

ÉCOLE DOCTORALE Sciences de la Vie et de la Santé

UMR 7104 I.G.B.M.C

THÈSE

présentée par :

Sandra MARTIN LORENZO

soutenue le : **31 octobre 2019**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Neurosciences**

Approches génétiques et thérapeutiques visant à comprendre et atténuer les conséquences de la délétion et duplication de la région 16p11.2 dans des modèles précliniques

THÈSE dirigée par :
Yann Hérault

Directeur de recherches, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :
LAUMONNIER Frédéric
MARTIN Stéphane
d'Azur, Valbonne

Chargé de recherches, INSERM, Tours
Directeur de recherches, INSERM/Université Côte

AUTRES MEMBRES DU JURY :
PITON Amélie

MCF – MCUPH, Université de Strasbourg

MEMBRES INVITÉS DU JURY
BILLUART Pierre

Directeur de recherches, INSERM, Paris

La dedicatoria de este manuscrito se divide en 6 partes :

a mis padres por TODO,

a mi hermana por ser mi persona,

a Mateo, Mara y mi cuñi por nunca olvidarme,

a Maria por convertirse en mi segunda hermana,

a mi familia estrasburguesa: Marta, Nico, Paula, Raquel y Simone

y a la suerte de mi vida porque volver a nuestra casa es el mejor momento
del dia.

Remerciements

En premier lieu, je tiens à exprimer ma reconnaissance à mon directeur de thèse, le Dr Yann Hérault, pour m'avoir permis de faire partie de son équipe il y a cinq ans quand j'ai commencé mon stage de Master. Merci de m'avoir confié plus tard un projet de thèse aussi passionnant. Merci de m'avoir transmis un état d'esprit curieux pour poser des questions scientifiques et attendre avec impatience ses réponses. Merci de m'avoir appris à aborder mes résultats de manière rigoureuse. Merci d'avoir été patient avec mes nombreux e-mails remplis de questions. Merci enfin de m'avoir permis de guider mon projet de recherche tout en étant disponible à mes questions, propositions scientifiques et inquiétudes.

Je remercie les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter l'évaluation de mon travail de thèse : Dr. Frédérique Laumonier, Dr. Stéphane Martin, Dr. Amélie Piton et Dr. Pierre Billuart.

J'exprime également ma gratitude à toute l'équipe sans laquelle mon travail aurait été beaucoup plus difficile. Merci Arnaud Duchon de m'avoir transmis toutes tes connaissances sur les études comportementales et pour tes conseils expérimentaux. Merci Claire Chevalier pour m'avoir aidé avec la gestion de mes lignes de souris mais surtout pour m'avoir toujours trouvé des solutions à mes problèmes techniques et pour t'être rendu disponible pour m'aider. Bien évidemment, je remercie Monika Rataj Baniowska pour toute l'aide qu'elle m'a apporté et pour la grande confiance que nous avons créée. Merci Valerie Nalesso pour tes génotypages, pour nos discussions de pailasse et pour nos rires pendant les repas. Merci Véronique Brault pour m'avoir transmis tes connaissances en ce qui concerne l'histologie pendant mon stage de master et merci Michel Roux pour tes nombreuses explications. Merci Damien Maréchal, car bien que tu travailles maintenant dans un autre laboratoire, tu as été d'une grande aide dans la zone du phénotypage de rat. Un grand merci à tous les membres de l'équipe et à tous les nouveaux doctorants. Je vous exprime mes sentiments les meilleurs. Por último, gracias a la española del equipo. Mar, muchas gracias por todos tus conocimientos en informática, por tus consejos y por tu ayuda.

Je remercie à la plateforme Trangenèse Rat et ImmunoPhénomique (TRIP) pour la création des modèles de rat 16p11.2.

Je souhaitais également remercier Marie Christine Birling pour la génération et les réponses qu'elle m'a apporté pour mes modèles murins et pour la transmission de ses connaissances de la technique CRISPR / Cas9. Je voulais aussi remercier Mohammed Selloum pour m'avoir aidé à comprendre mes analyses de viabilité.

De plus, je tenais particulièrement à remercier Anna Niewiadomska-Cimicka, Antoine et Hugues pour m'avoir aidé à établir la mise en place de mes analyses western blot.

Je tiens aussi à exprimer mes remerciements à monsieur Doulaye Dembele pour sa disponibilité et son sens du service pour répondre à mes questions concernant les analyses statistiques.

Finalement, j'ai une pensée particulière pour les personnes de la plateforme comportementale notamment Hamid Meziane pour ses conseils concernant les analyses

phénotypiques et Fabrice Riet, Christophe Mittelhaeuser et Aline Lux pour vos conseils techniques, vos démonstrations, pour m'avoir gardé les chronomètres et pour m'avoir aidé à retrouver mes souris fugueuses. Merci à Thi Bich Hanh Pham, Hamid Ennah, Leila El Fertak, Charley Pinault et Sophie Brignon du service de l'animalerie pour avoir pris soin de mes animaux de laboratoire. Je remercie également à Alexandru Parlog pour ses analyses craniofaciales ex vivo par microCT.

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	1
I. Les modifications génomiques, une source de variabilité phénotypique	1
II. Les études de génétique humaine	2
III. Les études d'association aux traits phénotypiques	4
IV. Le chromosome 16 humain	5
V. Les CNVs de la région chromosomique 16p11.2	6
VI. Des CNVs 16p11.2 aux phénotypes associés	7
1. Les syndromes 16p11.2	7
2. Phénotypes cliniques	8
3. Le biais sexuel dans les troubles neurodéveloppementaux	14
4. Anomalies cérébrales associées aux CNVs 16p11.2	15
VII. L'intervalle génétique 16p11.2 BP4-BP5	17
1. Des études du transcriptome humain	17
2. Gènes de la région	18
VIII. La modélisation des CNVs 16p11.2 BP4-BP5	24

1. Les modèles murins	24
2. Les modèles de souris pour les réarrangements 16p11.	25
IX. Projet de recherche	27
<u>ETUDE DE L'INHIBITION PHARMACOLOGIQUE DE LA VOIE DE SIGNALISATION RHOA/ROCK DEPENDANTE DE L'INTERACTION ENTRE KCTD13 ET CULLIN SUR LES MODELES 16P11.2 <i>DEL/+</i> ET <i>KCTD13^{+/-}</i></u>	<u>31</u>
<u>IMPLICATION DES GENES MVP ET SEZ6L2 POUR LES PHENOTYPES COMPORTEMENTAUX DES MODELES SOURIS DE LA DELETION DE LA REGION 16P11.2</u>	<u>61</u>
<u>MODELISATION DES SYNDROMES DE VARIATION DU NOMBRE DE COPIES DE LA REGION 16P11.2 CHEZ LE RAT</u>	<u>86</u>
<u>CARACTERISATION DU MODELE DE SOURIS CHEZ LA FEMELLE 16P11.2 <i>DEL/+</i> BP4-BP5 <i>Sult1a1-Spn</i></u>	<u>149</u>
<u>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</u>	<u>167</u>
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	<u>174</u>

Liste de figures

Figure 1 : Augmentation du nombre des variations génétiques référencées dans les bases de données de génétique humaine	2
Figure2 : Mécanisme NAHