de Chaves EP et al. 2001. Ceramide inhibits axonal growth and nerve growth factor uptake without compromising the viability of sympathetic neurons. *J Biol Chem*. 276:36207–36214. doi: 10.1074/jbc.M104282200.

- Chen PY et al. 2008. Strand-specific 5'-O-methylation of siRNA duplexes controls guide strand selection and targeting specificity. *RNA*. 14:263–274. doi: 10.1261/rna.789808.
- Chiaradia I, Lancaster MA. 2020. Brain organoids for the study of human neurobiology at the interface of in vitro and in vivo. *Nat Neurosci*. 23:1496–1508. doi: 10.1038/s41593-020-00730-3.
- Chinwalla AT et al. 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. 420:520–562. doi: 10.1038/nature01262.
- Choi M et al. 2009. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:19096–19101. doi: 10.1073/pnas.0910672106.
- Clelland C et al. 2009. A Functional Role for Adult Hippocampal Neurogenesis in Spatial Pattern Separation. *Science*. 325:210–213. doi: 10.1126/science.1173215.
- Cohen MM, Hall BD, Smith DW, Graham CB, Lampert KJ. 1973. A new syndrome with hypotonia, obesity, mental deficiency, and facial, oral, ocular, and limb anomalies. *J Pediatr*. 83:280–284. doi: 10.1016/s0022-3476(73)80493-7.
- Collins SC et al. 2018. A Method for Parasagittal Sectioning for Neuroanatomical Quantification of Brain Structures in the Adult Mouse. *Curr Protoc Mouse Biol*. 8:e48. doi: 10.1002/cpmo.48.
- Collyer ML, Adams DC. 2018. RRPP: An r package for fitting linear models to high-dimensional data using residual randomization. *Methods in Ecology and Evolution*. 9:1772–1779. doi: 10.1111/2041-210X.13029.
- Crawley JN. 2004. Designing mouse behavioral tasks relevant to autistic-like behaviors. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 10:248–258. doi: 10.1002/mrdd.20039.
- Da Costa R et al. 2020. Vps13b is required for acrosome biogenesis through functions in Golgi dynamic and membrane trafficking. *Cell Mol Life Sci*. 77:511–529. doi: 10.1007/s00018-019-03192-4.
- Dall'Armellina F, Stagi M, Swan LE. 2023. In silico modeling human VPS13 proteins associated with donor and target membranes suggests lipid transfer mechanisms. *Proteins*. 91:439–455. doi: 10.1002/prot.26446.
- Dastan J et al. 2016. Exome sequencing identifies pathogenic variants of VPS13B in a patient with familial 16p11.2 duplication. *BMC Med Genet*. 17:78. doi: 10.1186/s12881-016-0340-0.
- Davisson MT, Bergstrom DE, Reinholdt LG, Donahue LR. 2012. Discovery Genetics – The History and Future of Spontaneous Mutation Research. *Curr Protoc Mouse Biol*. 2:103–118. doi: 10.1002/9780470942390.mo110200.
- De Ravel TJL, Azou M, Fryns JR. 2002. Cohen syndrome and rheumatoid arthritis. *Genet Couns*. 13:63–64.
- Deacon RMJ. 2006. Digging and marble burying in mice: simple methods for in vivo identification of biological impacts. *Nat Protoc*. 1:122–124. doi: 10.1038/nprot.2006.20.
- Deng F-Y et al. 2010. Genome-wide Copy Number Variation Association Study Suggested VPS13B Gene for Osteoporosis in Caucasian. *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 21:579. doi: 10.1007/s00198-010-1427-7.

- Denny L, Coles S, Blitz R. 2017. Fetal Alcohol Syndrome and Fetal Alcohol Spectrum Disorders. *Am Fam Physician*. 96:515–522.
- Dimas P et al. 2019. CNS myelination and remyelination depend on fatty acid synthesis by oligodendrocytes. *Elife*. 8:e44702. doi: 10.7554/eLife.44702.
- Dixon-Salazar TJ et al. 2012. Exome sequencing can improve diagnosis and alter patient management. *Sci Transl Med*. 4:138ra78. doi: 10.1126/scitranslmed.3003544.
- Douglas RJ, Martin KAC. 2004. Neuronal circuits of the neocortex. *Annu Rev Neurosci*. 27:419–451. doi: 10.1146/annurev.neuro.27.070203.144152.
- Dragatsis I, Zeitlin S, Dietrich P. 2004. Huntingtin-associated protein 1 (Hap1) mutant mice bypassing the early postnatal lethality are neuroanatomically normal and fertile but display growth retardation. *Human Molecular Genetics*. 13:3115–3125. doi: 10.1093/hmg/ddh328.
- Duplomb L et al. 2014. Cohen syndrome is associated with major glycosylation defects. *Hum Mol Genet*. 23:2391–2399. doi: 10.1093/hmg/ddt630.
- Duplomb L et al. 2019. Serpin B1 defect and increased apoptosis of neutrophils in Cohen syndrome neutropenia. *J Mol Med (Berl)*. 97:633–645. doi: 10.1007/s00109-019-01754-4.
- Dyall SC et al. 2022. Polyunsaturated fatty acids and fatty acid-derived lipid mediators: Recent advances in the understanding of their biosynthesis, structures, and functions. *Prog Lipid Res*. 86:101165. doi: 10.1016/j.plipres.2022.101165.
- Dziurdzik SK, Conibear E. 2021. The Vps13 Family of Lipid Transporters and Its Role at Membrane Contact Sites. *Int J Mol Sci*. 22:2905. doi: 10.3390/ijms22062905.
- Egeland M, Zunszain PA, Pariante CM. 2015. Molecular mechanisms in the regulation of adult neurogenesis during stress. *Nat Rev Neurosci*. 16:189–200. doi: 10.1038/nrn3855.
- Ekblad M, Korkeila J, Lehtonen L. 2015. Smoking during pregnancy affects foetal brain development. *Acta Paediatrica*. 104:12–18. doi: 10.1111/apa.12791.
- EI Chehadeh S et al. 2010a. Search for the best indicators for the presence of a VPS13B gene mutation and confirmation of diagnostic criteria in a series of 34 patients genotyped for suspected Cohen syndrome. *J Med Genet*. 47:549–553. doi: 10.1136/jmg.2009.075028.
- EI Chehadeh-Djebbar S et al. 2013. Changing facial phenotype in Cohen syndrome: towards clues for an earlier diagnosis. *Eur J Hum Genet*. 21:736–742. doi: 10.1038/ejhg.2012.251.
- Elias WJ, Zheng ZA, Domer P, Quigg M, Pouratian N. 2012. Validation of connectivity-based thalamic segmentation with direct electrophysiologic recordings from human sensory thalamus. *Neuroimage*. 59:2025–2034. doi: 10.1016/j.neuroimage.2011.10.049.
- Ennaceur A, Delacour J. 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res*. 31:47–59. doi: 10.1016/0166-4328(88)90157-x.
- Enomoto Y et al. 2020. CNV analysis using whole exome sequencing identified biallelic CNVs of VPS13B in siblings with intellectual disability. *Eur J Med Genet*. 63:103610. doi: 10.1016/j.ejmg.2018.12.015.
- Eriksson PS et al. 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*. 4:1313–1317. doi: 10.1038/3305.

- Ernst A et al. 2014. Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell*. 156:1072–1083. doi: 10.1016/j.cell.2014.01.044.
- Falk MJ et al. 2004. Cohen syndrome in the Ohio Amish. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 128A:23–28. doi: 10.1002/ajmg.a.30033.
- Fan Q-W et al. 2002. Cholesterol-dependent modulation of dendrite outgrowth and microtubule stability in cultured neurons. *J Neurochem*. 80:178–190. doi: 10.1046/j.0022-3042.2001.00686.x.
- Fantini J, Barrantes FJ. 2009. Sphingolipid/cholesterol regulation of neurotransmitter receptor conformation and function. *Biochim Biophys Acta*. 1788:2345–2361. doi: 10.1016/j.bbamem.2009.08.016.
- Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T. 2000. Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. *Chem Phys Lipids*. 106:1–29. doi: 10.1016/s0009-3084(00)00128-6.
- Farwell KD et al. 2015. Enhanced utility of family-centered diagnostic exome sequencing with inheritance model-based analysis: results from 500 unselected families with undiagnosed genetic conditions. *Genet Med*. 17:578–586. doi: 10.1038/gim.2014.154.
- Fedorov A et al. 2012. 3D Slicer as an image computing platform for the Quantitative Imaging Network. *Magn Reson Imaging*. 30:1323–1341. doi: 10.1016/j.mri.2012.05.001.
- Fernando MB, Ahfeldt T, Brennand KJ. 2020. Modeling the complex genetic architectures of brain disease. *Nat Genet*. 52:363–369. doi: 10.1038/s41588-020-0596-3.
- Fester L et al. 2009. Cholesterol-promoted synaptogenesis requires the conversion of cholesterol to estradiol in the hippocampus. *Hippocampus*. 19:692–705. doi: 10.1002/hipo.20548.
- Finlay BL, Darlington RB. 1995. Linked regularities in the development and evolution of mammalian brains. *Science*. 268:1578–1584. doi: 10.1126/science.7777856.
- Foulkes AS et al. 2013. Mixed modeling of meta-analysis P-values (MixMAP) suggests multiple novel gene loci for low density lipoprotein cholesterol. *PLoS One*. 8:e54812. doi: 10.1371/journal.pone.0054812.
- Frankish A et al. 2021. GENCODE 2021. *Nucleic Acids Res*. 49:D916–D923. doi: 10.1093/nar/gkaa1087.
- Frega M et al. 2017. Rapid Neuronal Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells for Measuring Network Activity on Micro-electrode Arrays. *J Vis Exp*. 54900. doi: 10.3791/54900.
- Galvan C, Camoletto PG, Dotti CG, Aguzzi A, Ledesma MD. 2005. Proper axonal distribution of PrP(C) depends on cholesterol-sphingomyelin-enriched membrane domains and is developmentally regulated in hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci*. 30:304–315. doi: 10.1016/j.mcn.2005.07.003.
- Ghzawi A, Hirbawi H, Negida A, Abu-Farsakh H. 2021. A case of a Jordanian male twin with Cohen's syndrome, with genetic analysis and muscle biopsy; case report. *Ann Med Surg (Lond)*. 71:103014. doi: 10.1016/j.amsu.2021.103014.
- Goecke T, Majewski F, Kauther KD, Sterzel U. 1982. Mental retardation, hypotonia, obesity, ocular, facial, dental, and limb abnormalities (Cohen syndrome). Report of three patients. *Eur J Pediatr*. 138:338–340. doi: 10.1007/BF00442512.

- Gohlke JM, Griffith WC, Faustman EM. 2007. Computational models of neocortical neuronogenesis and programmed cell death in the developing mouse, monkey, and human. *Cereb Cortex*. 17:2433–2442. doi: 10.1093/cercor/bhl151.
- Goodall C. 1991. Procrustes Methods in the Statistical Analysis of Shape. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*. 53:285–321. doi: 10.1111/j.2517-6161.1991.tb01825.x.
- de Graaf-Peters VB, Hadders-Algra M. 2006. Ontogeny of the human central nervous system: what is happening when? *Early Hum Dev*. 82:257–266. doi: 10.1016/j.earlhumdev.2005.10.013.
- Green DR, Galluzzi L, Kroemer G. 2014. Cell biology. Metabolic control of cell death. *Science*. 345:1250256. doi: 10.1126/science.1250256.
- Grundy SM et al. 2004. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation*. 109:433–438. doi: 10.1161/01.CIR.0000111245.75752.C6.
- Guillén-Samander A et al. 2021. VPS13D bridges the ER to mitochondria and peroxisomes via Miro. *J Cell Biol*. 220:e202010004. doi: 10.1083/jcb.202010004.
- Guillén-Samander A, De Camilli P. 2022. Endoplasmic Reticulum Membrane Contact Sites, Lipid Transport, and Neurodegeneration. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. a041257. doi: 10.1101/cshperspect.a041257.
- Guy B, Zhang JS, Duncan LH, Johnston RJ. 2021. Human neural organoids: Models for developmental neurobiology and disease. *Developmental Biology*. 478:102–121. doi: 10.1016/j.ydbio.2021.06.012.
- Ha S, Stottmann RW, Furley AJ, Beier DR. 2015. A forward genetic screen in mice identifies mutants with abnormal cortical patterning. *Cereb Cortex*. 25:167–179. doi: 10.1093/cercor/bht209.
- Hager R, Lu L, Rosen GD, Williams RW. 2012. Genetic architecture supports mosaic brain evolution and independent brain–body size regulation. *Nat Commun*. 3:1079. doi: 10.1038/ncomms2086.
- Hall C, Ballachey EL. 1932. A study of the rat's behavior in a field. A contribution to method in comparative psychology. *University of California Publications in Psychology*. 6:1–12.
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. 404:293–296. doi: 10.1038/35005107.
- Harris, M.D JC, Harris, M.D JC. 2005. *Intellectual Disability: Understanding Its Development, Causes, Classification, Evaluation, and Treatment*. Oxford University Press: Oxford, New York.
- Hashmi JA et al. 2020. Homozygosity mapping and whole exome sequencing provide exact diagnosis of Cohen syndrome in a Saudi family. *Brain Dev*. 42:587–593. doi: 10.1016/j.braindev.2020.04.010.
- Hatten ME. 1993. The role of migration in central nervous system neuronal development. *Curr Opin Neurobiol*. 3:38–44. doi: 10.1016/0959-4388(93)90033-u.
- Hennies HC et al. 2004a. Allelic heterogeneity in the COH1 gene explains clinical variability in Cohen syndrome. *Am J Hum Genet*. 75:138–145. doi: 10.1086/422219.

- Herron BJ et al. 2002. Efficient generation and mapping of recessive developmental mutations using ENU mutagenesis. *Nat Genet.* 30:185–189. doi: 10.1038/ng812.
- Hodgkin AL, Huxley AF. 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of Physiology.* 117:500–544. doi: 10.1113/jphysiol.1952.sp004764.
- Hollville E, Deshmukh M. 2018. Physiological functions of non-apoptotic caspase activity in the nervous system. *Semin Cell Dev Biol.* 82:127–136. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.11.037.
- Hornemann T. 2021. Mini review: Lipids in Peripheral Nerve Disorders. *Neurosci Lett.* 740:135455. doi: 10.1016/j.neulet.2020.135455.
- Hrabé de Angelis MH et al. 2000. Genome-wide, large-scale production of mutant mice by ENU mutagenesis. *Nat Genet.* 25:444–447. doi: 10.1038/78146.
- Hu X et al. 2021. Identification of a Novel VPS13B Mutation in a Chinese Patient with Cohen Syndrome by Whole-Exome Sequencing. *Pharmgenomics Pers Med.* 14:1583–1589. doi: 10.2147/PGPM.S327252.
- Huang J, Zhu T, Qu Y, Mu D. 2016. Prenatal, Perinatal and Neonatal Risk Factors for Intellectual Disability: A Systemic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 11:e0153655. doi: 10.1371/journal.pone.0153655.
- Huang Y et al. 2021. A genome-wide association study of facial morphology identifies novel genetic loci in Han Chinese. *J Genet Genomics.* 48:198–207. doi: 10.1016/j.jgg.2020.10.004.
- Hussain G et al. 2019. Role of cholesterol and sphingolipids in brain development and neurological diseases. *Lipids in Health and Disease.* 18:26. doi: 10.1186/s12944-019-0965-z.
- Huynh K et al. 2020. Concordant peripheral lipidome signatures in two large clinical studies of Alzheimer's disease. *Nat Commun.* 11:5698. doi: 10.1038/s41467-020-19473-7.
- Jabaudon D. 2017. Fate and freedom in developing neocortical circuits. *Nat Commun.* 8:16042. doi: 10.1038/ncomms16042.
- Jinek M et al. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 337:816–821. doi: 10.1126/science.1225829.
- Karpf J, Turk J, Howlin P. 2004. Cognitive, language, and adaptive behavior profiles in individuals with a diagnosis of Cohen syndrome. *Clin Genet.* 65:327–332. doi: 10.1111/j.1399-0004.2004.00229.x.
- Katzaki E et al. 2007a. Clinical and molecular characterization of Italian patients affected by Cohen syndrome. *J. Hum. Genet.* 52:1011–1017. doi: 10.1007/s10038-007-0208-4.
- Kaushik P, Mahajan N, Girimaji SC, Kumar A. 2020. Whole Exome Sequencing Identifies a Novel Homozygous Duplication Mutation in the VPS13B Gene in an Indian Family with Cohen Syndrome. *J Mol Neurosci.* 70:1225–1228. doi: 10.1007/s12031-020-01530-x.
- Keays DA et al. 2007. Mutations in α -Tubulin Cause Abnormal Neuronal Migration in Mice and Lissencephaly in Humans. *Cell.* 128:45–57. doi: 10.1016/j.cell.2006.12.017.
- Kelsch W, Sim S, Lois C. 2010. Watching synaptogenesis in the adult brain. *Annu Rev Neurosci.* 33:131–149. doi: 10.1146/annurev-neuro-060909-153252.

- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. 1997. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*. 386:493–495. doi: 10.1038/386493a0.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 26:239–257. doi: 10.1038/bjc.1972.33.
- Kielar M et al. 2014. Mutations in Eml1 lead to ectopic progenitors and neuronal heterotopia in mouse and human. *Nat Neurosci*. 17:923–933. doi: 10.1038/nn.3729.
- Kim MJ et al. 2019. Spatial Learning and Motor Deficits in Vacuolar Protein Sorting-associated Protein 13b (Vps13b) Mutant Mouse. *Exp Neurobiol*. 28:485–494. doi: 10.5607/en.2019.28.4.485.
- Kitahara A, Toyota T, Kakizaki M, Goto Y. 1978. Activities of hepatic enzymes in spontaneous diabetes rats produced by selective breeding of normal Wistar rats. *Tohoku J Exp Med*. 126:7–11. doi: 10.1620/tjem.126.7.
- Kivitie-Kallio S, Norio R. 2001. Cohen syndrome: essential features, natural history, and heterogeneity. *Am J Med Genet*. 102:125–135. doi: 10.1002/1096-8628(20010801)102:2<125::aid-ajmg1439>3.0.co;2-0.
- Kivitie-Kallio S, Rajantie J, Juvonen E, Norio R. 1997. Granulocytopenia in Cohen syndrome. *Br J Haematol*. 98:308–311. doi: 10.1046/j.1365-2141.1997.2323049.x.
- Klingenberg CP, Barluenga M, Meyer A. 2002. Shape Analysis of Symmetric Structures: Quantifying Variation Among Individuals and Asymmetry. *Evolution*. 56:1909–1920. doi: 10.1111/j.0014-3820.2002.tb00117.x.
- Ko M et al. 2005. Cholesterol-mediated Neurite Outgrowth Is Differently Regulated between Cortical and Hippocampal Neurons *. *Journal of Biological Chemistry*. 280:42759–42765. doi: 10.1074/jbc.M509164200.
- Kochinke K et al. 2016. Systematic Phenomics Analysis Deconvolutes Genes Mutated in Intellectual Disability into Biologically Coherent Modules. *Am J Hum Genet*. 98:149–164. doi: 10.1016/j.ajhg.2015.11.024.
- Koehler K et al. 2020. A novel homozygous nonsense mutation of VPS13B associated with previously unreported features of Cohen syndrome. *Am J Med Genet A*. 182:570–575. doi: 10.1002/ajmg.a.61435.
- Koenig KA et al. 2019. The role of the thalamus and hippocampus in episodic memory performance in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler*. 25:574–584. doi: 10.1177/1352458518760716.
- Koike S, Jahn R. 2019. SNAREs define targeting specificity of trafficking vesicles by combinatorial interaction with tethering factors. *Nat Commun*. 10:1608. doi: 10.1038/s41467-019-09617-9.
- Kolehmainen J et al. 2003. Cohen Syndrome Is Caused by Mutations in a Novel Gene, COH1, Encoding a Transmembrane Protein with a Presumed Role in Vesicle-Mediated Sorting and Intracellular Protein Transport. *Am J Hum Genet*. 72:1359–1369.
- Kolehmainen J et al. 2004. Delineation of Cohen syndrome following a large-scale genotype-phenotype screen. *Am J Hum Genet*. 75:122–127. doi: 10.1086/422197.
- Kondo I et al. 2005. COH1 analysis and linkage study in two Japanese families with Cohen syndrome. *Clin Genet*. 67:270–272. doi: 10.1111/j.1399-0004.2005.00396.x.

- Kornack DR, Rakic P. 1999. Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:5768–5773. doi: 10.1073/pnas.96.10.5768.
- Kosicek M, Hecimovic S. 2013. Phospholipids and Alzheimer’s disease: alterations, mechanisms and potential biomarkers. *Int J Mol Sci*. 14:1310–1322. doi: 10.3390/ijms14011310.
- Kotani T, Kirisako H, Koizumi M, Ohsumi Y, Nakatogawa H. 2018. The Atg2-Atg18 complex tethers pre-autophagosomal membranes to the endoplasmic reticulum for autophagosome formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 115:10363–10368. doi: 10.1073/pnas.1806727115.
- Kraeuter A-K, Guest PC, Sarnyai Z. 2019. The Y-Maze for Assessment of Spatial Working and Reference Memory in Mice. *Methods Mol Biol*. 1916:105–111. doi: 10.1007/978-1-4939-8994-2_10.
- van Kruijning D et al. 2020. Sphingolipids as prognostic biomarkers of neurodegeneration, neuroinflammation, and psychiatric diseases and their emerging role in lipidomic investigation methods. *Adv Drug Deliv Rev*. 159:232–244. doi: 10.1016/j.addr.2020.04.009.
- Kumar M, Katyal A. 2018. Data on retinoic acid and reduced serum concentration induced differentiation of Neuro-2a neuroblastoma cells. *Data in Brief*. 21:2435–2440. doi: 10.1016/j.dib.2018.11.097.
- Kumar N et al. 2018. VPS13A and VPS13C are lipid transport proteins differentially localized at ER contact sites. *J Cell Biol*. 217:3625–3639. doi: 10.1083/jcb.201807019.
- Kunzler A et al. 2017. Changes in Cell Cycle and Up-Regulation of Neuronal Markers During SH-SY5Y Neurodifferentiation by Retinoic Acid are Mediated by Reactive Species Production and Oxidative Stress. *Mol Neurobiol*. 54:6903–6916. doi: 10.1007/s12035-016-0189-4.
- Lam Y-W, Sherman SM. 2010. Functional Organization of the Somatosensory Cortical Layer 6 Feedback to the Thalamus. *Cereb Cortex*. 20:13–24. doi: 10.1093/cercor/bhp077.
- Lancaster MA, Knoblich JA. 2014. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc*. 9:2329–2340. doi: 10.1038/nprot.2014.158.
- Lazarov O, Hollands C. 2016. Hippocampal neurogenesis: learning to remember. *Prog Neurobiol*. 138–140:1–18. doi: 10.1016/j.pneurobio.2015.12.006.
- Lee Y-K, Lee S-K, et al. 2020. Autophagy pathway upregulation in a human iPSC-derived neuronal model of Cohen syndrome with VPS13B missense mutations. *Mol Brain*. 13:69. doi: 10.1186/s13041-020-00611-7.
- Lee Y-K, Hwang S-K, et al. 2020. Cohen Syndrome Patient iPSC-Derived Neurospheres and Forebrain-Like Glutamatergic Neurons Reveal Reduced Proliferation of Neural Progenitor Cells and Altered Expression of Synapse Genes. *J Clin Med*. 9:1886. doi: 10.3390/jcm9061886.
- Lees JA, Reinisch KM. 2020. A role for Vps13 and Chorein-N motif proteins as inter-organelle lipid transfer channels? *Curr Opin Cell Biol*. 65:66–71. doi: 10.1016/j.ceb.2020.02.008.
- Lei W, Li W, Ge L, Chen G. 2019. Non-engineered and Engineered Adult Neurogenesis in Mammalian Brains. *Frontiers in Neuroscience*. 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2019.00131> (Accessed April 2, 2023).
- Lemmon MA. 2007. Pleckstrin homology (PH) domains and phosphoinositides. *Biochem Soc Symp*. 81–93. doi: 10.1042/BSS0740081.

- Lenth RV. 2021. Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means [R package emmeans version 1.7.0]. <https://www.scinapse.io/papers/3089169625> (Accessed March 29, 2023).
- Lesage S et al. 2016. Loss of VPS13C Function in Autosomal-Recessive Parkinsonism Causes Mitochondrial Dysfunction and Increases PINK1/Parkin-Dependent Mitophagy. *Am J Hum Genet.* 98:500–513. doi: 10.1016/j.ajhg.2016.01.014.
- Levitt P. 2003. Structural and functional maturation of the developing primate brain. *The Journal of Pediatrics.* 143:35–45. doi: 10.1067/S0022-3476(03)00400-1.
- Lhussiez V et al. 2020. Cohen Syndrome-Associated Cataract Is Explained by VPS13B Functions in Lens Homeostasis and Is Modified by Additional Genetic Factors. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 61:18. doi: 10.1167/iovs.61.11.18.
- Li L, Bu X, Ji Y, Tan P, Liu S. 2021. A Novel Homozygous VPS13B Splice-Site Mutation Causing the Skipping of Exon 38 in a Chinese Family With Cohen Syndrome. *Front Pediatr.* 9:651621. doi: 10.3389/fped.2021.651621.
- Li M et al. 2016. The Association of Maternal Obesity and Diabetes With Autism and Other Developmental Disabilities. *Pediatrics.* 137:e20152206. doi: 10.1542/peds.2015-2206.
- Li P, Lees JA, Lusk CP, Reinisch KM. 2020. Cryo-EM reconstruction of a VPS13 fragment reveals a long groove to channel lipids between membranes. *J Cell Biol.* 219:e202001161. doi: 10.1083/jcb.202001161.
- Limoge F et al. 2015. Insulin response dysregulation explains abnormal fat storage and increased risk of diabetes mellitus type 2 in Cohen Syndrome. *Hum Mol Genet.* 24:6603–6613. doi: 10.1093/hmg/ddv366.
- Lindner L et al. 2021. Droplet digital PCR or quantitative PCR for in-depth genomic and functional validation of genetically altered rodents. *Methods.* 191:107–119. doi: 10.1016/j.ymeth.2021.04.001.
- Liu L-K, Choudhary V, Toulmay A, Prinz WA. 2017. An inducible ER–Golgi tether facilitates ceramide transport to alleviate lipotoxicity. *J Cell Biol.* 216:131–147. doi: 10.1083/jcb.201606059.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods.* 25:402–8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- Maccione A et al. 2015. Microelectronics, bioinformatics and neurocomputation for massive neuronal recordings in brain circuits with large scale multielectrode array probes. *Brain Research Bulletin.* 119:118–126. doi: 10.1016/j.brainresbull.2015.07.008.
- Madison KC, Howard EJ. 1996. Ceramides are transported through the Golgi apparatus in human keratinocytes in vitro. *J Invest Dermatol.* 106:1030–1035. doi: 10.1111/1523-1747.ep12338596.
- Mann J, McDermott S, Hardin J, Pan C, Zhang Z. 2013. Pre-pregnancy body mass index, weight change during pregnancy, and risk of intellectual disability in children. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology.* 120:309–319. doi: 10.1111/1471-0528.12052.
- Mariën P, Borgatti R. 2018. Language and the cerebellum. *Handb Clin Neurol.* 154:181–202. doi: 10.1016/B978-0-444-63956-1.00011-4.
- Marrus N, Hall L. 2017. Intellectual Disability and Language Disorder. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am.* 26:539–554. doi: 10.1016/j.chc.2017.03.001.

- Martin RE, Bazan NG. 1992. Changing fatty acid content of growth cone lipids prior to synaptogenesis. *J Neurochem.* 59:318–325. doi: 10.1111/j.1471-4159.1992.tb08906.x.
- Massa G, Doms L, Vanderschueren-Lodeweyckx M. 1991. Growth hormone deficiency in a girl with the Cohen syndrome. *J Med Genet.* 28:48–50. doi: 10.1136/jmg.28.1.48.
- McManus MF, Nasrallah IM, Gopal PP, Baek WS, Golden JA. 2004. Axon mediated interneuron migration. *J Neuropathol Exp Neurol.* 63:932–941. doi: 10.1093/jnen/63.9.932.
- Melville SA et al. 2012. Multiple Loci Influencing Hippocampal Degeneration Identified by Genome Scan. *Ann Neurol.* 72:65–75. doi: 10.1002/ana.23644.
- Menéndez L, Lastra A, Hidalgo A, Baamonde A. 2002. Unilateral hot plate test: a simple and sensitive method for detecting central and peripheral hyperalgesia in mice. *Journal of Neuroscience Methods.* 113:91–97. doi: 10.1016/S0165-0270(01)00483-6.
- Mikhaleva A, Kannan M, Wagner C, Yalcin B. 2016. Histomorphological Phenotyping of the Adult Mouse Brain. *Curr Protoc Mouse Biol.* 6:307–332. doi: 10.1002/cpmo.12.
- Miller KD. 2003. Understanding Layer 4 of the Cortical Circuit: A Model Based on Cat V1. *Cerebral Cortex.* 13:73–82. doi: 10.1093/cercor/13.1.73.
- Mira H, Morante J. 2020. Neurogenesis From Embryo to Adult – Lessons From Flies and Mice. *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2020.00533> (Accessed April 3, 2023).
- Moberg S, Takahashi N. 2022. Neocortical layer 5 subclasses: From cellular properties to roles in behavior. *Front Synaptic Neurosci.* 14:1006773. doi: 10.3389/fnsyn.2022.1006773.
- Mochida GH et al. 2004a. Broader geographical spectrum of Cohen syndrome due to COH1 mutations. *J Med Genet.* 41:e87. doi: 10.1136/jmg.2003.014779.
- Momtazmanesh S et al. 2020. A novel VPS13B mutation in Cohen syndrome: a case report and review of literature. *BMC Medical Genetics.* 21:140. doi: 10.1186/s12881-020-01075-1.
- Monk CS, Webb SJ, Nelson CA. 2001. Prenatal neurobiological development: molecular mechanisms and anatomical change. *Dev Neuropsychol.* 19:211–236. doi: 10.1207/S15326942DN1902_5.
- Morris R. 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods.* 11:47–60. doi: 10.1016/0165-0270(84)90007-4.
- Mrugacz M, Sredzinska-Kita D, Bakunowicz-Lazarczyk A. 2005. Pediatric ophthalmologic findings of Cohen syndrome in twins. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus.* 42:54–56. doi: 10.3928/01913913-20050101-08.
- Muñoz-Braceras S, Tornero-Écija AR, Vincent O, Escalante R. 2019. VPS13A is closely associated with mitochondria and is required for efficient lysosomal degradation. *Dis Model Mech.* 12:dmm036681. doi: 10.1242/dmm.036681.
- Murphy A-M, Flanagan O, Dunne K, Lynch S-A. 2007. High prevalence of Cohen syndrome among Irish travellers. *Clinical Dysmorphology.* 16:257. doi: 10.1097/MCD.0b013e3282742530.
- Nagy A. 2000. Cre recombinase: The universal reagent for genome tailoring. *genesis.* 26:99–109. doi: 10.1002/(SICI)1526-968X(200002)26:2<99::AID-GENE1>3.0.CO;2-B.

- Naudí A et al. 2015. Lipidomics of human brain aging and Alzheimer's disease pathology. *Int Rev Neurobiol.* 122:133–189. doi: 10.1016/bs.irn.2015.05.008.
- Neri G, Schwartz CE, Lubs HA, Stevenson RE. 2018. X-linked intellectual disability update 2017. *Am J Med Genet A.* 176:1375–1388. doi: 10.1002/ajmg.a.38710.
- Nguyen S, Kannan M, Gaborit M, Collins SC, Yalcin B. 2022. Quantitative Neuroanatomical Phenotyping of the Embryonic Mouse Brain. *Curr Protoc.* 2:e509. doi: 10.1002/cpz1.509.
- Nishizono H, Hayano Y, Nakahata Y, Ishigaki Y, Yasuda R. 2021. Rapid generation of conditional knockout mice using the CRISPR-Cas9 system and electroporation for neuroscience research. *Molecular Brain.* 14:148. doi: 10.1186/s13041-021-00859-7.
- Olsen ASB, Færgeman NJ. 2017. Sphingolipids: membrane microdomains in brain development, function and neurological diseases. *Open Biol.* 7:170069. doi: 10.1098/rsob.170069.
- Olson EC, Walsh CA. 2002. Smooth, rough and upside-down neocortical development. *Curr Opin Genet Dev.* 12:320–327. doi: 10.1016/s0959-437x(02)00305-2.
- Osborn AG, Digre KB, eds. 2016. Congenital Malformations Overview. In: *Imaging in Neurology.* Elsevier pp. 10–13. doi: 10.1016/B978-0-323-44781-2.50009-7.
- Pavlovsky A, Chelly J, Billuart P. 2012. Emerging major synaptic signaling pathways involved in intellectual disability. *Mol Psychiatry.* 17:682–693. doi: 10.1038/mp.2011.139.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. 1985. Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods.* 14:149–167. doi: 10.1016/0165-0270(85)90031-7.
- Periyasamy S et al. 2017. Association Studies of Specific Cholesterol Related Genes (APOE, LPL, and CETP) with Lipid Profile and Memory Function: A Correlative Study Among Rural and Tribal Population of Dharmapuri District, India. *Journal of Alzheimer's Disease.* 60:S195–S207. doi: 10.3233/JAD-170272.
- Petrelli B, Bendelac L, Hicks GG, Fainsod A. 2019. Insights into retinoic acid deficiency and the induction of craniofacial malformations and microcephaly in fetal alcohol spectrum disorder. *Genesis.* 57:e23278. doi: 10.1002/dvg.23278.
- Piatti V, Ewell L, Leutgeb J. 2013. Neurogenesis in the dentate gyrus: carrying the message or dictating the tone. *Frontiers in Neuroscience.* 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2013.00050> (Accessed March 13, 2023).
- Piomelli D, Astarita G, Rapaka R. 2007. A neuroscientist's guide to lipidomics. *Nat Rev Neurosci.* 8:743–754. doi: 10.1038/nrn2233.
- Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. 1978. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur. J. Pharmacol.* 47:379–391. doi: 10.1016/0014-2999(78)90118-8.
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. 1977. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 229:327–336.
- Qiang L, Yu W, Andreadis A, Luo M, Baas PW. 2006. Tau Protects Microtubules in the Axon from Severing by Katanin. *J Neurosci.* 26:3120–3129. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5392-05.2006.

- Rafiq MA et al. 2015. Novel VPS13B Mutations in Three Large Pakistani Cohen Syndrome Families Suggests a Baloch Variant with Autistic-Like Features. *BMC Med Genet.* 16:41. doi: 10.1186/s12881-015-0183-0.
- Rakic P, Cameron RS, Komuro H. 1994. Recognition, adhesion, transmembrane signaling and cell motility in guided neuronal migration. *Curr Opin Neurobiol.* 4:63–69. doi: 10.1016/0959-4388(94)90033-7.
- Rakusiewicz K et al. 2021. Coexistence of bilateral macular edema and pale optic disc in the patient with Cohen syndrome. *Open Med (Wars).* 16:156–160. doi: 10.1515/med-2021-0208.
- Rampoldi L et al. 2001. A conserved sorting-associated protein is mutant in chorea-acanthocytosis. *Nat Genet.* 28:119–120. doi: 10.1038/88821.
- Ramseyer VD, Kimler VA, Granneman JG. 2018. Vacuolar protein sorting 13C is a novel lipid droplet protein that inhibits lipolysis in brown adipocytes. *Mol Metab.* 7:57–70. doi: 10.1016/j.molmet.2017.10.014.
- Razavi A, Jafarpour H, Khosravi MR, Abbasi G, Dabbaghzadeh A. 2021. A VPS13B mutation in Cohen syndrome presented with petechiae: An unusual presentation. *Clin Case Rep.* 9:e04492. doi: 10.1002/ccr3.4492.
- Rejeb I et al. 2017a. First case report of Cohen syndrome in the Tunisian population caused by VPS13B mutations. *BMC Med. Genet.* 18:134. doi: 10.1186/s12881-017-0493-5.
- Rhinn M, Picker A, Brand M. 2006. Global and local mechanisms of forebrain and midbrain patterning. *Curr Opin Neurobiol.* 16:5–12. doi: 10.1016/j.conb.2006.01.005.
- Rivera-Brugués N et al. 2011. Cohen syndrome diagnosis using whole genome arrays. *J Med Genet.* 48:136–140. doi: 10.1136/jmg.2010.082206.
- Robles RM, Domínguez-Sala E, Martínez S, Geijo-Barrientos E. 2020. Layer 2/3 Pyramidal Neurons of the Mouse Granular Retrosplenial Cortex and Their Innervation by Cortico-Cortical Axons. *Front Neural Circuits.* 14:576504. doi: 10.3389/fncir.2020.576504.
- Rolando C, Taylor V. 2014. Chapter Seven - Neural Stem Cell of the Hippocampus: Development, Physiology Regulation, and Dysfunction in Disease. In: *Current Topics in Developmental Biology.* Rendl, M, editor. Stem Cells in Development and Disease Vol. 107 Academic Press pp. 183–206. doi: 10.1016/B978-0-12-416022-4.00007-X.
- Rolfe S et al. 2021. SlicerMorph: An open and extensible platform to retrieve, visualize and analyse 3D morphology. *Methods in Ecology and Evolution.* 12:1816–1825. doi: 10.1111/2041-210X.13669.
- Ropers H-H, Hamel BCJ. 2005. X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet.* 6:46–57. doi: 10.1038/nrg1501.
- Rubio-Garrido P, Pérez-de-Manzo F, Porrero C, Galazo MJ, Clascá F. 2009. Thalamic input to distal apical dendrites in neocortical layer 1 is massive and highly convergent. *Cereb Cortex.* 19:2380–2395. doi: 10.1093/cercor/bhn259.
- Rudemo M. 2000. *Statistical Shape Analysis.* I. L. Dryden and K. V. Mardia, Wiley, Chichester 1998. No. of pages: xvii+347. Price: £60.00. ISBN 0-471-95816-6. *Statistics in Medicine.* 19:2716–2717. doi: 10.1002/1097-0258(20001015)19:19<2716::AID-SIM590>3.0.CO;2-O.

- Russell WL et al. 1979. Specific-locus test shows ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76:5818–5819. doi: 10.1073/pnas.76.11.5818.
- Sabitha KR, Shetty AK, Upadhy D. 2021. Patient-derived iPSC modeling of rare neurodevelopmental disorders: Molecular pathophysiology and prospective therapies. *Neurosci Biobehav Rev*. 121:201–219. doi: 10.1016/j.neubiorev.2020.12.025.
- Salvador-Carulla L, Symonds S. 2016. Health services use and costs in people with intellectual disability: building a context knowledge base for evidence-informed policy. *Curr Opin Psychiatry*. 29:89–94. doi: 10.1097/YCO.000000000000237.
- Sanlaville D et al. 2005. La CGH microarray : principe et applications en pathologie constitutionnelle. *Archives de Pédiatrie*. 12:1515–1520. doi: 10.1016/j.arcped.2005.07.014.
- Schwarz A, Rapaport E, Hirschberg K, Futerman AH. 1995. A regulatory role for sphingolipids in neuronal growth. Inhibition of sphingolipid synthesis and degradation have opposite effects on axonal branching. *J Biol Chem*. 270:10990–10998. doi: 10.1074/jbc.270.18.10990.
- Segeritz C-P, Vallier L. 2017. Chapter 9 - Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro. In: *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. Jalali, Morteza, Saldanha, FYL, & Jalali, Mehdi, editors. Academic Press: Boston pp. 151–172. doi: 10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6.
- Seifert W et al. 2011. Cohen syndrome-associated protein, COH1, is a novel, giant Golgi matrix protein required for Golgi integrity. *J Biol Chem*. 286:37665–37675. doi: 10.1074/jbc.M111.267971.
- Seifert W et al. 2015. Cohen syndrome-associated protein COH1 physically and functionally interacts with the small GTPase RAB6 at the Golgi complex and directs neurite outgrowth. *J Biol Chem*. 290:3349–3358. doi: 10.1074/jbc.M114.608174.
- Seifert W et al. 2009. Expanded mutational spectrum in Cohen syndrome, tissue expression, and transcript variants of COH1. *Hum Mutat*. 30:E404-420. doi: 10.1002/humu.20886.
- Seifert W et al. 2006. Mutational spectrum of COH1 and clinical heterogeneity in Cohen syndrome. *J Med Genet*. 43:e22. doi: 10.1136/jmg.2005.039867.
- Seong E et al. 2018. Mutations in VPS13D lead to a new recessive ataxia with spasticity and mitochondrial defects. *Ann Neurol*. 83:1075–1088. doi: 10.1002/ana.25220.
- Stark Z et al. 2016. A prospective evaluation of whole-exome sequencing as a first-tier molecular test in infants with suspected monogenic disorders. *Genet Med*. 18:1090–1096. doi: 10.1038/gim.2016.1.
- Starowicz-Filip A et al. 2017. The Role of the Cerebellum in the Regulation of Language Functions. *Psychiatria Polska*. 51:661–671. doi: 10.12740/PP/68547.
- Stassart RM, Möbius W, Nave K-A, Edgar JM. 2018. The Axon-Myelin Unit in Development and Degenerative Disease. *Front Neurosci*. 12:467. doi: 10.3389/fnins.2018.00467.
- Stern CD. 2001. Initial patterning of the central nervous system: how many organizers? *Nat Rev Neurosci*. 2:92–98. doi: 10.1038/35053563.
- Stevenson RE, Schwartz CE. 2002. Clinical and molecular contributions to the understanding of X-linked mental retardation. *Cytogenet Genome Res*. 99:265–275. doi: 10.1159/000071603.

- Summanen P, Kivittie-Kallio S, Norio R, Raitta C, Kivelä T. 2002. Mechanisms of myopia in Cohen syndrome mapped to chromosome 8q22. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43:1686–1693.
- Taban M, Memoracion-Peralta DSA, Wang H, Al-Gazali LI, Traboulsi EI. 2007. Cohen syndrome: report of nine cases and review of the literature, with emphasis on ophthalmic features. *J AAPOS.* 11:431–437. doi: 10.1016/j.jaapos.2007.01.118.
- Tahvanainen E et al. 1994. Cohen syndrome gene assigned to the long arm of chromosome 8 by linkage analysis. *Nat Genet.* 7:201–204. doi: 10.1038/ng0694-201.
- Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell.* 126:663–676. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- Tau GZ, Peterson BS. 2010. Normal Development of Brain Circuits. *Neuropsychopharmacol.* 35:147–168. doi: 10.1038/npp.2009.115.
- Telley L et al. 2016. Sequential transcriptional waves direct the differentiation of newborn neurons in the mouse neocortex. *Science.* 351:1443–1446. doi: 10.1126/science.aad8361.
- Thion MS, Garel S. 2017. On place and time: microglia in embryonic and perinatal brain development. *Current Opinion in Neurobiology.* 47:121–130. doi: 10.1016/j.conb.2017.10.004.
- Thomson A. 2010. Neocortical layer 6, a review. *Frontiers in Neuroanatomy.* 4. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnana.2010.00013> (Accessed September 28, 2023).
- Tjio JH, Levan A. 1956. The Chromosome Number of Man. *Hereditas.* 42:1–6. doi: 10.1111/j.1601-5223.1956.tb03010.x.
- Valtorta F, Leoni C. 1999. Molecular mechanisms of neurite extension. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 354:387–394.
- Velayos-Baeza A, Vettori A, Copley RR, Dobson-Stone C, Monaco AP. 2004. Analysis of the human VPS13 gene family. *Genomics.* 84:536–549. doi: 10.1016/j.ygeno.2004.04.012.
- Waite A et al. 2010a. Cerebellar hypoplasia and Cohen syndrome: a confirmed association. *Am J Med Genet A.* 152A:2390–2393. doi: 10.1002/ajmg.a.33569.
- Wang H. 2014. Lipid rafts: a signaling platform linking cholesterol metabolism to synaptic deficits in autism spectrum disorders. *Front Behav Neurosci.* 8:104. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00104.
- Wang H, Falk MJ, Wensel C, Traboulsi EI. 2016. *Cohen Syndrome*. University of Washington, Seattle <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1482/> (Accessed February 23, 2023).
- Wang J et al. 2021. An ESCRT-dependent step in fatty acid transfer from lipid droplets to mitochondria through VPS13D–TSG101 interactions. *Nat Commun.* 12:1252. doi: 10.1038/s41467-021-21525-5.
- Ward LM. 2011. The thalamic dynamic core theory of conscious experience. *Consciousness and Cognition.* 20:464–486. doi: 10.1016/j.concog.2011.01.007.
- Weninger WJ et al. 2006. High-resolution episcopic microscopy: a rapid technique for high detailed 3D analysis of gene activity in the context of tissue architecture and morphology. *Anat Embryol (Berl).* 211:213–221. doi: 10.1007/s00429-005-0073-x.

- Xiao Y et al. 2013. The Atypical Guanine Nucleotide Exchange Factor Dock4 Regulates Neurite Differentiation through Modulation of Rac1 GTPase and Actin Dynamics. *J Biol Chem.* 288:20034–20045. doi: 10.1074/jbc.M113.458612.
- Xu J, Huang X. 2020. Lipid Metabolism at Membrane Contacts: Dynamics and Functions Beyond Lipid Homeostasis. *Front Cell Dev Biol.* 8:615856. doi: 10.3389/fcell.2020.615856.
- Yao Z et al. 2021. A taxonomy of transcriptomic cell types across the isocortex and hippocampal formation. *Cell.* 184:3222-3241.e26. doi: 10.1016/j.cell.2021.04.021.
- Yeshaw WM et al. 2019. Human VPS13A is associated with multiple organelles and influences mitochondrial morphology and lipid droplet motility. *Elife.* 8:e43561. doi: 10.7554/eLife.43561.
- Yoon JH et al. 2022. Brain lipidomics: From functional landscape to clinical significance. *Sci Adv.* 8:eadc9317. doi: 10.1126/sciadv.adc9317.
- Zhang J, Liu Q. 2015. Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. *Protein Cell.* 6:254–264. doi: 10.1007/s13238-014-0131-3.
- Zhao S et al. 2019. Case report: two novel VPS13B mutations in a Chinese family with Cohen syndrome and hyperlinear palms. *BMC Med Genet.* 20:187. doi: 10.1186/s12881-019-0920-x.
- Zhao X-S et al. 2017. Hyperlipidemia-induced apoptosis of hippocampal neurons in apoE(-/-) mice may be associated with increased PCSK9 expression. *Mol Med Rep.* 15:712–718. doi: 10.3892/mmr.2016.6055.
- Zimmerman SM et al. 2022. Spatially resolved whole transcriptome profiling in human and mouse tissue using Digital Spatial Profiling. *Genome Res.* 32:1892–1905. doi: 10.1101/gr.276206.121.

Méthodes Annexes

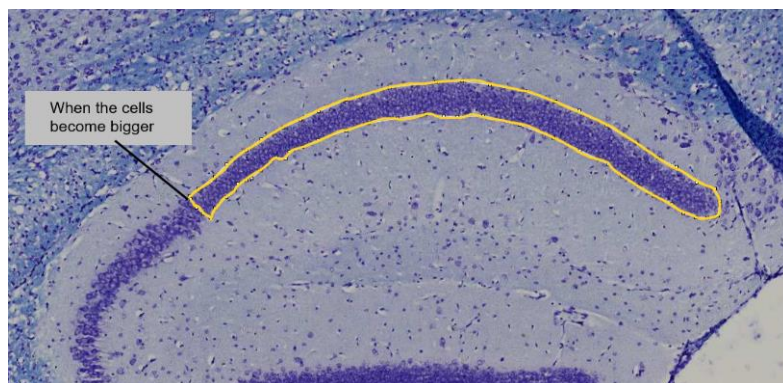
1. Etude approfondie de la neuroanatomie de l'hippocampe

Abréviations :

- **CA1_area** = couche CA1 de l'hippocampe
- **CA2/3_area** = couches CA2 + CA3 de l'hippocampe
- **DGupp_area** = bras supérieur du gyrus denté
- **DGlow_area** = bras inférieur du gyrus denté
- **DGmol_area** = couche moléculaire du gyrus denté
- **DGpoly_area** = couche polymorphique du gyrus denté

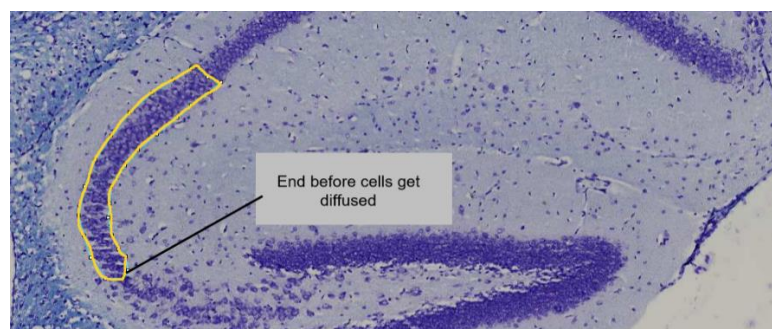
Indications :

- 1) Mesure de l'aire de la couche CA1 (**X4_CA1_area**) :

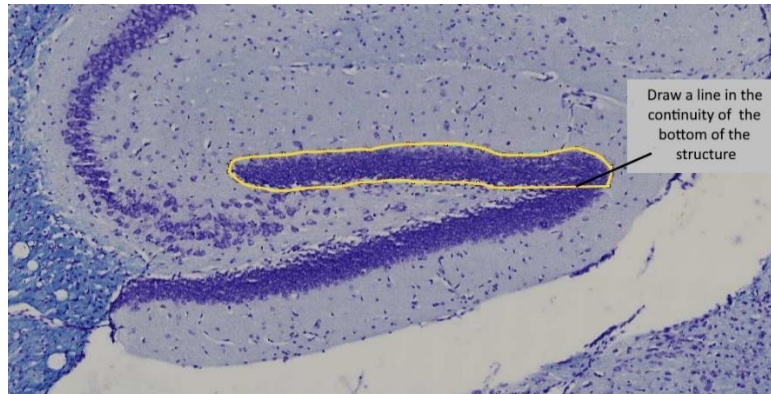


- 2) Mesure de l'aire des couches CA2 + CA3 (**X4_CA2/3_area**) :

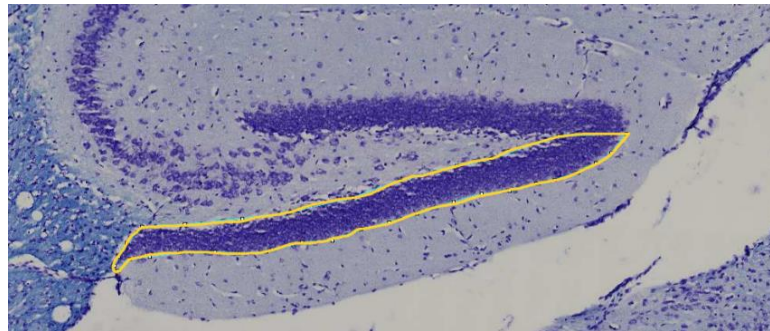
Note: Etant donné que la délimitation entre les couches CA2 et C3 n'est pas toujours évidente à identifier, nous mesurons les couches CA2 et CA3 ensemble.



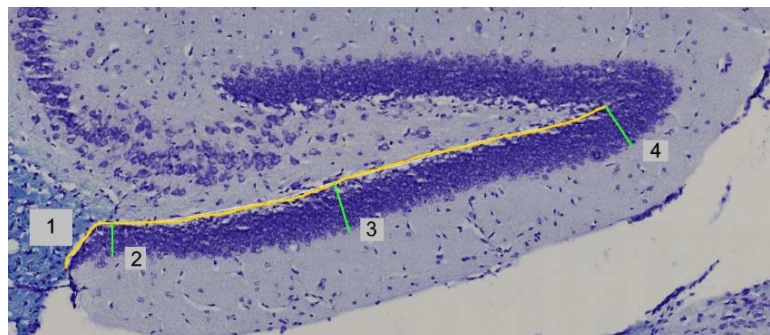
3) Mesure de l'aire du bras supérieur du gyrus denté (**4X_DGupp_area**).



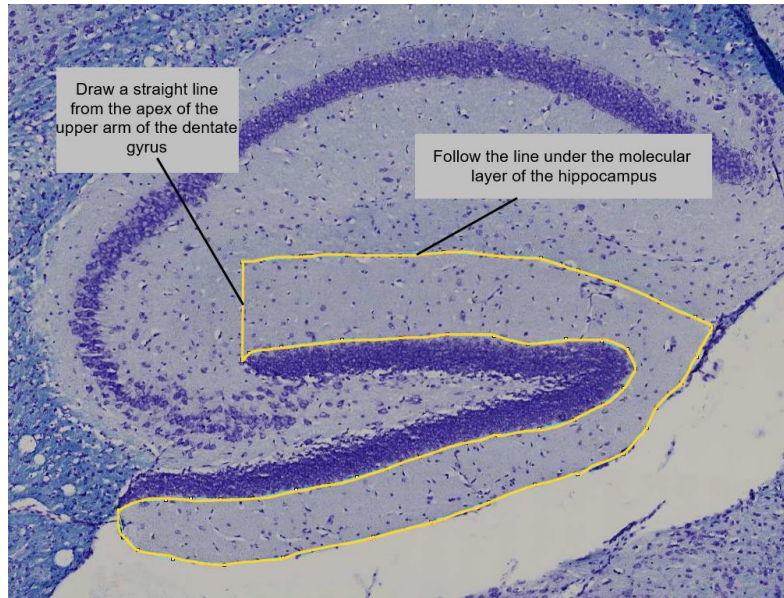
4) Mesure de l'aire du bras inférieur du gyrus denté (**4X_DGlow_area**).



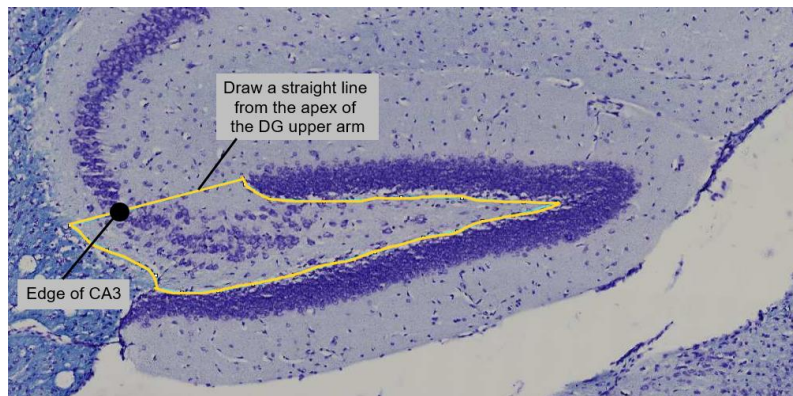
5) Mesure de la longueur (**4X_DGlow_length**) et de l'épaisseur, au début, au milieu et à la fin du bras inférieur du gyrus denté (**4X_DGlow_thickness1** (2) ; **4X_DGlow_thickness2** (3) ; **4X_DGlow_thickness3** (4))



6) Mesure de l'aire de la couche moléculaire du gyrus denté (**4X_DGmol_area**) :



7) Mesure de l'aire de la couche polymorphique du gyrus denté (**4X_DGpol_area**)



2. Etude approfondie de la neuroanatomie du cortex

Abréviations :

- **TCTX_lay1** = Couche I ou couche moléculaire. Cette couche contient uniquement quelques cellules.

- **TCTX_lay2-3** = Couche II ou couche granulaire externe et couche III ou couche pyramidale externe. Ces couches contiennent des neurons de taille moyenne organisés en réseaux verticaux.

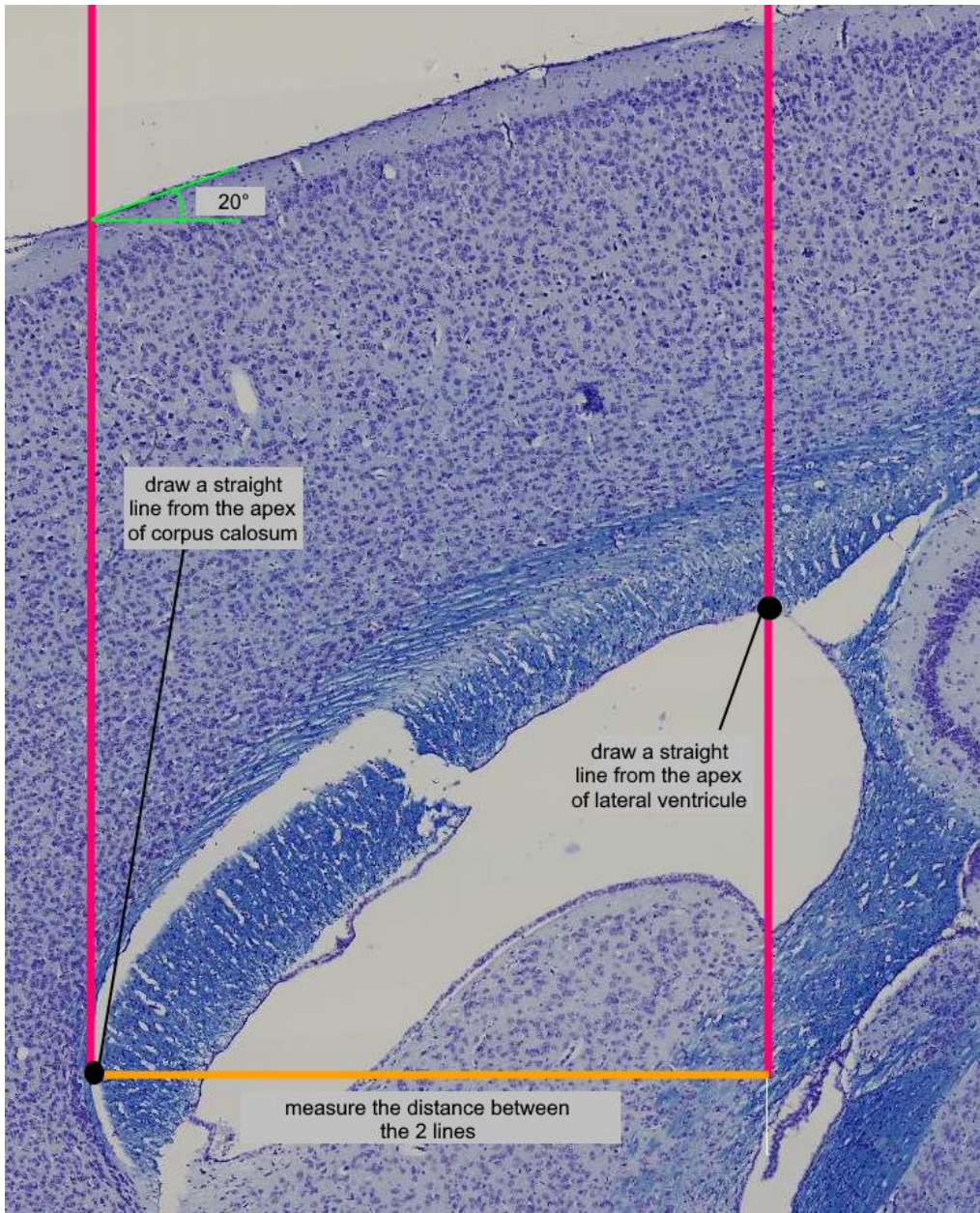
- **TCTX_lay5** = Couche V ou couche pyramidale interne. Cette couche contient de larges cellules pyramidales sans organisation spécifique.

- **TCTX_lay6a** = Couche VI ou couche multiforme. Cette couche contient des petites cellules organisées en réseaux horizontaux.

Indications :

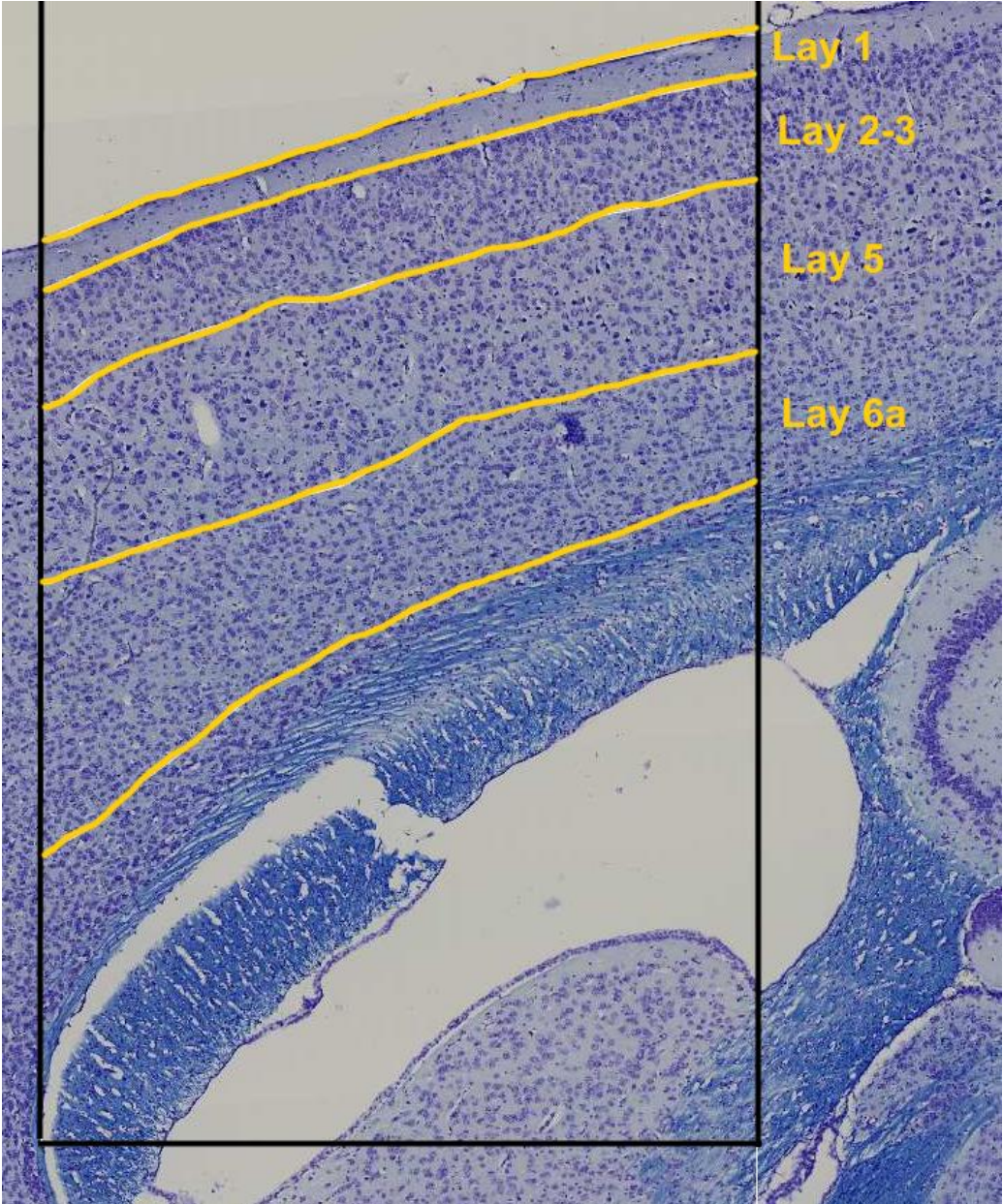
Préparation : Etant donné que tous les repères doivent être les mêmes sur chaque image, la première étape de l'analyse est de « préparer » les images.

- 1) Premièrement, tracer une ligne verticale pour délimiter l'apex du corps calleux (rose). Puis mesurer l'angle formé avec la limite supérieure du cortex. Cet angle doit être le même pour toutes les images d'une même cohorte. Si ce n'est pas le cas, les images devront être transformées par rotation.
- 2) Ensuite, tracer une autre ligne verticale pour délimiter l'apex du ventricule latéral (rose) et mesurer la distance entre les deux lignes roses. Prendre cette mesure sur toutes les images d'une même cohorte. La plus petite distance enregistrée servira de références pour toutes les images. Par exemple, si la plus petite distance mesurée est 0,18cm, toutes les autres mesures seront effectuées sur une portion de cortex de 0,18 cm de largeur (en commençant par l'apex du corps calleux).



Mesure :

Mesurer l'aire et compter le nombre de cellules à l'intérieur de chaque couche comme indiqué ci-dessous.



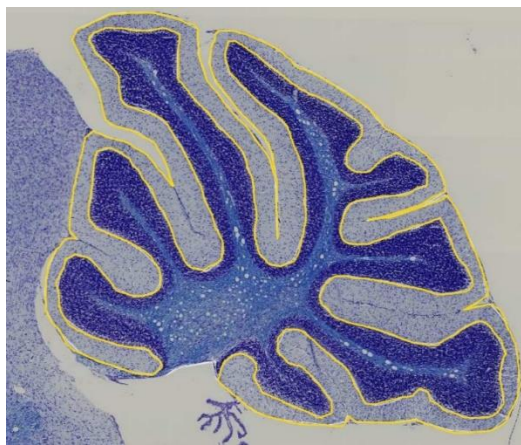
3. Etude approfondie de la neuroanatomie du cervelet

Abréviations :

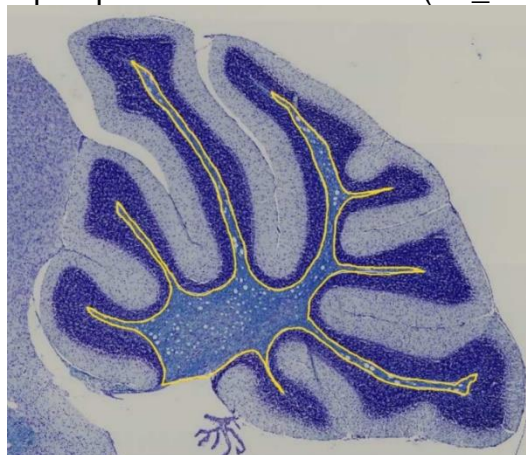
- **TC_mol** = Couche moléculaire du cervelet
- **TC_whitematter** = Matière blanche du cervelet
- **TC_granular** = Couche granulaire du cervelet

Indications:

- 1) Mesurer l'aire de la couche moléculaire du cervelet (**4X_TC_mol_area**).



- 2) Mesurer l'aire occupée par la matière blanche (**4X_TC_whitematter**)



- 3) Pour obtenir l'aire occupée par la couche granulaire (**4X_TC_granular**), utiliser la formule suivante :

$$TC_granular = TC_area - TC_whitematter_area - TC_mol$$

Résultats Annexes

Résultats annexes 1 : Analyses de la morphologie du crâne des souris

1. Raw summary statistics of skull sizes and endocranium volume

Raw averages of neurocranium and basicranium centroid sizes (CS) and endocranium volume (vol) according to the WT and *Vps13b* HOM knockout genotypes.

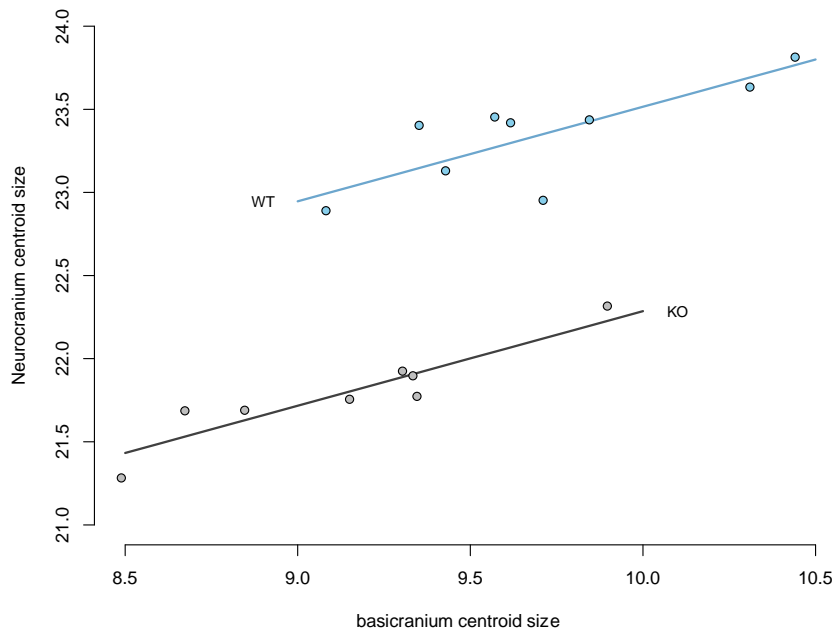
	Neurocranium CS	Basicranium CS	Endocranium vol
HOM	21.79073	9.129697	351.9044
WT	23.34793	9.705985	443.9706

Associated effect sizes calculated as a percentage increase or decrease relative to WT mice.

	Neurocranium CS	Basicranium CS	Endocranium vol
HOM	-6.67	-5.94	-20.74

1.1. Neurocranium centroid size

A linear model relating the variation in neurocranium centroid size to the genotypes after controlling for variation in the overall size as approximated by the basicranium centroid size was estimated to compute the expected genotype means. At comparable overall size, the HOM knockout mice show a significantly smaller centroid size of the neurocranium with a large effect of the genotype after controlling for general lower size of the HOM ($\eta_p^2 = 0.92$).

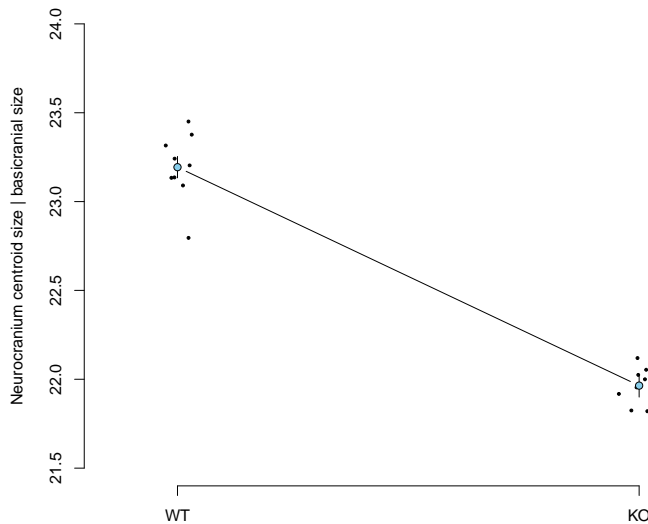


The associated ANOVA table is as follows:

Source	SS	df	F	Pr(>F)
Basicranium size	0.9537	1	35.891	3.306e-05
Genotype	4.3339	1	163.099	4.189e-09
Residuals	0.3720	14		

SS, Sum of Squares; df, degrees of freedom; F, F value; Pr, p-value associated with the F statistics.

From this model, the expected marginal means of the neurocranium size were estimated for a basicranium size of 9.43 mm as 22.0 ± 0.0645 mm for the HOM knockout mice and 23.2 ± 0.0601 mm for the WT mice. The associated linear contrast is -1.23 ± 0.0963 and its effect size calculated as a percentage increase or decrease relative to WT mice is -5.3 %.

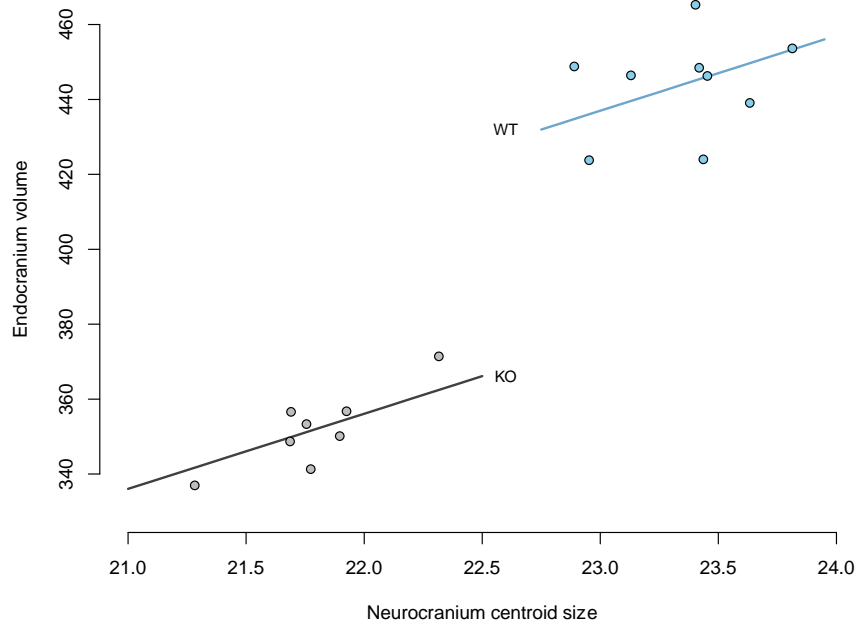


Expected marginal means of the genotype estimated for a basicranium size of 9.43 mm (blue dots), error bars correspond to associated standard errors and black dots to individual residuals.

These results show that the neurocranium size is directly affected by the *Vps13b* HOM knockout mutations beyond their effects on the overall size.

1.2. Endocranium volume

A linear model relating the variation in braincase volume to the genotypes after controlling for variation in the neurocranium size was estimated to compute the expected genotype means. The figure showing this model below demonstrate that disentangling the HOM knockout effect on the braincase volume from the effects on the general size and on neurocranium size is difficult. The HOM mice show a significantly smaller volume of the endocranium with a large effect of the genotype after controlling for the lower skull size of the HOM ($\eta_p^2 = 0.52$).

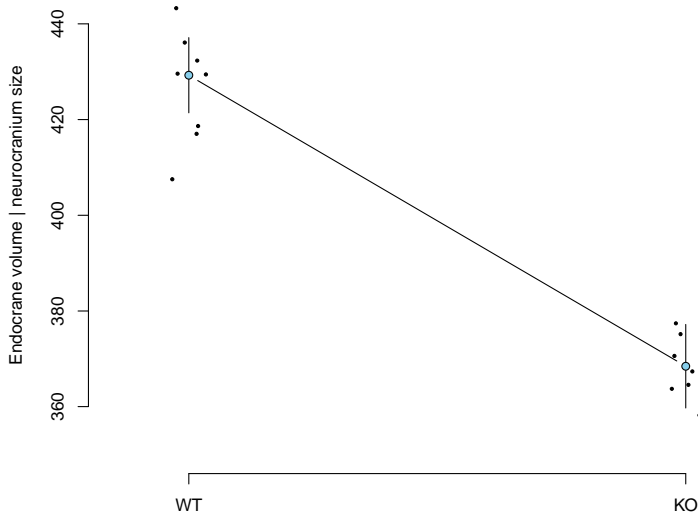


The associated ANOVA table is as follows:

Source	SS	df	F	Pr(>F)
Neurocranium size	533.77	1	4.4633	0.053076
Genotype	1791.16	1	14.9774	0.001699
Residuals	1674.28	14		

SS, Sum of Squares; df, degrees of freedom; F, F value; Pr, p-value associated with the F statistics.

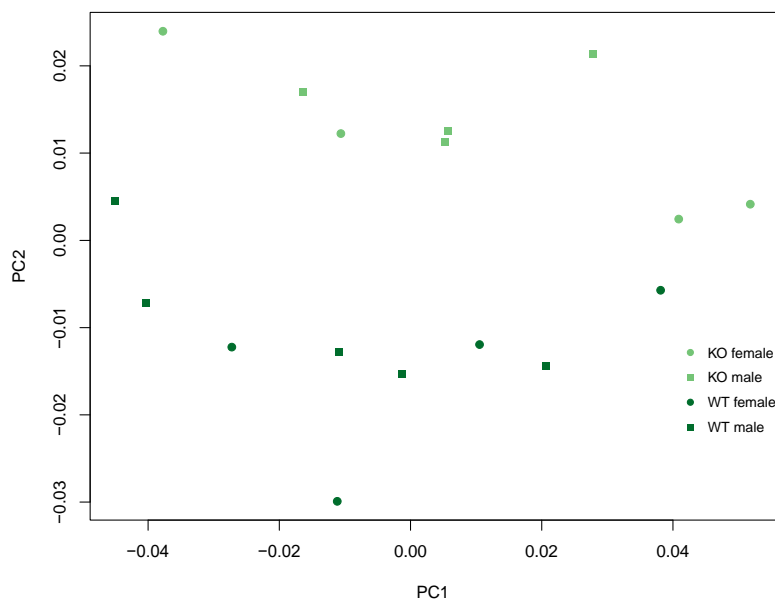
From this model, the expected marginal means of the endocranium volume were estimated for a neurocranium size of 22.6 mm as $368 \pm 8.73 \text{ mm}^3$ for the HOM mice and $429 \pm 7.86 \text{ mm}^3$ for the WT mice. The associated linear contrast is $-60.8 \pm 15.7 \text{ mm}^3$ and its effect size calculated as a percentage increase or decrease relative to WT mice is -14.2 %.



Expected marginal means of the genotype estimated for a neurocranium size of 22.6 mm (blue dots), error bars correspond to associated standard errors and black dots to individual residuals.

2. Shape analysis

After generalized Procrustes analysis with object symmetry on the neurocranium landmarks, a principal component analysis (PCA) on the tangent coordinates was computed to display the main patterns of variation. The two first PCs summarize 63.9 % of the total Procrustes variance. No evidence of sex differences appears on this two-dimension of the shape space but the *Vps13b* HOM knockout genotypes segregate along PC2.



A Procrustes ANOVA on the symmetric shape confirmed a probable large effect of the genotype on skull shape (14 % of the total shape variance) but larger sample size will be required to confirm its significance.

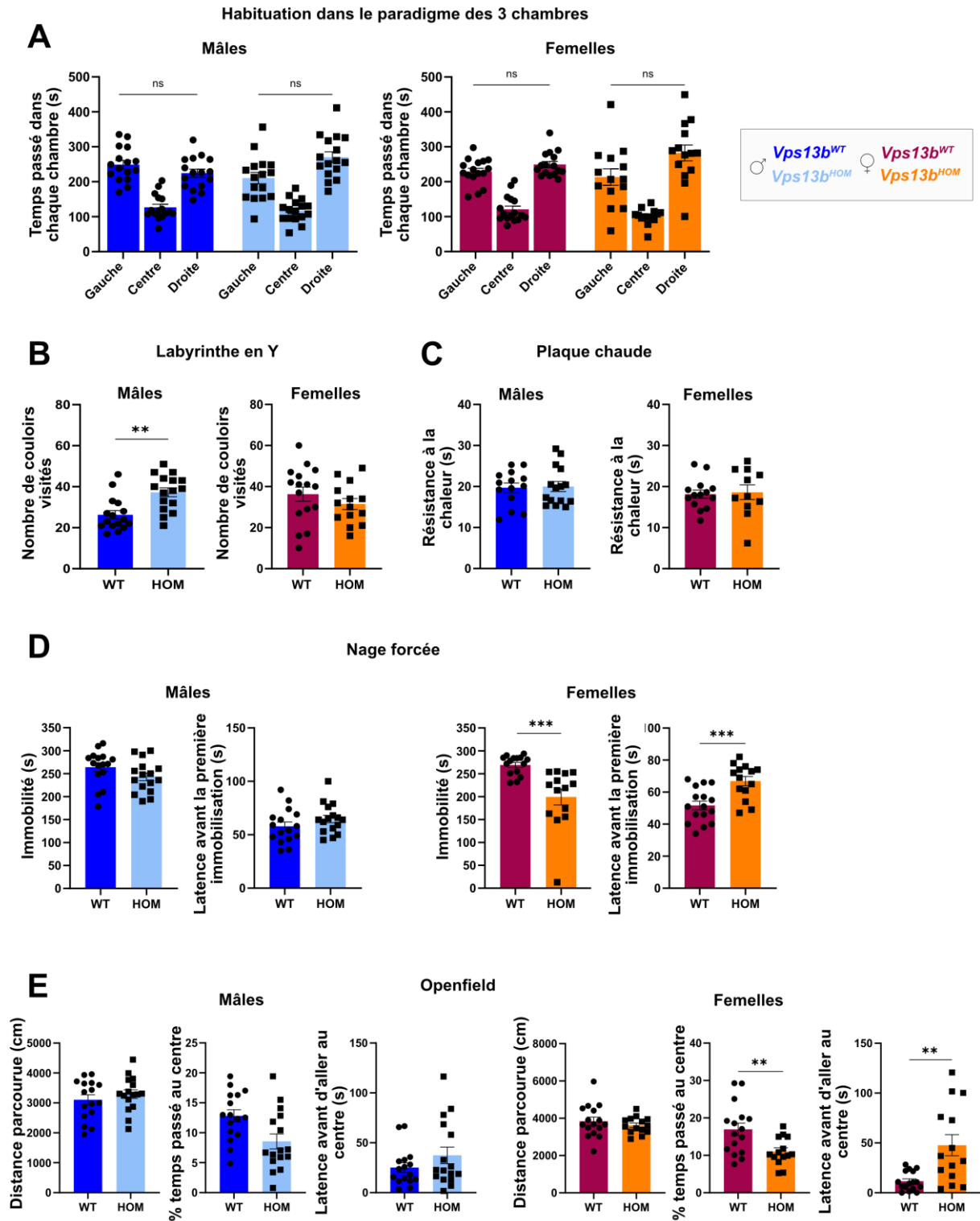
The associated ANOVA table is as follows:

Source	df	SS	MS	R²	F	Z	Pr(>F)
Genotype	1	0.0038984	0.0038984	0.14391	2.5215	1.6836	0.057
Residuals	15	0.0231911	0.0015461				

df, degrees of freedom; SS, Sum of Squares; MS, Mean Squares; R², R- squared statistics; F, F value; Z, Z-score; Pr, p-value associated with the F statistics.

The genotype effect on the symmetric shape (effect that could be partly allometric) appears to make the roof of the neurocranium flatter with a relative expansion of the posterior part.

Résultats annexes 2: Figure supplémentaire de résultats des tests de comportement



(A) Test de préférence pour l'un ou l'autre des côtés durant la phase d'habituation dans le paradigme des trois chambres. Mâles WT (n = 16) et HOM (n = 16) ; Femelles WT (n = 16) et HOM (n = 13). **(B)** Nombre de couloirs visités pendant le test du labyrinthe en Y. Mâles WT (n=16) et HOM (n = 16), test t de Student (non appariées) ; Femelles WT (n = 16) et HOM (n = 14). **(C)** Temps passé avant la première réaction à la chaleur pendant le test de la plaque chaude. Mâles WT (n = 14) et HOM (n = 15) ; Femelles WT (n = 14) et HOM (n = 11). **(D)** Test de la nage forcée. Immobilité totale pendant les six minutes du test, Latence avant la première immobilisation. Mâles WT (n = 16) et HOM (n = 16) ; Femelles WT (n = 15) et HOM (n = 13), test statistique non paramétrique de Mann-Whitney. **(E)** Test de l'Openfield. Distance parcourue, Temps passé au centre de l'arène et Latence avant d'atteindre le centre pour la première fois. Mâles WT (n = 16) et HOM (n = 16) ; Femelles WT (n = 16) et HOM (n = 14), test t de Student (non appariées).

Publication du travail de thèse

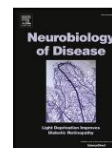
Neurobiology of Disease 185 (2023) 106259



Contents lists available at ScienceDirect

Neurobiology of Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ynbdi



Characterization of *Vps13b*-mutant mice reveals neuroanatomical and behavioral phenotypes with females less affected

Charlotte Montillot^{a,b}, Emilia Skutunova^{a,b,1}, Ayushma^{c,1}, Morgane Dubied^{d,1}, Adam Lahmar^{a,b}, Sylvie Nguyen^{a,b}, Benazir Peerally^{a,b}, Fabrice Prin^e, Yannis Duffourd^{a,b,f}, Christel Thauvin-Robinet^{a,b,i,g}, Laurence Duplomb^{a,b}, Heng Wang^h, Muhammad Ansar^{i,j}, Laurence Faivre^{a,b,k}, Nicolas Navarro^{d,1}, Shilpi Minocha^c, Stephan C. Collins^{a,b}, Binnaz Yalcin^{a,b,*}

^a Université de Bourgogne, 21000 Dijon, France

^b Inserm Unit 1231, 21000 Dijon, France

^c Kusuma School of Biological Sciences, Indian Institute of Technology Delhi (IITD), Hauz Khas, New Delhi 110016, India

^d Biogéosciences, UMR 6282 CNRS, EPHE, Université de Bourgogne, 21000 Dijon, France

^e Crick Advanced Light Microscopy Facility, The Francis Crick Institute, London NW1 1AT, UK

^f Unité Fonctionnelle Innovation en Diagnostic génomique des maladies rares, FHU-TRANSLAD, Dijon University Hospital, 21000 Dijon, France

^g Reference Center for Rare Diseases "Déficiences intellectuelles de causes rares", Dijon University Hospital, 21000 Dijon, France

^h DDC Clinic for Special Needs Children, Middlefield, OH 44062, USA

ⁱ Jules Gonin Eye Hospital, University of Lausanne, CH-1015 Lausanne, Switzerland

^j Advanced Molecular Genetics and Genomics Disease Research and Treatment Centre, Dow University of Health Sciences, Karachi, Pakistan

^k Reference Center for Rare Diseases "Anomalies du Développement et syndromes malformatifs", Dijon University Hospital, 21000 Dijon, France

¹ EPHE, PSL University, Paris 75014, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Brain neuroanatomical phenotyping
Cohen syndrome
Mouse mutants
Neurodegeneration
VPS13B

ABSTRACT

The vacuolar protein sorting-associated protein 13B (VPS13B) is a large and highly conserved protein. Disruption of VPS13B causes the autosomal recessive Cohen syndrome, a rare disorder characterized by microcephaly and intellectual disability among other features, including developmental delay, hypotonia, and friendly-personality. However, the underlying mechanisms by which VPS13B disruption leads to brain dysfunction still remain unexplained.

To gain insights into the neuropathogenesis of Cohen syndrome, we systematically characterized brain changes in *Vps13b*-mutant mice and compared murine findings to 235 previously published and 17 new patients diagnosed with *VPS13B*-related Cohen syndrome.

We showed that *Vps13b* is differentially expressed across brain regions with the highest expression in the cerebellum, the hippocampus and the cortex with postnatal peak. Half of the *Vps13b*^{-/-} mice die during the first week of life. The remaining mice have a normal lifespan and display the core phenotypes of the human disease, including microcephaly, growth delay, hypotonia, altered memory, and enhanced sociability. Systematic 2D and 3D brain histo-morphological analyses reveal specific structural changes in the brain starting after birth. The dentate gyrus is the brain region with the most prominent reduction in size, while the motor cortex is specifically thinner in layer VI. The fornix, the fasciculus retroflexus, and the cingulate cortex remain unaffected. Interestingly, these neuroanatomical changes implicate an increase of neuronal death during infantile stages with no progression in adulthood suggesting that VPS13B promotes neuronal survival early in life. Importantly, whilst both sexes were affected, some neuroanatomical and behavioral phenotypes were less pronounced or even absent in females. We evaluate sex differences in Cohen patients and conclude that females are less affected both in mice and patients.

* Corresponding author at: Inserm Unit 1231, 21000 Dijon, France

E-mail address: binnaz.yalcin@inserm.fr (B. Yalcin).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2023.106259>

Received 30 May 2023; Received in revised form 26 July 2023; Accepted 11 August 2023

Available online 12 August 2023

0969-9961/© 2023 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Our findings provide new insights about the neurobiology of VPS13B and highlight previously unreported brain phenotypes while defining Cohen syndrome as a likely new entity of non-progressive infantile neurodegeneration.

1. Introduction

Human brain development and homeostasis are dynamic processes requiring tightly regulated generation and maintenance of multiple structures relying on a tightly orchestrated sequence of events, including neuronal proliferation, migration, differentiation, and survival, which together contribute to the proper formation of functional circuits and acquisition of cognitive skills (Chiurazzi and Pirozzi, 2016). Brain malformation disorders with underlying genetic causes have been associated with most of these aforementioned events and can affect biological functionality controlled by the brain, including but not limited to learning and memory, motricity, emotion processing, and social skills. Although these functions are mediated by brain structures, including the cortex, the hippocampus, the cerebellum, and the thalamus, they are additionally dependent on formation of commissural pathways, such as the anterior commissure, the internal capsule, and the corpus callosum. This diversity of underlying mechanisms important for proper brain function consequently results in an array of quantifiable neuroanatomical phenotypes (Collins et al., 2019; Collins et al., 2018; Mikhaleva et al., 2016; Nguyen et al., 2022) (named NAPs by us Collins et al., 2019).

Vacuolar protein sorting-associated protein 13 (*Vps13*) is the founding member of a highly-conserved gene family found in all eukaryotes containing multiple domains, including WD40, whose importance has been recognized in brain structural disorders (Kannan et al., 2017); chorein; acyl-protein thioesterase (APT1); autophagy-related protein (ATG2-C); and pleckstrin-homology like (PH) (Fig. 1A). In humans and mice, there are four *VPS13* paralogues, namely *VPS13A*, *VPS13B*, *VPS13C*, and *VPS13D*. Comparative sequence analysis suggests that duplications have played an important role in the evolution of this gene family, (Velayos-Baeza et al., 2004) with the following three of the four members that have been associated with progressive late-onset neurodegenerative disorders: mutations in the *VPS13A* gene are associated with Choreoacanthocytosis (OMIM #200150), *VPS13C* with early-onset Parkinson's disease (OMIM #616840), and *VPS13D* with spinocerebellar ataxia and movement disorder (OMIM 607317) (reviewed in (Guillén-Samander and De Camilli, 2022)). Interestingly, recent studies have shown that these three *VPS13* genes regulate lipid homeostasis through a new intracellular mechanism of lipid transfer between membranes at contacts of the endoplasmic reticulum (where lipids are synthesized) with other organelles, (Guillén-Samander and Camilli, 2022; Guillén-Samander et al., 2021; Kumar et al., 2018; Cai et al., 2022) linking lipids to *VPS13*-related neurodegenerative conditions.

Mutations in the *VPS13B* gene, however, cause a rare neurodevelopmental disorder known as Cohen syndrome (OMIM #216550) first described in 1973, affecting about 500 cases worldwide, (Cohen et al., 1973; Kolehmainen et al., 2003) including a few cases that have been reported with autism spectrum disorders (ASDs) (Yu et al., 2013; Douzgou and Petersen, 2011). Also, a recent genome-wide association study using common genetic variants identified a quantitative trait locus within an intronic region of *VPS13B* associated with the core symptom domains in ASDs (Lee et al., 2022). Human *VPS13B* (initially designated as COH1) is a giant protein, with a molecular weight of 448 kilodaltons, and comprises 4022 amino acids encoded by a long transcript (NM_017890.5) of 14,086 base pairs located on human chromosome eight with 62 exons. To date, among 203 *VPS13B* recessive mutations, 170 cause Cohen syndrome and are mostly nonsense, indel, and splice site variants resulting in a functionally null or altered protein (The Human Gene Mutation Database; <http://www.hgmd.org>; accessed on 16

January 2023). Common clinical features include microcephaly (abnormally small head), intellectual disability, and hypotonia (reviewed in (Rodrigues et al., 2018)), although there are reports of high scores in the positive domains such as affectionate behavior, cheerful disposition, excessive friendly personality, and socialization (Norio et al., 1984; Kivitie-Kallio and Norio, 2001). At the neurological level, several sparse structural abnormalities have been described in various populations (e.g., Finnish, Tunisian, Italian, Turkish, Lebanese, Iranian, Chinese, and Jordanian) using cerebral magnetic resonance imaging (MR), including thick corpus callosum (Rejeb et al., 2017; Koehler et al., 2020; Mochida et al., 2004; Kivitie-Kallio et al., 1998), thin corpus callosum (Alipour et al., 2020), atrophy of the cerebellar vermis (Mochida et al., 2004; Waite et al., 2010), pontocerebellar atrophy (Katzaki et al., 2007), thinning of the neocortex (Hu et al., 2021), and brain atrophy (Ghazawi et al., 2021). However, the origin of these brain neuroanatomical disorders remains unknown. We provide a detailed hand-curated review of each published Cohen patient in Table S1.

Apart from an old *in situ* hybridization study reporting *Vps13b* expression in the adult mouse brain with no obvious regional differences (Mochida et al., 2004), little is known about its spatiotemporal expression profile. Similarly, there are only a few functional studies of *VPS13B* *in vitro* that directs neurite outgrowth in primary neuronal cultures in the rat (Seifert et al., 2015). Human iPSC-derived neurons associated with an upregulation of autophagy (Lee et al., 2020a) and an alteration of expression of synaptic genes (Lee et al., 2020b). Therefore, in this study, we set out to elucidate how the role of *VPS13B* in mouse models relates to the human disease by focusing on the functional consequences of *VPS13B* mutations on the dynamics of brain biology.

2. Materials and methods

2.1. Ethic statement

Experimental procedures related to animal care conformed to the Institutional Animal Care policies at the University of Burgundy. The project's authorization number is APAFIS#28630-202,012, 141,020,471. Written informed consent was obtained from all individuals studied or their legal guardians.

2.2. Generation and validation of the *Vps13b*^{Tm1.1cs} mouse model

The mouse model was generated at the Mouse Clinical Institute (MCI; Illkirch-Grattenstaden) by homologous recombination in ES cells. A targeting vector bearing two homology arms at either side of *Vps13b* critical exon (exon four) and a Neo resistance auto-selection cassette was electroporated into C57BL/6NTac strain cell line (black coat colour). Transfected ES clones were submitted to neomycin resistance auto-selection cassette, and resistant ES clones were isolated. The clones were then submitted to the screening process allowing secured identification of those harbouring the expected recombination events at both ends of the targeting vector. Targeted clones were identified by long-range PCR and confirmed by southern blot analysis using an internal and 5' external probes. Random integration of the construct in the genome was also checked. Targeted clones with the proper genotype were injected into BALB/cN strain blastocysts (white coat colour). The resulting chimeric males, that have a high percentage of coat colour derived from ES cells (percentage of black coat colour superior to 85%) and the correct targeted genotype, were bred with C57BL/6NCrl WT females for achieving germline transmission. Pups derived from this cross were then bred with the FlpO deleter Cre line (Birling et al., 2012)

to obtain constitutive knockout heterozygous (HET) animals (excision of the critical exon four) and crossed with C57BL/6J mice to obtain an outbred colony on a mixed genetic background. The International nomenclature given to this line is *Vps13b*^{Tm1.1cs} ("Tm1" refers to a Targeted mutation with a reporter-tagged deletion allele with selection cassette; "Ics" refers to Institut Clinique de la Souris). We validated our mouse model by verifying the correct deletion of exon four and showing the production of a mutation characterized by a truncated transcript lacking exon four (Fig. S2A–B) likely producing null or altered VPS13B protein. We further validated the model by excluding differential expression of neighboring genes (*Osr2* and *Cox6c*) and of other *Vps13* gene members (Fig. S2C–D and Supplementary Methods).

2.3. Animal breeding and husbandry

Mice were maintained in a conventional unit with sentinel mouse monitoring on a 12-h light: 12-h dark cycle with lights off at 7:00 pm and no twilight period. The ambient temperature was 21 ± 2 °C, and the humidity was $45 \pm 10\%$. All animals were monitored for health and welfare concerns on a daily basis and checked prior to and after procedures. Mice were housed using a stocking density of up to 10 mice per cage with cage dimensions of $425 \times 265 \times 175$ mm (Length x Width x Height), in individual caging. In addition to bedding substrate, standard environmental enrichment of 1–2 nestlets and a cardboard tunnel were provided in each cage. We maintained stock and breeding cages. For breeding cages, a "heterozygous-by-heterozygous" breeding scheme was used to propagate the mouse line considering the infertility of the homozygous mice reported previously (Da Costa et al., 2020). This ensured optimal health of the animals and produced animals for the desired genotypes that is wildtype (WT) and mutant homozygous (HOM) mice for comparative phenotypic characterization. The care and the use of mice were carried out in accordance with European and national guidelines and policies and in strict respect of the 3R guidelines (Replacement, Reduction, and Refinement). Both male and female mice were used for all experiments.

2.4. Genotyping

Animals were identified by ear punching at weaning age. Genomic DNA was extracted from the harvested ear sample. PCR amplification was performed using the GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega) according to the manufacturer's instructions. The genotyping primers used to confirm excision of the floxed exon four were 5'-GCTAGATTGGCTGTACGAAGCAC-3' (forward) upstream of the deleted exon four and 5'-CTAACAGTTGACTGAGGAAGCAGCAATG-3' (reverse) downstream of the deletion. The PCR reaction was run on an Eppendorf thermocycler using the following conditions: 94 °C for 5 min; [94 °C for 30 s then 62 °C for 1 min and 72 °C for 2 min] x 35 cycles; 72 °C for 7 min. PCR products were separated by 1.5% agarose gel electrophoresis, and PCR gel images were acquired using the GelDoc XR Imaging System (Bio-Rad). The expected size of the PCR fragments for the mutant allele is 307 base pairs (bp), and for the wildtype allele is 923 bp.

2.5. Genome annotation at the locus

Mus musculus (house mouse) assembly used in this study for genome annotation is GRCh38.p6 (Genome Reference Consortium Mouse Build 38 patch release 6). Annotations of the different *Vps13b* transcripts were extracted from the current Ensembl genome browser (www.ensembl.org/) based on proteins and mRNA from the UniProtKB database and RefSeq (Frankish et al., 2021). Mouse gene *Vps13b* is located on the forward strand of chromosome 15 at genomic coordinates 35,371,160–35,931,229 bp and has seven annotated transcripts (Fig. 1B). The canonical transcript (*Vps13b-201*) is the longest transcript encoding for the protein coding ENSMUSP0000045490, a 3993 amino acid protein (Fig. 1A). The second longest transcript is a processed transcript

(*Vps13b-202*) with no open reading frame. *Vps13b* has four retained introns obtained after alternative splicing, where an intron remains after transcript processing is complete (*Vps13b-203*, *Vps13b-205*, *Vps13b-206*, and *Vps13b-207*). Finally, a small coding protein ENSMUSP0000153856 of 46 amino acids is encoded by the two exons transcript (*Vps13b-204*) (Fig. S1B–C). Detailed analyses and coordinates are provided for all seven transcripts in Table S2 and Supplementary Results. Considering the length of the canonical transcript, we tagged three positions: at the start covering the junction between exon 1 and exon 2, at the middle (junction of exon 35–36), and at the end (junction of exon 61–62). The start position is common to four transcripts (*Vps13b-201*, *Vps13b-202*, *Vps13b-203*, and *Vps13b-206*), while the middle and end positions are specific to the canonical coding transcript (Fig. 1B).

2.6. Reverse transcription and real-time quantitative PCR (RT-qPCR)

2.6.1. Neuro2A cells

RNA isolation and cDNA synthesis from control and treated Neuro2A cells was performed by using AURUM total RNA mini kit (Bio-Rad, 732–6820) and iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, 1,708,891), respectively, as per manufacturer's guidelines. Amplification of 500 ng/μL of cDNA was done using iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, 1,725,121), and 1 μM of *Vps13b* forward primer (5'-TGGATTCTGCACCCAGGGCAAT-3') and reverse primer (5'-AGCATCGGTACTGGGCATCT-3') according to the following PCR reaction cycle: initial denaturation at 90 °C for 20 s, followed by 40 cycles at 95 °C for 30 s, 60 °C annealing for 30 s and 70 °C for 10 mins final extension.

2.6.2. Brain tissue

Total RNA was extracted from the whole mouse brain using Trizol (Sigma-Aldrich). RNA concentration and quality were assessed by spectrophotometry (Multiskan GO, Thermo Scientific). RNA samples with a ratio of A_{260}/A_{280} close to 1.8 and a ratio of A_{260}/A_{230} above 2.0, to exclude guanidine thiocyanate-containing buffer contamination, were further processed. RNA integrity number (RIN) was assessed using the Bioanalyser (Agilent 2100). Samples with RIN < 8 were not used in downstream experimental settings. 100 ng of total RNA was reverse transcribed to cDNA using iScript Reverse Transcription Supermix (Bio-Rad). The qPCR reaction was performed using iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, 1,725,121) in a final volume of 20 μL containing 2.5 ng of cDNA and 300 nM of each primer. The reaction cycle was 95 °C for 3 mins, followed by 40 cycles at 95 °C for 10 s and 60 °C for 30 s, 95 °C for 10 s, 65 °C for 5 °C and 95 °C for 5 mins. For time-course expression studies, the primers were designed as 5'-GGAAGACCCCTGCCGAAG-3' (forward) and 5'-AGGCTTTGATACATCCAAGTAGA-3' (reverse). The samples were run in triplicate and normalized against the housekeeping gene *Gnas* (forward primer: 5'-AGAACATCCGCCGTGTCTTC-3' and reverse: 5'-CCTTCITAGAGCAGCTCGTATTGG-3'). For *Vps13b* relative expression studies, total RNA was extracted as above from 11 brain and peripheral tissues (cortex, hippocampus, cerebellum, pons, hypothalamus, heart, liver, kidney, white adipose tissue, muscle, and lung). Primers were designed to span the boundary between exon 1 and exon 2 (exon 1/2) of the canonical transcript *Vps13b-201* as 5'-TCTCTGCCTACTCCTCGTCAG-3' (forward) and 5'-CTGTTCCAGAAGCTCCAAGT-3' (reverse), between exon 35/36 as 5'-GGAAGACCCCTGCCGAAG-3' (forward) and 5'-AGGCTTTGATACATCCAAGTAGA-3' (reverse) and between exon 61/62 as 5'-GCACAGGACCAAGCAAAA-3' (forward) and 5'-GGCCAGGTGACAAGATGTTT-3' (reverse). Primers spanning exon 35/36 and 61/62 were specific to transcript *Vps13b-201*, while exon 1/2 primers were common to processed transcript *Vps13b-202* and retained introns *Vps13b-203* and *Vps13b-206* (Fig. 1B). The expression of the transcript *Vps13b-204* was analysed using the primers 5'-CTGCGCTAGGGATCTGACTT-3' (forward) and 5'-GTTTGCTGA-GAACCAGTCC-3' (reverse). The samples were run in triplicate and normalized against housekeeping gene *Hprt* 5'-TCATTATGCCGAG-GATTTGA-3' (forward) and 5'-CAGAGGGCCACAATGTGTATG-3'

(reverse). Gene expression was analysed using the delta-delta cycle threshold method (Livak and Schmittgen, 2001).

2.7. RNA sequencing

2.7.1. Bulk RNA sequencing

RNA sequencing libraries were generated from 200 ng of total RNA from mouse hippocampus and cerebellum tissues using NEBNext RNA Ultra II kit (NEB), according to the manufacturer's instructions. Briefly, following purification with oligo d(T)₂₅ attached magnetic beads, the mRNA was fragmented using divalent cations at 80 °C for 2 mins. The cleaved RNA fragments were copied into first strand cDNA using reverse transcriptase and random primers. Strand specificity was achieved by replacing dTTP with dUTP during second strand cDNA synthesis using DNA Polymerase I and RNase H. Following the addition of a single 'A' base and subsequent ligation of the adapter on double-stranded cDNA fragments, the products were purified and enriched with PCR (30 s at 98 °C; [10 s at 98 °C, 75 s at 65 °C] x 12 cycles; 5 mins at 65 °C) to create the cDNA library. Surplus PCR primers were further removed by purification using AMPure XP beads (Beckman-Coulter, Villepinte, France), and the final cDNA libraries were checked for quality and quantified using capillary electrophoresis. These libraries were sequenced at the Department of Biosystems Science and Engineering (D-BSSE) at ETH Zürich in Basel (Switzerland), using an Illumina NovaSeq6000 with a Single-End 50 base read mode.

RNA sequencing analysis and base calling were performed using RTA 2.7.3 and bcl2fastq 2.17.1.14. Raw data quality was evaluated by FastQC software version 0.11.4 (available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Reads were preprocessed using Trimmomatic version 0.39 in order to remove adapters, polyA and low-quality sequences (Phred quality score below 30). Reads shorter than 40 bases were discarded from further analysis. Reads were then mapped onto the mm10 assembly of *Mus musculus* genome using STAR (Dobin et al., 2013) version 2.5.2b (--twopassMode Basic). Read counts were also collected using STAR2. Uniquely mapped reads were counted while overlapping only one gene. Gene expression was also quantified using htseq-count 0.6.1p1 (Langmead and Salzberg, 2012) and gene annotations from Ensembl release 102. Statistical analysis was performed using R version 4.2.0 and DESeq2 1.26.0 Bioconductor library (Love et al., 2014).

2.7.2. Single-cell RNA sequencing

Single-cell RNA sequencing was analysed using existing resources from the Allen Brain Institute (Yao et al., 2021). In brief, 1.3 million cells of adult mouse isocortex and hippocampal formation were profiled and clustered into 388 groups. A total of 584 male and female C57BL/6J animals were used to collect cells at various ages, including 531 animals at postnatal days (P) 53–59, 7 mice at P50–52 and 46 at P60–121 (details available in (Yao et al., 2021)). We downloaded the data using the following URL (<https://portal.brain-map.org/atlas-and-data/rnas-eq/>), and extracted *Vps13b* expression in three different cell types (glutamatergic neurons, GABAergic neurons and astrocytes) in the two brain regions available. We then quantified the percentage of *Vps13b* expressing cells in each cell type (Fig. 1G).

2.7.3. Spatial transcriptomics

Raw counts from the Spatial Mouse Brain Atlas were downloaded from the NanoString website (<https://nanosttring.com/products/geomx-digital-spatial-profiler/spatial-organ-atlas/mouse-brain/>) (Zimmerman et al., 2022). The Spatial Mouse Brain Atlas contains the whole transcriptome atlas profiling from four C57BL/6 WT male mice between the ages of 8 to 12 weeks. Formalin-fixed paraffin-embedded adult mouse brains were sectioned at a thickness of 5 µm on the coronal plane. The raw gene counts matrix from the samples was merged with the raw counts of the Spatial Organ Atlas. Q3-normalization was applied to the merged matrix. Boxplots of Log₂ transformed, normalized gene

expression were generated using ggplot2 in R.

2.8. Cell culture and differentiation treatment

Neuro2A (N2A) cells, a murine neuroblastoma cell line, were used for studying neuronal differentiation. N2A cells were obtained from the National Centre for Cell Science (NCCS, Pune, India) and cultured in incomplete Minimum Essential Media Eagle (MEM) containing 2.4 g of sodium bicarbonate (SRL, 36328), 10 mL of 1 M HEPES solution (Gibco, 15,630,080), and 100 µL of 35% HCl (Amplura, 1.94501.0521). Complete growth media was prepared by supplementing MEM with 10% FBS (Gibco, 10,270–106) and 1% (v/v) antibiotics; penicillin and streptomycin 5000 unit/mL (Gibco, 15,070–063). Cells were incubated at 37 °C in a 5% CO₂ humidified incubator and passaged two times a week.

For differentiation treatment, Neuro2A cells were seeded in a 35 mM plate (Tarsons, 460,035), at a density of 1.5×10^6 cells. Differentiation treatment was given for 24 h using incomplete MEM, 1% FBS (Gibco, 10,270–106), 1% (v/v) antibiotics; penicillin and streptomycin 5000 unit/mL (Gibco, 15,070–063), and 20 µM Retinoic acid (Sigma, 302–79-4). After 24 h, cells were visualized in phase contrast microscope (DEBRO, DSZ-55) for assessment of change in morphology and axonal growth.

2.9. Viability test

At E18.5, 69 fetuses were isolated from 13 pregnant females through caesarean delivery. After being extracted from their embryonic sac, the newborns were placed on a heating plate maintained at 37 °C and gently rolled on soft tissue paper to stimulate breathing. They were carefully observed for 30 mins after delivery for abnormalities in breathing, movement, sensitivity, and blood circulation. These functions were quantified for each newborn using a multi-level scoring system (Fig. S2G). Mice that survived were euthanized by decapitation with surgical scissors. Tail samples were harvested for genotyping and sexing. The newborns were placed in Bouin fixative solution (Thermo Scientific) for 96 h, and the brains were then processed for neurohistological studies as described in (Nguyen et al., 2022).

2.10. Skull morphometric analysis

X-ray micro-computed tomography (µCT) of the skull was acquired using a Bruker Skyscan 1174 scanner with the following specifications (voltage: 50 kV, current: 800 µA, exposure time: 3500 ms, rotation step: 0.700 degrees, frame averaging: 2, aluminum filter: 0.5, spatial resolution: 29.35 µm). The 3D surface was segmented using Avizo version 2019.4 at a gray value in the range of 22–255 with the magic wand tool. In addition to the face landmarks initially recorded (Bonfante et al., 2021), from which one landmark located at the intersection between the nasal and the frontal bone was conserved, 17 landmarks were digitized using 3D Slicer-5.0.2⁴³ by two experimenters independently. After checking for consistency and gross errors in landmark placement, the two sessions were averaged. Basicranium size (base of the skull) was computed as the centroid size, the square root of the sum of the squared Euclidean distances from each landmark to the centroid (Dryden and Mardia, 1998), of seven landmarks (orange in Fig. 2J). Neurocranium size (outside surface of the skull) was computed as the centroid size of 18 landmarks (orange plus black landmarks in Fig. 2J). Endocranium volume (inside surface of the skull) was automatically obtained from the 3D skull volume using the SlicerMorph extension (Rolfe et al., 2021) of 3D Slicer using parameters of kernel smoothing of 0.5 mm and hole size of 1.5 mm. Two linear models were computed relating: 2) the neurocranium size to *Vps13b* genotype after controlling for general skull size using the basicranium centroid size, and 2) the endocranium volume to *Vps13b* genotype after controlling for the neurocranium size. Expected marginal means at average basicranium or neurocranium sizes were computed with the emmeans R package v1.7.0 (Lenth, 2021).

A full generalized Procrustes analysis with object symmetry (Klingenberg et al., 2002) was performed from the neurocranium landmarks using Morpho R package version 2.9 (Schlager, 2017). A principal component analysis was computed from the symmetric tangent coordinates. Genotype effect was evaluated on the symmetric tangent coordinates using a Procrustes ANOVA (Goodall, 1991) with the geomorph R package version 4.0.0 (Adams et al., 2021) and the RRPP R package version 1.0.0 (Collyer and Adams, 2018). Expected marginal mean shapes for each genotype were estimated using the RRPP package, corresponding 3D shape models were inferred using thin plate splines, and signed distances between 3D models were computed with the Morpho R package.

2.11. Two-dimensional (2D) histology

2.11.1. Global brain analysis

Mice of various ages (juvenile, young adult, adult, and old) were anesthetized with isoflurane and euthanized by cervical dislocation. Brain samples were carefully dissected to not damage the soft tissue and fixed for 48 h in 4% paraformaldehyde (PFA). The samples were transferred in 70% ethanol for short-term storage for up to 7 days and embedded in paraffin in the CellImaP core facility, INSERM LNC-UMR1231 (Dijon, France). Brain samples were sectioned at a thickness of 5 μm on a sliding microtome (HM 450, Microm France) on a well-defined position to match Lateral +0.60 mm^3 . The sections were stained with 0.1% Luxol (Solvent Blue 38, Sigma-Aldrich) and 0.1% Cresyl violet acetate (Sigma-Aldrich). The slides were scanned using the Nanozoomer whole-slide scanner 2.0HT C9600 series (Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan) producing one image per sample. Each image was quality controlled to assess whether the section was at the correct position, the staining was of good quality, and the image was of good quality. The samples that did not fulfil these quality control steps were excluded from the analysis. These quality control steps are essential for the detection of small to moderate neuro-morphological phenotypes and without which the large majority of defects would be missed. This is explained in great detail elsewhere (Collins et al., 2019). To avoid experimenter bias, the same person carried out the measurements which were taken blind to the genotype.

For each sample, a total of 40 morphological parameters, made of area and length, were taken to cover a wide range of 22 neurodevelopmentally distinct brain structures, including the total brain area, the motor cortex, the cingulate cortex, the hippocampus, the corpus callosum, the thalamus, the caudate putamen, the fimbria of the hippocampus, the anterior commissure, the stria medullaris, the fornix, the optic chiasm, the hypothalamus, the substantia nigra, the pontine nuclei, the dorsal subiculum, the inferior colliculus, the superior colliculus, the pons, the transverse fibres of the pons, the cerebellum and the lateral ventricle. For each region, the number, density, and circularity of the cells were analysed. Every aspect of the procedure was managed through a relational database using the FileMaker (FM) Pro database management system (detailed elsewhere (Mikhaleva et al., 2016)). A similar approach was used for newborns fixed in Bouin's solution (Nguyen et al., 2022). All samples were also systematically assessed for cellular ectopia (misplaced neurons). A list and description of 2D histological parameters are provided in Table S3. Measurements data as well as associated effect sizes calculated as a percentage increase or decrease relative to matched WT mice are provided in Table S10.

2.11.2. Specific brain region analysis

Finer-scale neuroanatomical phenotyping protocols were developed for the hippocampus, the cortex, and the cerebellum. In the hippocampus, additional sub-regions measured included the individual layers of the CA1, CA2, and CA3, the upper and lower arms of the dentate gyrus, and the molecular and polymorphic layers of the dentate gyrus. In the cortex, the six layers were assessed individually (area and height parameters) across a portion of the cortical plate of the same width. Cell-

based parameters were analysed in the molecular and polymorphic layers of the dentate gyrus as well as in the different cortical layers. Cell density of Purkinje cells in the cerebellum was calculated by dividing the number of Purkinje cells by the total length of the granular layer of the cerebellum. A list of second-level histological parameters is provided in Table S4, and associated measurements and calculations in Table S11.

2.12. Three-dimensional (3D) high-resolution episcopic microscopy (HREM) histology

We used a new framework based on high-resolution episcopic microscopy, a three-dimensional histology technique, allowing 3D volumetric analysis of brain structures.

2.12.1. Sample preparation

Adult mice were euthanized by cervical dislocation, and the brain samples were carefully dissected to not damage the soft tissue and fixed for 48 h in 4% paraformaldehyde. The HREM methodology has been described previously (Weninger et al., 2006). Samples were dehydrated using an increasing series of 11 ethanol baths (10 to 90%, 95 and 100%) for 2 h each. After dehydration, samples were infiltrated at 4 °C with gentle rocking for 12 days in JB-4 methacrylate plastic resin (Polysciences Europe GmbH, Germany) containing the fluorescent dye eosin B (Sigma-Aldrich), which resulted in non-specific labelling of brain structures thereby enhancing contrast across the whole brain. After the addition of a catalyst according to the manufacturer's instructions (Polysciences Europe GmbH, Germany), blocks were left to polymerize overnight at room temperature and baked at 95 °C for 48 h, then cooled down for several hours at 4 °C to ensure a hard texture prior sectioning on a microtome with optics and camera (Indigo Scientific Ltd). Serial face sectioning was done using 3.4 μm sections. By sequentially imaging the block face during the sectioning process, a comprehensive stack of accurately aligned thousands of images was acquired, producing the 3D structure of the sample.

2.12.2. Volumetric segmentation of brain sub-regions

Data were analysed blind to the genotype. Isotropic voxels were computed using ImageJ version 1.53 based on X-Y resolution, which stood at an average of 3.4 μm . Manual segmentation was achieved using 3D Slicer-5.0.2 (Fedorov et al., 2012), and the "Grow from seeds" iterative method to interpose segments between images using all three axes (coronal, axial, and sagittal). We defined and segmented 23 unique non-overlapping segments covering the entire murine brain corresponding to the cortex, the amygdala, the corpus callosum, the striatum, the dentate gyrus, the hippocampus, the retrohippocampal region, the fimbria of the hippocampus, the fiber tracts, the anterior commissure, the fornix, the fasciculus retroflexus, the medial habenula, the lateral habenula, the thalamus, the hypothalamus, the midbrain, the pons, the medulla oblongata, the cerebellar arbor vitae layer, the granular layer of the cerebellum, the molecular layer of the cerebellum and the ventricles. The total brain volume was derived by adding the volume of each segment (Table S5). 19/24 volumetric data points have a corresponding area measurement in the 2D sagittal plane facilitating data comparison between 2D and 3D shapes.

2.12.3. Whole-brain shape analysis

Based on intersections of external and internal brain substructures, 65 paired landmarks and 27 unpaired landmarks (*i.e.*, located on the sagittal plane) were digitized by one experimenter using 3D Slicer-5.0.2 (Fedorov et al., 2012). A full generalized Procrustes analysis with object symmetry (Klingenberg et al., 2002) was computed using Morpho R package version 2.9 (Schlager, 2017). Expected marginal means for each genotype were computed using the RRPP R package version 1.0.0 (Collyer and Adams, 2018). Corresponding 3D shape models were inferred using thin plate splines and signed distances between 3D models were computed with the Morpho R package.

2.13. Golgi-cox staining

Golgi-Cox staining was performed using the FD Rapid GolgiStain Kit (FD NeuroTechnologies) on entire fresh brains removed from the skull and processed as indicated by the manufacturer. After 3 weeks of impregnation, brains were embedded in 3% low-melting agarose (Sigma-Aldrich) and the tissue was cut in 105 μm thick coronal sections floating in Solution C of the kit with the semiautomatic vibrating microtome (Leica Vibratome VT1200S) with a speed of 0.38 mm/s and amplitude of 0.60 mm. The slices were mounted on gelatin-coated slides and kept for drying in the dark for 2 days before the staining, performed according to the manufacturer's instructions. The images were acquired with the Nikon Eclipse Ti inverted microscope in the DImaCell core facility (University of Burgundy, Dijon, France) at 100 \times magnification with multi-layered mode every 0.2 μm . The dendritic spines were counted on the secondary dendrites (30 μm long on average) of the granular cells of the dentate gyrus. The spine density was calculated by dividing the number of dendritic spines by the length of the dendritic section measured. All the measurements were taken by the same experimenter, blind to the genotype, and performed manually using the NDPviewer2.0 viewing software.

2.14. TUNEL assay

TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labelling) assay was performed on embryonic, newborn, and adult paraffin-embedded brain sections with the *in situ* cell death detection kit Fluorescein (Roche Applied Science, cat # 11684795910) and TMR red (Roche Applied Science, cat # 12156792910). Staining was performed according to the manufacturer's instructions.

2.15. Tissue immunohistochemistry

Brain samples were fixed for 48 h in 4% PFA and preserved in 70% ethanol solution before paraffin embedding. Sections of 5 μm thickness were made with a microtome (HM 450, Microm France) and mounted on slides before performing immunohistochemistry.

2.15.1. Fluorescence immunostaining for mature neurons and astrocytes

Briefly, the sections were deparaffinized by successive baths of xylene, ethanol (100%, then 90%, 70%, 50%, and 30%) and water. Antigen retrieval was performed in citrate solution (H-3300, Vector Laboratories) for 20 mins in a water bath at 95 $^{\circ}\text{C}$. After rinsing in 1 \times PBS solution, the sections were incubated in PBS-10% Normal Donkey Serum (NDS) blocking solution for 1 h at 37 $^{\circ}\text{C}$. Anti-NeuN (GTX132974, 1/250, GeneTex) and anti-GFAP (GTX108711, 1/250, GeneTex) primary antibodies were incubated overnight at 4 $^{\circ}\text{C}$. The sections were then washed in 1 \times PBS for 3 h to remove primary antibody residues and then incubated with secondary antibodies (Donkey anti-rabbit Alexa FluorTM 568 A#10042, Invitrogen, 1/1000 and Hoechst 33342, Invitrogen 1/2000) for 1 h at room temperature in the dark. After washing with 1 \times PBS, the slides were mounted in an aqueous mounting medium (Aqua-Poly/Mount, Polysciences). Acquisitions were performed using the Axiozoom (Zeiss) fluorescence microscope for NeuN and CellObserver (Zeiss) for GFAP.

2.15.2. Fluorescence immunostaining for apoptosis and cortical layers

For fluorescence immunostaining, paraffin-embedded embryonic (at birth) and adult (male, 25 weeks old) sections were deparaffinized by heating at 60 $^{\circ}\text{C}$ for 10 mins followed by dewaxing in xylene overnight. This was followed by rehydration in graded alcohol baths and 1 \times PBS washes. Antigen retrieval was performed by immersing slides in 0.1 M sodium citrate buffer (pH 6.0) in 750 W microwave oven for 10 mins, allowed to cool at 4 $^{\circ}\text{C}$, and washed with 1 \times PBS twice. 1% Normal Goat Serum (NGS) was used as a blocking reagent for 30 mins and kept overnight in the primary antibody at 4 $^{\circ}\text{C}$. Thereafter, 1 \times PBS wash was

given three times. Sections were incubated in secondary antibody for 1 h, followed by 1 \times PBS wash three. Sections were counterstained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), and washed twice with 1 \times PBS. Mounting was done in Mowiol solution (Sigma-Aldrich, CAS # 9002-89-5).

The primary antibodies used were: rabbit anti-Ph3S10 (Cell Signaling Technology), anti-Tbr1 (Abcam) for layer VI neurons and anti-Reelin (gift from Dr. Cécile Lebrand) for layer I neurons. The secondary antibody used was goat anti-rabbit A488 (Invitrogen, A11008).

2.16. Behavioral analyses

Behavioral tests were conducted at the University of Burgundy in the B3 Building (Dijon, France) by the same female experimenter blind to the genotype during a contiguous period of eight weeks. Nine behavioral tests were performed, including the open-field test, the grip strength, the three-chamber Crawley paradigm, the elevated plus maze, the marble burying test, the Y-maze, the hot plate, the traction test, and the forced swim test. Mice tested were given several days up to two weeks of rest between experiments. Before each experiment, an acclimatization time of a minimum of 30 mins was given to the mice transferred to the testing room. All apparatus was cleaned with 70% ethanol systematically after each animal was tested. Behaviors were recorded using a video tracking system (Ethovision 14, Noldus) except for the marble burying test, where the buried marbles were manually counted.

2.16.1. Open-field test

The open-field test is used to study basic locomotor activity, exploratory behavior, and anxiety. The mice were put in an arena of dimensions 40 \times 40 \times 40 cm made of blue PVC (Noldus) illuminated at 320 Lux. The activity was recorded for 10 mins using a video tracking system (Ethovision 14, Noldus). The distance covered by the mice and the time spent in the center of the arena were quantified.

2.16.2. Grip strength

The grip strength test is typically used to evaluate hindlimb and forelimb muscular strength. The mice were gripped on a grid attached to a dynamometer (Ugo Basile) and pulled back by their tail. The grip strength was calculated by a ratio between the gripping force (grams) and the mouse's weight (grams). Each mouse was tested twice within an interval of at least 2 weeks, and the maximal force was recorded.

2.16.3. Three-chamber Crawley paradigm

The three-chamber Crawley paradigm assesses social cognition. The apparatus is a Plexiglas box made up of 3 chambers (60 cm \times 39,5 cm \times 21,5 cm) (Width \times Length \times Height), one central chamber and two identical wire containers with removable lids and large enough to hold a single mouse. The animal has free access from the central room to the other two chambers by means of a small opening in the partition wall. The test took place in three sessions. The first session of 10 mins was a habituation phase during which the subject mouse could freely explore the 3 chambers. Immediately after habituation, the subject mouse was escorted back to the central chamber, and a naïve individual (called Intruder 1 of the same sex than the subject mouse and without any prior contact with the subject mouse) was introduced into the wire compartment of one of the chambers. The partition wall between the chambers was removed, allowing free access for the subject mouse to explore each of the three chambers, and parameters were measured. After 5 mins, the subject mouse was escorted back to the central chamber, and a novel naïve individual (Intruder 2) was introduced into the opposite side wire container. Similarly, the partition wall was removed, allowing free access for the subject mouse to explore each of the three chambers, and parameters were measured for 5 mins. For each session, the distance travelled, the time spent in each chamber, the latency before the first sniffing, and the total time spent sniffing the intruder was recorded.

2.16.4. Elevated plus maze

The elevated plus maze is used to evaluate the anxiogenic behavior. The arena is composed of four arms: two open arms without a wall (35 cm × 6 cm) and two closed arms (35 cm × 6 cm × 15 cm) and is situated at a height of 60 cm from the floor. The luminosity at the end of the open arms was 60 Lux. The subject mouse was placed in the maze with the head directed to an open arm and allowed to freely explore the different arms for a period of 5 mins. The distance travelled, the percentage of time spent in open arms, the frequency of visit of each arm, and the head dips were quantified.

2.16.5. Marble burying test

The marble burying test is used to evaluate anxiety and compulsive-like behaviors. 20 marbles were arrayed on the surface of clean bedding (5 rows of 4 marbles each). The mouse was placed in a closed cage for 15 mins. The number of marbles buried was scored by two investigators and averaged. A marble was considered buried when 2/3 of its surface was covered.

2.16.6. Y-maze

The spontaneous alternation behavior test is used to evaluate short-term working memory. The test was performed using a three-armed Y-maze where the arms have the same size (35 cm × 15 cm; Noldus) lighted under a luminosity of 50 Lux. The subject mouse was placed on the Y-maze, the head directed to an open arm, and allowed to freely explore the different arms for a period of 6 mins. An alternation was considered successful if the animal visited three consecutive different arms. The percentage of alternation was calculated by dividing the number of correct alternations by the number of triads (number of triads = total entries – 2).

2.16.7. Hot plate

The hot plate test is used to evaluate thermal sensitivity. The mice were placed into a hot plate set to 52 °C, and the latency to the first reaction (shake, jump, and lick) was recorded.

2.16.8. Traction test

The suspension test is used to evaluate motor function. The subject mouse was suspended by its forelimbs on a horizontal bar at a height of 30 cm. The latency of fall was recorded. If the animal did not fall after 5 mins, the test was stopped, and the latency recorded was 300 s.

2.16.9. Forced-swim test

The forced swim test is used to evaluate depressive behavior. It was performed using the original method described by Porsolt and colleagues (Porsolt et al., 1977). The chamber was a glass container with a diameter of 13 cm filled with water at 23 °C to a depth of 20 cm. The behavior of the subject mouse was video-recorded for a period of 6 mins. The latency before the first stop and the duration of immobility during the last 4 mins were manually analysed.

2.17. Systematic literature review

Searches of the literature were performed in Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) using two independent keywords, “Cohen syndrome” and “Vps13b”. A total of 47 publications were identified and classified as relevant and read by the same person. Information systematically recorded included the origin, age, and sex of the patient, the mutation type, whether cerebral magnetic resonance imaging (MRI) was performed or not, and if so, a description of the MRI findings, presence or absence of microcephaly, and any other information related to intellectual disability, behavioral concerns (such as excessive cheerful disposition and repetitive behaviors), craniofacial anomalies and hypotonia (Table S1).

2.18. Statistics

Statistics were performed with GraphPad Prism 8.0.2. The detection of outliers was performed using the ROUT 1% test. The normality of the distribution of the data was checked using a combination of 4 tests (D'Agostino 1 Person test, Shapiro-Wilk test, Kolmogorov-Smirnov test, and Anderson-Darling test). The normality test was declared as passed if at least 3 of the 4 tests were passed. Normally distributed data were analysed using two-tailed Student's *t*-test, while non-normally distributed data were analysed using Mann-Whitney test. Tests utilized are indicated in the legends of the figures. Results are reported as box plots with individual data points overlaid as mean ± sample standard error of the mean, except Fig. 4E-F, which show an average for simplicity purposes. Significance was reported as follows: **P* < 0.05, ***P* < 0.01 and ****P* < 0.001. All replicates are biological replicates. For qPCR data, delta *C_T* values were obtained by normalizing *C_T* values of *Vps13b* against one housekeeping gene, *Gnas* or *Hprt*.

3. Results

3.1. *Vps13b* is expressed in neurons from embryonic to adult stages with postnatal peak

Aside from an old study reporting *Vps13b* expression in the brain (Mochida et al., 2004), a detailed analysis of *Vps13b* expression profiles in the mouse has not been clearly established yet. We thus began by assessing the distribution of *Vps13b* transcripts in five different brain regions (cortex, hippocampus, cerebellum, pons, hypothalamus) and six peripheral tissues (heart, liver, kidney, white adipose tissue, muscle, and lung) by RT-qPCR, in adult male and female WT mice, tagging three positions along *Vps13b* transcripts (Fig. 1B and Methods).

Overall, we found consistent expression throughout the examined tissues with highest expression in the cerebellum, the hippocampus, the cortex, the liver, the kidney, and the lung (Fig. 1C-D). More specifically, when looking at the three tagged positions, we identified differential transcript distribution in the peripheral system. However, in the central nervous system, the canonical transcript seems to be the main transcript expressed, in line with the notion that only one main transcript is expressed ubiquitously throughout the brain (Mochida et al., 2004). Interestingly, in the pons, our study reveals the presence of an additional putative mouse transcript consistent with an existing transcript in the corresponding human locus (Fig. S1A). Overall, the expression profiles were consistent between males and females across transcripts (Fig. 1C-D). We then assessed *Vps13b* expression at eight stages of mouse brain development from embryonic day 18.5 (E18.5) to postnatal day 126 (P126), in adult male and female WT mice. At every stage examined, *Vps13b* was expressed but showed a postnatal peak of expression at P35 in both males and females (Fig. 1E-F) in line with an existing resource of expression profiles across multiple organs and developmental stages, which also revealed a postnatal peak of *Vps13b* expression at P28 (Fig. S1D) (Cardoso-Moreira et al., 2019). To complement these tissue-level results, we next examined *Vps13b* expression in cells upon differentiation treatment in Neuro2a neuronal cells and found an increase of 44% (*P* = 0.03) in *Vps13b* expression levels in differentiated neurons (Fig. S1E). The published single cell transcriptomic atlas of the developing mouse cortex also showed higher *Vps13b* expression in the differentiation of newborn and mature neurons when compared to progenitor cells (Fig. S1F) (Telley et al., 2016). By analysing the adult single cell transcriptomic atlas of the mouse brain in the cortex and the hippocampal formation (Yao et al., 2021) (Methods), we further found highest percentage of *Vps13b* expressing cells in excitatory (92% and 82%) and inhibitory (85% and 81%) neurons in the cortex and the hippocampus, respectively (Fig. 1G).

Together these results indicate that the canonical protein-coding *Vps13b* transcript is expressed in neuronal tissues from late embryonic to adult stages with postnatal peak.

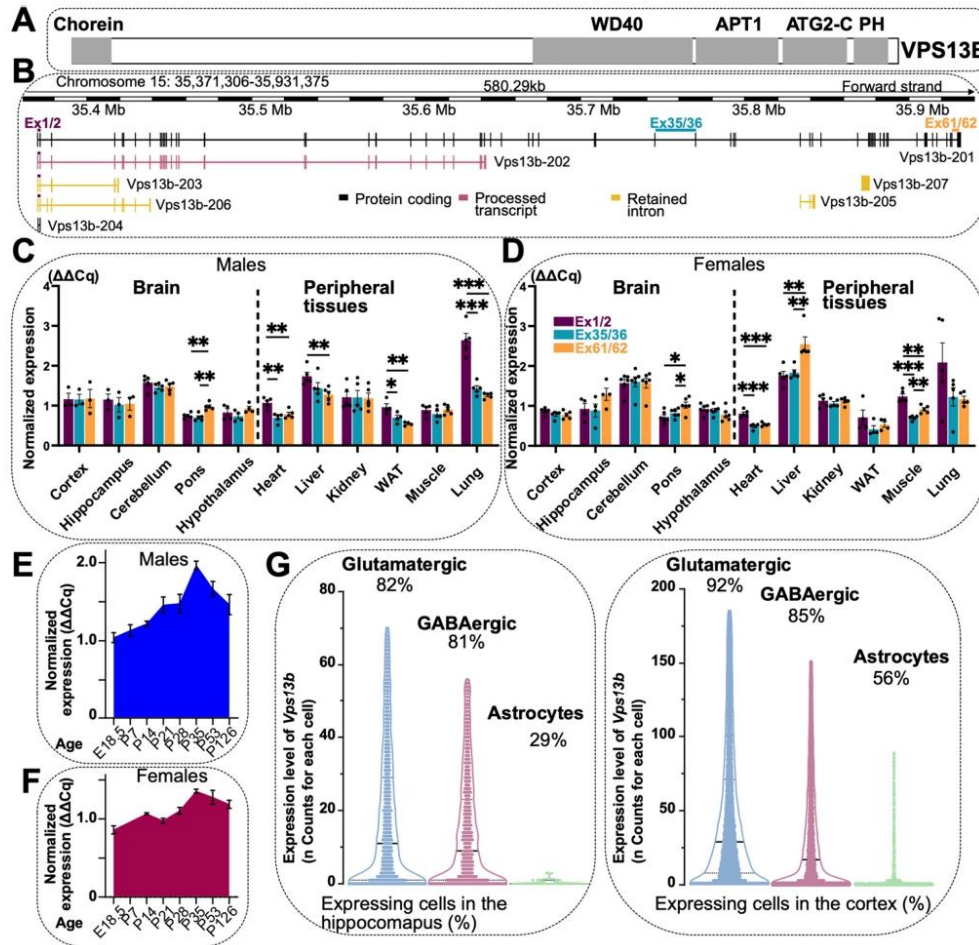
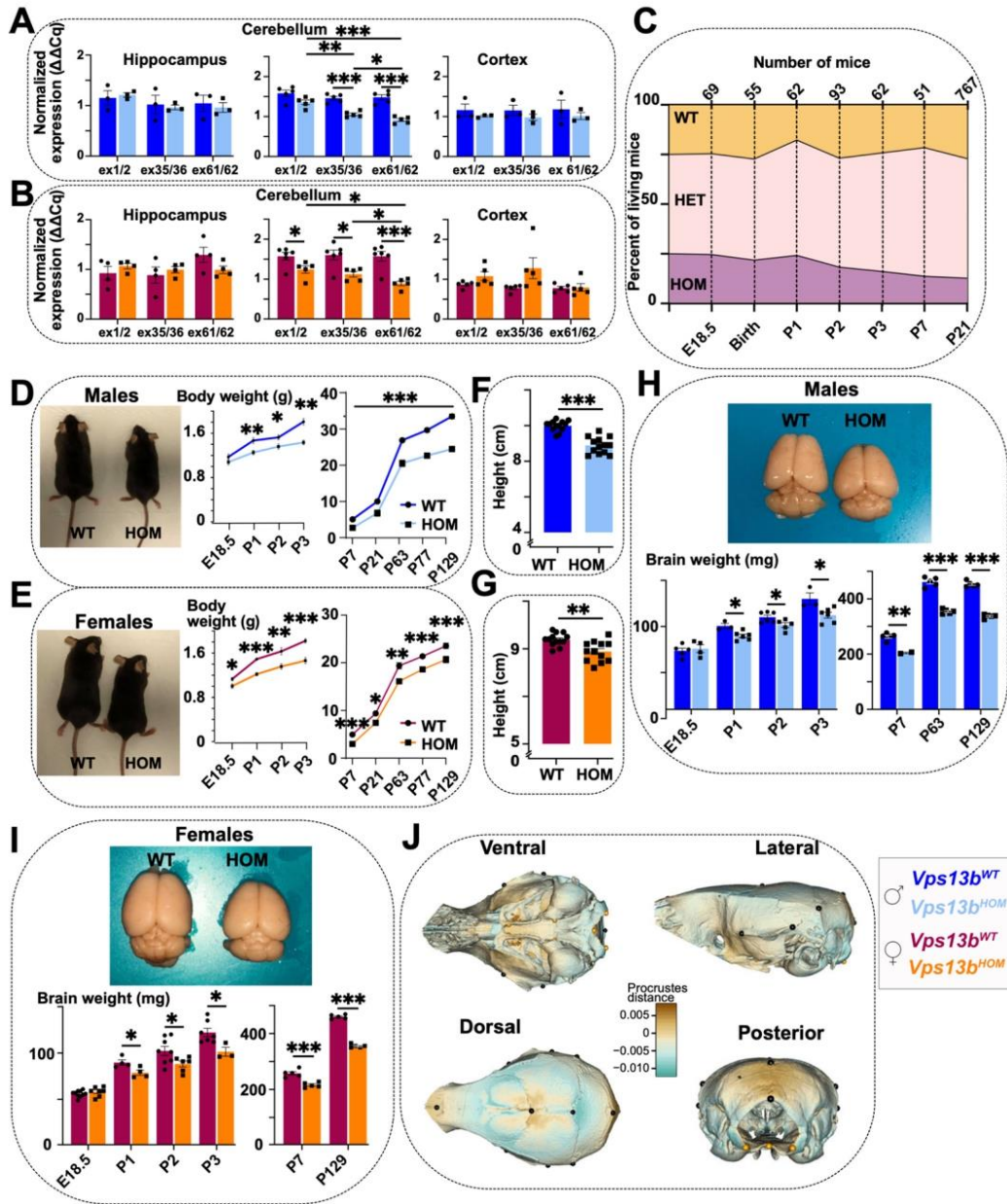


Fig. 1. *Vps13b* is expressed in the brain. (A) Schematic representation of VPS13B domains: Chorein, WD40-like, APT1 (acyl-protein thioesterase), ATG2-C (autophagy related protein 2C-terminal), and PH (pleckstrin-homology like). Domains were predicted based on AlphaFold prediction and homology searches (Jumper et al., 2021). (B) *Vps13b* genomic locus and *Vps13b* transcripts annotation relative to the mouse assembly GRCh38.p6. The position of the primers used in the expression study is indicated in a purple solid line (exon 1/2), blue (exon 35/36), and orange (exon 61/62). (C) Male *Vps13b* relative expression using RT-qPCR in 19 weeks old WT mice across 11 tissues. Male mice used for cortex and hippocampus ($n = 3$); hypothalamus and white adipose tissue (WAT) ($n = 4$); all other tissues ($n = 5$). (D) Female *Vps13b* relative expression using RT-qPCR in 19 weeks old WT mice across 11 tissues. Female mice used for hippocampus and WAT ($n = 4$); cerebellum, pons, and hypothalamus ($n = 6$); all other tissues ($n = 5$). Measurements were performed in triplicate. Normalization was done using *Hprt* (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase). (E) Male *Vps13b* longitudinal expression in WT whole brain using RT-qPCR. E18.5 ($n = 5$ male mice used); P7 ($n = 4$); P14 ($n = 5$); P21 and P28 ($n = 4$); P35 and P53 ($n = 3$); P128 ($n = 4$). (F) Female *Vps13b* longitudinal expression in WT whole brain using RT-qPCR. E18.5, P14, P21, P28 and P35 ($n = 3$); P53 ($n = 2$); P126 ($n = 3$). Normalization was done using *Gnas* (guanine nucleotide-binding protein, alpha-stimulating) for both male and female mice. (G) Violin plot showing *Vps13b* expression in percentage of cells expressing *Vps13b* in hippocampal and cortical cells using existing single cell RNA sequencing data. (C–D) Each plot represents mean \pm SEM. Statistical analysis was done using Student's *t*-test (two-tailed). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

3.2. *Vps13b* is essential for survival, growth, and brain homeostasis

To model the mutated recessive disease-causing *VPS13B* gene, we used a mouse model engineered by homologous recombination to delete a critical exon (exon four). A recent report on LoF mouse models showed that nonsense-mediated mRNA decay (NMD), a mechanism that degrades transcripts, is generally not achieved with a critical-exon

approach (Lindner et al., 2021). We thus thought to verify NMD in our model in different brain regions. While we confirmed that NMD does not take place in the hippocampus and the cortex of mutant HOM mice, we noticed marginal NMD in the cerebellum (Fig. 2A–B). The differences in NMD between the forebrain, the midbrain and the hindbrain doesn't seem to be linked to the differences in the severity of the phenotypes (Fig. 2A–B, S2E–F and Table S9), suggesting that the impact of *Vps13b*



(caption on next page)

Fig. 2. Phenotyping of *Vps13b*-mutant mice reveals pleiotropy in various developmental contexts. (A) Expression of *Vps13b* transcript in male mice at 19 weeks of age using RT-qPCR (WT vs HOM): hippocampus ($n = 3$ vs 3); cerebellum ($n = 5$ vs 5) and cortex ($n = 3$ vs 3). (B) Expression of *Vps13b* transcript in female mice (WT vs HOM): hippocampus ($n = 4$ vs 4); cerebellum ($n = 6$ vs 5), and cortex ($n = 5$ vs 5). Normalization was done using *Hprt* (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) for both male and female. Each measure was realized in triplicate. (C) Mouse survival outcome carried out at seven time points both in males and female mice. Expected Mendelian ratio is 25% WT, 50% HET, and 25% HOM. (D) Left: Photograph of WT and mutant HOM male mice at 19 weeks of age. Right: Body weight curves of WT vs HOM male mice at nine ages (E18.5: $n = 9$ vs 9; P1: $n = 6$ vs 10; P2: $n = 11$ vs 6; P3: $n = 7$ vs 7; P7: $n = 5$ vs 2; P21: $n = 19$ vs 5; P63: $n = 5$ vs 4; P77: $n = 15$ vs 12; P129: $n = 11$ vs 7). (E) Left: Photograph of WT and mutant HOM female mice at 19 weeks of age. Right: Body weight curves of WT vs HOM female mice at nine ages (E18.5: $n = 13$ vs 12; P1: $n = 5$ vs 4; P2: $n = 12$ vs 11; P3: $n = 10$ vs 3; P7: $n = 6$ vs 5; P21: $n = 23$ vs 8; P63: $n = 4$ vs 4; P77: $n = 17$ vs 11; P129: $n = 10$ vs 10). (F) Height plot of WT and HOM male mice at 19 weeks of age ($n = 13$ vs 13). (G) Height plot of WT and HOM female mice at 19 weeks of age ($n = 13$ vs 12). (H) Top: Photograph of brain samples derived from WT and HOM male mice aged 19 weeks. Bottom: Brain weight plots at seven ages (E18.5: $n = 5$ vs 4; P1: $n = 3$ vs 6; P2: $n = 6$ vs 5; P3: $n = 3$ vs 6; P7: $n = 5$ vs 2; P63: $n = 5$ vs 5; P129: $n = 5$ vs 5) of HOM male mice. (I) Top: Photograph of brain samples derived from WT and HOM female mice at 19 weeks of age. Bottom: Brain weight plots at six ages (E18.5: $n = 10$ vs 7; P1: $n = 4$ vs 4; P2: $n = 8$ vs 6; P3: $n = 7$ vs 3; P7: $n = 5$ vs 5; P129: $n = 5$ vs 5). (J) Skull shape analysis in mutant HOM male and female mice combined ($n = 9$) relative to WT ($n = 9$). Darker colors represent strong positive (blue) or negative (brown) deviation from the WT, given in Procrustes distance. Positive distance represents expansion from the WT, whereas negative distance represents contraction from the WT. (A–B and H–I) Each plot represents mean \pm SEM. Statistical analyses were done using Student's *t*-test (two-tailed). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

mutation on the brain might be controlled at the level of protein expression, which we were unable to show due to a lack of antibody specificity (Supplementary Methods).

Mouse survival was assessed from 767 successfully genotyped mice at weaning age (P21), at which stage the expected ratio was not met (27% WT, 60% HET, and 13% HOM), indicating a lethality of 50% in mutant HOM mice (Fig. 2C). To determine whether death occurs at birth, we performed birth delivery at term using 69 E18.5 embryos and monitored the newborns 30 mins after birth. Mendelian ratio was respected at E18.5, mutant HOM newborns did not reveal excess mortality, and the various functions monitored after caesarean were normal (Fig. S2G and Table S6). To determine the lethality window during the newborns' first week of life, we genotyped mice at P1 ($n = 62$), P2 ($n = 93$), P3 ($n = 62$), and P7 ($n = 51$). While the mendelian ratio was respected at P1 (24% HOM), it decreased progressively, ranging from 18% at P2 to 14% at P7, and 13% at P21, from which stage onwards, the ratio remained stable throughout life, suggesting progressive lethality during the neonatal period, possibly due to poor feeding ability and poor oral-motor skills of mouse pups between birth and weaning age, as evidenced in human studies (Montazmanesh et al., 2020). In respect of the other genes of the same family, the progressive lethality during the neonatal period is unique to the *Vps13b* gene. *Vps13a* and *Vps13c* mice are fully viable while *Vps13d*-mutant mice have been reported as completely lethal prior to tooth bud stage assessed at E12.5 from the IMPC Consortium (White et al., 2013) (also see <https://www.mousephenotype.org/data/genes/MGI:2448530>).

Mutant HOM mice that survived were monitored for body and brain weight at multiple time points (birth, P1, P2, P3, P7, P21, P63, P77, and P129), independently in males and females (Table S7). Body weight differences between mutant HOM and WT progressively worsened during the first week of life and reached a maximum at P7 with a sudden reduction of 47% ($P = 0.01$) in mutant male and 40% ($P = 0.00003$) in mutant female HOM mice (Fig. 2D–E). From weaning age onwards, body weight was not as severely altered as in the neonatal period; for example, at P129, HOM male mice were smaller by 27% ($P < 10^{-4}$) and HOM female by 13% ($P < 10^{-4}$), suggesting partial rescue mechanisms over time with the mutant female mice being less affected. Body height differences were mild, with male mutant shorter by 12% ($P < 0.0001$) and female mutant HOM mice by 8% ($P = 0.002$) (Fig. 2F–G).

Brain weight differences were not apparent at birth but started to be visible as of the first postnatal day, with a reduction of 12% in both mutant HOM male and female mice (Fig. 2H–I). By contrast to body weight, progression occurred evenly from P1 to P7 (with no sudden change at P7) and was slightly faster in mutant male which reached a reduction of 23% in brain weight by P7 ($P = 0.002$) as opposed to 16% ($P = 0.0005$) in mutant female HOM mice. In adult ages, brain weight was overall consistent at P63 and P129 when compared to P7 (Fig. 2H–I), suggesting that brain homeostasis is mainly altered during the first week of life in mice. As a control, body and brain weight was also assessed in

the mutant HET mice at similar time points, in males and females, and no difference was seen (Table S7 and Fig. S2H–I).

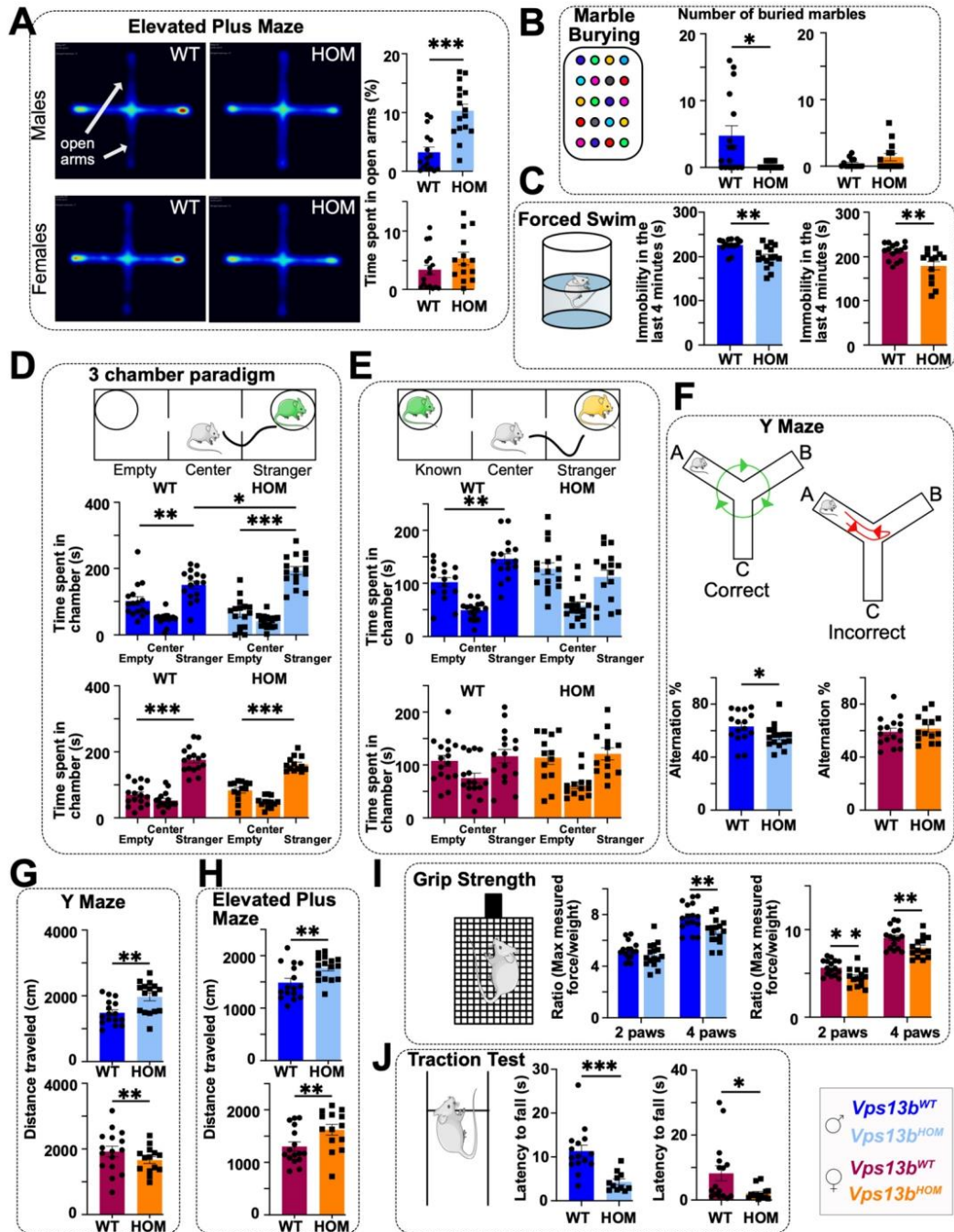
Adult mutant HOM mice that survived were also examined for the size and the shape of the skull using 19 landmarks to study the basicranium, the neurocranium, and the endocranium. Applying μ CT-based geometric analyses, without controlling for the general lower size of the skull of mutant mice, showed a decrease in the size of the basicranium (–5.9%) consistent with the decrease in the size of the neurocranium (–6.7%). The size of the computed endocranium volume was however reduced by 20.7% when compared to WT (Supplementary Results). These defects remained significant even after controlling for the general lower size of the skull of mutant mice. Procrustes shape analysis showed a significant phenotypic effect explaining 14% of the total Procrustes variance in skull shape with no obvious differences between male and female mutant HOM mice (Supplementary Results). Shape changes mainly involve the cranial vault which undergoes shrinkage occurring with a concomitant expansion of the anterior and the posterior parts of the neurocranium (Fig. 2J and Movie S1).

Together these results implicate *Vps13b* in multiple phenotypes that appear within the first week of life and are characterized by distinct progression of effect sizes suggesting *Vps13b* pleiotropy in various developmental contexts regulating mouse survival, growth, brain and skull size, with females less affected than male *Vps13b*-mutant mice.

3.3. *Vps13b* is involved in resilience to anxiety, enhanced sociability, altered memory, hyperactivity, and hypotonia

To add to the first report of behavioral deficits in spatial memory (Kim et al., 2019), we set out to assess additional cognitive functions, including sensory functions, short-term memory, social recognition, anxiety-like behaviors, and depression, independently in mutant HOM male and female mice. The experimental workflow is provided in Fig. S3A, raw data in Table S8, and explanations of each behavioral paradigm in the Methods section.

Mutant HOM male mice were less anxious because they spent more time (three-fold increase, $P < 0.0001$) in the open arms of the elevated plus maze when compared to WT mice (Fig. 3A) and showed increased level of head-dipping behavior ($P = 0.002$) (Fig. S3B). This was confirmed using the marble burying test, which showed a reduced number of marbles buried ($P = 0.01$), reflecting resilience to anxiety (Fig. 3B). In the forced swim test, mutant HOM male mice showed a reduction of 8% ($P = 0.001$) in immobility time when compared to WT (Fig. 3C), indicating a certain degree of resilience to depressive behaviors as well. The three-chamber paradigm revealed an enhanced social motivation as mutant HOM mice spent 22% ($P = 0.015$) more time with the naive mouse (Intruder 1) (Fig. 3D), while they did not show a preference for one side or the other during the habituation phase (Fig. S3D). In the social recognition test, mutant HOM male mice did not spend more time with the newly encountered mouse (Intruder 2) than



(caption on next page)

Fig. 3. Assessment of behavioral traits in *Vps13b*-mutant mice show hypotonia, altered memory, and enhanced sociability. (A) Left: Heat map of the time spent in each arm of the Elevated Plus Maze (EPM) apparatus. Right: Percentage of time spent in the open arms of the EPM. Male WT ($n = 16$) vs male HOM ($n = 16$) mice; female WT ($n = 16$) vs female HOM ($n = 14$) mice. (B) Number of buried marbles (out of 20) in the Marble Burying Test after 15 mins. Male WT ($n = 16$) vs male HOM ($n = 16$) mice; female WT ($n = 14$) vs female HOM ($n = 14$; 2 outliers removed) mice. (C) Immobility time in the last four mins of the Forced Swim Test. Male WT ($n = 16$) vs male HOM ($n = 16$) mice; female WT ($n = 15$) vs female HOM ($n = 13$) mice. (D) Time spent in the “Empty” and “Stranger” chambers of the Three-Chamber Paradigm to test social behaviors. Male WT ($n = 16$) vs male HOM ($n = 16$) mice; female WT ($n = 16$) vs female HOM ($n = 13$) mice. (E) Time spent in the “Known” and “Stranger” chambers of the Three-Chamber Paradigm to test social memory. Male WT ($n = 16$) vs male HOM ($n = 16$) mice; female WT ($n = 16$) vs female HOM ($n = 13$) mice. (F) Percentage of correct alternations in the Y Maze Test. Male WT ($n = 16$) vs male HOM ($n = 16$) mice; female WT ($n = 16$) vs female HOM ($n = 14$) mice. (G) Distance (in cm) travelled in the Y Maze Test. Male WT ($n = 16$) vs male HOM ($n = 16$) mice; female WT ($n = 16$) vs female HOM ($n = 14$) mice. (H) Distance (in cm) travelled in the Elevated Plus Maze. Male WT ($n = 16$) vs male HOM ($n = 16$) mice; female WT ($n = 16$) vs female HOM ($n = 14$) mice. (I) Ratio of maximal measured force/weight in the Grip Strength Test for forelimbs or fore- and hind-limbs. Male WT ($n = 16$) vs male HOM ($n = 16$) mice; female WT ($n = 16$) vs female HOM ($n = 14$) mice. (J) Latency to fall in the Traction Suspension Test. Male WT ($n = 15$) vs male HOM ($n = 12$) mice; female WT ($n = 16$) vs female HOM ($n = 13$) mice. All plots are represented as mean \pm SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns = not significant. Unpaired Student's *t*-test was the main statistical test used to detect differences between groups of mice, except for panels B–C and J for which Mann-Whitney comparative ranks were used instead.

the familiar mouse (Intruder 1) (Fig. 3E), suggesting an altered social recognition memory. In the Y-maze, the mutant HOM male mice also showed a deficiency in working memory. The percentage of good alternation was lower in mutant HOM male mice compared to WT mice (55% vs 63%, $P = 0.049$) (Fig. 3F). Interestingly, mutant HOM male mice were 33% ($P = 0.003$) more active than the WT in the Y-maze (Fig. 3G and S3E). The hyperactivity was replicated in the elevated plus maze paradigm with the mutant males covering 19% ($P = 0.009$) more distance than WT (Fig. 3H). Controversially, mutant HOM males showed muscular weakness (-14% , $P = 0.002$) when testing both forelimbs and hindlimbs using the grip test (Fig. 3I). This was confirmed using the traction test, where the latency to fall was 2.5-fold reduced ($P < 10^{-4}$) in HOM males compared to WT (Fig. 3J). The mutant HOM males show no phenotypes in heat resistance during the hot plate test (Fig. S3F).

The behavioral phenotypes are less pronounced in females. Unlike males, mutant HOM female mice did not show deficiency in working memory (Fig. 3F) or resilience to anxiety (Fig. 3A). But interestingly, they were still resilient to depressive behaviors since they showed a reduction of 16% ($P = 0.009$) in immobility time in the forced swim test (Fig. 3C) and in latency to the first immobilization when compared to WT (Fig. S3C). The hyperactivity has only been observed in the elevated plus maze where mutant HOM female mice travelled 24% more distance ($P = 0.02$) than WT (Fig. 3G). Mutant HOM female mice were also hypotonic. They showed lower grip strength than WT for forelimbs only (-20% , $P = 0.007$) and both forelimbs and hindlimbs (-14% , $P = 0.006$) (Fig. 3I). This was confirmed in the traction test, where the latency to fall was four-fold smaller ($P = 0.028$) in mutant HOM female mice when compared to matched WT (Fig. 3J). Interestingly, only HOM female mice showed a decrease ($P = 0.007$) in the time spent in the center of the arena during the open-field test (Fig. S3G).

To summarise, both male and female mutant HOM mice showed hyperactivity, hypotonia, and resilience to depression, but only male mutant HOM mice exhibited impaired memory, enhanced sociability, and resilience to anxiety.

3.4. *Vps13b* mice show a mosaic of neuro-morphological defects with the most severe phenotypes pertaining to the hippocampus

We previously showed that studies of mouse brain morphogenesis offer stable endophenotypes of behavioral disorders (Collins et al., 2019). In this study, we developed a new pipeline based on high-resolution episcopic microscopy, a 3D histology technique (Methods). We analysed 24 unique segments covering the whole brain, focusing on male mice, and found decreased volume for the majority of segments (21/24), including the total brain volume (-28% , $P = 2.9 \times 10^{-5}$), the total cortical volume (-28% , $P = 0.00023$), the total volume of the cerebellar arbor vitae layer (-30% , $P = 8.4 \times 10^{-4}$), the total volume of the medulla oblongata (-31% , $P = 0.0068$), the total volume of the amygdala (-32% , $P = 0.0005$), and the total volume of the midbrain (-32% , $P = 4.0 \times 10^{-4}$) (Fig. 4A and Table S9). Interestingly, not all segments covering white matter bundles were smaller in size. While the

total volume of the corpus callosum was smaller by 31% ($P = 1.8 \times 10^{-5}$) and the total volume of the anterior commissure by 38% ($P = 4.53 \times 10^{-5}$), the fornix and the fasciculus retroflexus were not altered (Fig. 4A and Table S9). The volume of the ventricles was not changed either. The total volume of the hippocampus was the most severely reduced segment in size by 39% ($P = 8 \times 10^{-5}$). After controlling for the small total brain volume of HOM mice, Procrustes shape analysis showed tilting of posterior regions, such as the cerebellum sliding down below the cerebrum while the posterior base of the cerebrum underwent expansion ventrally (Fig. 4B and Movie S2).

To examine neuro-morphological features down to cell-level resolution, we then used our existing 2D quantitative and precision histology approach for the assessment of 40 global morphological parameters in 22 different brain regions (Collins et al., 2018). This consisted of a systematic quantification of the same sagittal brain region at Lateral +0.60 mm (Fig. S4A–B). Male and female mice were analysed at five stages from birth to 5, 7, 18, and 33 weeks of age, measuring 40 brain parameters in each stage (Table S3). The total brain area was normal at birth both in male and female HOM mice (Fig. 4C–D). Likewise, no other neuroanatomical phenotypes were detected at birth. At 5 weeks of age, the total brain area at Lateral +0.60 mm had gone smaller by 22% in male ($P = 0.01$) and by 17% in female ($P = 0.01$), with no worsening until the age of 33 weeks (Fig. S4C). Most other parameters were also smaller in size in mutant HOM mice with no apparent progression between 5 and 33 weeks of age (Fig. S4C). For example, at the age of 7 weeks, the area of the thalamus was reduced by 20% ($P = 0.002$) in male and by 25% ($P = 0.003$) in female, the area of the inferior colliculus was smaller by 30% in male ($P = 0.03$) and by 30% ($P = 0.005$) in female, and the area of the superior colliculus was reduced by 18% in male ($P = 0.005$) and by 17% ($P = 0.02$) in female mutant HOM mice (Fig. 4E–F and S4C). Consistent with 3D histology, the most severely affected parameter pertained to the hippocampus with the dorsal subiculum decreased in size by 41% ($P = 0.005$) in male and by 29% ($P = 0.0005$) in female mutant HOM mice (Fig. 4E–F). The area of the corpus callosum was smaller by 24% ($P = 0.02$) in male but not in female mutant HOM mice (Fig. 4E–F). The cingulate cortex was not altered in both sexes. Taking advantage of the cell-level resolution of our 2D histology approach, we manually counted Nissl-stained cells across the four adult stages, which revealed a decrease in the number of cells within most affected regions (Fig. S4D). At birth, however, the HOM mice did not show any difference in the number of cells in the regions analysed (the lower layer of the cortical plate, thalamic nucleus 1, thalamic nucleus 2, and the inferior colliculus) (Fig. 4G), suggesting that neuro-morphological defects stem from cell loss after birth. Consistently, quantification of the proliferation marker *ph3S10* in the hippocampus and in the cortex did not show any changes between WT and HOM mice (Fig. S4E–F). No difference was observed between the brains of WT and HET *Vps13b*-mutant mice, confirming the recessive character of the disorders (Table S10).

Together, 2D and 3D histology findings indicate that *Vps13b* is a key regulator in the maintenance of brain homeostasis after birth, showing a

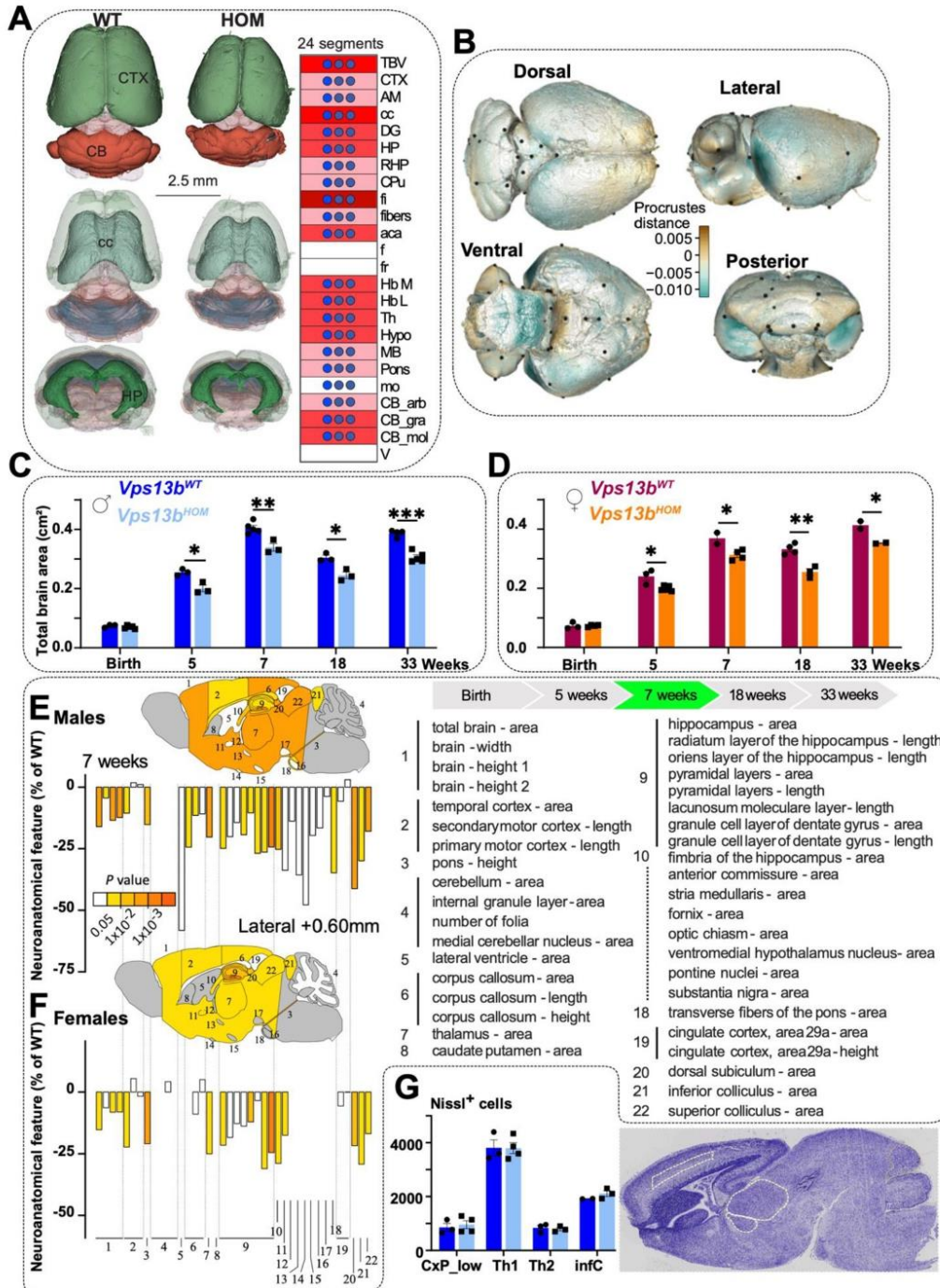


Fig. 4. *Vps13b* is implicated in a diversity of neuroanatomical phenotypes from birth through adulthood. (A) HREM postprocessing: we developed a standardised operating procedure for the segmentation of 24 brain regions in 10 brain samples (5 WT and 5 HOM) derived from male mice aged 19 weeks (Supplementary Methods). Left: Image of a representative WT and HOM 3D rendering. Scale bar is 2.5 mm. Right: Blue circles indicate $P < 0.001$ using Student's t-test (two-tailed). Pink rectangles indicate z-scores of 4–6, and red rectangles of 6–11. (B) Brain shape analysis using HREM segmentations from Panel B. Blue colors represent positive (expansion) and brown colors negative (shrinkage) deviations from the WT, given in Procrustes distance. (C) Time course neuroanatomical studies from birth to 5, 7, 18, and 33 weeks of age in a total of 38 male mice. 40 parameters were measured in each stage (Fig. S4A-B and Table S10). We show the distribution of one of the 40 parameters, the total brain area (TBA) across the different time points, male WT vs HOM mutant mice (birth: $n = 3$ vs 4; 5 weeks: $n = 3$ vs 3; 7 weeks: $n = 3$ vs 2; 18 weeks: $n = 3$ vs 3; 33 weeks: $n = 4$ vs 5). (D) Time course neuroanatomical studies from birth, to 5, 7, 18 and 33 weeks of age in a total of 44 female mice (Fig. S4A-B and Table S10). We show the distribution of TBA, across the different time points, female WT vs HOM mutant mice (birth: $n = 3$ vs 4; 5 weeks: $n = 3$ vs 5; 7 weeks: $n = 2$ vs 4; 18 weeks: $n = 4$ vs 3; 33 weeks: $n = 2$ vs 2). (E) Top: Heat map of 22 distinct brain regions quantified at Lateral +0.60 mm in male mice at the age of 7 weeks. Bottom: Bar plots of percentage changes of brain structural areas relative to male WT mice. (F) Top: Heat map of 22 brain regions quantified at Lateral +0.60 mm in female mice at the age of 7 weeks. Bottom: Bar plots of neuroanatomical percentage changes relative to female WT mice. (G) Right: Representative brain images stained with Nissl of a male WT at birth compared to a male HOM of the same age. The lower layer of the cortical plate, the two thalamic nuclei, and the inferior colliculus are circled using dashed yellow line. Left: Nissl-stained counted cells from the previously circled regions in WT and HOM newborns. Plots from panels C–D and G are represented as mean \pm SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns = not significant (unpaired Student's t-test). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

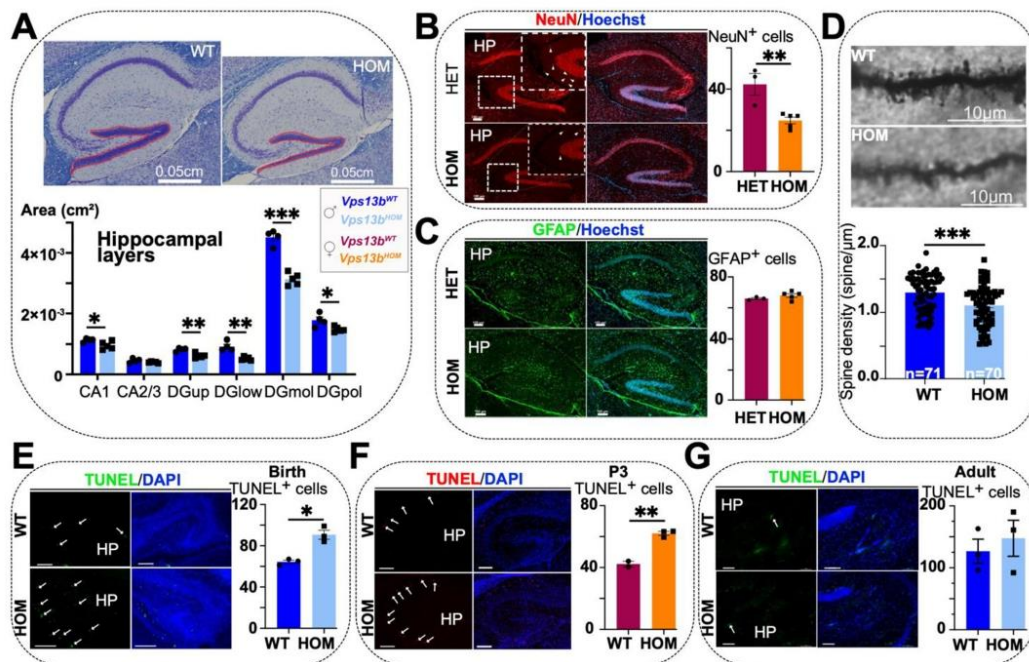


Fig. 5. Finer-scale analysis of *Vps13b*-mutant mice reveals neuronal loss in the hippocampus. (A) Top: Sagittal image at Lateral +0.60 mm double-stained with Nissl-luxol showing the granular layer of the dentate gyrus in red. Bottom: Histogram of hippocampal layer areas ($n = 3$ WT vs $n = 5$ HOM male mice aged 33 weeks). Abbreviations: CA1 = layer 1 of Cornus Ammonis; CA2/3 = layers 2 and 3 of Cornus Amonis; DG up = upper arm of granular layer of the dentate gyrus; DG low = lower arm of granular layer of the dentate gyrus; DG mol = molecular layer of the dentate gyrus; DG pol = polymorphic layer of the dentate gyrus. The delimitation of each area is shown in Fig. S5A. (B) Left: NeuN immunostaining in the hippocampus (HET $n = 3$ vs HOM $n = 5$ female mice, 5 weeks old). The number of positive cells has been counted in the molecular layer of the DG using ImageJ. Right: Histogram showing counts of NeuN+ cells in the molecular layer of the DG (HET vs HOM). The HET mice are used as control. Scale bar indicates 100 μ m. (C) Left: GFAP immunostaining in the hippocampus (HET $n = 3$ vs HOM $n = 5$ female mice, 5 weeks old). Right: Histogram showing counts of GFAP+ cells in the molecular layer of the DG (HET vs HOM). Scale bar indicates 100 μ m. (D) Golgi-Cox staining (WT $n = 4$ vs HOM $n = 4$ male mice, 13 weeks old). Images were acquired using a Nikon Eclipse Ti at 100 \times magnification in multi-layers mode of 0.2 μ m. Histogram of spine density along granular cells of the DG. (E) TUNEL assay at birth in the hippocampus (male mice WT $n = 3$ vs HOM $n = 3$). Immunostaining on the left and quantification of positive cells on the right. Scale bar indicates 100 μ m. (F) TUNEL assay at postnatal day 3 (female mice WT $n = 2$ vs HOM $n = 3$). Scale bar indicates 100 μ m. (G) TUNEL assay in adult mice at 25 weeks (male mice WT $n = 3$ vs HOM $n = 3$). Scale bar indicates 100 μ m. Plots are represented as mean \pm SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. Unpaired Student's t-test. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

mosaic of neuro-morphological defects. The hippocampus is one of the most affected regions, while few regions, including the fornix, the fasciculus retroflexus, and the cingulate cortex, are not affected and could explain the dichotomy between positive and negative dispositions observed in behavioral manifestations.

3.5. *Vps13b* promotes neuronal survival in infancy

The hippocampus being one of the top brain regions affected by *Vps13b*-mutation, we thought to further characterize the underlying neuroanatomical phenotypes and developed a new finer-scale protocol for the analysis of the various layers of the hippocampus at the four stages already used for the generic analysis (5, 7, 18 and 33 weeks of age) in male mice (Methods and Fig. S5A). While the CA2/CA3 pyramidal layers of the hippocampus are not altered, most hippocampal defects originate from the dentate gyrus, with the most drastic effect observed in the granular layer (delineated in red in Fig. 5A). Notably, the lower arm of the dentate gyrus appeared more affected with a reduction of 44% of its size ($P = 0.001$) at 33 weeks of age when compared to the upper arm smaller by 25% ($P = 0.003$) at the same age (Fig. S5B). The molecular layer of the dentate gyrus was smaller by 31% ($P = 3.10 \times 10^{-5}$), and the area of the polymorphic layer decreased in size by 17% ($P = 0.03$) at 33 weeks of age. These finer-scale neuroanatomical phenotypes did not worsen between 5 and 33 weeks, in line with our previous neuro-morphological observations. Focusing on the dentate gyrus, we quantified NeuN+ and GFAP+ cells which revealed a specific decrease in the number of neurons (Fig. 5B) but not astrocytes (Fig. 5C). Consistently, similar findings were observed in the thalamus (Fig. S5C-E). We then focused on the perforant path which connects the entorhinal cortex to all areas of the hippocampus, including the granule cells of the dentate gyrus where the impact is strongest, and analysed neuronal morphology and more specifically, the density of dendritic spine. We found reduced spine density in male mutant HOM mice by 15% ($P = 0.0002$) (Fig. 5D), indicating a potential cortico-hippocampal network connectivity problem. Given the absence of neuroanatomical phenotypes in embryos, we next hypothesized that hippocampal structural changes are due to apoptosis. To test this, we used TUNEL assays at multiple time points, and showed that marked apoptosis was limited to the first days of life in the hippocampus (+41% of TUNEL+ positive cells at birth, $P = 0.005$; +47% at postnatal day 3, $P = 0.002$) (Fig. 5E-F) with no clear apoptotic indication in adulthood (Fig. 5G).

We adapted a similar approach for the cerebellum (Fig. S5F) and the cortex (Fig. S6A) by developing finer-scale protocols for the analysis of the various layers that make these structures. In the cerebellum, HOM male mice (aged 18 weeks) showed reduction of the total cerebellum area by 11% ($P = 0.02$), thinning of the internal granular layer by 30% ($P = 0.001$), and reduced density of Purkinje cells by 17% ($P = 0.04$) (Fig. S5G). TUNEL assays showed a dramatic increase of apoptotic cells by 220% ($P = 0.0004$) limited to birth with no indication of cell death at adult age (Fig. S5H-I). In the cortex, we found that only cortical layers I and VIa were affected with thinning by 18% ($P = 0.008$) in layer I and 24% in layer VIa ($P = 0.011$) in HOM male mice at the age of 33 weeks (Fig. S6B-C). We confirmed these observations using specific markers, showing a reduction of Reelin+ cells by 54% ($P = 0.006$) and of Tbr1 cells by 77% ($P = 0.0001$) (Fig. S6D-E). Consistently, in the cortex, TUNEL assays also revealed a substantial increase of apoptotic cells at birth but not at adult age (Fig. S6F-G).

Together, these results indicate that *Vps13b* promotes neuronal survival in infancy in major brain structures involved in cognition and

motor control, including the dentate gyrus, input region of the hippocampus through the perforant path, the cerebellum, and cortical layer VI involved in cortico-thalamo-cortical loops and integration of motor information.

3.6. Neurological features of Cohen syndrome show infantile alterations with no aggravation, and girls are less affected

In order to translate murine findings to the clinics of Cohen syndrome, we performed an extensive analysis of the literature focusing on manifestations pertaining to head size, brain anatomy, cognition, sociability, and motor functions and recorded data for 96 males and 71 females who received a molecular diagnosis for *VPS13B* (Table S1). Most patients being children, there is an enrichment of cases of 10 years old or younger, explaining why we split the data per age category into five bins (0, 0–1, 1–3, 3–5, 5–10 years old) (Fig. 6A-B). In *Vps13b*-mutant mice, brain size and anatomical defects appear progressively after birth in the first week of life, from which stage onwards, a plateau is reached with no aggravation up to adulthood and aging, with females less affected than males. Remarkably, we found equivalence in patients for head size with few patients (18%) who had an abnormal occipital frontal circumference (OFC) at birth, but by three years of age, all boys (100%) showed microcephaly (Fig. 6A). In girls, 6% were microcephalic at birth reaching 62% for the 1 to 3-year age group and stabilizing at 87% from 3 years onwards (Fig. 6B), reflecting milder impact on head size in females.

To trace OFC longitudinally for the same patient through various ages, we followed the evolution of the microcephaly phenotype in a cohort of 17 (14 boys and 3 girls) newly collected Cohen patients with *VPS13B* LoF mutations (Fig. 6C-D and Supplementary Results). These new 17 cases suggest that head size is overall normal at birth but rapidly decreases below the 3rd percentile after 2 months of life until 18 months, from which stage onwards it remains relatively stable. While microcephaly is fairly well documented in the literature on Cohen syndrome, neuroimaging findings are not systematic and will require careful reevaluations in the future. However, we were able to identify 20 patients (out of the 235 previously published) who had brain scan images showing structural anomalies. In line with the mouse, the cerebellum is reported as hypoplastic in 6 patients (Fig. 6E). Other brain regions reported as structurally altered include the corpus callosum (hypoplasia or enlargement), the posterior fossa (malformation), the subarachnoid space (dilatation), periventricular areas (increased white matter density), the sub-entorhinal space (dilatation), and the prefrontal, temporal lobe (under-development) (Fig. 6E).

Finally, we analysed behavioral data when available (Fig. 6F), and like in mice, intellectual disability is a common clinical feature in patients (100% of male vs 97% of female patients affected). Stereotypic behaviors are reported in 67% of males and 77% of females. The cheerful disposition is more present in males (93% of affected male vs 79% of female patients affected), which is consistent with the murine findings where male mice showed enhanced sociability but not female *Vps13b*-mutant mice. Hypotonia is present in 100% of males and 75% of females (the latter lacks statistical power as there were only four reports). To sum up, clinical and murine findings are consistent and confirm alterations in infancy with no aggravation later on in life, and females are less affected than males by *Vps13b* mutations. In Table 1, we provide a comparative summary table of the neuroanatomical and behavioral phenotypes between individuals with variants in the *VPS13B* gene and *Vps13b*-mutant mice, from this study and a literature review.

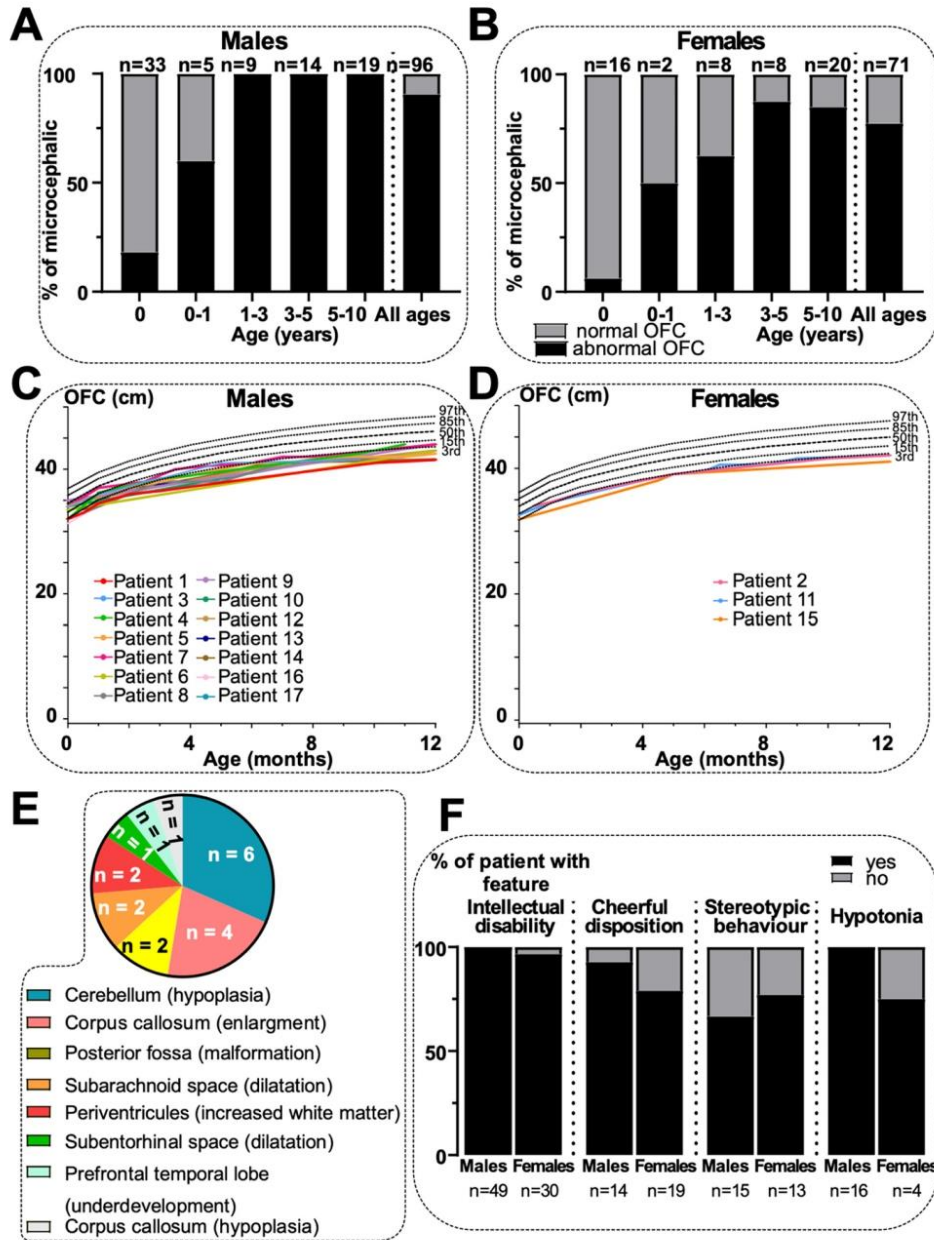


Fig. 6. Analysis of brain-related features of Cohen Syndrome. (A) Proportion of male patients based on available data showing microcephalic brain or not. Data from 96 male patients were reviewed and classified in six age groups ranging from birth to 10 years old. (B) Proportion of female patients exhibiting microcephaly or not. Data from 71 female patients were reviewed for head size phenotype. (C) Evolution of head size in 14 unreported male patients suffering from Cohen syndrome diagnosed with *VPS13B* mutations (Table S12). (D) Evolution of head size in 3 unreported female Cohen patients diagnosed with *VPS13B* mutations (Table S12). (E) Pie chart of the repartition of available data on cerebral structural changes in Cohen patients acquired using brain imaging (20/235). (F) Proportion of male and female patients with neurological features (intellectual disability, cheerful disposition, stereotypic behavior, and hypotonia).

Table 1

Comparative summary of neuroanatomical and behavioral phenotypes between individuals with variants in the *VPS13B* gene and *Vps13b*-mutant mice, from this study and a literature review (Rejeb et al., 2017; Koehler et al., 2020; Mochida et al., 2004; Waite et al., 2010; Katzaki et al., 2007; Bonfante et al., 2021; White et al., 2013; Kim et al., 2019; Zhao et al., 2019; Dehghan et al., 2021; Rafiq et al., 2015; Enomoto et al., 2020). The symbol "+" indicates the presence of the phenotype while "-" indicates its absence. In the first column, ID refers to Intellectual Disability. To facilitate the interpretation of the murine findings, we provide the full nomenclature of the models used in the literature review: for the current study, allele designation *Vps13b*^{7mi.kz}, mixed genetic background C57BL/6J × C57BL/6N; for Kim et al., (Kim et al., 2019) allele designation *Vps13b*^{em1Yosl}, genetic background C57BL/6N; for White et al., (White et al., 2013) allele designation *Vps13b*^{em1(IMPC)Tsp}, genetic background C57BL/6NCl. In *Vps13b*^{em1Yosl}, exon 2 was targeted with two sgRNAs (targeting ACGCTTAAATTGAAGATGCTGG and CGAGTAAAGTTG-GAGTTCTGG) using CRISPR/Cas9 technology, resulting in a 156 bp deletion that includes the start codon. In *Vps13b*^{em1(IMPC)Tsp}, the allele from IMPC was generated at Toronto Centre for Phenogenomics by injecting CAS9 Protein and 4 guide sequences CATGGATAATCTGTAAACAGCTGG, TGACAGTGCATTGCTATTTACGG, TATGGATTACCTGTATACAGTGG, CCTTGGCAAGCTGCACTGTTACA, which resulted in an Exon Deletion.

Features	Patients		Mice			
	%	Number	This Study	This study	Kim et al., 2019	White et al., 2013
			Males	Females		
Perinatal lethality	Not reported		+	+	Not reported	+
Growth retardation (short stature)	70%	102/145	+	+	-	+
Typical facial features	99%	117/118	+ (Bonfante et al., 2021)	+ (Bonfante et al., 2021)	Not reported	Not reported
Hypotonia	82%	18/22	+	+	+	Not reported
Hyperactivity		3 cases reported (Zhao et al., 2019; Dehghan et al., 2021; Rafiq et al., 2015)	+	+	Hypoactivity	Decreased exploration time
ID/memory impairment	99%	79/80	+	-	+	Not reported
Sociability/cheerful disposition	84%	27/32	+	-	-	Not reported
Stereotypic/autistic behavior	74%	20/27	Not assessed		Not reported	Not reported
Resistance to anxiety	Not reported		+	-	-	Not reported
Resilience to depression	Not reported		+	+	Not reported	Not reported
Microcephaly (postnatal)	87%	145/167	+	+	-	Not reported
Cerebellum hypoplasia		6 cases reported (Mochida et al., 2004; Waite et al., 2010; Katzaki et al., 2007)	+	-	Not assessed	Not reported
Corpus callosum dysgenesis		5 cases reported (Rejeb et al., 2017; Koehler et al., 2020; Mochida et al., 2004)	+	+	Not assessed	Not reported
Malformation of posterior fossa		2 cases reported (Enomoto et al., 2020)	Not assessed		Not assessed	Not reported
Dilatation of subarachnoid space		2 cases reported (Enomoto et al., 2020)	Not assessed		Not assessed	Not reported
Hippocampal defects	Not reported		+	+	Not assessed	Not reported
Cortical anomalies	Not reported		+	+	Not assessed	Not reported

4. Discussion

Here we report a detailed characterization of male and female *Vps13b*-mutant HOM mice focusing on brain biology and found growth delay, microcephaly, craniofacial gestalt, hypotonia, and positive-friendly behaviors paralleling those seen in patients with Cohen syndrome. Importantly, we identified previously unreported neuropathological findings, including a plethora of neuroanatomical phenotypes which likely originates from non-progressive infantile neuronal cell death.

First, we establish that *Vps13b* has pervasive pleiotropic roles in various developmental contexts. *Vps13b*-mutant HOM mice showed: (i) a mortality of about 50%, (ii) a reduced body weight starting before birth, (iii) a decreased brain weight visible one day after birth, and (iv) a small neurocranium. There was a mild difference in developmental outcomes between sexes, with female *Vps13b*-mutant HOM mice less affected, exhibiting reduced body weight by 21% (vs 32% in male) and decreased brain weight by 16% (as opposed to 23% in male) at weaning age. The *Vps13b* exons 2 to 4 deletion mutant mice from the International Mouse Phenotyping Consortium (White et al., 2013), share the same difference between sexes in terms of weight and length features than the *Vps13b* exon four deletion mutant mice used in the present study, showing high reproducibility between the various models available. Consistently, our comprehensive review of the literature reveals that girls are less affected than boys in neuropathological manifestations of the human disease. Old mice (up to fifteen months) showed normal life expectancy, suggesting that once weaning age is reached, *Vps13b*

mutation does not compromise life, similar to previous reports in human studies (Kivitie-Kallio and Norio, 2001).

Second, we report neuroanatomical phenotypes (NAPs) in the *Vps13b*-mutant HOM mice using existing 2D (Collins et al., 2018; Nguyen et al., 2022) and newly developed 3D high-resolution episcopic microscopy histology techniques and examine phenotypic trajectories at multiple time points from birth until old age. Through careful assessment of brain anatomy, we were able to identify that at birth, the mouse brain in *Vps13b*-mutant HOM mice appears normal with no apparent brain structural anomalies but decreases in size gradually from the first day of life until postnatal day seven, remaining stable afterwards with no progression. Interestingly, we showed that the degree of phenotypic severity differs according to the brain regions assessed, resulting in mosaic and diverse effects. This demonstrates that different brain regions do not develop as a whole and are free to respond individually to *Vps13b* genetic perturbation so that the small brain is not the product of equally small and coordinated brain regions, as previously speculated (Finlay and Darlington, 1995). Our main neuropathological findings are the degeneration of the whole thalamus (-35%), the hippocampus (-34%), and the cerebellum (-21%). Several independent studies support these neuropathological findings (Mochida et al., 2004; Waite et al., 2010; Katzaki et al., 2007; Hager et al., 2012; Melville et al., 2012). For the thalamus, a mouse genome-wide association study (GWAS) in 10,000 mice from the BXD panel of recombinant inbred strains reported association of a locus in the vicinity of the *Vps13b* gene with the weight of the thalamus⁶¹. For the hippocampus, a single nucleotide polymorphism (SNP) rs959695 located within the *Vps13b*

gene was significantly associated with hippocampal degeneration measured using MRI scans in a large human GWAS influencing Alzheimer's disease risk (Melville et al., 2012). For the cerebellum, the most consistent feature when brain structural anomalies are reported in Cohen syndrome pertains to the cerebellum with hypoplasia of the cerebellar vermis and pontocerebellar atrophy (Mochida et al., 2004; Waite et al., 2010; Kizaki et al., 2007). Based on these evidences, we think that brain structural defects might be more frequent in Cohen syndrome but difficult to detect. Thus, we recommend doctors to acquire higher resolution brain imaging scans when possible for better clinical stratification of the syndrome.

A recent behavioral study of *Vps13b* exon 2 deletion mutant mouse has linked *Vps13b* to cognitive and motor functions (Kim et al., 2019). Our findings replicate the learning deficits previously identified that could be explained by cortico-hippocampal network connectivity problems due to cell death and reduced spine density of granule cells in the dentate gyrus identified in the current study. Our findings also validate deficits in motor function, most likely involving the connections of the cortical layer VI pyramidal cells made by axons to the thalamus via the cortico-thalamic loop. Interestingly, when we reanalyzed existing spatial transcriptomic data from 21 distinct areas of the mouse brain (Zimmerman et al., 2022), we found the highest counts for *Vps13b* in the segment delineating cortical layer VI and the dentate gyrus, showing a strong link between *Vps13b* spatial expression pattern and its fine-scale neuroanatomical profile when mutated in the mouse brain. Since cheerful dispositions were the second most common feature reported in patients with Cohen syndrome after intellectual disability, we explored mouse sociability and were surprised to find that *Vps13b*-mutant mice show a clear pattern of enhanced friendliness also. These positive behavioral domains could potentially stem from brain regions anatomically not affected by *Vps13b* mutation, such as the cingulate cortex and the fornix, two regions of the limbic system involved in the regulation of emotions.

Finally, we show non-progressive neuronal loss in the hippocampus, the cerebellum and the cortex of *Vps13b*-mutant HOM mice during early infancy which gives insights into the origins of brain neuroanatomical phenotypes in Cohen syndrome. The causes of this neuronal loss are currently unknown. Bulk RNA sequencing in the hippocampus and the cerebellum of 13-week aged male mice did not show any differentially expressed genes that could explain the phenotypes, although this remains to be verified in additional age groups. The paralogous VPS13A, VPS13C, and VPS13D copies of VPS13B are lipid transport proteins allowing the flow of lipids from the ER to other cellular membranes (Guillén-Samander et al., 2021; Kumar et al., 2018) (for a detailed review, see (Guillén-Samander and Camilli, 2022)). Considering VPS13B co-localization to the Golgi complex (Seifert et al., 2015; Seifert et al., 2011), it is tempting to speculate that VPS13B might be implicated in lipid transfer from the ER to the Golgi. In line with this, a previous study had identified a polymorphism (SNP rs7841688) for modulation of lipids in the *VPS13B* gene (Foulkes et al., 2013). In the absence of functional VPS13B, membrane properties could potentially be disturbed ultimately inducing neuronal loss, opening up perspectives for future research.

5. Conclusion

To conclude, our work uncovers similar neurological defects in mouse and human, with onset in the first week in mice and in the first year of life in humans with no progression and with females less affected than males in both species. Our work highlights the power of detailed and careful characterization of male and female mouse models of human neurodevelopmental disorders, allowing for a better classification of neuroanatomical and behavioral features, opening up new avenues for pre-clinical modelling and therapeutic interventions for *VPS13B*-related brain disorders.

Funding

A. is sponsored by the Council for Scientific and Industrial Research (CSIR), Government of India for the award of Junior Research Fellowship. This research was funded by the IFCPAR/CEFIPRA (Indo-French Centre for Promotion of Advanced Research/Centre Franco-Indien pour la Promotion de la Recherche Avancée) grant no. 6503-J to S.M. and B.Y. as well as the GIS-Institute for Rare Diseases, the Jérôme Lejeune Foundation (JLF 2020 project #1985), the French National Research Agency (ANR-18-12-0009CE-01), the European Union through FEDER programs (WDR and PERSONALISE), and the National Institute of Health and Medical Research (INSERM start-up grant) to B.Y. Several authors of this publication are members of the European Reference Network on Rare Congenital Malformations and Rare Intellectual Disability ERN-ITHACA.

CRedit authorship contribution statement

Charlotte Montillot: Investigation, Visualization, Writing – original draft. **Emilia Skutunova:** Methodology, Investigation. **Ayushma:** Investigation. **Morgane Dubied:** Investigation. **Adam Lahmar:** Investigation. **Sylvie Nguyen:** Investigation. **Benazir Peerialy:** Investigation. **Fabrice Prin:** Investigation. **Yannis Duffourd:** Formal analysis. **Christel Thauvin-Robinet:** Resources. **Laurence Duplomb:** Resources. **Heng Wang:** Resources. **Muhammad Ansar:** Resources. **Laurence Faivre:** Resources. **Nicolas Navarro:** Validation, Formal analysis, Supervision. **Shilpi Minocha:** Validation, Supervision, Funding acquisition. **Stephan C. Collins:** Methodology, Investigation, Validation, Software, Data curation, Visualization, Supervision. **Binnaz Yalcin:** Conceptualization, Methodology, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no competing interests. Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2023.106259>.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

We thank Marie-Christine Birling and her team for the generation of the *Vps13b*^{Tm1.1cc} mouse model. We are grateful to the members of the laboratory who contributed to the project (Lola Tanneur, Marion Bouiller, Marie Thirion, Maylis Joly, and Axel Brocard). We thank Céline Jaimet, Ana Ortalli, and Thibaud Metzger from Nanostring Technologies; Audrey Geissler and Amandine Bataille from the CellImaP histology platform; Lauriane Poloni, Emilie Steimetz, and the GISMO platform for CT scanning and skull landmarking; Laure Avoscan, Elodie Noïrot, and Pascale Winckler from DImaCell imaging platform; Valérie Saint-Giorgio for animal housing; Didier Rebeix and Antoine Migeon from the University of Burgundy Computing Center; Romain Da Costa, Yaël Grosjean, Juliette Godin, and Jean-Paul Pais De Barros from the Lipidomic Analytical Platform (LAP) for valuable discussion.

References

- Adams, D.C., Collyer, M.L., Kaliontzopoulou, A., Balken, E.K., 2021. Geomorph: software for geometric morphometric analyses. In: R package version 4.0.0.
- Alipour, N., et al., 2020. Mutations in the VPS13B gene in Iranian patients with different phenotypes of Cohen syndrome. *J. Mol. Neurosci.* 70, 21–25.

- Birling, M.-C., Dierich, A., Jacquot, S., Héroult, Y., Pavlovic, G., 2012. Highly-efficient, fluorescent, locus directed cre and FlpO deleter mice on a pure C57BL/6N genetic background. *Genesis* 50, 482–489.
- Bonfante, B., et al., 2021. A GWAS in Latin Americans identifies novel face shape loci, implicating VPS13B and a Denisovan introgressed region in facial variation. *Sci. Adv.* 7.
- Cai, S., et al., 2022. In situ architecture of the lipid transport protein VPS13C at ER-lysosomal membrane contacts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 119, e2203769119.
- Cardoso-Moreira, M., et al., 2019. Gene expression across mammalian organ development. *Nature* 571, 505–509.
- Chiaruzzi, P., Pirozzi, F., 2016. Advances in understanding - genetic basis of intellectual disability. *F1000Res* 5. F1000 Faculty Rev-599.
- Cohen, M.M., Hall, B.D., Smith, D.W., Graham, C.B., Lampert, K.J., 1973. A new syndrome with hypotonia, obesity, mental deficiency, and facial, oral, ocular, and limb anomalies. *J. Pediatr.* 83, 280–284.
- Collins, S.C., et al., 2018. A method for parasagittal sectioning for neuroanatomical quantification of brain structures in the adult mouse. *Curr Protoc Mouse Biol* 8, e48.
- Collins, S.C., et al., 2019. Large-scale neuroanatomical study uncovers 198 gene associations in mouse brain morphogenesis. *Nat. Commun.* 10, 3465.
- Collyer, M.L., Adams, D.C., 2018. RRPP: an R package for fitting linear models to high-dimensional data using residual randomization. *Methods Ecol. Evol.* 9, 1772–1779.
- Da Costa, R., et al., 2020. Vps13b is required for acrosome biogenesis through functions in Golgi dynamic and membrane trafficking. *Cell. Mol. Life Sci.* 77, 511–529.
- Dehghan, R., Behnam, M., Moafi, A., Salehi, M., 2021. A novel mutation in the VPS13B gene in a Cohen syndrome patient with positive antiphospholipid antibodies. *Case Reports Immunol* 2021, 3143609.
- Dobin, A., et al., 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21.
- Doungou, S., Petersen, M.B., 2011. Clinical variability of genetic isolates of Cohen syndrome. *Clin. Genet.* 79, 501–506.
- Dryden, I.L., Mardia, K.V., 1998. *Statistical Shape Analysis*. John Wiley and Sons.
- Enomoto, Y., et al., 2020. CNV analysis using whole exome sequencing identified biallelic CNVs of VPS13B in siblings with intellectual disability. *Eur J Med Genet* 63, 103610.
- Fedorov, A., et al., 2012. 3D slicer as an image computing platform for the quantitative imaging network. *Magn. Reson. Imaging* 30, 1323–1341.
- Finlay, B.L., Darlington, R.B., 1995. Linked regularities in the development and evolution of mammalian brains. *Science* 268, 1578–1584.
- Foulkes, A.S., et al., 2013. Mixed modeling of meta-analysis P-values (MixMAP) suggests multiple novel gene loci for low density lipoprotein cholesterol. *PLoS One* 8, e54812.
- Frankish, A., et al., 2021. GENCODE 2021. *Nucleic Acids Res.* 49, D916–D923.
- Ghazawi, A., Hirbawi, H., Negida, A., Abu-Farsakh, H., 2021. A case of a Jordanian male twin with Cohen's syndrome, with genetic analysis and muscle biopsy; case report. *Ann Med Surg (Lond)* 71 (103014).
- Goodall, Colin, 1991. Procrustes methods in the statistical analysis of shape. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* 53, 285–339.
- Guillén-Samander, A., Camilli, P.D., 2022. Endoplasmic reticulum membrane contact sites, lipid transport, and neurodegeneration. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* a041257 <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a041257>.
- Guillén-Samander, A., De Camilli, P., 2022. Endoplasmic reticulum membrane contact sites, lipid transport, and neurodegeneration. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* a041257 <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a041257>.
- Guillén-Samander, A., et al., 2021. VPS13D bridges the ER to mitochondria and peroxisomes via Miro. *J. Cell Biol.* 220, e202010004.
- Hager, R., Lu, L., Rosen, G.D., Williams, R.W., 2012. Genetic architecture supports mosaic brain evolution and independent brain-body size regulation. *Nat. Commun.* 3, 1079.
- Hu, X., et al., 2021. Identification of a novel VPS13B mutation in a Chinese patient with Cohen syndrome by whole-exome sequencing. *Pharmacogenom. Pers Med* 14, 1583–1589.
- Jumper, J., et al., 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596, 583–589.
- Kannan, M., et al., 2017. WD40-repeat 47, a microtubule-associated protein, is essential for brain development and autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E9308–E9317.
- Katzaki, E., et al., 2007. Clinical and molecular characterization of Italian patients affected by Cohen syndrome. *J. Hum. Genet.* 52, 1011–1017.
- Kim, M.J., et al., 2019. Spatial learning and motor deficits in vacuolar protein sorting-associated protein 13b (Vps13b) mutant mouse. *Exp Neurobiol* 28, 485–494.
- Kivitie-Kallio, S., Norio, R., 2001. Cohen syndrome: essential features, natural history, and heterogeneity. *Am. J. Med. Genet.* 102, 125–135.
- Kivitie-Kallio, S., Autti, T., Salonen, O., Norio, R., 1998. MRI of the brain in the Cohen syndrome: a relatively large corpus callosum in patients with mental retardation and microcephaly. *Neuropediatrics* 29, 298–301.
- Klingenberg, C.P., Barluenga, M., Meyer, A., 2002. Shape analysis of symmetric structures: quantifying variation among individuals and asymmetry. *Evolution* 56, 1909–1920.
- Koehler, K., et al., 2020. A novel homozygous nonsense mutation of VPS13B associated with previously unreported features of Cohen syndrome. *Am. J. Med. Genet. A* 182, 570–575.
- Kolehmainen, J., et al., 2003. Cohen syndrome is caused by mutations in a novel gene, COH1, encoding a transmembrane protein with a presumed role in vesicle-mediated sorting and intracellular protein transport. *Am. J. Hum. Genet.* 72, 1359–1369.
- Kumar, N., et al., 2018. VPS13A and VPS13C are lipid transport proteins differentially localized at ER contact sites. *J. Cell Biol.* 217, 3625–3639.
- Langmead, B., Salzberg, S.L., 2012. Fast gapped-read alignment with bowtie 2. *Nat. Methods* 9, 357–359.
- Lee, I.-H., Koelliker, E., Kong, S.W., 2022. Quantitative trait locus analysis for endophenotypes reveals genetic substrates of core symptom domains and neurocognitive function in autism spectrum disorder. *Transl. Psychiatry* 12, 407.
- Lee, Y.-K., et al., 2020a. Autophagy pathway upregulation in a human iPSC-derived neuronal model of Cohen syndrome with VPS13B missense mutations. *Mol Brain* 13, 69.
- Lee, Y.-K., et al., 2020b. Cohen syndrome patient iPSC-derived Neurospheres and forebrain-like glutamatergic neurons reveal reduced proliferation of neural progenitor cells and altered expression of synapse genes. *J. Clin. Med.* 9, E1886.
- Leith, Russell V., 2021. Emmeans: estimated marginal means, aka least-squares means. In: R package version 1.7.0.
- Lindner, L., et al., 2021. Droplet digital PCR or quantitative PCR for in-depth genomic and functional validation of genetically altered rodents. *Methods* 191, 107–119.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25, 402–408.
- Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 550.
- Melville, S.A., et al., 2012. Multiple loci influencing hippocampal degeneration identified by genome scan. *Ann. Neurol.* 72, 65–75.
- Mikhaleva, A., Kannan, M., Wagner, C., Yalcin, B., 2016. Histomorphological phenotyping of the adult mouse brain. *Curr Protoc Mouse Biol* 6, 307–332.
- Mochida, G.H., et al., 2004. Broader geographical spectrum of Cohen syndrome due to COH1 mutations. *J. Med. Genet.* 41, e87.
- Montazmanesh, S., et al., 2020. A novel VPS13B mutation in Cohen syndrome: a case report and review of literature. *BMC Med. Genet.* 21, 140.
- Nguyen, S., Kannan, M., Gaborit, M., Collins, S.C., Yalcin, B., 2022. Quantitative neuroanatomical phenotyping of the embryonic mouse brain. *Current Protocols* 2, e509.
- Norio, R., Raitta, C., Lindahl, E., 1984. Further delineation of the Cohen syndrome; report on chorioretinal dystrophy, leukopenia and consanguinity. *Clin. Genet.* 25, 1–14.
- Porsolt, R.D., Le Pichon, M., Jalfre, M., 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266, 730–732.
- Rafiq, M.A., et al., 2015. Novel VPS13B mutations in three large Pakistani Cohen syndrome families suggests a Baloch variant with autistic-like features. *BMC Med. Genet.* 16, 41.
- Rejeb, I., et al., 2017. First case report of Cohen syndrome in the Tunisian population caused by VPS13B mutations. *BMC Med. Genet.* 18, 134.
- Rodrigues, J.M., Fernandes, H.D., Caruthers, C., Braddock, S.R., Knutsen, A.P., 2018. Cohen syndrome: review of the literature. *Cureus* 10, e3330.
- Rolfé, S., et al., 2021. SlicerMorph: an open and extensible platform to retrieve, visualize and analyse 3D morphology. *Methods Ecol. Evol.* 12, 1816–1825.
- Schlager, Stefan, 2017. *Statistical Shape and Deformation Analysis*. Academic Press.
- Seifert, W., et al., 2011. Cohen syndrome-associated protein, COH1, is a novel, giant Golgi matrix protein required for Golgi integrity. *J. Biol. Chem.* 286, 37665–37675.
- Seifert, W., et al., 2015. Cohen syndrome-associated protein COH1 physically and functionally interacts with the small GTPase RAB6 at the Golgi complex and directs neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* 290, 3349–3358.
- Telley, L., et al., 2016. Sequential transcriptional waves direct the differentiation of newborn neurons in the mouse neocortex. *Science* 351, 1443–1446.
- Velayos-Baeza, A., Vettori, A., Copley, R.R., Dobson-Stone, C., Monaco, A.P., 2004. Analysis of the human VPS13 gene family. *Genomics* 84, 536–549.
- Waite, A., et al., 2010. Cerebellar hypoplasia and Cohen syndrome: a confirmed association. *Am. J. Med. Genet. A* 152A, 2390–2393.
- Weninger, W.J., et al., 2006. High-resolution episcopic microscopy: a rapid technique for high detailed 3D analysis of gene activity in the context of tissue architecture and morphology. *Anat Embryol (Berl)* 211, 213–221.
- White, J.K., et al., 2013. Genome-wide generation and systematic phenotyping of knockout mice reveals new roles for many genes. *Cell* 154, 452–464.
- Yao, Z., et al., 2021. A taxonomy of transcriptomic cell types across the isocortex and hippocampal formation. *Cell* 184, 3222–3241.e26.
- Yu, T.W., et al., 2013. Using whole-exome sequencing to identify inherited causes of autism. *Neuron* 77, 259–273.
- Zhao, S., et al., 2019. Case report: two novel VPS13B mutations in a Chinese family with Cohen syndrome and hyperlinear palms. *BMC Med. Genet.* 20, 187.
- Zimmerman, S.M., et al., 2022. Spatially resolved whole transcriptome profiling in human and mouse tissue using digital spatial profiling. *Genome Res.* 32, 1892–1905.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Table of Contents

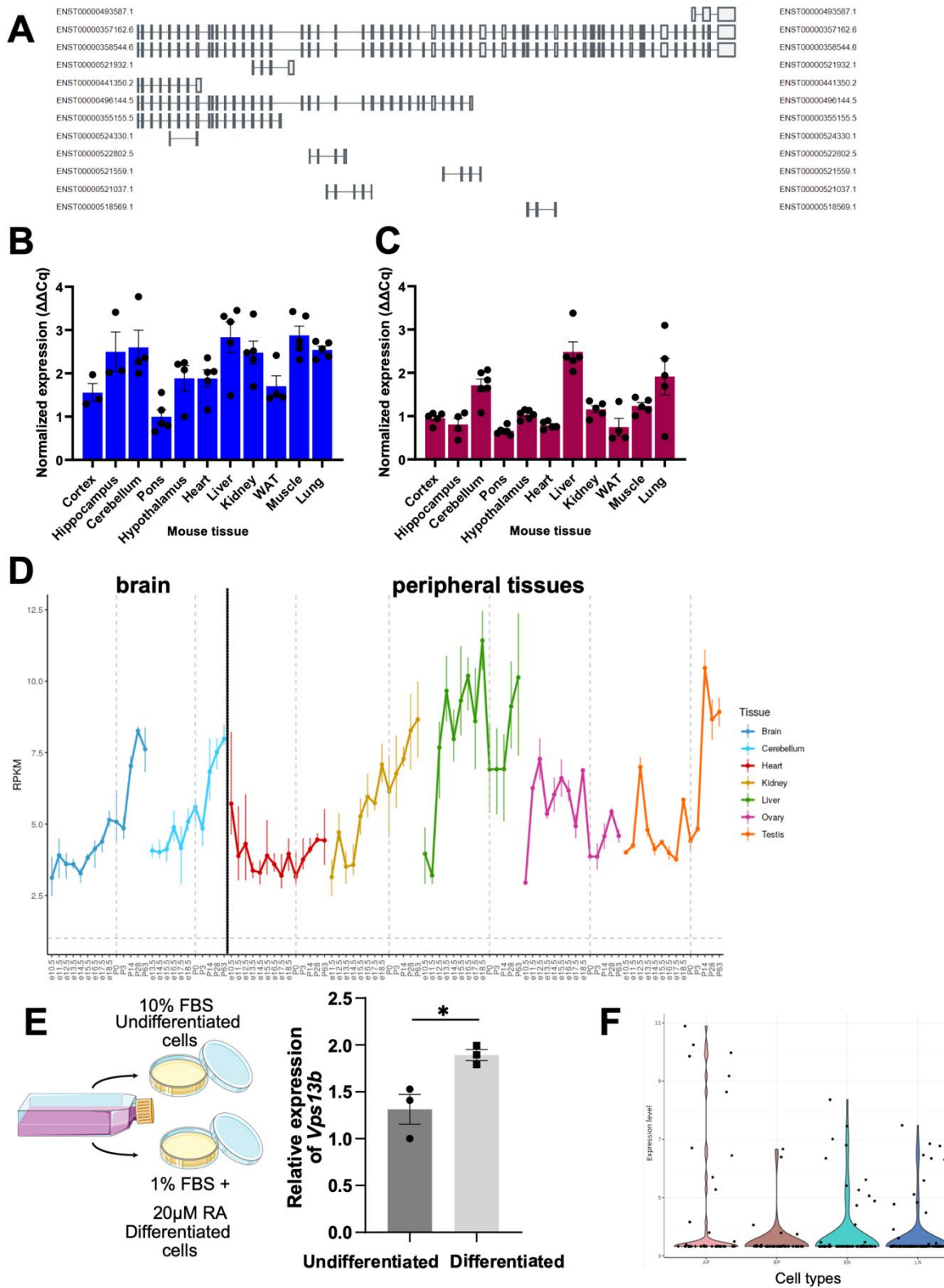
Table of Contents	281
1. Supplementary Figures and Legends	282
1.1. <i>Vps13b</i> expression studies	282
1.2. Mouse generation and characterization of whole-body phenotypes	284
1.3. Behavioral traits assessed in <i>Vps13b</i> -mutant mice	286
1.4. Procedures for systematic neuroanatomical phenotyping	288
1.5. Finer-scale NAP in the hippocampus, the thalamus, and the cerebellum	290
1.6. Finer-scale NAP in the cortex reveals neuronal loss	292
2. Supplementary Tables	294
3. Supplementary Movies	294
4. Supplementary Methods	295
4.1. Strategy to target the transcript coding for the small protein	295
4.2. Expression of neighboring and other Vps13 genes	295
4.3. VPS13B antibodies	296
5. Supplementary Results	297
5.1. Additional <i>Vps13b</i> expression data	297
5.2. Skull morphometric analysis	297
5.2.1. <i>Raw summary statistics of skull sizes and endocranium volume</i>	297
5.2.2. <i>Neurocranium centroid size</i>	297
5.2.3. <i>Endocranium volume</i>	299
5.3. Shape analysis	301
5.4. Patient data	302

1. Supplementary Figures and Legends

1.1. *Vps13b* expression studies

Figure S1. (A) Schematic representation of the different *VPS13B* transcript in the human genome. Image source: <http://www.gtexportal.org>. (B) Relative expression studies of the *Vps13b* little coding protein transcript using RT-qPCR in wild-type (WT) male mice aged 19 weeks across 11 tissues. Cortex and hippocampus n=3; cerebellum, hypothalamus and white adipose tissue n=4; other tissues n=5. (C) Relative expression studies of the *Vps13b* little coding protein transcript using RT-qPCR in wild-type (WT) female mice aged 19 weeks across 11 tissues. Hippocampus and white adipose tissue n=4; cerebellum, pons and hypothalamus n=6; others n=5. Each measure was realized in triplicate. Normalization was done using HPRT (Hypoxanthine-Guanine PhosphoRibosylTransferase). The plots represent mean \pm SEM. (D) *Vps13b* longitudinal expression in WT mice across 7 tissues (brain, cerebellum, heart, kidney, liver, ovary and testis) from E10.5 to P63. Data is taken from Cardoso-Moreira *et al.* 2019. (E) Relative expression change of *Vps13b* levels upon induction of differentiation in Neuro2a cells by using 20 μ M retinoic acid and serum starvation. The plot represents mean \pm SEM. Statistical analysis was done using Student's t test (two-tailed; * $P < 0.05$). (F) *Vps13b* expression in mouse E14.5 in 6-48 hours post-mitotic neurons using single cell transcriptomic on developing neocortex. Data is adapted from Telley *et al.* 2016 and <http://genebrowser.unige.ch>. Abbreviations: AP: Apical progenitors; BP: daughter basal progenitors; EN: Early neurons; LN: Late neurons

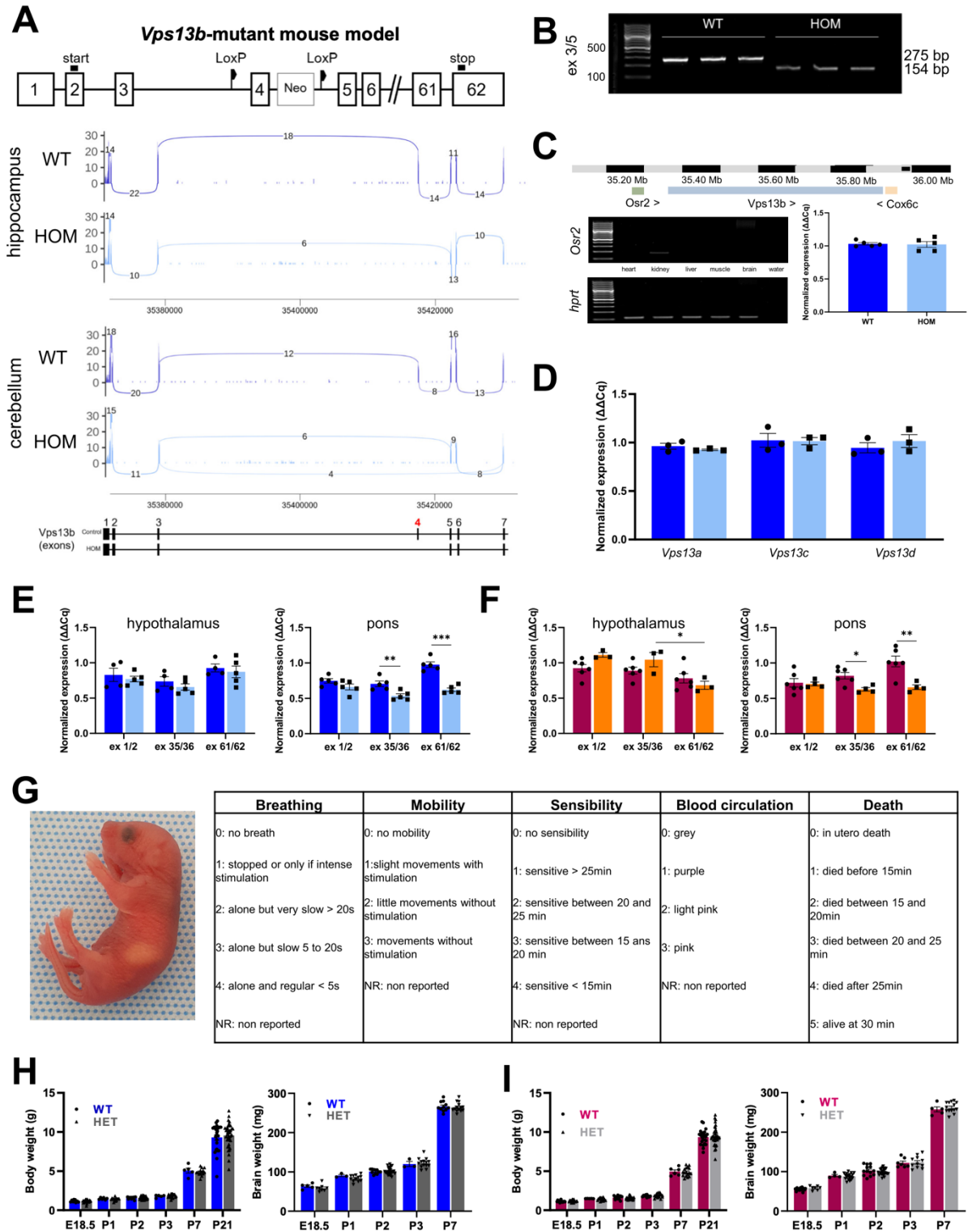
Fig. S1



1.2. Mouse generation and characterization of whole-body phenotypes

Figure S2. (A) Schematic representation of allele construction targeting *Vps13b* exon four and verification of exon 4 deletion in homozygous (HOM) male mice aged from 12 to 16 weeks using bulk RNA sequencing. The results in the hippocampus (n= 3 vs 2) and the cerebellum (n = 3 vs 2) are represented using Sashimi plots. (B) Validation of the deletion of *Vps13b* exon four using whole brain extracts from male mice of 16 weeks (n = 3 vs 3) using RT-PCR. Primers used are targeting the junction between exon 3 and 5. (C) Assessment of the impact of *Vps13b* mutation on neighboring genes. Top: Schematic representation of the *Vps13b* locus in mice (GRCm38.p6). Bottom: RT-PCR of *Osr2* and *Cox6c* genes on cDNA extracted from testis, heart, kidney, liver, muscle and brain of WT male mice (n = 3). Right: Expression quantification of *Cox6c* on brain of n=10 male mice aged 19 weeks using RT-qPCR (n= 5 vs 5). (D) Effect of *Vps13b* mutation on the expression of other *Vps13* genes using RT-qPCR on 19 weeks male mice (n = 3 vs 3). Each measure was realized in triplicate. Normalization was done using HPRT (Hypoxanthine-Guanine PhosphoRibosylTransferase). The plot represents mean \pm SEM. (E) *Vps13b* expression of the canonical transcript in WT and HOM male mice at 19 weeks using RT-qPCR. WT vs HOM: hypothalamus (n=4 vs 5) and pons (n=5 vs 5). (F) *Vps13b* expression of the canonical transcript in WT and HOM female mice at 19 weeks using RT-qPCR. WT vs HOM: hypothalamus (n=6 vs 3) and pons (n=6 vs 4). (G) Left: Photograph of a newborn baby 30 minutes after caesarian section done at E18.5. Right: Recapitulative table of observed parameters and scoring system used. (H) Body weight in WT vs HET male mice at six ages (E18.5 n=9 vs 28; P1 n=6 vs 15; P2 n=11 vs 25; P3 n=5 vs 22; P7 n=5 vs 14; P21 n=25 vs 40) and brain weight at five ages (E18.5 n= 5 vs 8; P1 n=3 vs 12; P2 n=11 vs 27; P3 n= 3 vs 14; P7 n=11 vs 14). (I) Body weight in WT vs HET female mice at six ages (E18.5 n=13 vs 19; P1 n=5 vs 20; P2 n=13 vs 24; P3 n=10 vs 15; P7 n=6 vs 17; P21 n=23 vs 36) and brain weight at five ages (E18.5 n= 13 vs 7; P1 n=4 vs 18; P2 n=13 vs 23; P3 n=7 vs 11; P7 n=5 vs 14). The plots represent mean \pm SEM. Statistical analysis was done using Student's t test (two-tailed). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Fig. S2

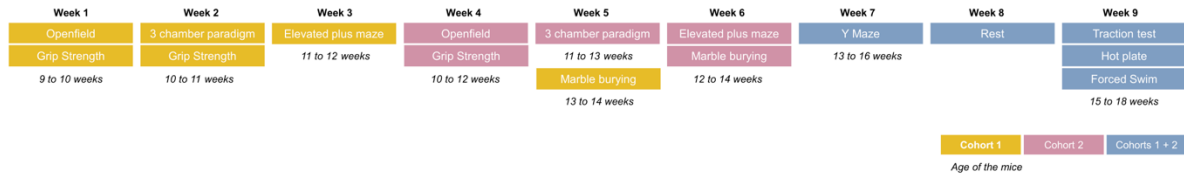


1.3. Behavioral traits assessed in *Vps13b*-mutant mice

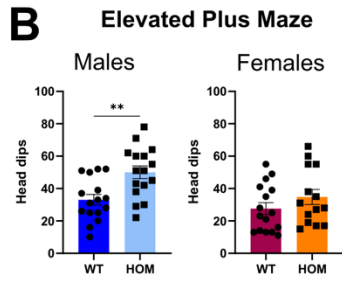
Figure S3. (A) Experimental workflow and design used in behavioral phenotyping. (B) Number of head dips in the elevated plus maze paradigm. Males WT (n=16) and HOM (n=16), unpaired Student t-test; Females WT (n=16) and HOM (n=14), unpaired Student t-test. (C) Forced Swim test: Immobility time in the six minutes of forced swim test and latency to the first immobility. Males WT (n=16) and HOM (n=16); Females WT (n=15) and HOM (n=13), Mann-Whitney comparative ranks. (D) Non-preference assay of a particular side during the habituation phase in the three-chamber apparatus. Males WT (n=16) and HOM (n=16); Females WT (n=16) and HOM (n=13). (E) Number of visited arms during the Y Maze test. Males WT (n=16) and HOM (n=16), unpaired Student t-test; Females WT (n=16) and HOM (n=14). (F) Time before the first reaction to the heat in the hot plate test. Males WT (n=14) and HOM (n=15); Females WT (n=14) and HOM (n=11). (G) Open-field test: Distance travelled, Time spent in the center area of the arena and latency to reach the center for the first time. Males WT (n=16) and HOM (n=16); Females WT (n=16) and HOM (n=14), unpaired Student t-test. All plots are represented as mean \pm SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns = not significant.

Fig. S3

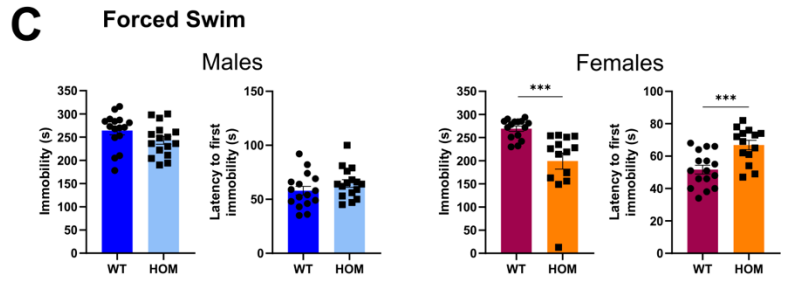
A



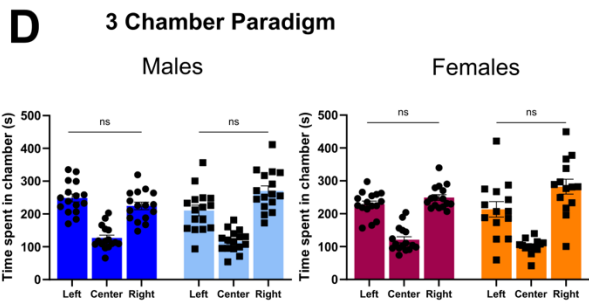
B



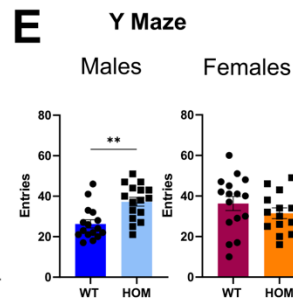
C



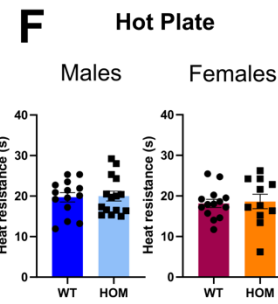
D



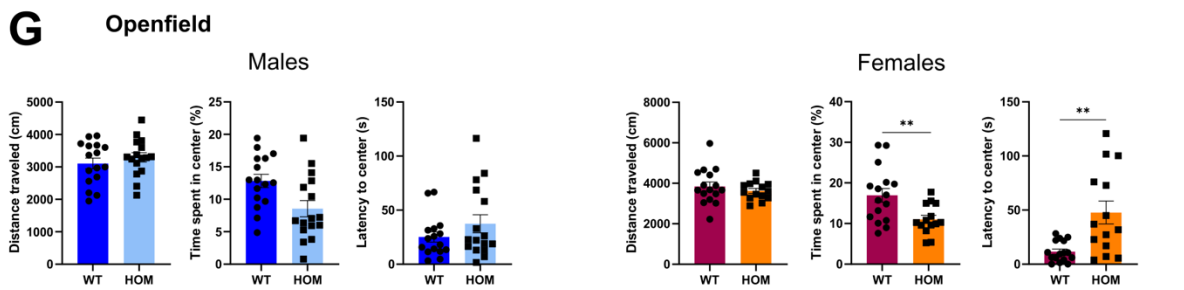
E



F



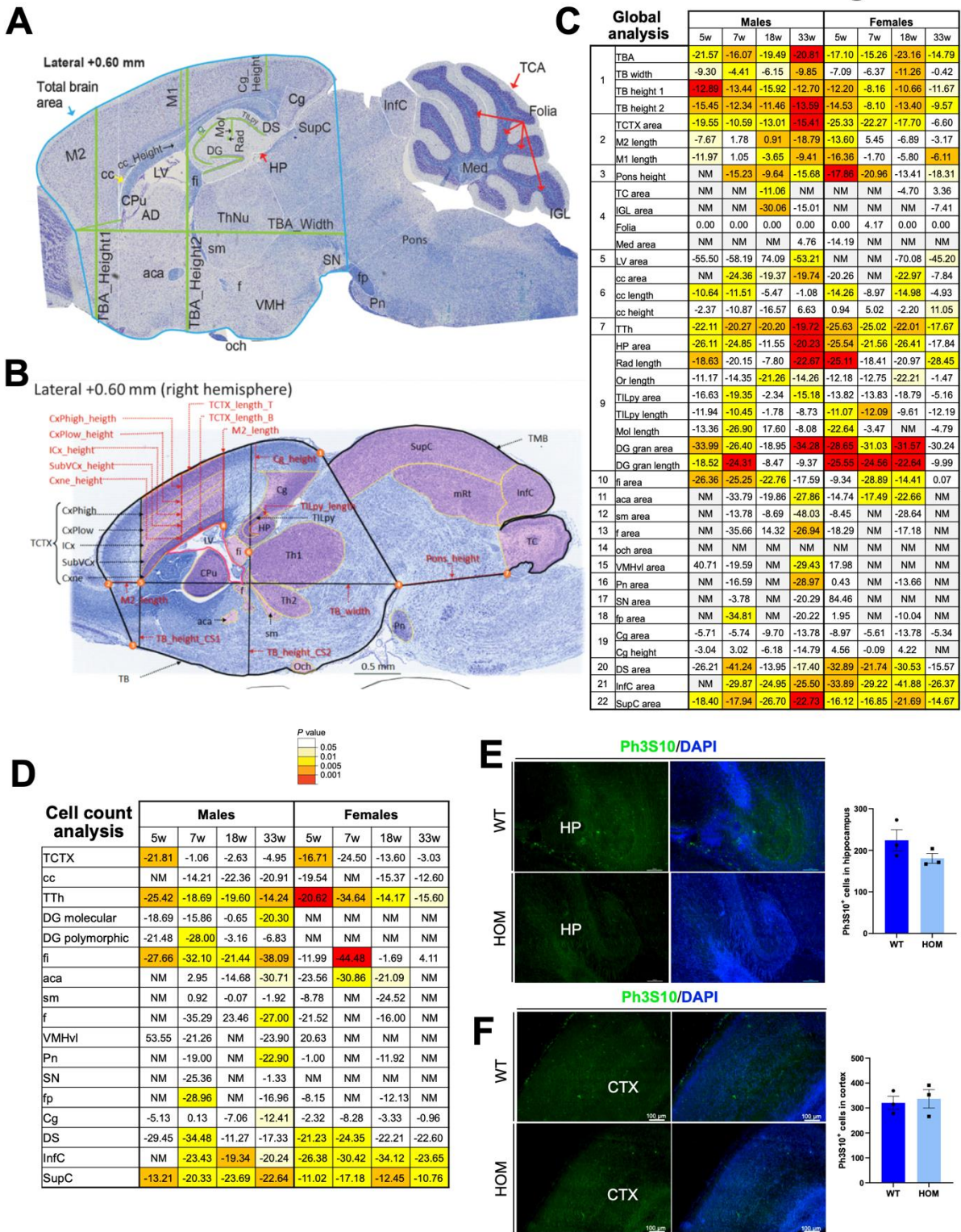
G



1.4. Procedures for systematic neuroanatomical phenotyping

Figure S4. (A) Scheme of the brain regions quantified in adult mice using ImageJ at the sagittal section of interest (Lateral +0.60 mm). (B) Regions quantified in the embryonic brain. (C) Recapitulative table of effect sizes of morphological features in male and female mice at 5, 7, 18 and 33 weeks of age. Each color represents the significance of the difference using unpaired Student t-test. White indicates non-significance and NM a parameter that was not measurable. Abbreviations are described in **Table S3**. (D) Recapitulative table of effect sizes of cell count analysis within brain regions assessed in Panel C. (E) Left: Hippocampus (HP) immunostaining using the proliferative marker Ph3S10 on paraffin embedded brain sections of mice at birth ($n = 3$ vs 3). Right: Quantification of Ph3S10 signal (manually counting cells). (F) Left: Cortex (CTX) immunostaining using Ph3S10 on paraffin embedded sections of mice at birth ($n = 3$ vs 3). Right: Quantification of Ph3S10 signal (manually counting cells). All plots are represented as mean \pm SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns = not significant.

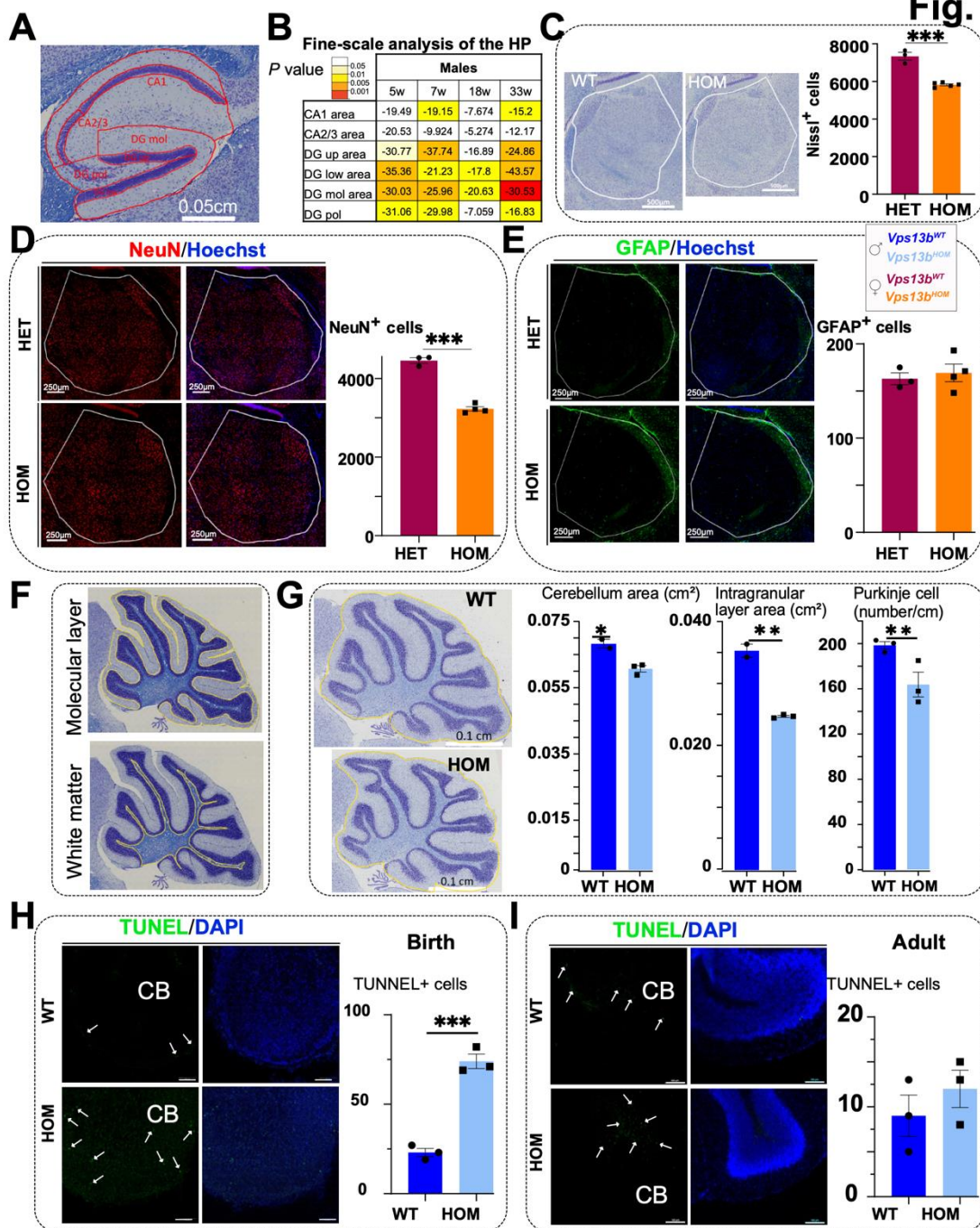
Fig. S4



1.5. Finer-scale NAP in the hippocampus, the thalamus, and the cerebellum

Figure S5. (A) The delimitation of hippocampal layers quantified using Image J traced on a representative image at Lateral +0.60 mm. (B) Recapitulative table of effect sizes of hippocampal layer features in male mice at 5 weeks ($n = 3$ vs 3), 7 weeks ($n = 3$ vs 2), 18 weeks ($n = 3$ vs 3) and 33 weeks ($n = 4$ vs 5). Each color represents the significance of the difference using unpaired Student t-test. White color indicates non-significance. (C) Top: Delineation of the thalamus in mice aged 5 weeks shown on a histological slice stained with Luxol-Nissl at Lateral +0.60 mm. Bottom: Histogram showing the number of Nissl positive cells in 2 WT and 5 HOM mice; unpaired Student's t-test. (D) Top: NeuN immunostaining in the thalamus of female mice (HET $n = 3$ vs HOM $n = 5$) of 5 weeks of age. The number of positive cells has been counted automatically using the software ImageJ. Bottom: Histogram showing the counts of NeuN positive cells in HET and HOM within the thalamic region; unpaired Student's t-test. (E) Top: GFAP immunostaining in the thalamus of female mice (HET $n = 3$ vs HOM $n = 5$) of 5 weeks of age. The number of positive cells has been counted manually in 5 serial slices using the software ImageJ. Bottom: Histogram showing the counts of GFAP positive cells in HET and HOM mice with the thalamic region delineated; unpaired Student's t-test. (F) The delimitation of the molecular layer and white matter area of the cerebellum quantified using Image J and traced on the representative image at Lateral +0.60 mm. (G) Left: Cerebellum sagittal image at Lateral +0.60 mm double stained with Nissl-luxol derived from male mice at 18 weeks of age. Right: Histogram showing the total cerebellum area (2 WT vs 3 HOM male mice at 19 weeks). Histogram of the area of the intragranular layer of the cerebellum (2 WT vs 3 HOM male mice at 19 weeks). Histogram of Purkinje cell density (number/cm) of 3 WT vs 3 HOM male mice at 19 weeks. (H) TUNEL assay on male mouse cerebellum at birth (WT $n=3$ vs HOM $n=3$) with quantification of positive cells. Scale bar indicates 50 μ m. (I) TUNEL assay at 25 weeks of age (male mice WT $n=3$ vs HOM $n=3$) with quantification of positive cells. Scale bar indicates 100 μ m. All plots are represented as mean \pm SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

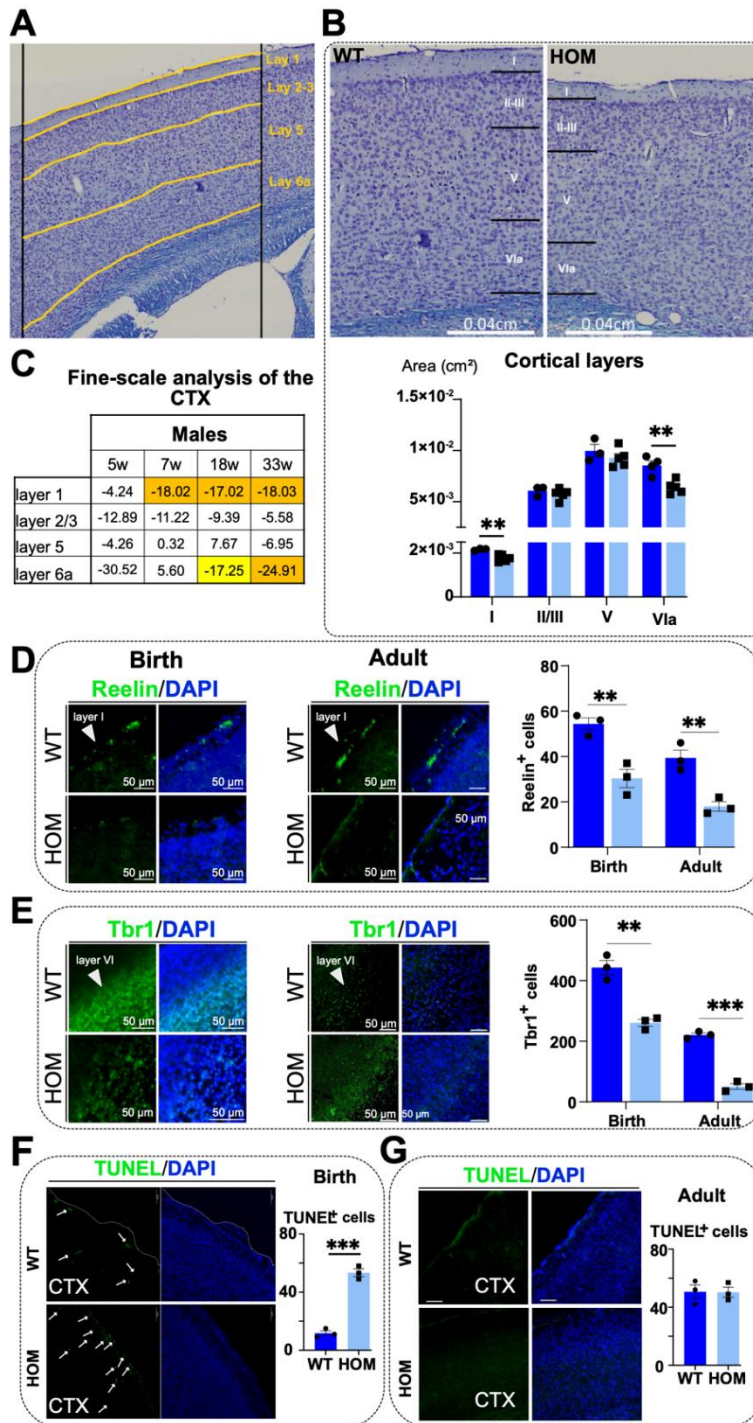
Fig. S5



1.6. Finer-scale NAP in the cortex reveals neuronal loss

Figure S6. (A) The delimitation of the different cortical layers quantified using Image J traced on the representative image at Lateral +0.60 mm. (B) Left: Sagittal image at Lateral +0.60 mm double-stained with Nissl-luxol showing layers in the secondary motor cortex of male HOM at 33 weeks compared to matched WT. Right: Histogram of cortical layer areas (n=3 WT vs n=5 HOM male mice aged 33 weeks). (C) Recapitulative table of effect sizes of cortical layers in male mice at 5 weeks (n = 3 vs 3), 7 weeks (n = 3 vs 2), 18 weeks (n = 3 vs 3) and 33 weeks (n = 4 vs 5). Each color represents the significance of the difference using unpaired Student t-test. (D-E) Immunostaining of Reelin and Tbr1 on paraffin embedded brain sections derived from male mice at birth (n = 3 WT vs 3 HOM) and adult (n = 3 WT vs 3 HOM). Manual quantification of Reelin and Tbr1 signals. (F) TUNEL assay on male mouse cortex at birth (WT n=3 vs HOM n=3) with quantification of positive cells. Scale bar indicates 50 μ m. (G) TUNEL assay at 25 weeks of age (male mice WT n=3 vs HOM n=3) with quantification of positive cells. Scale bar indicates 50 μ m. All plots are represented as mean \pm SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Fig. S6



2. Supplementary Tables

Table S1. Hand curated literature review on Cohen Syndrome. Contains one sheet.

Table S2. Description and genomic coordinates positions of *Vps13b* transcripts in the mouse genome (GRCm38.p6). Contains five sheets (one for each transcript).

Table S3. Acronyms and description of 2D histological parameters used in the study. Contains two sheets (birth and adult).

Table S4. List of second-level parameters used in 2D histological procedures. Contains one sheet.

Table S5. Acronyms and description of 3D parameters used in the HREM study (24 segments). Contains one sheet.

Table S6. Raw data related to the viability test of *Vps13b*-mutant mice. Contains one sheet.

Table S7. Height, body and brain weight data. Contains nine sheets (one for each time point: E18.5, P1, P2, P3, P7, P21, P63, P77 and P129).

Table S8. Raw behavioral data. Contains nine sheets (one for each paradigm used).

Table S9. Raw HREM data. Contains one sheet.

Table S10. Raw 2D histology data. Contains four sheets.

Table S11. In-depth analysis of 2D histology. Contains one sheet.

Table S12. Summary table of patient's data. Contains one sheet.

3. Supplementary Movies

Movie S1. Shape changes from the WT skull to the KO skull symmetric mean shapes. Changes are magnified two-fold.

Movie S2. Shape changes from the WT brain to the KO whole-brain symmetric mean shapes. Changes are magnified two-fold.

4. Supplementary Methods

4.1. Strategy to target the transcript coding for the small protein

To specifically target the transcript coding for the small protein (*Vps13b-204*), the qPCR primers were designed to cover a sequence only present in the mRNA of this transcript. We used the forward primer (5'-CTGCGCTAGGGATCTGACTT-3') and the reverse primer (5'-GTTTGCTGAGAACCACGTCC-3') found at the junction between exons 1 and 2 of the small coding protein. In the canonical transcript, 78 nucleotides are inserted in the middle of the sequence, preventing its correct hybridization and making it specific to the transcript coding for the small protein. The qPCR reaction was realised using iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, 1725121) in a final volume of 20 μ L containing 2.5 ng of cDNA and 300 nM of each primer. The reaction cycle was 95°C for 3 minutes, followed by 40 cycles at 95°C for 10 s and 60°C for 30 s, 95°C for 10 s, 65°C for 5 s and 95°C for 5 minutes. The samples were run in triplicate and normalized against housekeeping gene *Hprt* 5'-TCATTATGCCGAGGATTTGGA-3' (forward) and 5'-CAGAGGGCCACAATGTGATG-3' (reverse). Gene expression was analysed using the delta delta cycle threshold method (Livak & Schmittgen 2001).

4.2. Expression of neighboring and other *Vps13* genes

To evaluate the effect of *Vps13b* invalidation on the expression of neighbouring genes at the locus, total RNA was extracted from the wild-type mouse tissues (testis, heart, kidney, liver, muscle and brain) using Trizol (Sigma-Aldrich). RNA concentration and quality were assessed by spectrophotometry (Multiskan GO, Thermo Scientific). RNA samples with a ratio A_{260}/A_{280} close to 1.8 and a ratio A_{260}/A_{230} above 2.0, to exclude guanidine thiocyanate-containing buffer contamination, were further processed. 100 ng of total RNA was reverse transcribed to cDNA using iScript Reverse Transcription Supermix (Bio-Rad). First, to see if the transcript was expressed in mouse brain, RT-PCR was realised using the GoTaq Flexi DNA polymerase

(Promega) according to the manufacturer's instructions. The primers used to evaluate the expression of the *Osr2* gene were 5'-GGCCATACACCTGTGACATC-3' (forward) and 5'-AGTTTTGTGAACTGCTAGGGT-3' (reverse). The primers used to evaluate the expression of the *Cox6c* gene were 5'-GTCTTCTGGCCAAGCGTCT-3' (forward) and 5'-GCATACGCCTTCTTTCTTGG-3' (reverse). The housekeeping gene was *Hprt* 5'-TCATTATGCCGAGGATTTGGA-3' (forward) and 5'-CAGAGGGCCACAATGTGATG-3' (reverse). Because only *Cox6c* was expressed in the mouse brain, we performed RT-qPCR using the same set of primers. The qPCR reaction was realised using iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, 1725121) in a final volume of 20 µL containing 2.5 ng of cDNA and 300 nM of each primer. The reaction cycle was 95°C for 3 minutes, followed by 40 cycles at 95°C for 10 s and 60°C for 30 s, 95°C for 10 s, 65°C for 5 s and 95°C for 5 minutes. The samples were run in triplicate and normalized against housekeeping gene *Hprt* 5'-TCATTATGCCGAGGATTTGGA-3' (forward) and 5'-CAGAGGGCCACAATGTGATG-3' (reverse). Gene expression was analysed using the delta delta cycle threshold method. The same parameters were used to evaluate expression of other members of the Vps13 family. The primers used to evaluate the expression of the Vps13 genes were 5'-GAGAGTTTACGACCTCCCAGA-3' (forward) and 5'-TGCAAATCTTCCATTTTCCATGA-3' (reverse) for the *Vps13a* gene, 5'-CGGGCTCTCTCTGGTTAACA-3' (forward) and 5'-TTCGAATAGGCCTGCTCCAG-3' (reverse) for the *Vps13c* gene, and 5'-GAACCTCAAGATCAGCATCCC-3' (forward) and 5'-CCGAGTGAAGGGATCCAGAT-3' (reverse) for the *Vps13d* gene.

4.3. VPS13B antibodies

In order to evaluate the expression of VPS13B protein in the mouse brain, we wanted to perform immunohistochemical staining on brain histological section. We used one commercial antibody (Proteintech #24505-1-AP) and an "homemade" targeted the deleted sequence (Covalab). Unfortunately, we didn't show any differences between WT and HOM mice suggesting a lack of antibody specificity. No signal was detected using Western Blot.

5. Supplementary Results

5.1. Additional *Vps13b* expression data

We targeted the transcript corresponding to the small coding protein involving the first two exons using a specific set of primers in adult male and female wild-type mice (see **Section 4.1** above) and found similar levels of expression in the brain and the peripheral tissues (**Fig. S1B-C**). We were not able to tag the remaining processed transcript and the four retained introns due to the lack of specificity in the underlying sequence annotation (**Table S2**).

5.2. Skull morphometric analysis

5.2.1. Raw summary statistics of skull sizes and endocranium volume

Raw averages of neurocranium and basicranium centroid sizes (CS) and endocranium volume (vol) according to the WT and *Vps13b* HOM knockout genotypes.

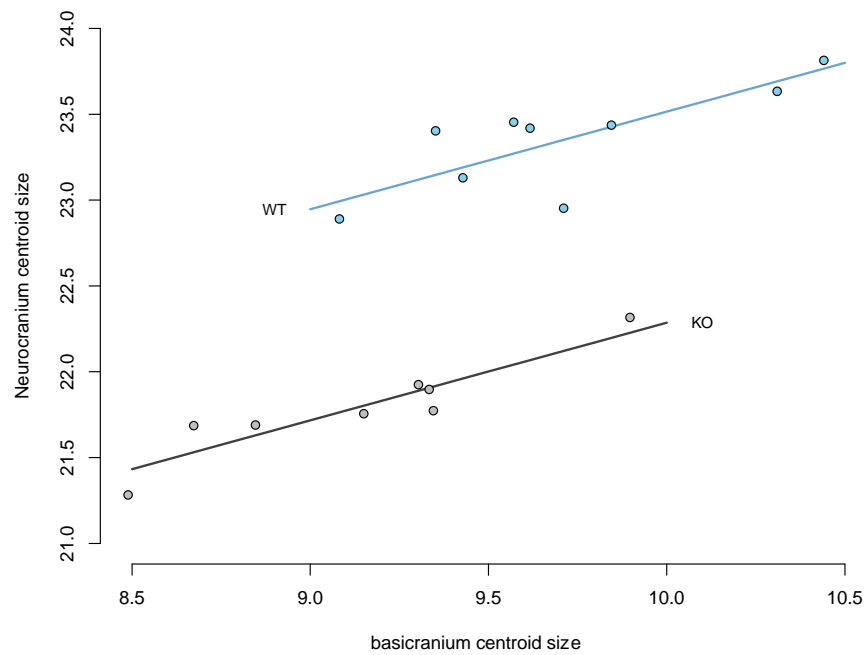
	Neurocranium CS	Basicranium CS	Endocranium vol
HOM	21.79073	9.129697	351.9044
WT	23.34793	9.705985	443.9706

Associated effect sizes calculated as a percentage increase or decrease relative to WT mice.

	Neurocranium CS	Basicranium CS	Endocranium vol
HOM	-6.67	-5.94	-20.74

5.2.2. Neurocranium centroid size

A linear model relating the variation in neurocranium centroid size to the genotypes after controlling for variation in the overall size as approximated by the basicranium centroid size was estimated to compute the expected genotype means. At comparable overall size, the HOM knockout mice show a significantly smaller centroid size of the neurocranium with a large effect of the genotype after controlling for general lower size of the HOM ($\eta_p^2 = 0.92$).

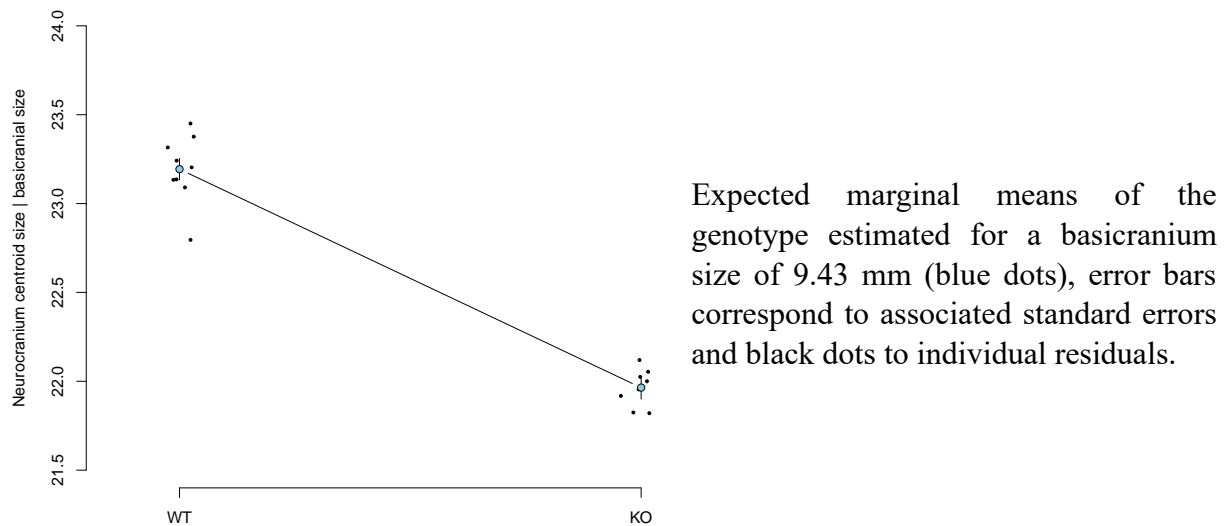


The associated ANOVA table is as follows:

Source	SS	df	F	Pr(>F)
Basicranium size	0.9537	1	35.891	3.306e-05
Genotype	4.3339	1	163.099	4.189e-09
Residuals	0.3720	14		

SS, Sum of Squares; df, degrees of freedom; F, F value; Pr, p-value associated with the F statistics.

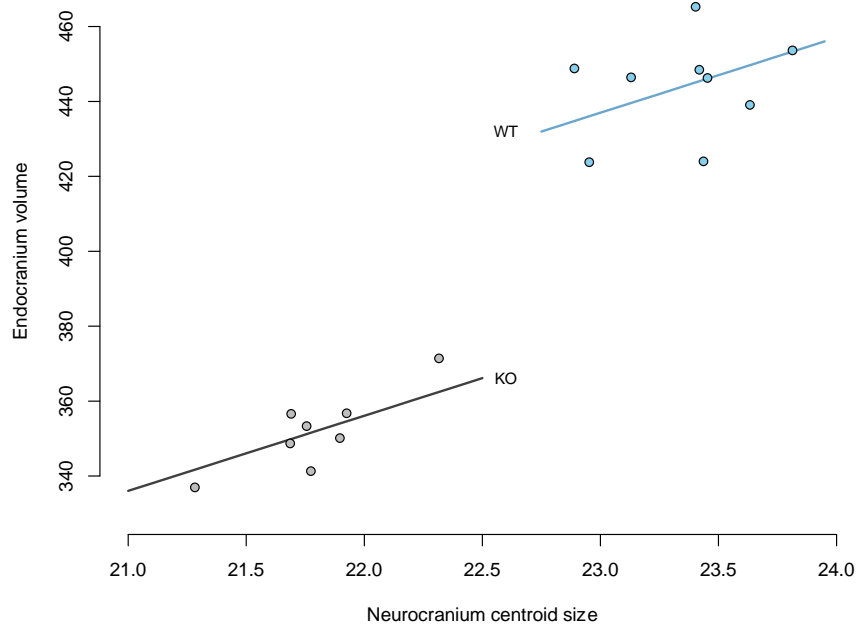
From this model, the expected marginal means of the neurocranium size were estimated for a basicranium size of 9.43 mm as 22.0 ± 0.0645 mm for the HOM knockout mice and 23.2 ± 0.0601 mm for the WT mice. The associated linear contrast is -1.23 ± 0.0963 and its effect size calculated as a percentage increase or decrease relative to WT mice is -5.3 %.



These results show that the neurocranium size is directly affected by the *Vps13b* HOM knockout mutations beyond their effects on the overall size.

5.2.3. Endocranium volume

A linear model relating the variation in braincase volume to the genotypes after controlling for variation in the neurocranium size was estimated to compute the expected genotype means. The figure showing this model below demonstrate that disentangling the HOM knockout effect on the braincase volume from the effects on the general size and on neurocranium size is difficult. The HOM mice show a significantly smaller volume of the endocranium with a large effect of the genotype after controlling for the lower skull size of the HOM ($\eta_p^2 = 0.52$).

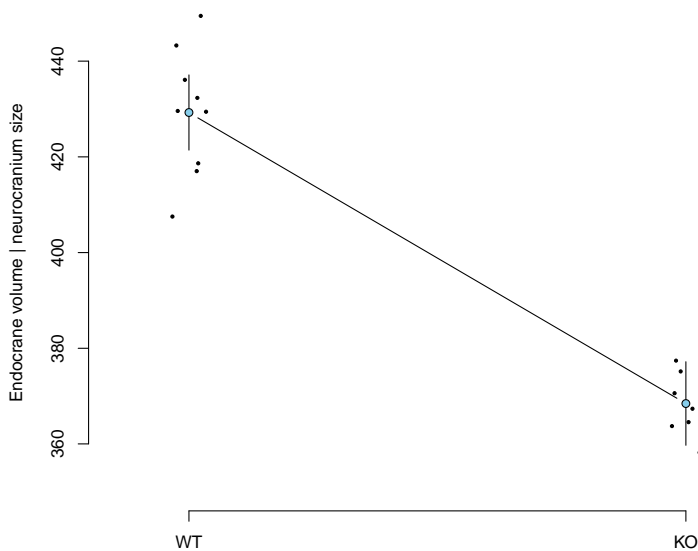


The associated ANOVA table is as follows:

Source	SS	df	F	Pr(>F)
Neurocranium size	533.77	1	4.4633	0.053076
Genotype	1791.16	1	14.9774	0.001699
Residuals	1674.28	14		

SS, Sum of Squares; df, degrees of freedom; F, F value; Pr, p-value associated with the F statistics.

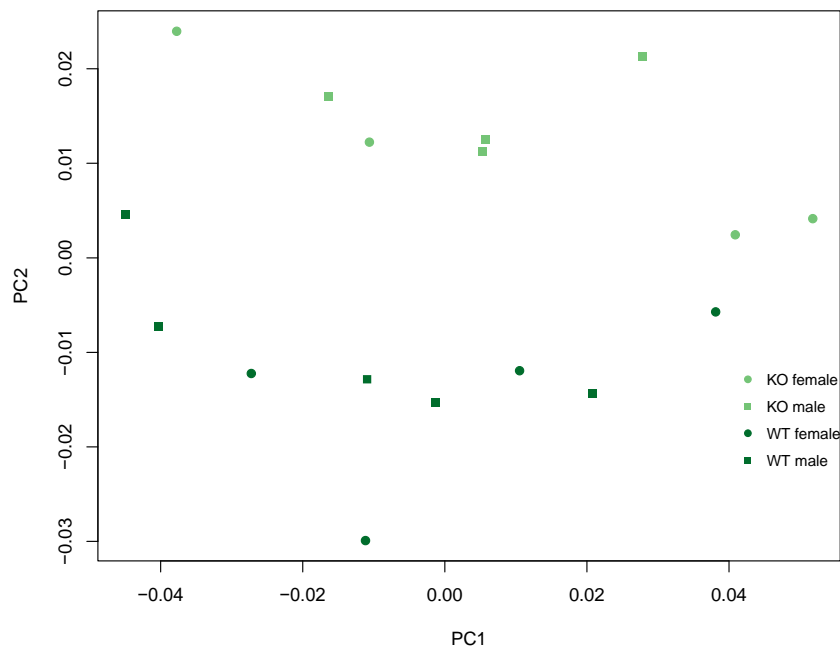
From this model, the expected marginal means of the endocranium volume were estimated for a neurocranium size of 22.6 mm as $368 \pm 8.73 \text{ mm}^3$ for the HOM mice and $429 \pm 7.86 \text{ mm}^3$ for the WT mice. The associated linear contrast is $-60.8 \pm 15.7 \text{ mm}^3$ and its effect size calculated as a percentage increase or decrease relative to WT mice is -14.2 %.



Expected marginal means of the genotype estimated for a neurocranium size of 22.6 mm (blue dots), error bars correspond to associated standard errors and black dots to individual residuals.

5.3. Shape analysis

After generalized Procrustes analysis with object symmetry on the neurocranium landmarks, a principal component analysis (PCA) on the tangent coordinates was computed to display the main patterns of variation. The two first PCs summarize 63.9 % of the total Procrustes variance. No evidence of sex differences appears on this two-dimension of the shape space but the *Vps13b* HOM knockout genotypes segregate along PC2.



A Procrustes ANOVA on the symmetric shape confirmed a probable large effect of the genotype on skull shape (14 % of the total shape variance) but larger sample size will be required to confirm its significance.

The associated ANOVA table is as follows:

Source	df	SS	MS	R ²	F	Z	Pr(>F)
Genotype	1	0.0038984	0.0038984	0.14391	2.5215	1.6836	0.057
Residuals	15	0.0231911	0.0015461				

df, degrees of freedom; SS, Sum of Squares; MS, Mean Squares; R², R- squared statistics; F, F value; Z, Z-score; Pr, p-value associated with the F statistics.

The genotype effect on the symmetric shape (effect that could be partly allometric) appears to make the roof of the neurocranium flatter with a relative expansion of the posterior part (see **Movie S1**).

5.4. Patient data

In patient 1, microcephaly was apparent as early as 6 months of age (-1 cm compared with the 3rd percentile, then -1.7 cm at 12 months, -0.9 cm at 18 months, -3.1 cm at 31 months, and -2.4 cm at 52 months). In patient 2, microcephaly is visible earlier at 2 months (-0.9 cm smaller than the 3rd percentile). From 6 months onwards, there was no further significant worsening of the phenotype (-1.5 cm at 6 months, -1.2 cm at 8 months, -1.7 cm at 17 months, and -1.8 cm at 25 months). Patient 3 had no microcephaly at birth. However, by 1 month of age, his head circumference was smaller than the 3rd percentile (-0.5 cm), and microcephaly remained present at -1 cm at 5 months, -2 cm at 12 months, and -1.5 cm at 16 months. Patient 4 was the only patient with mild microcephaly at birth (-0.3 cm). At 5 months, her head circumference was 1.3 cm smaller than the 3rd percentile, and this worsened to -2.6 cm at 12 months, -2.8 cm at 15 months, and -3.2 cm at 31 months. In patient 6, microcephaly was visible from 5 months of age (-1.3 cm) and reached -2.5 cm at 8 months and -1.9 cm at 18 months.

Publications annexes

En parallèle de mon travail de thèse, j'ai eu l'occasion de réaliser des collaborations sur d'autres projets.

J'ai participé au projet du Dr. Amélie BAUD portant sur la compréhension de l'effet du génotype d'une souris sur le phénotype des souris qui la côtoient. Pour ce projet, j'ai microdisséqué des cerveaux de souris, extraits des ARN et réalisé des RT-qPCR afin d'analyser le niveau d'expression d'*Epha4* dans les tissus des souris.

« Dissecting indirect genetic effects from peers in laboratory mice »

Article publié le 26 juillet 2021 dans la revue Genome Biology

J'ai également participé au projet de thèse de Perrine KRETZ (soutenance le 10 mars 2021) qui s'intitule « Analyses des causes génétiques du syndrome de microdeletion du 16p11.2 et de l'impact de la protéine majeure de la voute (MVP) et de son interaction avec MAPK3 dans la physiologie cérébrale ». Mon travail a consisté à entretenir certaines des lignées de souris du projet et à réaliser des Western-blot afin d'évaluer, entre autres, l'expression des protéines ERK1 et ERK2 dans le striatum et le cortex des souris.

« Unravelling the implication of the major vault protein in neuroanatomical phenotypes »

Article accepté en septembre 2023 dans la revue Genome Biology

Enfin, j'ai collaboré avec les Dr. Andres RUIZ-LINARES et Dr. Nicolas NAVARRO dans une étude impliquant VPS13B dans des anomalies morpho-faciales. Pour ce projet, j'ai généré et préparé la cohorte de souris *Vps13b^{tm1.ICS}*.

« A GWAS in Latin Americans implicates a region of Denisovan introgression and VPS13B in facial variation »

Article publié le 5 février 2021 dans la revue Science Advances

Etant donné que ce projet était en lien direct avec mon projet de thèse, le manuscrit est publié est disponible dans les pages qui suivent.

HUMAN GENETICS

A GWAS in Latin Americans identifies novel face shape loci, implicating VPS13B and a Denisovan introgressed region in facial variation

Betty Bonfante^{1*}, Pierre Faux^{1*}, Nicolas Navarro^{2,3}, Javier Mendoza-Revilla^{4,5}, Morgane Dubied², Charlotte Montillot⁶, Emma Wentworth⁷, Lauriane Poloni^{2,3}, Ceferino Varón-González⁸, Philip Jones⁹, Ziyi Xiong¹⁰, Macarena Fuentes-Guajardo¹¹, Sagnik Palmal¹, Juan Camilo Chacón-Duque¹², Malena Hurtado⁴, Valeria Villegas⁴, Vanessa Granja⁴, Claudia Jaramillo¹³, William Arias¹³, Rodrigo Barquera^{14,15}, Paola Everardo-Martínez¹⁴, Mirsha Sánchez-Quinto¹⁶, Jorge Gómez-Valdés¹⁴, Hugo Villamil-Ramírez¹⁷, Caio C. Silva de Cerqueira¹⁸, Tábita Hünemeier¹⁹, Virginia Ramallo^{20,21}, Fan Liu^{10,22,23}, Seth M. Weinberg^{24,25,26}, John R. Shaffer^{24,25}, Evie Stergiakouli^{27,28}, Laurence J. Howe²⁷, Pirro G. Hysi²⁹, Timothy D. Spector²⁹, Rolando Gonzalez-José²¹, Lavinia Schüler-Faccini²⁰, Maria-Cátira Bortolini²⁰, Víctor Acuña-Alonzo¹⁴, Samuel Canzales-Quinteros¹⁷, Carla Gallo⁴, Giovanni Poletti⁴, Gabriel Bedoya¹³, Francisco Rothhammer³⁰, Christel Thauvin-Robinet^{6,31}, Laurence Faivre^{6,31}, Caroline Costedoat¹, David Balding^{9,32}, Timothy Cox³³, Manfred Kayser¹⁰, Laurence Duplomb⁶, Binnaz Yalcin⁶, Justin Cotney⁷, Kaustubh Adhikari^{34,9†}, Andrés Ruiz-Linares^{1,9,35†}

To characterize the genetic basis of facial features in Latin Americans, we performed a genome-wide association study (GWAS) of more than 6000 individuals using 59 landmark-based measurements from two-dimensional profile photographs and ~9,000,000 genotyped or imputed single-nucleotide polymorphisms. We detected significant association of 32 traits with at least 1 (and up to 6) of 32 different genomic regions, more than doubling the number of robustly associated face morphology loci reported until now (from 11 to 23). These GWAS hits are strongly enriched in regulatory sequences active specifically during craniofacial development. The associated region in 1p12 includes a tract of archaic adaptive introgression, with a Denisovan haplotype common in Native Americans affecting particularly lip thickness. Among the nine previously unidentified face morphology loci we identified is the VPS13B gene region, and we show that variants in this region also affect midfacial morphology in mice.

INTRODUCTION

Because of its evolutionary, biomedical, and forensic significance, there is an increasing interest in the characterization of the genetic

basis of human facial variation. Thus far, nine genome-wide association (GWA) studies (GWASs) have reported ~50 genetic loci associated with facial features in humans (1–12), although only about a

¹Aix-Marseille Université, CNRS, EFS, ADES, Marseille 13005, France. ²Biogéosciences, UMR 6282 CNRS, EPHE, Université Bourgogne Franche-Comté, Dijon 21078, France. ³EPHE, PSL University, Paris 75014, France. ⁴Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, 31, Perú. ⁵Unit of Human Evolutionary Genetics, Institut Pasteur, Paris 75015, France. ⁶INSERM UMR 1231 Génétique des Anomalies du Développement, Université Bourgogne Franche-Comté, Dijon 21000, France. ⁷Department of Genetics and Genome Sciences, University of Connecticut Health, Farmington, CT 06030, USA. ⁸Institut de Systématique, Évolution, Biodiversité, ISYEB-UMR 7205-CNRS, MNHN, UPMC, EPHE, UA, Muséum National d'Histoire Naturelle, Sorbonne Universités, Paris 75005, France. ⁹Department of Genetics, Evolution and Environment, and UCL Genetics Institute, University College London, London WC1E 6BT, UK. ¹⁰Department of Genetic Identification, Erasmus MC University Medical Center Rotterdam, Rotterdam 3015GD, Netherlands. ¹¹Departamento de Tecnología Médica, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Tarapacá, Arica 1000000, Chile. ¹²Division of Vertebrates and Anthropology, Department of Earth Sciences, Natural History Museum, London SW7 5BD, UK. ¹³GENMOL (Genética Molecular), Universidad de Antioquia, Medellín 5001000, Colombia. ¹⁴Molecular Genetics Laboratory, National School of Anthropology and History, Mexico City 14050, Mexico. ¹⁵Department of Archaeogenetics, Max Planck Institute for the Science of Human History (MPI-SHH), Jena 07745, Germany. ¹⁶Forensic Science, Faculty of Medicine, UNAM (Universidad Nacional Autónoma de México), Mexico City 06320, Mexico. ¹⁷Unidad de Genómica de Poblaciones Aplicada a la Salud, Facultad de Química, UNAM-Instituto Nacional de Medicina Genómica, Mexico City 4510, Mexico. ¹⁸Scientific Police of São Paulo State, Ourinhos-SP 19900-109, Brazil. ¹⁹Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP 05508-090, Brazil. ²⁰Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90040-060, Brasil. ²¹Instituto Patagónico de Ciencias Sociales y Humanas, Centro Nacional Patagónico, CONICET, Puerto Madryn U9129ACD, Argentina. ²²Key Laboratory of Genomic and Precision Medicine, Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100864, China. ²³University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100864, China. ²⁴Department of Human Genetics, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA 15260, USA. ²⁵Center for Craniofacial and Dental Genetics, Department of Oral Biology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA 15260, USA. ²⁶Department of Anthropology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA 15260, USA. ²⁷Medical Research Council Integrative Epidemiology Unit, Population Health Sciences, University of Bristol, Bristol BS1 2LY, UK. ²⁸School of Oral and Dental Sciences, University of Bristol, Bristol BS1 2LY, UK. ²⁹Department of Twin Research and Genetic Epidemiology, King's College London, London WC2R 2LS, UK. ³⁰Instituto de Alta Investigación, Universidad de Tarapacá, Arica, Arica 1000000, Chile. ³¹Centre de Référence Maladies Rares "Anomalies du Développement et Syndromes Malformatifs" de l'Est, Centre de Génétique, FHU TRANSLAD, CHU Dijon, Dijon 21000, France. ³²Melbourne Integrative Genomics, Schools of BioSciences and Mathematics & Statistics, University of Melbourne, Melbourne, VIC 3052, Australia. ³³Department of Oral and Craniofacial Sciences, School of Dentistry and Department of Pediatrics, School of Medicine, University of Missouri, Kansas City, MO 64108, USA. ³⁴School of Mathematics and Statistics, Faculty of Science, Technology, Engineering and Mathematics, The Open University, Milton Keynes MK7 6AA, UK. ³⁵Ministry of Education Key Laboratory of Contemporary Anthropology and Collaborative Innovation Center of Genetics and Development, School of Life Sciences and Human Phenome Institute, Fudan University, Yangpu District, Shanghai, China.

*These authors contributed equally to this work.

†Corresponding author. Email: andresruiz@fudan.edu.cn (A.R.-L.); kaustubh.adhikari@open.ac.uk (K.A.)

dozen of these loci show significant association signals across independent studies, representing the most robust findings so far. Other than stochastic variation, the limited overlap of findings from independent GWASs could relate to various methodological and biological factors, including a different genetic architecture of facial variation across human populations.

We recently initiated a research program focused on the genetic basis of physical appearance in a sample of ~7000 individuals recruited in Latin America the Consortium for the Analysis of the Diversity and Evolution of Latin America (CANDELA cohort) (13). Our study sample is mostly of mixed European-Native American ancestry and shows extensive phenotypic variation and high genetic diversity (13, 14). This sample has high power for the genetic analysis of physical appearance in a considerably understudied population (4, 15–17). In a previous analysis of 14 facial features (characterized mainly using a discrete, categorical scoring approach), we reported genome-wide significant associations with single-nucleotide polymorphisms (SNPs) at six genomic loci (4). These loci harbor candidate genes known to be involved in mammalian craniofacial development/evolution, and four have now been replicated in other study samples, using a range of phenotyping approaches (10, 18).

From an evolutionary perspective, facial projection shows extensive variation across extinct and extant mammals, with aspects of brow-ridge, midface, and mandible projection being defining features of primate and hominid taxa (19). Such changes in facial projection have often been proposed to result from the action of selection, including various environmental adaptations, and possibly (particularly in hominids) social factors (20). In modern humans, the facial profile varies greatly between individuals and populations and has been shown to be highly informative in various perception domains, including gender and age attribution, individual recognition, and attractiveness (21).

Here, we present results stemming from GWA analyses of the facial profile in the CANDELA cohort. We evaluated 59 quantitative traits (i.e., landmark-based measurements) and found significant associations at 32 genomic regions (9 previously unidentified, 4 of which replicate in a European meta-analysis). We provide robust evidence of association for 23 loci that have been implicated by previous GWASs, more than doubling the number of well-validated face morphology loci. We find that associated SNPs are strongly enriched in enhancers active during the late organogenesis phase of human development, including many that are specifically active during craniofacial development. In the region of association in 1p12 (overlapping *WARS2/TBX15*), we find a Denisovan haplotype affecting face morphology, particularly lip thickness. Among the four previously unidentified face morphology loci that replicate in Europeans is *VPS13B* (associated with nose shape), and we demonstrate that variants of the homologous region in the mouse (*Vps13b*) also influence nasal morphology.

RESULTS

Study sample and phenotyping

We examined individuals from the CANDELA study cohort, collected in five Latin American countries (13). Two operators placed 19 landmarks and 22 semi-landmarks (fig. S1), primarily along the midfacial contour, on right profile two-dimensional (2D) photographs of 6169 subjects (3408 women and 2761 men). After Procrustes superposition, we defined 59 measurements (distances, ratios, and angles) based on the landmarks/semi-landmarks. These

measurements quantify aspects of the morphology of the upper, middle, and lower face, with similar measurements having been examined in a range of morphological studies of the human face, including genetic, medical, anthropological, and forensic applications (Fig. 1 and table S1). We found these quantitative traits to be reliably assessed (see Methods and table S2), approximately normally distributed and with extensive variation in the CANDELA sample. The individuals studied were genotyped on Illumina's OmniExpress BeadChip. After quality control filters, we retained 671,038 SNPs for further analyses.

Other than the high correlation ($r > 0.8$) seen for similar traits from the same anatomical structure (e.g., nose roundedness and lip thickness), most traits were found to have a low to moderate correlation (table S3). On the basis of genome-wide SNP data, average admixture proportions in the CANDELA individuals examined were estimated as 51% European, 45% Native American, and 4% sub-Saharan African. Most traits showed a low to moderate (but generally significant) correlation with age, body mass index (BMI), sex, and continental genetic ancestry (table S4). The strongest effects for age, BMI, and sex were seen, respectively, for measures of lip thickness ($r \sim 0.33$), traits affected by neck thickness ($r \sim 0.49$), and brow-ridge protrusion ($r \sim 0.51$). The strongest effect of Native American/European ancestry estimates [themselves strongly negatively correlated (13)] was for a measure of nasion position ($r \sim 0.38$). In addition, several measures of nose/chin protrusion and lip thickness had correlations ~ 0.20 with Native American/European ancestry. Subcontinental genetic ancestry (North Europe v. Iberia; Central Andes v. Southern South America) also correlated significantly with certain traits, particularly of the midface (table S4), consistent with previous observations (14).

On the basis of a kinship matrix derived from the SNP data, we estimated narrow-sense trait heritability (h^2) using LDAK5 (22). We found moderate (but mostly highly significant) heritability values for all traits, ranging from 0.20 to 0.61 (table S3), consistent with independent estimates (2, 18). The highest heritability (>0.60) was observed for measures of brow-ridge, nose, and lip protrusion. Genetic correlations among traits were approximately proportional to phenotypic correlations (except for traits with low h^2), suggesting a similar role for genetic and environmental effects across traits (table S3).

GWA analyses

We performed imputation using 1000 Genomes Phase 3 data (23), which allowed us to include up to 8,703,729 autosomal SNPs in the GWA analyses. For association testing, we used multiple linear regression, as implemented in PLINK (24), with an additive genetic model adjusting for age, sex, BMI, landmarking operator, and the first six principal components (PCs) computed from the SNP data. A total of 32 genomic regions (including 2684 SNPs) showed genome-wide significant association (P value $< 5 \times 10^{-8}$) with at least one trait (and up to six) (Figs. 1 and 2, Table 1, and table S5). These regions often also showed association with additional traits at a genome-wide suggestive significance threshold (P value $< 10^{-5}$; Fig. 2). Conversely, of the 59 traits examined, 32 showed genome-wide significant association with at least one genomic region (and up to five regions), as well as genome-wide suggestive association with regions significantly associated with other traits (Fig. 2). Index SNPs (i.e., the one with the smallest P value in a region) at loci showing strongest association with a trait explain 0.4 to 0.9% of trait variance (median = 0.52%), in line with previous estimates of genetic effects in GWASs of facial variation (1, 15, 18).

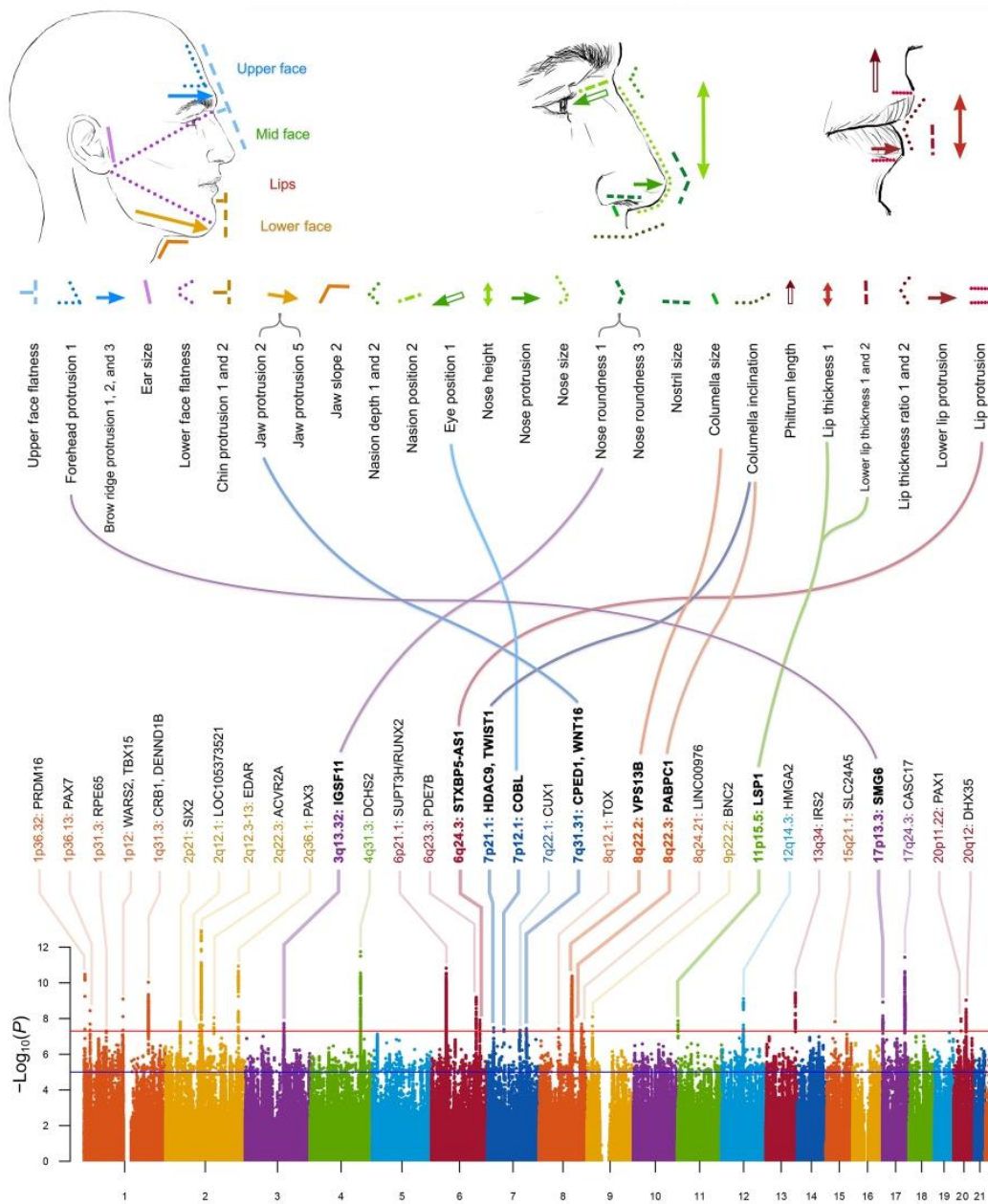


Fig. 1. Face profile features showing genome-wide significant association. **Top:** Drawings indicate the features for which the 32 traits listed below were measured in the CANDELA individuals (as defined in table S1). **Bottom:** Aggregate of the GWAS signals detected (across all traits). The chromosomal region (and nearest candidate gene) showing strongest association to a trait is indicated above each GWAS peak (bold type marks the previously unidentified face morphology regions identified here). Curved lines in the middle of the figure connect the previously unidentified face morphology region to their associated traits.

To account for the number of traits and SNPs tested, we also calculated adjusted genome-wide significance thresholds following a global false discovery rate (FDR) procedure (25), at two overall significance levels ($\alpha = 1\%$ and $\alpha = 5\%$). The commonly used threshold of 5×10^{-8} was slightly more stringent than the calculated FDR thresholds (see Methods); therefore, the associations identified as

significant above remain significant after FDR adjustment for multiple testing.

Integration of face profile GWAS hits with the literature

For 24 of the 32 regions showing significant trait associations, there is substantial literature supporting an involvement in craniofacial

Downloaded from https://www.science.org on April 04, 2023

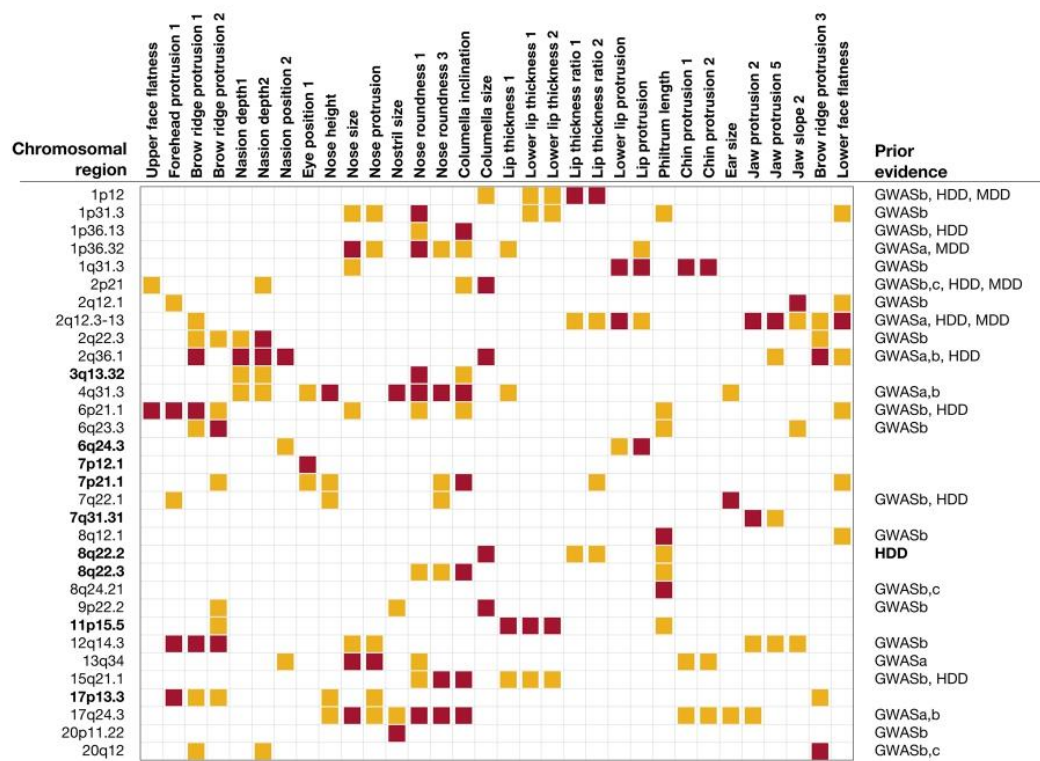


Fig. 2. Thirty-two chromosomal regions associated with face profile traits. The 32 traits showing genome-wide significant association are listed at the top (Fig. 1 and table S1). For ease of visualization, association P values are represented by colored boxes as follows: red, genome-wide significant ($< 5 \times 10^{-8}$); orange, genome-wide suggestive ($< 10^{-5}$) (P values are provided in table S5). Chromosomal regions in bold were previously unidentified (Fig. 1 and Table 1). Prior evidence: GWASa, associated with a similar face trait; GWASb, associated with a different facial trait; GWASc, associated with a facial developmental disorder [e.g., nonsyndromic cleft lip/palate (NSCL/P)]; HDD, human developmental defect reported (e.g., Mendelian disorder); MDD, model developmental defect (related phenotype involving a homologous region reported in animal models).

morphology (summarized in Fig. 2 and table S5). This evidence is of five broad types, with certain loci being implicated by more than one line of evidence: (i) Some hits represent direct replications of previous GWAS findings. That is, the same (or a similar) facial trait has been associated with the same genomic region in previous studies. The most prominent example is nasion position (measured in various ways), which has been repeatedly associated with SNPs in the *PAX3* region on 2q35 (1, 2, 10, 15, 18). Here, we replicate this finding in that we observe an association of this region with measures sensitive to nasion position (table S1). (ii) Some of the genome regions showing association have been detected in previous face morphology GWAS but for traits other than those associated here, suggesting an effect of these regions on various aspects of facial morphology. A prime example is the *WARS2/TBX15* gene region in 1p12. We initially reported association of SNPs in this region with rolling of the helix (in the outer ear) (15); this region was subsequently associated with midface morphology and frontal bossing (10, 18), and in the current study, we find it associated with two measures of lip thickness (traits 35 and 36; Fig. 2 and table S1). (iii) Certain genomic regions identified here have been implicated by previous GWASs of craniofacial anomalies, particularly nonsyndromic cleft lip/palate (NSCL/P). For instance, SNPs in 8q24.21, downstream of *MYC*, have been strongly associated with NSCL/P

(26), and here we find this region associated with philtrum length, consistent with genes in the region being involved in the development of this part of the midface. (iv) For some of the associated chromosomal regions highlighted here, there is evidence in the literature of their involvement in complex craniofacial abnormalities, including Mendelian disorders. For instance, the 8q22.2 region associated here with columella size (trait 27) has been involved in Cohen syndrome (OMIM #216550). Last, (v) some of the regions associated here have been previously implicated in craniofacial development in animal models. For instance, the Tabby mouse mutant (15) presents a range of craniofacial abnormalities caused by a duplication involving the *Tbx15* gene in the 1p12 homologous region, and here we found this locus to be associated with lower lip thickness and lip thickness ratio. In Supplementary Notes, we provide comments on the 23 genomic regions detected here for which GWAS evidence of involvement in with nonpathological craniofacial variation has been reported previously.

Regulatory annotation enrichment analysis

Index SNPs at the GWAS hits identified here occur primarily in noncoding regions (table S5). We therefore evaluated the potential enrichment of SNPs in these regions within enhancers identified by chromatin 25-state annotations in 150 human tissues and cell types

Table 1. Features of the nine chromosomal regions newly associated with face profile traits in the CANDELA sample. Candidate genes where the index SNP is intragenic are underlined. Association P values in bold are genome-wide significant ($P \leq 5 \times 10^{-8}$). Rep., European meta-analysis; AFR, sub-Saharan African; EUR, European (from 1000 genomes); NAM, Native American (14); CAN, CANDELA. # SNPs refers to the total number of genome-wide significant SNPs in that chromosomal region (P value $\leq 5 \times 10^{-8}$).

Chromosomal region	Nearest candidate gene	Index SNP	Association P value									Minor allele frequency					# SNPs	
			Forehead protrusion	Eye position	Nose roundness	Columella inclination	Columella size	Lip thickness	Lower lip thickness	Lower lip thickness	Lip protrusion	Jaw protrusion	Rep. P value	AFR	EUR	NAM		CAN
3q13.32	<u>IGSF11</u>	rs7633584	7.3×10^{-3}	5.2×10^{-1}	1.8×10^{-8}	4.4×10^{-6}	4.2×10^{-1}	1.6×10^{-1}	3.8×10^{-1}	2.0×10^{-1}	8.2×10^{-2}	2.6×10^{-1}	2.4×10^{-4}	0.29	0.05	0.39	0.22	11
6q24.3	<u>SZABES1</u>	rs6570789	9.8×10^{-1}	8.0×10^{-1}	2.0×10^{-1}	2.2×10^{-1}	4.1×10^{-2}	7.9×10^{-2}	1.2×10^{-2}	4.2×10^{-2}	1.2×10^{-8}	3.3×10^{-3}	9.2×10^{-3}	0.40	0.55	0.92	0.68	11
7p12.1	INTERGENIC (COBL)	rs17134499	6.2×10^{-1}	4.1×10^{-8}	9.9×10^{-1}	6.4×10^{-1}	1.3×10^{-1}	5.6×10^{-1}	6.5×10^{-1}	6.6×10^{-1}	6.3×10^{-1}	9.8×10^{-1}	6.6×10^{-2}	0.32	0.02	0.03	0.03	3
7p21.1	<u>HDA19</u>	rs1178103	9.4×10^{-1}	1.1×10^{-4}	2.4×10^{-6}	3.3×10^{-6}	1.2×10^{-4}	1.9×10^{-2}	4.1×10^{-3}	7.4×10^{-3}	3.0×10^{-3}	2.6×10^{-1}	4.9×10^{-5}	0.13	0.18	0.38	0.26	1
7p13.1	<u>CEP1</u>	rs6950680	4.9×10^{-4}	1.0×10^{-2}	1.0×10^{-6}	5.6×10^{-5}	2.1×10^{-1}	6.9×10^{-1}	4.7×10^{-1}	4.4×10^{-1}	8.2×10^{-1}	3.6×10^{-6}	2.0×10^{-4}	0.21	0.36	0.04	0.21	2
8q22.2	<u>VPS33B</u>	rs75976055	1.0×10^{-2}	3.7×10^{-1}	8.8×10^{-2}	3.0×10^{-2}	4.2×10^{-1}	3.3×10^{-1}	2.8×10^{-2}	3.3×10^{-2}	3.7×10^{-2}	3.0×10^{-1}	5.0×10^{-5}	0.08	0.13	0.31	0.38	598
8q22.3	<u>PABPC1</u>	rs10173776ATATT	1.0×10^{-2}	5.8×10^{-1}	4.9×10^{-7}	1.1×10^{-6}	3.6×10^{-1}	1.7×10^{-1}	9.9×10^{-1}	6.6×10^{-1}	3.9×10^{-1}	-	-	0.23	0.00	0.00	0.02	17
11p15.5	<u>USP1</u>	rs907613	4.9×10^{-1}	3.7×10^{-1}	7.7×10^{-1}	4.2×10^{-5}	7.1×10^{-1}	4.2×10^{-6}	4.0×10^{-6}	4.4×10^{-6}	4.9×10^{-1}	9.8×10^{-1}	4.0×10^{-2}	0.33	0.41	0.39	8	
17p13.3	<u>SMG6</u>	rs8069947	1.2×10^{-9}	1.8×10^{-1}	2.2×10^{-1}	3.8×10^{-3}	6.8×10^{-1}	2.7×10^{-2}	2.6×10^{-2}	5.0×10^{-2}	4.2×10^{-1}	7.1×10^{-1}	2.3×10^{-2}	0.26	0.49	0.59	0.54	41

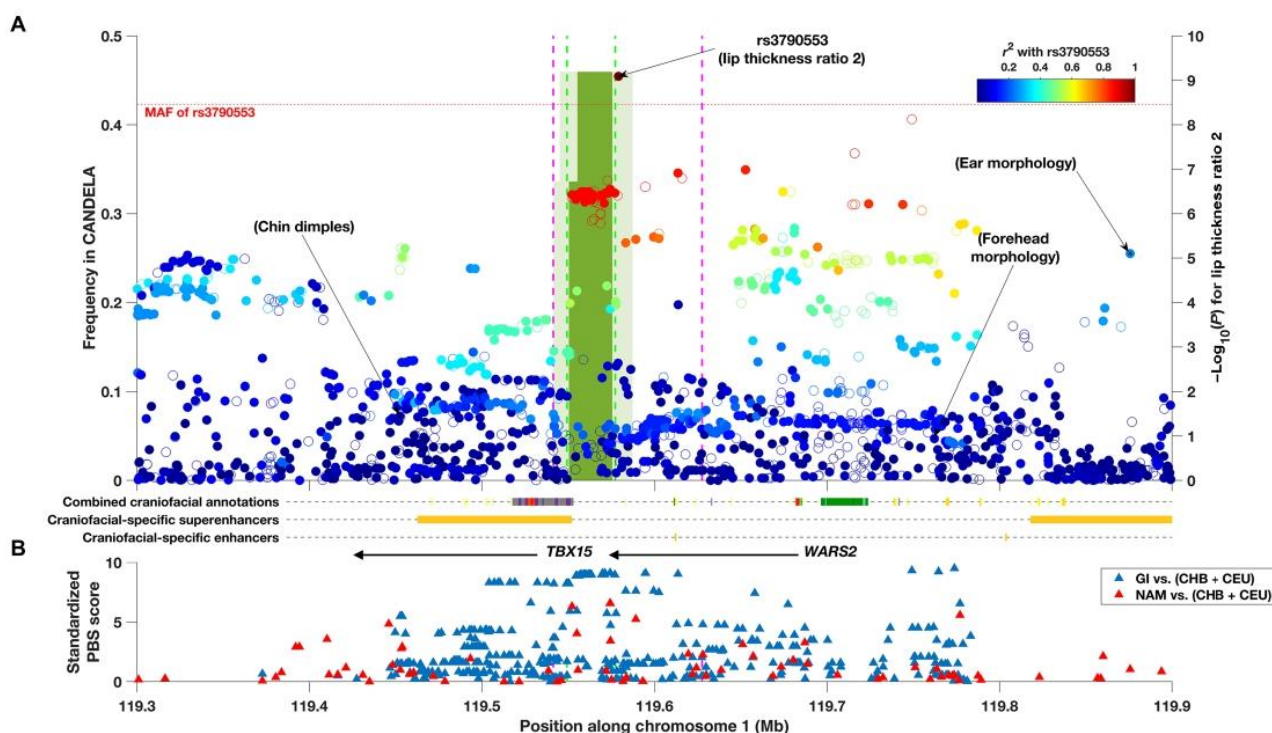


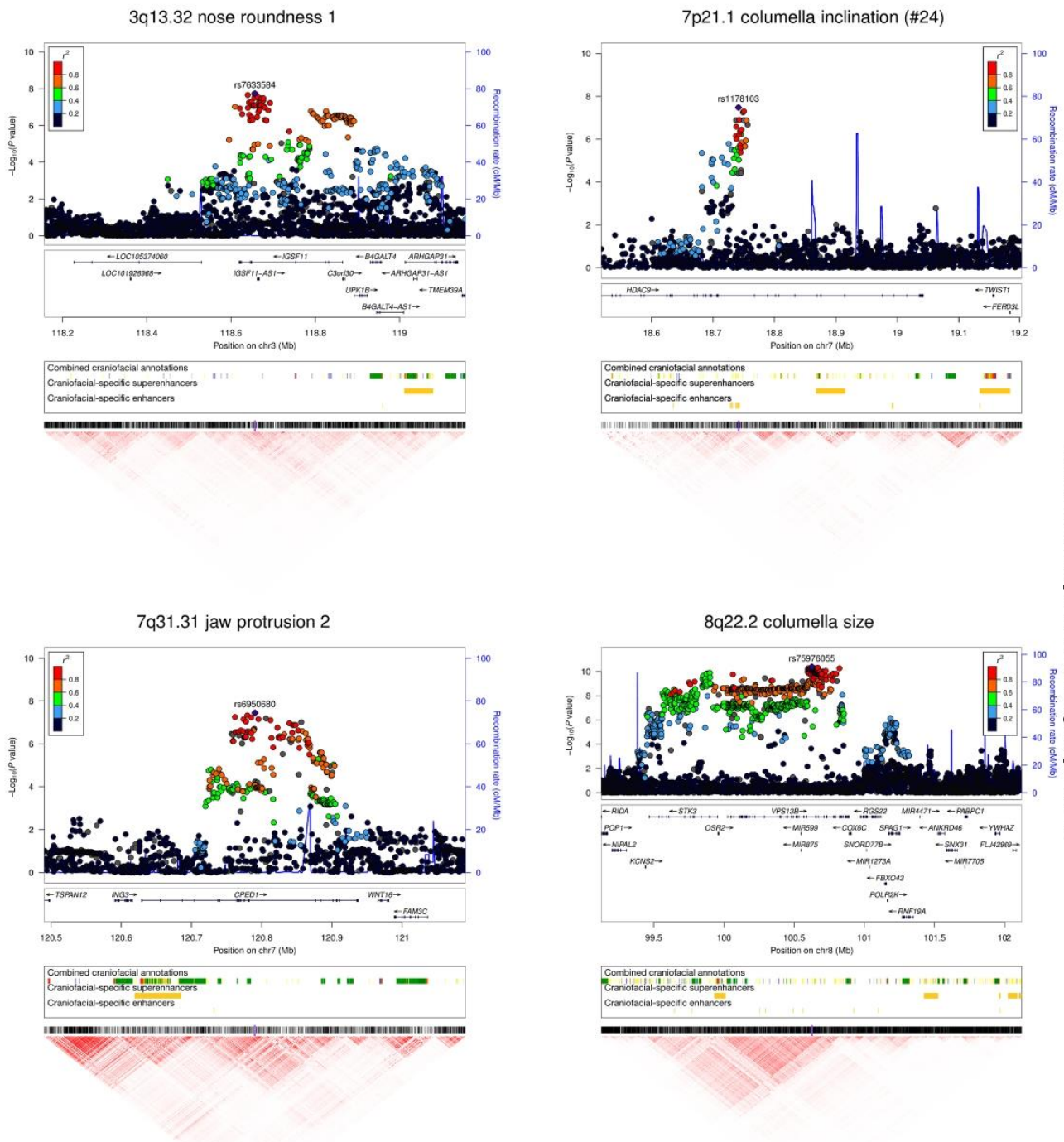
Fig. 3. Evidence of association, Denisovan introgression, and selection in the WARS2-TBX15 region. (A) Association P values (right y -axis) with lip thickness ratio 2 and the location and frequency (left y -axis) of introgressed haplotypes inferred in the CANDELA data. Filled dots indicate the SNPs retained for introgression analysis. Dots are plotted accordingly to the significance of their association and have been colored to reflect r^2 with the index SNP for association with that trait (rs3790553). The location of the index SNPs associated previously with ear morphology (15), chin dimples (7), and forehead shape (10) is indicated. SNPs associated with facial features in the European meta-analysis (18) are outside the region shown here. The green bins show the introgressed region, and their height displays the allelic frequency and their shade refers to the confidence level at which the tract was called (pale, 20%; dark, 90%). The dashed lines denote the bounds of the Denisovan introgression region previously estimated with the same approach used here (green) (31) or using a Conditional Random Field approach (purple) (32). (B) Standardized PBS scores obtained for genotyped SNPs when contrasting Native Americans (NAM) to CHB + CEU (red triangles) or Greenland Inuits (GI) to CHB + CEU (blue triangles). The location of the TBX15 and WARS2 genes is indicated by black arrows along with various annotations inferred from human embryonic tissue (27) (the color key for combined craniofacial annotations can be found in table S6).

across embryonic, fetal, and adult time points (including multiple stages of human craniofacial development) (27). The index SNPs we identified are not necessarily causal and are often in strong linkage disequilibrium (LD) with other SNPs within a region (e.g., Figs. 3 and 4). We therefore identified proxy variants in LD with the index variant ($r^2 > 0.8$) up to 1 Mb away. We then used the program GREGOR (28) to evaluate the enrichment of these SNPs (relative to an equal number of randomly selected SNPs) in regulatory annotations for each of the tissues and cell types mentioned above. We found a ~ 2 -fold and ~ 4 -fold enrichment of SNPs at face GWAS hits in all craniofacial enhancers and in craniofacial-specific enhancers, respectively (Bonferroni-corrected P values $< 10^{-50}$) (fig. S2). Craniofacial-specific enhancers have not been detected in any other human tissues or stages of development and represent a small fraction of all genome annotations (i.e., $\sim 8\%$ of all craniofacial enhancers) (27). The observed enrichment of SNPs in the craniofacial-specific enhancers suggests that these regions play a regulatory role specific to facial development rather than being broadly involved in skeletal biology or embryonic development. Contrasting samples from early and late embryonic stages, we observe that samples from the later

stages have the highest (~ 2 -fold; Bonferroni-corrected P value $< 10^{-20}$) enrichment (fig. S2). This supports previous analyses suggesting that gene expression regulation in late embryonic and early fetal development has the greatest impact on nonpathological adult face morphology (18, 27). Below, we comment on specific regulatory elements present in selected genome regions associated with face morphology.

Association in 1p12 involves SNPs in a region with evidence of adaptive introgression from archaic humans

SNPs in 1p12 overlapping the WARS2/TBX15 gene region were associated here with two measures of lip thickness ratio [Figs. 1 and 2; lip thickness ratio referring to the thickness of the upper lip relative to total lip thickness: upper lip thickness/(upper + lower lip thickness); see table S1]. This genomic region has been previously reported to be associated with features of the outer ear (15) and face (7, 10, 18), but this is the first time it is associated with lip thickness. SNPs in 1p12 have also been implicated in GWASs of anthropometric traits and fat distribution (29). The WARS2/TBX15 gene region has been reported to show a strong signal of selection in Greenland Inuit, as evidenced by extreme Population Branch Statistics (PBS)



Downloaded from <https://www.science.org> on April 04, 2023

Fig. 4. Features of four genomic regions newly associated with face features in the CANDELA sample and replicating in Europeans. Regional association P values (index SNP is labeled) are shown at the top. Regulatory annotations from human embryonic tissue (27) (combined chromatin states at various Carnegie stages and craniofacial-specific enhancers and superenhancers; the color key for combined craniofacial annotations is in table S6) are provided below each association plot. A heatmap of pairwise LD (r^2) in the region is shown at the bottom of each panel. Similar plots for the other previously unidentified regions, detected in the CANDELA sample but not replicating in the European meta-analysis, are shown in Supplementary Notes.

values (30). This observation has been interpreted as resulting from adaptation to a low environmental temperature (30). Furthermore, the selection signal in this region was shown to overlap with a tract of introgression from archaic humans, most likely Denisovans (31), pointing to the possibility of adaptive introgression.

We evaluated evidence for Denisovan introgression in the *WARS2/TBX15* gene region in the CANDELA data using a Hidden Markov Model approach (31). We inferred two overlapping introgressed tracts called at confidence levels 20 to 99%, with decreasing size (Fig. 3 and fig. S3). At 99% confidence, the largest and most frequent (34%) introgression tract inferred in the CANDELA data almost exactly matches the 28-kb tract previously inferred in Greenlandic Inuits and various Asian and Native American populations (31). This tract is included within a longer tract of introgression reported previously using an alternative (Conditional Random Field) approach (Fig. 3) (32). We also estimated PBS values in Native American populations related to the ancestral populations contributing to admixture in Latin Americans (14). As previously observed in Greenlandic Inuit (30), we found extreme PBS values in that region, peaking in the tract of Denisovan introgression (Fig. 3). Notably, the SNPs showing significant association with lip thickness in the CANDELA data overlap with the signal of selection and the tract of Denisovan introgression (Fig. 3). The index SNP (rs3790553) is included in the introgressed haplotype inferred at 50% confidence. By contrast, SNPs previously associated with ear morphology (15) and facial features (10, 18) are located over 90 kb away from the tract of Denisovan introgression and have an association r^2 with this tract < 0.23 (Fig. 3). Furthermore, the derived allele at rs3790553 is carried by 91% of the introgressed haplotypes, while the ancestral allele of that SNP is carried by 99.7% of the chromosomes in which the introgression tract was not inferred. This level of association was not seen for any of the index SNPs reported in previous GWAS implicating the *WARS2/TBX15* region. We examined the effect of the Denisovan haplotype on the profile traits evaluated in the CANDELA sample and found five significant associations (P values $< 10^{-3}$; fig. S4). Among these, a positive effect is seen on lip thickness ratio and upper lip protrusion, while a negative effect is seen on lower lip thickness and protrusion. There is also a positive effect (albeit not significant) on upper lip thickness. These opposite effects of the Denisovan haplotype on the upper v. lower lips effectively add up in the lip thickness ratio measures, consistent with them showing strongest associations.

Features of loci not significantly associated in previous face morphology GWAS

As shown in Fig. 2, among the 32 genomic regions showing association, 9 have not been genome-wide significant in previous GWAS of nonpathological facial features. We sought replication of the index SNPs from these nine regions in a recent facial morphology GWA meta-analysis that included data for over 10,000 Europeans (18). Traits examined in the meta-analysis consist of pairwise distances between 13 landmarks placed on 3D images. Although we placed in the CANDELA 2D photos the same nine right-profile landmarks used in the European meta-analysis, only 3 of the 59 measurements we obtained correspond to distances included in the European meta-analysis. Considering this limited overlap, we examined association P values in the full set of 36 right-profile distances measured in the European meta-analysis (Table 1). One of our nine index SNPs is not polymorphic in Europeans; therefore,

we could not evaluate replication for this SNP. Of the eight index SNPs that are polymorphic in Europeans, four showed replication P values exceeding a Bonferroni-corrected threshold for significance for at least one facial distance (Table 1). Although most of the distances with significant association in the European meta-analysis do not correspond to those showing association in the CANDELA data, they often share landmarks. For example, SNP rs75976055 is associated here with a measure of columella size incorporating the Subnasale landmark (table S1), and the strongest replication P value (5×10^{-5}) was observed in the European meta-analysis for the distance between the Subnasale and Labial inferius landmarks.

Figure 4 shows regional association plots for the four previously unidentified facial morphology loci with evidence of replication in the European meta-analysis. In 3q13.32, SNPs in the IGSF11 (immunoglobulin superfamily member 11) region show significant association with nose roundness (and suggestive association with columella inclination). The index SNP in this region (rs7633584) is located within an intron of IGSF11. IGSF11 is a cell adhesion molecule playing a role in osteoclast differentiation and bone resorption (33), but no association with morphological features has been reported previously.

In 7p21.1, an SNP significantly associated with columella inclination is intronic to HDAC9 (Histone deacetylase 9). HDAC9 is an enzyme involved in gene expression regulation through histone acetylation. SNPs in this gene region have been suggestively associated with the vertical position of the sublabial sulcus, relative to the central midface (5). The region of association identified here overlaps with two craniofacial-specific enhancers (Fig. 4). Although HDAC9 does not appear to be expressed in developing mouse craniofacial tissues, many enhancers located within HDAC9 have been shown to form long-range interactions with the neighboring TWIST1 gene during the development of limbs and pharyngeal arches in mice (34). TWIST1 is a transcription factor important in limb and craniofacial development (34), and mutations of TWIST1 have been shown to result in Saethre-Chotzen syndrome, defined by its facial and cranial gestalt (OMIM #101400). These observations suggest that the effect of SNPs showing association with profile traits in the CANDELA individuals could be mediated through regulatory elements within HDAC9 controlling TWIST1 expression during craniofacial development.

SNPs in 7q31.31 associated with jaw protrusion overlap CPED1 (Cadherin-like and PC-esterase domain containing 1), a gene of unknown function. The index SNP in this region (rs6950680) is intronic to CPED1, with a number of regulatory elements active in embryonic craniofacial tissue being present within CPED1 (Fig. 4). Variants in this region have been associated with height (35) and bone mineral density (36). Of potential relevance, the WINT16 gene is located less than 30 kb downstream of CPED1. WINT signaling, in concert with other morphogenetic signaling pathways, plays critical roles in embryonic development, including midfacial morphogenesis, and has been implicated in orofacial clefting (37).

Last, in 8q22.2, we find that 597 SNPs overlapping *VPS13B* (vacuolar protein sorting 13 homolog B) are significantly associated with columella size. Mutations in *VPS13B* have been reported to cause Cohen syndrome (OMIM #216550), a recessive multisystem disorder with characteristic facial dysmorphism that can include a high nasal bridge, prominent nose, short philtrum, and malar hypoplasia. Below, we describe mouse follow-up analyses we carried out for this gene region.

The five loci with no evidence of replication in the European meta-analysis include genes and regulatory features of potential

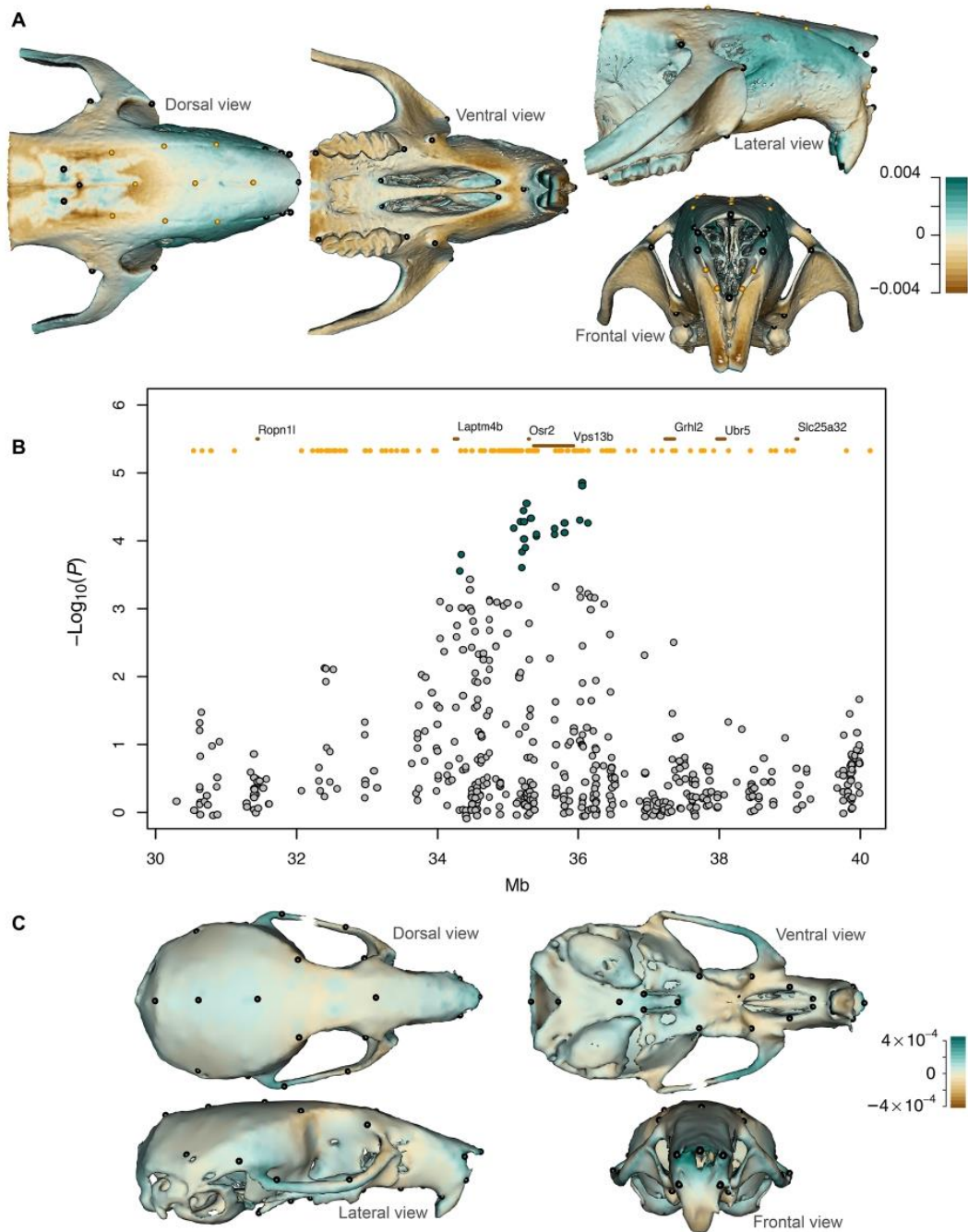
Downloaded from <https://www.science.org> on April 04, 2023

Fig. 5. *Vps13b* and mouse craniofacial shape. (A) Shape changes in the *Vps13b* KO mutant male mice relative to WT. Effect is predicted according to the expected marginal means at the populational average centroid size. Darker colors represent strong positive (blue) or negative (brown) deviation from the WT, given in Procrustes distance. Positive distance represents expansion from the WT, whereas negative distance represents contraction from the WT. Mesh warping is amplified by a factor of 2 to facilitate the visualization (see also movie S1). (B) Regional association plot for the *VPS13* homologous region in chromosome 15 among outbred mice. Significantly associated SNPs are shown as green dots (FDR < 5%). Ensembl annotations for genes (brown) and enhancers active in embryonic facial prominence (orange) are shown at the top. (C) Phenotypic effect associated with allele dosage at the *Vps13b* index SNP among outbred mice. Skull zones with an expansion/contraction relative to the mean shape are shown in brown/blue (see also movie S2). To facilitate visualization, shape variation has been magnified by $\times 20$.

in 1p12 previously associated with ear and face features are located some distance away from the tract of introgression (10, 15, 18) and are not in LD with it (Fig. 3). The Denisovan haplotype has a low frequency in Europeans and a high frequency in East Asians and is nearly fixed in Native Americans (31), and we observe it at a frequency of ~50% in the CANDELA data (in line with the European/Native American admixture of these samples), thus facilitating the detection of any associated phenotypic effects. It is possible that the facial trait association that we see in the CANDELA data for SNPs in 1p12 could relate to an impact of variants in this region on facial fat distribution (perhaps as part of a broader effect on body fat distribution) in East Asians and Native Americans and that this could have been relevant in adaptation to a cold environment. The *WARS2/TBX15* region includes a bivalent transcription factor as well as a superenhancer (Fig. 3), hallmarks of critical patterning transcription factors responsible for specifying tissue/cell-type identity (44), in this case active during early human craniofacial development. It will therefore be important to directly examine the role of variants in the *WARS2/TBX15* regions (including the Denisovan haplotype) on gene expression regulation and to evaluate the impact of any such changes in gene expression on body fat distribution.

Of the previously unidentified face morphology loci we detected, evidence is most compelling for *VPS13B*, mutations of which result in Cohen syndrome. Consistent with the effect on columella size that we detect in the CANDELA individuals, patients with Cohen syndrome typically exhibit a beak-shaped, prominent nose (OMIM #216550). In agreement with these phenotypic effects in humans, here we show that mice deficient in *Vps13b* present a cranioskeletal dysmorphology that includes anteriorly lengthened nasal bones. Other cranioskeletal changes with similarities across humans and mice have been reported for rare mutations at a number of loci, for instance, in Williams syndrome (45). These homologous changes probably reflect genetic effects on related cranial neural crest-derived bony elements of the skull (45). Furthermore, our confirmation that common variants of *Vps13b* affect midfacial morphology mice establishes a specific role for this gene in craniofacial development, beyond the various phenotypic effects associated with *VPS13B* mutations and Cohen syndrome. *VPS13B* is a widely expressed transmembrane protein, and on the basis of its homology to the yeast *VPS13* protein, it is thought to function in vesicle-mediated transport and sorting of proteins within the cell. By forming a complex with the small guanosine triphosphatase *RAB6* at the Golgi, *VPS13B* strongly colocalizes with the cis-Golgi matrix protein *GM130* and is required to maintain Golgi integrity (46). *VPS13B* also plays a role in Golgi protein glycosylation (47) and has been identified as a tethering factor functioning in transport from early endosomes to recycling endosomes (47). Facial dysmorphism is a common feature of disorders of glycosylation (48) and likely reflects the importance of glycosylation as a modulator of many extracellular signaling pathways that are highly active during embryogenesis.

The observation of an effect of *Vps13b* on morphology in outbred mice suggests that variation in this gene could play a role in natural craniofacial variation in *Mus* as well as *Homo*. In this context, it seems relevant that the *VPS13B* region has been highlighted in genome scans for selective sweeps both in dog breeds (49) and in comparisons of Neanderthal and modern human sequences (50). This suggests that certain gene regions affecting facial variation within species could also have played a role in craniofacial differentiation across species. This appears to be the case for the *SUPT3H/RUNX2* region. We initially detected an association of SNPs in this

gene region with nose bridge breadth (15). Subsequently, an effect for SNPs in *SUPT3H/RUNX2* on nose morphology (10) and chin dimples (7) has been reported, and here we find an association of this region with forehead protrusion. The ratio of glutamines to alanines in a functional domain of *RUNX2* was shown to correlate with facial length in *Carnivora* (51), and this glutamine/alanine ratio has recently been shown to also correlate with facial length in anthropoid primates (52). It will therefore be of interest to more broadly examine the extent to which the loci being implicated in human facial variation could play a role in natural variation in other species, as well as in the differentiation of facial features between taxa. Of particular interest for our species is the role that these genes could have played in the differentiation of anatomically modern humans from more archaic forms, which might also provide insights into the evolutionary forces involved.

METHODS

Study subjects

We used CANDELA consortium (13) data from 6282 volunteers recruited in five Latin American countries (Brazil, 630; Chile, 1794; Colombia, 1419; Mexico, 1265; Peru, 1174). All volunteers provided written informed consent. Ethics approvals were obtained from Universidad Nacional Autónoma de México (México), Universidad de Antioquia (Colombia), Universidad Peruana Cayetano Heredia (Perú), Universidad de Tarapacá (Chile), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Brazil), and University College London (UK).

Phenotyping

On each of the 6282 right side face profile 2D digital photographs (13), we manually placed 19 landmarks [commonly used in face morphology studies (53)] and 22 semi-landmarks (fig. S1) using TpsDig (54). Then, we slid the semi-landmarks using TpsUtil and TpsRelw (54) and performed a full Procrustes superimposition using MorphoJ (55). From those 41 Procrustes-adjusted landmarks and semi-landmarks, we obtained 59 facial measurements using MATLAB 9.6.0 (table S1). The measurements include distances, angles, and ratios, on the overall face and on specific regions of the upper, middle, or lower face, including features of the nose, lips, and eyes. The measurement protocol used was devised building on our previous analyses (4) and seeks to include features reported to be variable in human populations (56). While GWAS of facial landmarks commonly analyze all pairwise distances (1–3, 6, 18), or linear combinations of landmark coordinates such as PCs (10), the measurements obtained here are akin to those commonly used in certain anthropological, medical, or forensic applications (57). Broadly, 35 features were measured according to one or more definitions (up to five for jaw protrusion) and covering either the whole profile (face flatness) or a specific region of the face: forehead (4 measurements), ear (inclination and size), eye (4 measurements), nose (18 measurements), lips and philtrum (15 measurements), jaw (8 measurements), and chin (3 measurements). We assessed the reliability of our phenotyping protocol by calculating concordance correlation coefficient (CCC) for all landmarks, semi-landmarks, and measurements (58). For four pairs of series, the CCC was computed as $\frac{2 \times S_{12}}{S_1^2 + S_2^2 + (Y_1 - Y_2)^2}$ where S_{12} is the covariance between the two series of that pair and S_1^2 and Y_1 are, respectively, the variance and the average of the i th series of that pair. The pairs of series were INTER (inter-observer: two

operators landmarked the same 200 photographs), INTRA 1 (intra-observer 1: operator P.J. landmarked twice the same 50 photographs 2 weeks apart), INTRA 2 (intra-observer 2: operator B.B. landmarked twice the same 100 photographs 2 weeks apart), and ALT (alternative picture: operator B.B. landmarked two different photographs of the same 100 individuals 2 weeks apart). All CCC results are given in table S2.

DNA genotyping and quality control

DNA samples from participants were genotyped on the Illumina HumanOmniExpress chip including 730,525 SNPs. PLINK v1.9 (24) was used to exclude SNPs and individuals with >5% missing data, markers with minor-allele frequency < 1%, monozygous twins or sample duplicates [PLINK Identity-By-Descent (IBD) estimate > 0.95], and those who failed the X or Y chromosome sex concordance check (sex estimated from X chromosome heterozygosity or Y chromosome call rate not matching recorded sex information). After applying these filters, 636,195 autosomal SNPs and 7010 individuals (1853 from Colombia, 693 from Brazil, 1891 from Chile, 1288 from Mexico, and 1285 from Peru) were retained for further analysis. Because of the admixed nature of the study sample, there is an inflation in Hardy-Weinberg *P* values (4). We therefore did not exclude markers based on Hardy-Weinberg deviation but performed stringent quality controls at software and biological levels (4). For example, we checked for batch effects by genotyping a control sample on each plate and comparing its genotype calls across batches; the consistency rate (i.e., matched proportion of genotypes) was ≥ 0.999 in all cases after SNP-level QC. We also assessed the accuracy of our genotypes independently by comparing against genotype calls obtained on a subset of samples by high-coverage sequencing, and consistency was again ≥ 0.999 .

SNP genotype imputation

The chip genotype data of the CANDELA sample were phased using SHAPEIT2 (59). IMPUTE2 (60) was then used to impute genotypes at untyped SNPs using variant positions from the 1000 Genomes Phase 3 data, which include haplotype information for 2504 individuals across the world at 77,818,332 autosomal variant positions. Positions that are monomorphic in 1000 Genomes Latin American samples [CLM (Colombian in Medellin), MXL (Mexican in Los Angeles), PEL (Peruvian in Lima), and PUR (Puerto Rican from Puerto Rico)] were excluded, leading to 11,218,392 autosomal biallelic variants being imputed in our dataset. Of these, we removed 64,681 SNPs based on the following criteria that may indicate poor imputation and/or genotyping: (i) imputation quality scores < 0.4, (ii) low concordance value (<0.7) with chip genotypes, or (iii) a large gap between info [a cross-validation metric implemented in IMPUTE2 (60), indicating imputation certainty] and concordance values (info_type0-concord_type0 > 0.1). In the latter two cases, these SNPs were also excluded from the chip dataset. The IMPUTE2 (60) genotype probabilities at each locus were converted into most probable genotypes using PLINK (24) (at the default setting of >0.9 certainty). SNPs with a proportion of samples with uncalled genotypes > 5% and minor-allele frequency < 1% were excluded. The final imputed dataset contained genotypes for 8,780,546 autosomal biallelic SNPs (638,266 genotyped SNPs and 8,142,280 imputed SNPs).

We have estimated the imputation accuracy of the final dataset using the median info score. The overall median info score was 99.2%. It is slightly higher (99.5%) for “European” variants (defined

as variants with MAF (Minor Allele Frequency) > 20% in highly European individuals and MAF < 5% in highly Native American individuals) as well as for “Native American” variants (99.3%). For the sake of comparison, the rare variants (MAF < 5% in CANDELA; ~30% of the imputed dataset) have a median info score of 97.4%. We have therefore concluded that imputation was as reliable for Native American variants as for European variants and was high overall for the entire imputed dataset including rare variants as observed from the median values. (As SNPs with MAF < 1% in the AMR reference population or in the CANDELA samples are excluded, we consider a threshold of MAF < 5% for “rare” SNPs.)

In addition, we sought to verify the quality of imputed genotypes by comparing with an independently sequenced dataset. A set of Native American samples collected for a previous study (14) was sequenced at high coverage and variants were filtered. We calculated the concordance for these samples as the proportion of imputed genotypes that match the sequence data exactly. The overall median concordance was high (99.4%) and remained high in subcategories: 98.9% for SNPs common in Native American samples (MAF > 5% in that population) and 99.8% for rare SNPs in Native American samples (MAF < 5%).

Sample filtering

For all traits together, we initially performed the following data quality control on volunteers with available genotype data regardless of the studied trait. We discarded from the dataset any volunteer (i) with missing age information, (ii) with discordant information between recorded age and age computed based on birth date, (iii) older than 45 years, or (iv) younger than 18 years. Also, as the African ancestry is underrepresented in our population, we discarded from the dataset 23 individuals whose African continental ancestry share (computed using Admixture) (61) was higher than either their Native American or European shares.

The filtering of individuals was then performed for each trait independently to maximize the number of samples per trait (a global filtering, e.g., on phenotype outliers, would discard 942 individuals from the dataset). To that end, we first removed from the dataset any individual presenting an outlier phenotype (trait value lower or greater than the trait value average for that sex plus or minus three times the SD).

Then, among the remaining individuals for that trait, we identified highly related pairs and removed one member of each pair. The threshold for highly related pairs was set to an IBD probability estimate equal to 0.1, to exclude third-degree relatives and higher. The threshold, however, needed adjustment because of inflation in IBD estimates due to the admixed nature of the samples. In our previous study (4), we observed that highly Native samples have higher IBD values due to drift and inbreeding in the founder populations: Among unrelated CANDELA samples with >95% European ancestry, median IBD is <0.01, but among samples with >95% Native ancestry, median IBD value is ~0.2. Therefore, the actual IBD threshold was adjusted according to the ethnic composition of the participants, so that it is always 0.1 above the expected IBD level between unrelated samples of that ethnic composition. For example, that threshold was relaxed to 0.30 (0.1 + 0.2) for the specific case of a large (~240 individuals) genetic group mainly composed of Peruvian and Chilean samples and of very high Native American ancestry (average Native American ancestry is equal to 94%).

Once highly related pairs are identified, we recursively removed individuals involved in multiple pairs, starting with those involved

in many pairs, and update the count until each individual is included in at most one pair. For these remaining pairs, we removed the sample with greater age deviation from the average sampling age.

Genetic PCs were computed on the resulting set of individuals for each trait. Among these individuals, genetic outliers were identified by computing, for each sample, the distance to the nearest neighbor based on the 10 leading PCs [obtained with PLINK (24)], with the i th PC weighted by λ_i/λ_{10} . Samples whose distance to nearest neighbor distance was greater than the average distance plus three times the SD were discarded as genetic outliers.

Such sample filtering was applied independently for each of the 59 phenotypes, yielding similar numbers of samples qualified for downstream analyses (from 5686 to 5731; median, 5719). Some of these analyses use the set of all samples that were qualified at least for one trait (5764 samples).

Statistical genetic analyses

Primary GWA was implemented using PLINK v1.9 (24). For each phenotypic trait independently, we performed a multiple linear regression analysis with sex, age, landmarking operator, BMI, and the six leading genetic PCs (computed on the samples qualified for this trait) as covariates. The association analyses were tested on the imputed data. Q-Q plots for all traits showed no sign of inflation, the genomic control factor λ being ~ 1 in all cases, indicating that our study performs appropriate subject QC, such as exclusion of relatives and outliers, and appropriately controls for population stratification.

To account for multiple testing across all the traits, we estimated the FDR threshold with the Benjamini-Hochberg procedure (25). Applying the FDR procedure on all 59 traits and all tested SNPs (i.e., a total of 507,440,483 tests), the adjusted genome-wide significance threshold was 6.72×10^{-7} at $\alpha = 5\%$ and 7.08×10^{-8} at $\alpha = 1\%$. Both P value thresholds were larger than the commonly used GWAS genome-wide significance threshold of 5×10^{-8} , indicating that this threshold of 5×10^{-8} is more stringent than the FDR significance thresholds adjusted for all traits, and therefore, its use controls for testing multiple traits. Therefore, we used the commonly threshold of 5×10^{-8} across all traits.

To estimate narrow-sense heritability (h^2) and genetic correlations between traits, we have computed a genomic relationship matrix gathering the 5764 samples qualified for at least one trait, on 634,753 genotyped SNPs (MAF > 1%, autosomes only) using LDK5 (22) with default parameters (option --power set to -0.25). For each of the 59 traits, we further used the submatrix gathering all samples qualified for this specific trait. We have obtained h^2 by partitioning the phenotypic variance into additive genetic (σ_g^2) and residual (σ_e^2) variances using REML in LDK5 (22) on a linear mixed model $y \sim \text{sex} + \text{age} + \text{BMI} + \text{rater} + g + e$, where sex, age, BMI, and rater are fixed effects and g and e are random (respectively additive genetic and the residual) effects. Testing $h^2 = 0$ was done by fitting the same model with GCTA (Genome-wide Complex Trait Analysis software) (62). We have used the same tools on a bivariate model (with the same terms) to estimate the genetic correlation ($\rho_{ij} = \sigma_{ij}/\sqrt{\sigma_{g_i}^2 \sigma_{g_j}^2}$) for each pair of traits.

Cranioskeletal analysis of *Vps13b*^{tm1.1cs} KO mice

Mice were bred and housed at the animal facility of the University of Burgundy, and animal procedures were approved by the local ethics committee under the reference number 821231010. A total of 51 mice, balanced between genders and genotypes, were euthanized

at 18.7 ± 1.2 weeks old. Skulls were cleaned with dermestid beetles and then scanned at 29 μm using a Skyscan 1174 microCT. Brain removal before scanning damaged some specimens, and they were not included further in the study. Prior analyses reveal three additional gross outliers that were removed from the data. A final sample size of 14 females (9 WT and 5 KO) and 23 males (12 WT and 11 KO) was retained for the study.

Mesh surfaces of each skull were obtained in Avizo 2019 using a Marching cube algorithm. A set of 11 paired landmarks and 4 unpaired landmarks on the face and the palate was digitized on these meshes using the R package digit3Dland version 0.1.5. Seven additional curve paired semi-landmarks and five unpaired curve semi-landmarks were also digitized (Supplementary Notes and fig. S3-1). Sliding of these curve semi-landmarks on the 3D surface of the skulls was performed using the R package Morpho 2.6. Before sliding, meshes were decimated to 500,000 faces and smoothed using a surface preserving Laplace algorithm in the R package Rvcg version 0.98. The final set of 44 landmarks and semi-landmarks was superimposed using a full generalized Procrustes analysis with bilateral object symmetry (63) in the Morpho package.

A linear model accounting for centroid size as well as genotype by sex effects was fitted on the symmetric shapes. Mutant mice were generally smaller and lighter than their WT counterparts (Supplementary Notes). Therefore, skull centroid size was included as a covariate in the modeling of shape variation to control for size-related effects. Since sample size was small compared to the number of variables, phenotypic effects were evaluated with Procrustes analysis of variance (ANOVA) (64) computed with the R package geomorph version 3.1.3 and processed with 1000 residual permutations. Shape changes were visualized as shape differences between expected marginal genotype means predicted at the population average centroid size for WT and KO and visualized with a twofold amplification.

Analysis of genetic association in outbred mice

We reanalyzed the data of Pallares *et al.* (39), which include genotypes for 70,000 SNPs obtained from 692 mice and raw 3D coordinate data for 44 landmarks (17 pairs of symmetric landmarks and 10 landmarks on the median plane). Craniofacial variation was modeled only on the basis of the 67 non-null PCs obtained from the 44×3 symmetric tangent coordinates (which include 51 dimensions redundant due to symmetry) (63).

Association between SNP genotype and the set of 67 PCs representing skull shape was evaluated with a multivariate mixed model, incorporating centroid size as covariate. Population structure was modeled from the genomic relatedness matrix (65). The variance components estimated from the model were used to correct both genotypes and phenotypes (66). Association was tested on the basis of Pillai trace statistics obtained from the multivariate regression between the corrected genotypes and PC scores. FDR was computed on the basis of 100 permutations of corrected PC scores following the approach of Nicod *et al.* (66) and used to identify SNPs exceeding an FDR threshold of 5%.

Regulatory annotation enrichment analysis

We extracted chromatin enhancer annotations (ChromHMM states 13 to 18) identified in 127 non-craniofacial tissues analyzed by the Roadmap Epigenomics Consortium (67), as well as those obtained in 24 primary human embryonic craniofacial tissues, 4.5 to 8 post-conception weeks, and two samples derived from cultured HEPM

(human embryonic palatal mesenchyme) cells (27). We also extracted the superenhancer annotations reported for craniofacial tissue using the ROSE (Ranking Of Super Enhancer) approach (27, 44). The SNPs included in the GWAS were filtered for association P values $< 5 \times 10^{-8}$, and their enrichment in enhancer annotations was evaluated using the approach implemented in GREGOR (28). Testing of each associated SNP included a minimum of 500 neighboring SNPs with $r^2 \geq 0.8$, in windows up to 1 Mb [based on 1000 Genome Project European data (23)].

Selection signal near *WARS2-TBX15*

To test for signals of selection at the *WARS2-TBX15* region in Native Americans, we computed PBS scores (68) using CANDELA individuals with more than 95% Native American ancestry (127 samples). As PBS in an F_{ST} -based statistic, we inferred allele frequencies by accounting for non-Native American ancestry. To do so, we used the RFMix software (69) to assign local ancestry at each SNP. Three continental populations consisting of phased haplotypes for 175 Native Americans, 107 IBS (Iberian Population in Spain; 1000 Genomes Project Phase 3), and 101 YRI (Yoruba in Ibadan, Nigeria; 1000 Genomes Project Phase 3) were used as reference samples. We ran RFMix (69) with the phase correction feature enabled and performed two rounds of the EM (expectation maximization) algorithm. We used the default window size of 0.2 cM, the default number of trees (100), and the default model of admixture occurring eight generations ago. Genetic distances were obtained from the HapMap Phase II genetic map. For each SNP, we then computed Native American allele frequency f_{Nat} as

$$f_{\text{Nat}} = \frac{f_{\text{NatCANDELA}} - f_{\text{Eur}} \alpha_{\text{Eur}} - f_{\text{Afr}} \alpha_{\text{Afr}}}{1 - \alpha_{\text{Eur}} - \alpha_{\text{Afr}}}$$

where $f_{\text{NatCANDELA}}$ is the allele frequency for CANDELA individuals with >95% Native American ancestry, f_{Eur} is the allele frequency for European individuals, and f_{Afr} is the allele frequency of sub-Saharan African individuals. The ancestry proportion for each reference population was estimated as

$$\alpha_{\text{Anc}} = \frac{\sum_i P(\text{Anc})_i}{2N}$$

where i is a haplotype at each site and $P(\text{Anc})$ is the posterior probability of assignment of a given ancestry. Using these estimated allele frequencies, we computed PBS scores for Native Americans using CEU (Northern Europeans from Utah, USA; 1000 Genomes Project Phase 3) and CHB (Han Chinese in Beijing, China; 1000 Genomes Project Phase 3) as reference populations. SNPs not polymorphic in at least two populations were excluded.

Detection of Denisovan introgression near *WARS2-TBX15* and association with face profile traits

The imputed genotypes of the 7026 CANDELA samples were first phased in a 3-Mb window around the *WARS2-TBX15* region (chromosome 1, from 118 to 121 Mb) using SHAPEIT2 (59) with default parameters and no reference panel. We have retained 2383 biallelic SNPs among the 9582 variants in the central megabase of that window, complying with the following rules: (i) those with read depth greater than or equal to 20 in *Homo denisovensis* (downloaded from <http://cdna.eva.mpg.de/>), (ii) those with filter PASS in the VCFs of Denisova and 1000 Genomes sequences, (iii) those for which ancestral allele information was consistent throughout VCFs (Variant

Call Formats), (iv) those for which ancestral allele is not different from the two reported alleles in modern or archaic samples, (v) those that have the same polymorphism reported in modern and both archaic samples, and (vi) those that were located within the 119 to 120 Mb. This selection contained the leading SNP for our GWAS hit in that region (rs3790553) as well as three other close SNPs that were found to be significantly associated with facial traits in former studies: rs1766786 [associated with chin dimples in Pickrell *et al.* (7)], rs72691108 [associated with frontal bossing phenotype in Claes *et al.* (10)], and rs17023457 [associated with two ear phenotypes—folding of antihelix and antitragus size—in Adhikari *et al.* (15)]. We ran the same hidden Markov model as in a previous study of Greenlandic Inuit (*admixtureHMM*) (31) on the 14,052 CANDELA chromosomes after coding them according to the human-chimp ancestral allele (0/1 for ancestral/derived allele, following the authors' procedure). The purpose of *admixtureHMM* is to detect segments of the test chromosomes that are more likely to originate from archaic than modern humans. We used the allele frequencies of the Denisovan sample and, as proxy for modern humans, those of the 108 YRI samples from the 1000 Genomes Phase 3. We ran the *admixtureHMM* with default parameters, except for confidence level for which we have tested four values (20, 50, 90, and 99%). The putative introgression tracts that were called at each of these thresholds and with a minor allele frequency $\geq 1\%$ were further considered for association analyses. We have then tested for association between the genotypes (0, 1, or 2—the number of copies of an introgression tract) and the 59 traits using the same linear model as for GWA tests (see the “Statistical genetic analyses” section), hence accounting for sex, age, BMI, landmarking operator, and six genetic PCs.

URLs

For HaploReg, see <https://pubs.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>. For NCBI, see www.ncbi.nlm.nih.gov. For UCSC (University of California Santa Cruz Genome Browser), see <https://genome.ucsc.edu>. For Ensembl, see www.ensembl.org. For GTEx, see <https://gtexportal.org/>. For GWAS catalog, see www.ebi.ac.uk/gwas/. For Denisovan sample, see <http://cdna.eva.mpg.de/>.

For the R package FastMan used to draw the Manhattan plot in Fig. 1, see <https://github.com/kaustubhad/fastman>. For the R package digit3DLand version 0.1.5, see <https://github.com/morphOptics/digit3DLand>. For the R package Morpho 2.6, see <https://cran.r-project.org/web/packages/Morpho/index.html>. For the R package Rvcg version 0.98, see <https://cran.r-project.org/web/packages/Rvcg/index.html>. For the R package geomorph version 3.1.3, see <https://cran.r-project.org/package=geomorph>.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary material for this article is available at <http://advances.sciencemag.org/cgi/content/full/7/6/eabc6160/DC1>

[View/request a protocol for this paper from Bio-protocol.](#)

REFERENCES AND NOTES

1. L. Paternoster, A. I. Zhurov, A. M. Toma, J. P. Kemp, B. S. Pourcain, N. J. Timpon, G. McMahon, W. McArdle, S. M. Ring, G. D. Smith, S. Richmond, D. M. Evans, Genome-wide association study of three-dimensional facial morphology identifies a variant in *PAX3* associated with nasion position. *Am. J. Hum. Genet.* **90**, 478–485 (2012).
2. F. Liu, F. van der Lijn, C. Schurmann, G. Zhu, M. M. Chakravarty, P. G. Hysi, A. Wollstein, O. Lao, M. de Bruijne, M. A. Ikram, A. van der Lugt, F. Rivadeneira, A. G. Uitterlinden, A. Hofman, W. J. Niessen, G. Homuth, G. de Zubicaray, K. L. McMahon, P. M. Thompson,

- A. Daboul, R. Puls, K. Hegenscheid, L. Bevan, Z. Pausova, S. E. Medland, G. W. Montgomery, M. J. Wright, C. Wicking, S. Boehringer, T. D. Spector, T. Paus, N. G. Martin, R. Biffar, M. Kayser, A genome-wide association study identifies five loci influencing facial morphology in Europeans. *PLoS Genet.* **8**, e1002932 (2012).
3. J. B. Cole, M. Manyama, E. Kimwaga, J. Mathayo, J. R. Larson, D. K. Liberton, K. Lukowiak, T. M. Ferrara, S. L. Riccardi, M. Li, W. Mio, M. Prochazkova, T. Williams, H. Li, K. L. Jones, O. D. Klein, S. A. Santorico, B. Hallgrímsson, R. A. Spritz, Genomewide association study of African children identifies association of *SCHIP1* and *PDE8A* with facial size and shape. *PLoS Genet.* **12**, e1006174 (2016).
 4. K. Adhikari, M. Fuentes-Guajardo, M. Quinto-Sánchez, J. Mendoza-Revilla, J. C. Chacón-Duque, V. Acuña-Alonzo, C. Jaramillo, W. Arias, R. B. Lozano, G. M. Pérez, J. Gómez-Valdés, H. Villamil-Ramírez, T. Hunemeier, V. Ramallo, C. C. S. de Cerqueira, M. Hurtado, V. Villegas, V. Granja, C. Gallo, G. Poletti, L. Schuler-Faccini, F. M. Salzano, M.-C. Bortolini, S. Canizales-Quinteros, M. Cheeseman, J. Rosique, G. Bedoya, F. Rothhammer, D. Headon, R. Gonzalez-José, D. Balding, A. Ruiz-Linares, A genome-wide association scan implicates *DCHS2*, *RUNX2*, *GLI3*, *PAX1* and *EDAR* in human facial variation. *Nat. Commun.* **7**, 11616 (2016).
 5. M. K. Lee, J. R. Shaffer, E. J. Leslie, E. Orlova, J. C. Carlson, E. Feingold, M. L. Marazita, S. M. Weinberg, Genome-wide association study of facial morphology reveals novel associations with *FREM1* and *PARK2*. *PLoS ONE* **12**, e0176566 (2017).
 6. J. R. Shaffer, E. Orlova, M. K. Lee, E. J. Leslie, Z. D. Raffensperger, C. L. Heike, M. L. Cunningham, J. T. Hecht, C. H. Kaul, N. L. Nidey, L. M. Moreno, G. L. Wehby, J. C. Murray, C. A. Laurie, C. C. Laurie, J. Cole, T. Ferrara, S. Santorico, O. Klein, W. Mio, E. Feingold, B. Hallgrímsson, R. A. Spritz, M. L. Marazita, S. M. Weinberg, Genome-wide association study reveals multiple loci influencing normal human facial morphology. *PLoS Genet.* **12**, e1006149 (2016).
 7. J. K. Pickrell, T. Berisa, J. Z. Liu, L. Segurel, J. Y. Tung, D. A. Hinds, Detection and interpretation of shared genetic influences on 42 human traits. *Nat. Genet.* **48**, 709–717 (2016).
 8. D. J. M. Crouch, B. Winney, W. P. Koppen, W. J. Christmas, K. Hutnik, T. Day, D. Meena, A. Boumertit, P. Hysi, A. Nessa, T. D. Spector, J. Kittler, W. F. Bodmer, Genetics of the human face: Identification of large-effect single gene variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **115**, E676–E685 (2018).
 9. S. Cha, J. E. Lim, A. Y. Park, J.-H. Do, S. W. Lee, C. Shin, N. H. Cho, J.-O. Kang, J. M. Nam, J.-S. Kim, K.-M. Woo, S.-H. Lee, J. Y. Kim, B. Oh, Identification of five novel genetic loci related to facial morphology by genome-wide association studies. *BMC Genomics* **19**, 481 (2018).
 10. P. Claes, J. Roosenboom, J. D. White, T. Swigut, D. Sero, J. Li, M. K. Lee, A. Zaidi, B. C. Matern, C. Liebowitz, L. Pearson, T. Gonzalez, E. J. Leslie, J. C. Carlson, E. Orlova, P. Suetens, D. Vandermeylen, E. Feingold, M. L. Marazita, J. R. Shaffer, J. Wysocka, M. D. Shriver, S. M. Weinberg, Genome-wide mapping of global-to-local genetic effects on human facial shape. *Nat. Genet.* **50**, 414–423 (2018).
 11. P. Claes, D. K. Liberton, K. Daniels, K. M. Rosana, E. E. Quillen, L. N. Pearson, B. McEvoy, M. Bauchet, A. A. Zaidi, W. Yao, H. Tang, G. S. Barsh, D. M. Absher, D. A. Puts, J. Rocha, S. Belez, R. W. Pereira, G. Baynam, P. Suetens, D. Vandermeylen, J. K. Wagner, J. S. Boster, M. D. Shriver, Modeling 3D facial shape from DNA. *PLoS Genet.* **10**, e1004224 (2014).
 12. K. Indenleef, J. Roosenboom, H. Hoskens, J. D. White, M. D. Shriver, S. Richmond, H. Peeters, E. Feingold, M. L. Marazita, J. R. Shaffer, S. M. Weinberg, G. Hens, P. Claes, Six NSCLP loci show associations with normal-range craniofacial variation. *Front. Genet.* **9**, 502 (2018).
 13. A. Ruiz-Linares, K. Adhikari, V. Acuña-Alonzo, M. Quinto-Sánchez, C. Jaramillo, W. Arias, M. Fuentes, M. Pizarro, P. Everardo, F. de Avila, J. Gómez-Valdés, P. León-Mimila, T. Hunemeier, V. Ramallo, C. C. S. de Cerqueira, M.-W. Burley, E. Konca, M. Z. de Oliveira, M. R. Veronez, M. Rubio-Codina, O. Attanasio, S. Gibbon, N. Ray, C. Gallo, G. Poletti, J. Rosique, L. Schuler-Faccini, F. M. Salzano, M.-C. Bortolini, S. Canizales-Quinteros, F. Rothhammer, G. Bedoya, D. Balding, R. Gonzalez-José, Admixture in Latin America: Geographic structure, phenotypic diversity and self-perception of ancestry based on 7,342 individuals. *PLoS Genet.* **10**, e1004572 (2014).
 14. J.-C. Chacón-Duque, K. Adhikari, M. Fuentes-Guajardo, J. Mendoza-Revilla, V. Acuña-Alonzo, R. Barquera, M. Quinto-Sánchez, J. Gómez-Valdés, P. E. Martínez, H. Villamil-Ramírez, T. Hunemeier, V. Ramallo, C. C. S. de Cerqueira, M. Hurtado, V. Villegas, V. Granja, M. Villena, R. Vásquez, E. Llop, J. R. Sandoval, A. A. Salazar-Granara, M.-L. Parolin, K. Sandoval, R. I. Peñalosa-Espinosa, H. Rangel-Villalobos, C. A. Winkler, W. Klitz, C. Bravi, J. Molina, D. Corach, R. Barrantes, V. Gomes, C. Resende, L. Gusmão, A. Amorim, Y. Xue, J.-M. Dugoujon, P. Moral, R. González-José, L. Schuler-Faccini, F. M. Salzano, M.-C. Bortolini, S. Canizales-Quinteros, G. Poletti, C. Gallo, G. Bedoya, F. Rothhammer, D. Balding, G. Hellenthal, A. Ruiz-Linares, Latin Americans show wide-spread Converso ancestry and imprint of local Native ancestry on physical appearance. *Nat. Commun.* **9**, 5388 (2018).
 15. K. Adhikari, G. Reales, A. J. P. Smith, E. Konka, J. Palmen, M. Quinto-Sánchez, V. Acuña-Alonzo, C. Jaramillo, W. Arias, M. Fuentes, M. Pizarro, R. B. Lozano, G. M. Pérez, J. Gómez-Valdés, H. Villamil-Ramírez, T. Hunemeier, V. Ramallo, C. C. S. de Cerqueira, M. Hurtado, V. Villegas, V. Granja, C. Gallo, G. Poletti, L. Schuler-Faccini, F. M. Salzano, M.-C. Bortolini, S. Canizales-Quinteros, F. Rothhammer, G. Bedoya, M. Cheeseman, M. F. Bhutta, S. E. Humphries, R. Gonzalez-José, D. Headon, D. Balding, A. Ruiz-Linares, A genome-wide association study identifies multiple loci for variation in human ear morphology. *Nat. Commun.* **6**, 7500 (2015).
 16. K. Adhikari, T. Fontanil, S. Cal, J. Mendoza-Revilla, M. Fuentes-Guajardo, J.-C. Chacón-Duque, F. Al-Saadi, J. A. Johansson, M. Quinto-Sánchez, V. Acuña-Alonzo, C. Jaramillo, W. Arias, R. B. Lozano, G. M. Pérez, J. Gómez-Valdés, H. Villamil-Ramírez, T. Hunemeier, V. Ramallo, C. C. S. de Cerqueira, M. Hurtado, V. Villegas, V. Granja, C. Gallo, G. Poletti, L. Schuler-Faccini, F. M. Salzano, M.-C. Bortolini, S. Canizales-Quinteros, F. Rothhammer, G. Bedoya, R. Gonzalez-José, D. Headon, C. López-Otin, D. J. Tobin, D. Balding, A. Ruiz-Linares, A genome-wide association scan in admixed Latin Americans identifies loci influencing facial and scalp hair features. *Nat. Commun.* **7**, 10815 (2016).
 17. K. Adhikari, J. Mendoza-Revilla, A. Sohail, M. Fuentes-Guajardo, J. Lampert, J. C. Chacón-Duque, M. Hurtado, V. Villegas, V. Granja, V. Acuña-Alonzo, C. Jaramillo, W. Arias, R. B. Lozano, P. Everardo, J. Gómez-Valdés, H. Villamil-Ramírez, C. C. S. de Cerqueira, T. Hunemeier, V. Ramallo, L. Schuler-Faccini, F. M. Salzano, R. Gonzalez-José, M.-C. Bortolini, S. Canizales-Quinteros, C. Gallo, G. Poletti, G. Bedoya, F. Rothhammer, D. J. Tobin, M. Fumagalli, D. Balding, A. Ruiz-Linares, A GWAS in Latin Americans highlights the convergent evolution of lighter skin pigmentation in Eurasia. *Nat. Commun.* **10**, 358 (2019).
 18. Z. Xiong, G. Dankova, L. J. Howe, M. K. Lee, P. G. Hysi, M. A. de Jong, G. Zhu, K. Adhikari, D. Li, Y. Li, B. Pan, E. Feingold, M. L. Marazita, J. R. Shaffer, K. M. Aloney, S.-H. Xu, L. Jin, S. Wang, F. M. S. de Vrij, B. Lendemeijer, S. Richmond, A. Zhurov, S. Lewis, G. C. Sharp, L. Patemoster, H. Thompson, R. Gonzalez-José, M. C. Bortolini, S. Canizales-Quinteros, C. Gallo, G. Poletti, G. Bedoya, F. Rothhammer, A. G. Uitterlinden, M. A. Ikram, E. Wolvius, S. A. Kushner, T. E. C. Nijsten, R.-J. T. S. Palstra, S. Boehringer, S. E. Medland, K. Tang, A. Ruiz-Linares, N. G. Martin, T. D. Spector, E. Stergiakouli, S. M. Weinberg, F. Liu, M. Kayser, On behalf of the International Visible Trait Genetics (VisiGen), Novel genetic loci affecting facial shape variation in humans. *eLife* **8**, e49898 (2019).
 19. K. Usui, M. Tokita, Creating diversity in mammalian facial morphology: A review of potential developmental mechanisms. *EvoDevo* **9**, 15 (2018).
 20. R. S. Lacruz, C. B. Stringer, W. H. Kimbel, B. Wood, K. Harvati, P. O'Higgins, T. G. Bromage, J.-L. Arsuaga, The evolutionary history of the human face. *Nat. Ecol. Evol.* **3**, 726–736 (2019).
 21. N. Davidenko, Silhouetted face profiles: A new methodology for face perception research. *J. Vis.* **7**, 6 (2007).
 22. D. Speed, N. Cai; UCLEB Consortium, M. R. Johnson, S. Nejentsev, D. J. Balding, Reevaluation of SNP heritability in complex human traits. *Nat. Genet.* **49**, 986–992 (2017).
 23. 1000 Genomes Project Consortium, A. Auton, L. D. Brooks, R. M. Durbin, E. P. Garrison, H. M. Kang, J. O. Korbel, J. L. Marchini, S. McCarthy, G. A. McVean, G. R. Abecasis, A global reference for human genetic variation. *Nature* **526**, 68–74 (2015).
 24. C. C. Chang, C. C. Chow, L. C. Tellier, S. Vattikuti, S. M. Purcell, J. J. Lee, Second-generation PLINK: Rising to the challenge of larger and richer datasets. *Gigascience* **4**, 7 (2015).
 25. Y. Benjamini, Y. Hochberg, Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J. Roy. Statist. Soc. Ser. B* **57**, 289–300 (1995).
 26. S. Bimbaum, K. U. Ludwig, H. Reutter, S. Herms, M. Steffens, M. Rubini, C. Baluardo, M. Ferriani, N. A. de Assis, M. A. Alblas, S. Barth, J. Freudenberg, C. Lauster, G. Schmidt, M. Scheer, B. Braumann, S. J. Bergé, R. H. Reich, F. Schiefke, A. Hemplich, S. Pöttsch, R. P. Steegers-Theunissen, B. Pöttsch, S. Moebus, B. Horsthemke, F.-J. Kramer, T. F. Wienker, P. A. Mossey, P. Propping, S. Cichon, P. Hoffmann, M. Knapp, M. M. Nöthen, E. Mangold, Key susceptibility locus for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate on chromosome 8q24. *Nat. Genet.* **41**, 473–477 (2009).
 27. A. Wilderman, J. VanOudenhove, J. Kron, J. P. Noonan, J. Cotney, High-resolution epigenomic atlas of human embryonic craniofacial development. *Cell Rep.* **23**, 1581–1597 (2018).
 28. E. M. Schmidt, J. Zhang, W. Zhou, J. Chen, K. L. Mohlke, Y. E. Chen, C. J. Willer, GREGOR: Evaluating global enrichment of trait-associated variants in epigenomic features using a systematic, data-driven approach. *Bioinformatics* **31**, 2601–2606 (2015).
 29. I. M. Heid, A. U. Jackson, J. C. Randall, T. W. Winkler, L. Qi, V. Steinthorsdottir, G. Thorleifsson, M. C. Zillikens, E. K. Speliotes, R. Mägi, T. Workalemahu, C. C. White, N. Bouatia-Naji, T. B. Harris, S. I. Berndt, E. Ingelsson, C. J. Willer, M. N. Weedon, J. Luan, S. Vedantam, T. Esko, T. O. Kilpeläinen, Z. Kutalik, S. Li, K. L. Monda, A. L. Dixon, C. C. Holmes, L. M. Kaplan, L. Liang, J. L. Min, M. F. Moffatt, C. Molony, G. S. Nicholson, E. E. Schadt, K. T. Zondervan, M. F. Feitosa, T. Ferreira, H. L. Allen, R. J. Weiyant, E. Wheeler, A. R. Wood, M. A. G. Estrada, M. E. Goddard, G. Lettre, M. Mangino, D. R. Nyholt, S. Purcell, A. V. Smith, P. M. Visscher, J. Yang, S. A. McCarroll, J. Nemesb, B. F. Voight, D. Absher, N. Amin, T. Aspelund, L. Coin, N. L. Glazer, C. Hayward, N. L. Heard-Costa, J.-J. Hottenga, A. Johansson, T. Johnson, M. Kaakinen, K. Kapur, S. Ketkar, J. W. Knowles, P. Kraft, A. T. Kraja, C. Lamina, M. F. Leitzman, B. McKnight, A. P. Morris, K. K. Ong, J. R. B. Perry, M. J. Peters, O. Polasek, I. Prokopenko, N. W. Rayner, S. Ripatti, F. Rivadeneira, N. R. Robertson, S. Sanna, U. Sovio, I. Surakka, A. Teumer, S. van Wingerden, V. Vitart,

- J. H. Zhao, C. Cavalcanti-Proença, P. S. Chines, E. Fisher, J. R. Kulzer, C. Lecoeur, N. Narisu, C. Sandholt, L. J. Scott, K. Silander, K. Stark, M.-L. Tammesoo, T. M. Teslovich, N. J. Timpson, R. M. Watanabe, R. Welch, D. I. Chasman, M. N. Cooper, J.-O. Jansson, J. Kettunen, R. W. Lawrence, N. Pellikka, M. Perola, L. Vandenput, H. Alavere, P. Almgren, L. D. Atwood, A. J. Bennett, R. Biffar, L. L. Bonnycastle, S. R. Bornstein, T. A. Buchanan, H. Campbell, I. N. M. Day, M. Dei, M. Dörr, P. Elliott, M. R. Erdos, J. G. Eriksson, N. B. Freimer, M. Fu, S. Gagel, E. J. C. Geus, A. P. Gjesing, H. Gallert, J. Grässler, C. J. Groves, C. Guiducci, A.-L. Hartikainen, N. Hassanal, A. S. Havulinna, K.-H. Herzig, A. A. Hicks, J. Hui, W. Igl, P. Jousilahti, A. Jula, E. Kajantie, L. Kinnunen, I. Kolcic, S. Koskinen, P. Kovacs, H. K. Kroemer, V. Krzelj, J. Kuusisto, K. Kvaloy, J. Laitinen, O. Lantieri, G. M. Lathrop, M.-L. Lokki, R. N. Luben, B. Ludwig, W. L. Mc Ardle, A. Mc Carthy, M. A. Morken, M. Nelis, M. J. Neville, G. Paré, A. N. Parker, J. F. Peden, I. Pichler, K. H. Pietiläinen, C. G. P. Platou, A. Pouta, M. Ridderstråle, N. J. Samani, J. Saramies, J. Sinisalo, J. H. Smit, R. J. Strawbridge, H. M. Stringham, A. J. Swift, M. Teder-Laving, B. Thomson, G. Usala, J. B. J. van Meurs, G.-J. van Ommen, V. Vatin, C. B. Volpato, H. Wallaschofski, G. B. Walters, E. Widen, S. H. Wild, G. Willemsen, D. R. Witte, L. Zgaga, P. Zitting, J. P. Beilby, A. L. James, M. Kähönen, T. Lehtimäki, M. S. Nieminen, C. Ohlsson, L. J. Palmer, O. Raitakari, P. M. Ridker, M. Stumvoll, A. Tönjes, J. Viikari, B. Balkau, Y. Ben-Shlomo, R. N. Bergman, H. Boeing, G. D. Smith, S. Ebrahim, P. Froguel, T. Hansen, C. Hengstenberg, K. Hveem, B. Isomaa, T. Jørgensen, F. Karpe, K.-T. Khaw, M. Laakso, D. A. Lawlor, M. Marre, T. Meitinger, A. Metspalu, K. Midtjell, O. Pedersen, V. Salomaa, P. E. H. Schwarz, T. Tuomi, J. Tuomilehto, T. T. Valle, N. J. Wareham, A. M. Arnold, J. S. Beckmann, S. Bergmann, E. Boerwinkle, D. I. Boomsma, M. J. Caulfield, F. S. Collins, G. Eiriksdottir, V. Gudnason, U. Gyllenstein, A. Hamsten, A. T. Hattersley, A. Hofman, F. B. Hu, T. Illig, C. Iribarren, M.-R. Jarvelin, W. H. L. Kao, J. Kaprio, L. J. Launer, P. B. Munroe, B. Oostra, B. W. Penninx, P. P. Pramstaller, B. M. Psaty, T. Quertermous, A. Rissanen, I. Rudan, A. R. Shuldiner, N. Soranzo, T. D. Spector, A.-C. Syvänen, M. Uda, A. Uitterlinden, H. Völzke, P. Vollenweider, J. F. Wilson, J. C. Witteman, A. F. Wright, G. R. Abecasis, M. Boehnke, I. B. Borecki, P. Deloukas, T. M. Frayling, L. C. Groop, T. Haritunians, D. J. Hunter, R. C. Kaplan, K. E. North, J. R. O'Connell, L. Peltonen, D. Schlessinger, D. P. Strachan, J. N. Hirschhorn, T. L. Assimes, H.-E. Wichmann, U. Thorsteinsdottir, C. M. van Duijn, K. Stefansson, L. A. Cupples, R. J. F. Loos, I. Barroso, M. I. McCarthy, C. S. Fox, K. L. Mohlke, C. M. Lindgren, Meta-analysis identifies 13 new loci associated with waist-hip ratio and reveals sexual dimorphism in the genetic basis of fat distribution. *Nat. Genet.* **42**, 949–960 (2010).
30. M. Fumagalli, I. Moltke, N. Grarup, F. Racimo, P. Bjerregaard, M. E. Jørgensen, T. S. Korneliussen, P. Gerbault, L. Skotte, A. Linneberg, C. Christensen, I. Brandt Lund, T. Jørgensen, E. Huerta-Sanchez, E. B. Schmidt, O. Pedersen, T. Hansen, A. Albrechtsen, R. Nielsen, Greenlandic Inuit show genetic signatures of diet and climate adaptation. *Science* **349**, 1343–1347 (2015).
31. F. Racimo, D. Gokhman, M. Fumagalli, A. Ko, T. Hansen, I. Moltke, A. Albrechtsen, L. Camel, E. Huerta-Sanchez, R. Nielsen, Archaic adaptive introgression in TBX15/WARS2. *Mol. Biol. Evol.* **34**, 509–524 (2017).
32. S. Sankararaman, S. Mallick, N. Patterson, D. Reich, The combined landscape of denisovan and Neanderthal ancestry in present-day humans. *Curr. Biol.* **26**, 1241–1247 (2016).
33. H. Kim, N. Takegahara, M. C. Walsh, S. A. Middleton, J. Yu, J. Shirakawa, J. Ueda, Y. Fujihara, M. Ikawa, M. Ishii, J. Kim, Y. Choi, IgSF11 regulates osteoclast differentiation through association with the scaffold protein PSD-95. *Bone Res.* **8**, 5 (2020).
34. N. Hirsch, R. Eshel, R. B. Yaacov, T. Shahar, F. Shmulevich, I. Dahan, N. Levaot, T. Kaplan, D. G. Lupianez, R. Y. Birnbaum, Unraveling the transcriptional regulation of TWIST1 in limb development. *PLoS Genet.* **14**, e1007738 (2018).
35. G. Kichaev, G. Bhatia, P. R. Loh, S. Gazal, K. Burch, M. K. Freund, A. Schoech, B. Pasaniuc, A. L. Price, Leveraging polygenic functional enrichment to improve GWAS power. *Am. J. Hum. Genet.* **104**, 65–75 (2019).
36. C. Medina-Gomez, J. P. Kemp, K. Trajanoska, J. Luan, A. Chesni, T. S. Ahluwalia, D. O. Mook-Kanamori, A. Ham, F. P. Hartwig, D. S. Evans, R. Joro, I. Nedeljkovic, H.-F. Zheng, K. Zhu, M. Atalay, C.-T. Liu, M. Nethander, L. Broer, G. Porleifsson, B. H. Mullin, S. K. Handelman, M. A. Nalls, L. E. Jensen, D. H. M. Hepppe, J. B. Richards, C. Wang, B. Chawes, K. E. Schraut, N. Amin, N. Wareham, D. Karasik, N. Van der Velde, M. A. Ikram, B. S. Zemel, Y. Zhou, C. J. Carlsson, Y. Liu, F. E. McGuigan, C. G. Boer, K. Bonnelykke, S. H. Ralston, J. A. Robbins, J. P. Walsh, M. C. Zillikens, C. Langenberg, R. Li-Gao, F. M. K. Williams, T. B. Harris, K. Akesson, R. D. Jackson, G. Sigurdsson, M. den Heijer, B. C. J. van der Eerden, J. van de Peppel, T. D. Spector, C. Pennell, B. L. Horta, J. F. Felix, J. H. Zhao, S. G. Wilson, R. de Mutsert, H. Bisgaard, U. Styrkarsdóttir, V. W. Jaddoe, E. Orwoll, T. A. Lakka, R. Scott, S. F. A. Grant, M. Lorentzon, C. M. van Duijn, J. F. Wilson, K. Stefansson, B. M. Psaty, D. P. Kiel, C. Ohlsson, E. Ntzani, A. J. van Wijnen, V. Forgetta, M. Ghanbari, J. G. Logan, G. R. Williams, J. H. D. Bassett, P. I. Croucher, E. Evangelou, A. G. Uitterlinden, C. L. Ackert-Bicknell, J. H. Tobias, D. M. Evans, F. Rivadeneira, Life-course genome-wide association study meta-analysis of total body BMD and assessment of age-specific effects. *Am. J. Hum. Genet.* **102**, 88–102 (2018).
37. K. Reynolds, P. Kumari, L. S. Rincon, R. Gu, Y. Ji, S. Kumar, C. J. Zhou, Wnt signaling in orofacial clefts: Crosstalk, pathogenesis and models. *Dis. Model. Mech.* **12**, dmm037051 (2019).
38. R. Da Costa, M. Bordessoules, M. Guillemain, V. Carmignac, V. Lhussiez, H. Courrot, A. Bataille, A. Chlémaire, C. Bruno, P. Fauque, C. Thauvin, L. Faivre, L. Duplomb, Vps13b is required for acrosome biogenesis through functions in Golgi dynamic and membrane trafficking. *Cell. Mol. Life Sci.* **77**, 511–529 (2019).
39. L. F. Pallares, P. Carbonetto, S. Gopalakrishnan, C. C. Parker, C. L. Ackert-Bicknell, A. A. Palmer, D. Tautz, Mapping of craniofacial traits in outbred mice identifies major developmental genes involved in shape determination. *PLoS Genet.* **11**, e1005607 (2015).
40. R. Soldatov, M. Kaucka, M. E. Kastriji, J. Petersen, T. Chontorotzea, L. Englmaier, N. Akkuratova, Y. Yang, M. Häring, V. Dyachuk, C. Bock, M. Farlik, M. L. Piacentino, F. Boismoreau, M. M. Hilscher, C. Yokota, X. Y. Qian, M. Nilsson, M. E. Bronner, L. Croci, W.-Y. Hsiao, D. A. Guertin, J.-F. Brunet, G. G. Gonzalez, P. Ernfor, K. Fried, P. V. Kharchenko, I. Adameyko, Spatiotemporal structure of cell fate decisions in murine neural crest. *Science* **364**, eaas9536 (2019).
41. S. L. Prescott, R. Srinivasan, M. C. Marchetto, I. Grishina, I. Narvaiza, L. Selleri, F. H. Gage, A. A. Palmer, J. Wysocka, Enhancer divergence and cis-regulatory evolution in the human and chimp neural crest. *Cell* **163**, 68–83 (2015).
42. J. Hu, M. P. Verzi, A. S. Robinson, P. L.-F. Tang, L. H. Hua, S.-M. Xu, P.-Y. Kwok, B. L. Black, Endothelin signaling activates Mef2c expression in the neural crest through a MEF2C-dependent positive-feedback transcriptional pathway. *Development* **142**, 2775–2780 (2015).
43. M. Dannemann, F. Racimo, Something old, something borrowed: Admixture and adaptation in human evolution. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **53**, 1–8 (2018).
44. W. A. Whyte, D. A. Orlando, D. Hnisz, B. J. Abraham, C. Y. Lin, M. H. Kagey, P. B. Rahil, T. I. Lee, R. A. Young, Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell* **153**, 307–319 (2013).
45. M. Segura-Puimedon, I. Sahun, E. Velot, P. Dubus, C. Borralleras, A. J. Rodrigues, M. C. Valero, O. Valverde, N. Sousa, Y. Heraut, M. Diersen, L. A. Perez-Jurado, V. Campuzano, Heterozygous deletion of the Williams-Beuren syndrome critical interval in mice recapitulates most features of the human disorder. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 6481–6494 (2014).
46. W. Seifert, J. Kuhnisch, T. Maritz, S. Lommatzsch, H. C. Hennies, S. Bachmann, D. Horn, V. Haucke, Cohen syndrome-associated protein COH1 physically and functionally interacts with the small GTPase RAB6 at the Golgi complex and directs neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* **290**, 3349–3358 (2015).
47. L. Duplomb, S. Duvet, D. Picot, G. Jegou, S. El Chehadah-Djebbar, N. Marle, N. Gigot, B. Aral, V. Carmignac, J. Thevenon, E. Lopez, J. B. Riviere, A. Klein, C. Philippe, N. Droin, E. Blair, F. Girodon, J. Donadieu, C. Bellanne-Chantelot, L. Delva, J. C. Michalski, E. Solary, L. Faivre, F. Foulquier, C. Thauvin-Robinet, Cohen syndrome is associated with major glycosylation defects. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 2391–2399 (2014).
48. R. Peanne, P. de Lonlay, F. Foulquier, U. Komak, D. J. Lefeber, E. Morava, B. Perez, N. Seta, C. Thiel, E. Van Schaftingen, G. Matthijs, J. Jaeken, Congenital disorders of glycosylation (CDG): Quo vadis? *Eur. J. Med. Genet.* **61**, 643–663 (2018).
49. A. Vaysse, A. Ratnakumar, T. Derrien, E. Axelsson, G. R. Pielberg, S. Sigurdsson, T. Fall, E. H. Seppälä, M. S. T. Hansen, C. T. Lawley, E. K. Karlsson; LUPA Consortium, D. Bannasch, C. Vilà, H. Lohi, F. Galibert, M. Fredholm, J. Häggström, A. Hedhammar, C. André, K. Lindblad-Toh, C. Hitte, M. T. Webster, Identification of genomic regions associated with phenotypic variation between dog breeds using selection mapping. *PLoS Genet.* **7**, e1002316 (2011).
50. R. E. Green, J. Krause, A. W. Briggs, T. Maricic, U. Stenzel, M. Kircher, N. Patterson, H. Li, W. Zhai, M. H.-Y. Fritz, N. F. Hansen, E. Y. Durand, A.-S. Malaspinas, J. D. Jensen, T. Marques-Bonet, C. Alkan, K. Prüfer, M. Meyer, H. A. Burbano, J. M. Good, R. Schultz, A. Aximu-Petri, A. Butthof, B. Höber, B. Höffner, M. Siegemund, A. Weihmann, C. Nusbaum, E. S. Lander, C. Russ, N. Novod, J. Affourtit, M. Egholm, C. Verna, P. Rudan, D. Brajkovic, Z. Kucan, I. Gušić, V. B. Doronichev, L. V. Golovanova, C. Lalueva-Fox, M. de la Rasilla, J. Fortea, A. Rosas, R. W. Schmitz, P. L. F. Johnson, E. E. Eichler, D. Falush, E. Bimyre, J. C. Mullikin, M. Slatkin, R. Nielsen, J. Kelso, M. Lachmann, D. Reich, S. Pääbo, A draft sequence of the Neanderthal genome. *Science* **328**, 710–722 (2010).
51. K. E. Sears, A. Goswami, J. J. Flynn, L. A. Niswander, The correlated evolution of Runx2 tandem repeats, transcriptional activity, and facial length in carnivora. *Evol. Dev.* **9**, 555–565 (2007).
52. T. B. Ritzman, N. Banovich, K. P. Buss, J. Guida, M. A. Rubel, J. Pinney, B. Khang, M. J. Ravosa, A. C. Stone, Facing the facts: The Runx2 gene is associated with variation in facial morphology in primates. *J. Hum. Evol.* **111**, 139–151 (2017).
53. J. Caple, C. N. Stephan, A standardized nomenclature for craniofacial and facial anthropometry. *Int. J. Leg. Med.* **130**, 863–879 (2016).
54. F. J. Rohlf, The tps series of software. *Hystrix It. J. Mamm.* **26**, 9–12 (2015).
55. C. P. Klingenberg, MorphoJ: An integrated software package for geometric morphometrics. *Mol. Ecol. Resour.* **11**, 353–357 (2011).

56. S. Ritz-Timme, P. Gabriel, J. Tutkuvienė, P. Poppa, Z. Obertová, D. Gibelli, D. De Angelis, M. Ratnayake, R. Rizgeliene, A. Barkus, C. Cattaneo, Metric and morphological assessment of facial features: A study on three European populations. *Forensic Sci. Int.* **207**, 239. e1–239.e239238 (2011).
57. L. G. Farkas, M. J. Katic, C. R. Forrest, Comparison of craniofacial measurements of young adult African-American and North American white males and females. *Ann. Plast. Surg.* **59**, 692–698 (2007).
58. L. I. Lin, A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics* **45**, 255–268 (1989).
59. J. O'Connell, D. Gurdasani, O. Delaneau, N. Pirastu, S. Ulivi, M. Cocca, M. Traglia, J. Huang, J. E. Huffman, I. Rudan, R. McQuillan, R. M. Fraser, H. Campbell, O. Polasek, G. Asiki, K. Ekoru, C. Hayward, A. F. Wright, V. Vitart, P. Navarro, J. F. Zagury, J. F. Wilson, D. Toniolo, P. Gasparini, N. Soranzo, M. S. Sandhu, J. Marchini, A general approach for haplotype phasing across the full spectrum of relatedness. *PLoS Genet.* **10**, e1004234 (2014).
60. B. Howie, C. Fuchsberger, M. Stephens, J. Marchini, G. R. Abecasis, Fast and accurate genotype imputation in genome-wide association studies through pre-phasing. *Nat. Genet.* **44**, 955–959 (2012).
61. D. H. Alexander, J. Novembre, K. Lange, Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Res.* **19**, 1655–1664 (2009).
62. J. Yang, S. H. Lee, M. E. Goddard, P. M. Visscher, GCTA: A tool for genome-wide complex trait analysis. *Am. J. Hum. Genet.* **88**, 76–82 (2011).
63. C. P. Klingenberg, M. Barluenga, A. Meyer, Shape analysis of symmetric structures: Quantifying variation among individuals and asymmetry. *Evolution* **56**, 1909–1920 (2002).
64. C. R. Goodall, Procrustes methods in the statistical analysis of shape (with discussion and rejoinder). *J. Roy. Stat. Soc. Ser. B* **53**, 285–339 (1991).
65. H. M. Kang, J. H. Sul, S. K. Service, N. A. Zaitlen, S.-Y. Kong, N. B. Freimer, C. Sabatti, E. Skinn, Variance component model to account for sample structure in genome-wide association studies. *Nat. Genet.* **42**, 348–354 (2010).
66. J. Nicod, R. W. Davies, N. Cai, C. Hassett, L. Goodstadt, C. Cosgrove, B. K. Yee, V. Lionikaite, R. E. MC Intyre, C. A. Remme, E. M. Lodder, J. S. Gregory, T. Hough, R. Joynton, H. Phelps, B. Nell, C. Rowe, J. Wood, A. Walling, N. Bopp, A. Bhomra, P. Hernandez-Pliego, J. Callebert, R. M. Aspden, N. P. Talbot, P. A. Robbins, M. Harrison, M. Fray, J.-M. Launay, Y. M. Pinto, D. A. Blizard, C. R. Bezzina, D. J. Adams, P. Franken, T. Weaver, S. Wells, S. D. M. Brown, P. K. Potter, K. Klennerman, A. Lionikas, R. Mott, J. Flint, Genome-wide association of multiple complex traits in outbred mice by ultra-low-coverage sequencing. *Nat. Genet.* **48**, 912–918 (2016).
67. Roadmap Epigenomics Consortium, A. Kundaje, W. Meuleman, J. Ernst, M. Bilenyk, A. Yen, A. Heravi-Moussavi, P. Kheradpour, Z. Zhang, J. Wang, M. J. Ziller, V. Amin, J. W. Whitaker, M. D. Schultze, L. D. Ward, A. Sarkar, G. Quon, R. S. Sandstrom, M. L. Eaton, Y.-C. Wu, A. R. Pfenning, X. Wang, M. Claussnitzer, Y. Liu, C. Coarfa, R. A. Harris, N. Shores, C. B. Epstein, E. Gjoneska, D. Leung, W. Xie, R. D. Hawkins, R. Lister, C. Hong, P. Gascard, A. J. Mungall, R. Moore, E. Chuah, A. Tam, T. K. Canfield, R. S. Hansen, R. Kaul, P. J. Sabo, M. S. Bansal, A. Carles, J. R. Dixon, K.-H. Farh, S. Feizi, R. Karlic, A.-R. Kim, A. Kulkarni, D. Li, R. Lowdon, G. N. Elliott, T. R. Mercer, S. J. Neph, V. Onuchic, P. Polak, N. Rajagopal, P. Ray, R. C. Sallari, K. T. Siebenthall, N. A. Sinnott-Armstrong, M. Stevens, R. E. Thurman, J. Wu, B. Zhang, X. Zhou, A. E. Beaudet, L. A. Boyer, P. L. De Jager, P. J. Farnham, S. J. Fisher, D. Haussler, S. J. M. Jones, W. Li, M. A. Marra, M. T. McManus, S. Sunyaev, J. A. Thomson, T. D. Tlsty, L.-H. Tsai, W. Wang, R. A. Waterland, M. Q. Zhang, L. H. Chadwick, B. E. Bernstein, J. F. Costello, J. R. Ecker, M. Hirst, A. Meissner, A. Milosavljevic, B. Ren, J. A. Stamatoyannopoulos, T. Wang, M. Kellis, Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature* **518**, 317–330 (2015).
68. X. Yi, Y. Liang, E. Huerta-Sanchez, X. Jin, Z. X. P. Cuo, J. E. Pool, X. Xu, H. Jiang, N. Vinckenbosch, T. S. Kornelissen, H. Zheng, T. Liu, W. He, K. Li, R. Luo, X. Nie, H. Wu, M. Zhao, H. Cao, J. Zou, Y. Shan, S. Li, Q. Yang, Asan, P. Ni, G. Tian, J. Xu, X. Liu, T. Jiang, R. Wu, G. Zhou, M. Tang, J. Qin, T. Wang, S. Feng, G. Li, Huasang, J. Luosang, W. Wang, F. Chen, Y. Wang, X. Zheng, Z. Li, Z. Bianba, G. Yang, X. Wang, S. Tang, G. Gao, Y. Chen, Z. Luo, L. Gusang, Z. Cao, Q. Zhang, W. Ouyang, X. Ren, H. Liang, H. Zheng, Y. Huang, J. Li, L. Bolund, K. Kristiansen, Y. Li, Y. Zhang, X. Zhang, R. Li, S. Li, H. Yang, R. Nielsen, J. Wang, J. Wang, Sequencing of 50 human exomes reveals adaptation to high altitude. *Science* **329**, 75–78 (2010).
69. B. K. Maples, S. Gravel, E. E. Kenny, C. D. Bustamante, RFMix: A discriminative modeling approach for rapid and robust local-ancestry inference. *Am. J. Hum. Genet.* **93**, 278–288 (2013).
70. S. Boehringer, F. van der Lijn, F. Liu, M. Gunther, S. Sinigerova, S. Nowak, K. U. Ludwig, R. Herber, S. Klein, A. Hofman, A. G. Uitterlinden, W. J. Niessen, M. M. B. Bretelet, A. van der Lugt, R. P. Wurtz, M. M. Nothen, B. Horsthemke, D. Wiczorek, E. Mangold, M. Kayser, Genetic determination of human facial morphology: Links between cleft-lips and normal variation. *Eur. J. Hum. Genet.* **19**, 1192–1197 (2011).
71. K. U. Ludwig, A. C. Bohmer, J. Bowes, M. Nikolic, N. Ishorst, N. Wyatt, N. L. Hammond, L. Goltz, F. Thieme, S. Barth, H. Schuenke, J. Klamt, M. Spielmann, K. Aldhore, A. Rojas-Martinez, M. M. Nothen, A. Rada-Iglesias, M. J. Dixon, M. Knapp, E. Mangold, Imputation of orofacial clefting data identifies novel risk loci and sheds light on the genetic background of cleft lip ± cleft palate and cleft palate only. *Hum. Mol. Genet.* **26**, 829–842 (2017).
72. L. Qiao, Y. Yang, P. Fu, S. Hu, H. Zhou, S. Peng, J. Tan, Y. Lu, H. Lou, D. Lu, S. Wu, J. Guo, L. Jin, Y. Guan, S. Wang, S. Xu, K. Tang, Genome-wide variants of Eurasian facial shape differentiation and a prospective model of DNA based face prediction. *J. Genet. Genomics* **45**, 419–432 (2018).
73. T. H. Beaty, J. C. Murray, M. L. Marazita, R. G. Munger, I. Ruczinski, J. B. Hetmanski, K. Y. Liang, T. Wu, T. Murray, M. D. Fallin, R. A. Redett, G. Raymond, H. Schwender, S.-C. Jin, M. E. Cooper, M. Dunnwald, M. A. Mansilla, E. Leslie, S. Bullard, A. C. Lidral, L. M. Moreno, R. Menezes, A. R. Vieira, A. Petrin, A. J. Wilcox, R. T. Lie, E. W. Jabs, Y. H. Wu-Chou, P. K. Chen, H. Wang, X. Ye, S. Huang, V. Yeow, S. S. Chong, S. H. Jee, B. Shi, K. Christensen, M. Melbye, K. F. Doheny, E. W. Pugh, H. Ling, E. E. Castilla, A. E. Czeizel, L. Ma, L. L. Field, L. Brody, F. Panglilan, J. L. Mills, A. M. Molloy, P. N. Kirke, J. M. Scott, M. Arcos-Burgos, A. F. Scott, A genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near MAFB and ABCA4. *Nat. Genet.* **42**, 525–529 (2010).
74. G. Fatemifar, C. J. Hoggart, L. Paternoster, J. P. Kemp, I. Prokopenko, M. Horikoshi, V. J. Wright, J. H. Tobias, S. Richmond, A. I. Zhurov, A. M. Toma, A. Pouta, A. Taanila, K. Sipila, R. Lähdesmäki, D. Pillas, F. Geller, B. Feenstra, M. Melbye, E. A. Nohr, S. M. Ring, B. S. Pourcain, N. J. Timpson, G. D. Smith, M.-R. Jarvelin, D. M. Evans, Genome-wide association study of primary tooth eruption identifies pleiotropic loci associated with height and craniofacial distances. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 3807–3817 (2013).
75. S. Schuler, J. Hauptmann, B. Perner, M. M. Kessels, C. Englert, B. Qualmann, Ciliated sensory hair cell formation and function require the F-BAR protein syndapin I and the WH2 domain-based actin nucleator Cobl. *J. Cell Sci.* **126**, 196–208 (2013).
76. S. C. Goetz, K. V. Anderson, The primary cilium: A signalling centre during vertebrate development. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 331–344 (2010).
77. X. Zhu, F. Wang, Y. Zhao, P. Yang, J. Chen, H. Sun, L. Liu, W. Li, L. Pan, Y. Guo, Z. Kou, Y. Zhang, C. Zhou, J. He, X. Zhang, J. Li, W. Han, J. Li, G. Liu, S. Gao, Z. Yang, A gain-of-function mutation in *Tnni2* impeded bone development through increasing *Hif3a* expression in DA2B mice. *PLoS Genet.* **10**, e1004589 (2014).
78. B. Wei, J.-P. Jin, *TNNT1*, *TNNT2*, and *TNNT3*: Isoform genes, regulation, and structure-function relationships. *Gene* **582**, 1–13 (2016).
79. S. Yakar, H. Wemer, C. J. Rosen, Insulin-like growth factors: Actions on the skeleton. *J. Mol. Endocrinol.* **61**, T115–T137 (2018).
80. N. Wittkopp, E. Huntzinger, C. Weiler, J. Sauliere, S. Schmidt, M. Sonawane, E. Izaurralde, Nonsense-mediated mRNA decay effectors are essential for zebrafish embryonic development and survival. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 3517–3528 (2009).

Acknowledgments: We thank the volunteers for their enthusiastic support for this research. We also thank A. Alvarado, M. Ballesteros Romero, R. Cebrecos, M. Á. Contreras Sieck, F. de Ávila Becerril, J. De la Piedra, M. Teresa Del Solar, W. Flores, M. Granados Riveros, R. Paim, R. Gunski, J. Felisberto Menezes Cavalheiro, E. Correa de Souza Jr., W. Hart, I. Jafet Moreno, P. León-Mimila, F. Quispealaya, D. Rogel Diaz, R. Rojas, and V. Sarabia for assistance with volunteer recruitment, sample processing, and data entry. We are very grateful to the institutions that allowed the use of their facilities for the assessment of volunteers, including Escuela Nacional de Antropología e Historia and Universidad Nacional Autónoma de México (México), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Brazil), 13ª Companhia de Comunicações Mecanizada do Exército Brasileiro (Brazil), Pontificia Universidad Católica del Perú, and Universidad de Lima and Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Perú). We also acknowledge the Centre de Calcul Intensif d'Aix-Marseille for granting access to high-performance computing resources and the Gismo analytical platform of the University of Burgundy for scanning the mouse skulls. We thank M. Fumagalli and Q. Li for comments on the manuscript and D. Speed for advice on heritability calculations. We acknowledge M. A. Ikram, T. E. C. Nijsten, M. A. de Jong, S. Boehringer, M. K. Lee, E. Feingold, M. L. Marazita, L. Paternoster, H. Thompson, G. C. Sharp, S. Lewis, S. Richmond, A. Zhurov, and L. Pallares for facilitating access to published datasets. We are grateful to E. Bellini for the face drawing incorporated in Fig. 1. We thank L. Pallares and A. Palmer for sharing the GWA mouse data. **Funding:** Work leading to this publication was funded by grants from the National Natural Science Foundation of China (#31771393), the Scientific and Technology Committee of Shanghai Municipality (18490750300), the Ministry of Science and Technology of China (2020YFE021600), the Shanghai Municipal Science and Technology Major Project (2017SHZDZX01) and the 111 Project (B13016), the Leverhulme Trust (F/07 134/DF), BBSRC (BB/1021213/1), the Excellence Initiative of Aix-Marseille University—A*MIDEX (a French "Investissements d'Avenir" program), Universidad de Antioquia (CODI sostenibilidad de grupos 2013-2014 and MASO

2013-2014), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (Apoio a Núcleos de Excelência Program), Fundação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, the National Institute of Dental and Craniofacial Research (R01-DE027023, U01-DE020078, R01-DE016148, and X01-HG007821), and a Santander Research and Scholarship Award. B.B. is supported by a doctoral scholarship from Ecole Doctorale 251 Aix-Marseille Université. **Author contributions:** B.B., C.C.S.d.C., C.G., C.J., C.M., E.W., F.R., G.B., G.P., H.V.-R., J.C., J.G.-V., L.P., L.S.-F., M.-C.B., M.D., M.F.-G., M.H., P.E.-M., P.J., R.B., R.G.-J., S.C.-Q., T.H., V.A.-A., V.G., V.V., V.R., and W.A. contributed to volunteer recruitment or data collection. B.B., C.V.-G., J.M.-R., K.A., N.N., P.F., S.P., and Z.X. performed analyses. B.Y., D.B., K.A., L.D., M.K., N.N., R.G.-J., and T.C. provided guidance on aspects of study design. A.R.-L., C.C., C.T.-R., D.B., L.F., F.L., S.M.W., J. R.S., E.S., L.J.H., P.G.H., T.D.S., and M.K. obtained funding or granted access to resources. A.R.-L. and D.B. designed the project. A.R.-L., B.B., K.A., J.C., N.N. and P.F. wrote the paper with input from coauthors. A.R.-L. coordinated the study. **Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests. **Data and materials availability:** Raw genotype or phenotype data cannot be made available due to restrictions imposed by the ethics approval. Summary statistics obtained here have been deposited at GWAS central and

can be accessed with the link: www.gwascentral.org/study/HGVST4323 (available from the Spring 2021 release).

Submitted 5 May 2020

Accepted 17 December 2020

Published 5 February 2021

10.1126/sciadv.abc6160

Citation: B. Bonfante, P. Faux, N. Navarro, J. Mendoza-Revilla, M. Dubied, C. Montillot, E. Wentworth, L. Poloni, C. Varón-González, P. Jones, Z. Xiong, M. Fuentes-Guajardo, S. Palma, J. C. Chacón-Duque, M. Hurtado, V. Villegas, V. Granja, C. Jaramillo, W. Arias, R. Barquera, P. Everardo-Martinez, M. Sánchez-Quinto, J. Gómez-Valdés, H. Villamil-Ramirez, C. C. Silva de Cerqueira, T. Hünemeier, V. Ramallo, F. Liu, S. M. Weinberg, J. R. Shaffer, E. Stergiakouli, L. J. Howe, P. G. Hysi, T. D. Spector, R. Gonzalez-José, L. Schüler-Faccini, M.-C. Bortolini, V. Acuña-Alonzo, S. Canizales-Quinteros, C. Gallo, G. Poletti, G. Bedoya, F. Rothhammer, C. Thauvin-Robinet, L. Faivre, C. Costedoat, D. Balding, T. Cox, M. Kayser, L. Duplomb, B. Yalcin, J. Cotney, K. Adhikari, A. Ruiz-Linares, A GWAS in Latin Americans identifies novel face shape loci, implicating VPS13B and a Denisovan introgressed region in facial variation. *Sci. Adv.* **7**, eabc6160 (2021).

Titre : Identifier le rôle de VPS13B dans le système nerveux central

Mots clés : Syndrome de Cohen, Neuroanatomie, Neurodégénérescence, Modèle murin

Résumé : La protéine associée au tri vacuolaire 13B (VPS13B) est une protéine de grande taille et très conservée. Les mutations de la protéine VPS13B sont à l'origine du syndrome de Cohen, une maladie rare, à transmission autosomique récessive, caractérisée par une microcéphalie et une déficience intellectuelle accompagnées, notamment, d'un retard de développement, d'une hypotonie et d'une disposition joyeuse et amicale. Cependant, les mécanismes sous-jacents par lesquels la perturbation du gène *VPS13B* entraîne un dysfonctionnement cérébral restent encore inexplicés. Pour mieux comprendre la neuropathogénèse du syndrome de Cohen, nous avons caractérisé systématiquement les changements cérébraux chez les souris mutantes *Vps13b^{HOM}* et comparé les résultats murins à ceux de 235 patients déjà publiés et de 17 patients non publiés diagnostiqués avec un syndrome de Cohen lié à VPS13B. Nous avons montré que *Vps13b* est exprimé de manière différentielle dans toutes les régions du cerveau, avec une expression maximale dans le cervelet, la couche corticale VI et le gyrus denté, et qu'il joue un rôle dans la différenciation neuronale. La moitié des souris homozygotes mutantes pour *Vps13b* meurent au cours de la première semaine de vie, tandis que l'autre moitié a une durée de vie normale et présente les principaux phénotypes de la maladie humaine, notamment la microcéphalie, le retard de croissance, l'hypotonie, l'altération de la mémoire et l'amélioration de la sociabilité. Le neurocrâne des souris mutantes *Vps13b^{HOM}* est plus petit de 7 % et présente des changements de forme, tandis que l'ensemble du tissu cérébral présente une réduction de taille plus importante de 28 %. Des analyses histo-morphologiques systématiques en 2D et 3D d'un grand nombre de structures à plusieurs moments ont révélé un scénario, en mosaïque, de changements structurels dans l'ensemble du cerveau à partir de la naissance. Le cervelet, le gyrus denté et le thalamus sont les régions cérébrales qui présentent la réduction de taille la plus importante, tandis que le cortex moteur est spécifiquement plus mince dans la couche VI, et que le fornix, le fascicule rétroflexe et le cortex cingulaire ne sont pas affectés. Ces changements structurels impliquent une augmentation de la mort neuronale pendant les stades infantiles, sans progression à l'âge adulte, et une augmentation des espèces lipidiques cérébrales, ce qui suggère que VPS13B favorise la survie neuronale tôt dans la vie, peut-être par un mécanisme impliquant les lipides. Il convient de noter que les deux sexes ont été systématiquement utilisés tout au long de l'étude et ont montré des caractéristiques communes, certains phénotypes étant moins prononcés ou absents chez les femelles, tant chez les souris que chez les patients. Ces résultats de thèse fournissent de nouvelles informations sur la neurobiologie de *VPS13B* et mettent en évidence des caractéristiques neuropathologiques inédites qui définissent le syndrome de Cohen comme une nouvelle entité de neurodégénérescence infantile non progressive, tout en impliquant des phénotypes neuroanatomiques et des altérations de la composition du lipidome cérébral comme des pistes de traitement possibles.

Title : Deciphering the role of VPS13B in the central nervous system

Keywords : Cohen Syndrome, Neuroanatomy, Neurodegeneration, Mouse model

Abstract: The vacuolar protein sorting-associated protein 13B (VPS13B) is a large and highly conserved protein. Disruption of VPS13B causes the autosomal recessive Cohen syndrome, a rare disorder characterized by microcephaly and intellectual disability among other features, including developmental delay, hypotonia, and friendly personality. However, the underlying mechanisms by which VPS13B disruption leads to brain dysfunction remain unexplained. To gain insights into the neuropathogenesis of Cohen syndrome, we systematically characterized brain changes in *Vps13b*-mutant mice and compared murine findings to 235 previously published and 17 unpublished patients diagnosed with *VPS13B*-related Cohen syndrome. We showed that *Vps13b* is differentially expressed across brain regions with the highest expression in the cerebellum, the cortical layer VI and the dentate gyrus, and has a role in neuronal differentiation. Half of the homozygous mutant mice for *Vps13b* die during the first week of life, while the remaining half have a normal lifespan and display the core phenotypes of the human disease, including microcephaly, growth delay, hypotonia, altered memory, and enhanced sociability. The neurocranium of *Vps13b*-mutant mice is smaller by 7% and exhibits shape changes, while the whole brain tissue presents a greater reduction in size by 28%. Systematic 2D and 3D brain histo-morphological analyses in many structures across multiple time points revealed a mosaic scenario of structural changes throughout the brain starting after birth. The cerebellum, the dentate gyrus, and the thalamus are the brain regions that display most prominent reduction in size, while the motor cortex is specifically thinner in layer VI, and the fornix, the fasciculus retroflexus, and the cingulate cortex remain unaffected. These structural changes implicate an increase of neuronal death during infantile stages with no progression in adulthood and an increase of brain lipid species suggesting that VPS13B promotes neuronal survival early in life, possibly through a mechanism involving lipids. It is noteworthy that both sexes were systematically used throughout the study and showed shared features with some phenotypes being less pronounced or absent in females both in mice and patients. This PhD work provides new insights about the neurobiology of VPS13B and highlight previously unreported neuropathological features defining Cohen syndrome as a new entity of non-progressive infantile neurodegeneration while implicating neuroanatomical phenotypes and alterations in the brain lipidome composition as possible treatment avenues.



Université Bourgogne Franche-Comté
32, avenue de l'Observatoire
25000 Besançon

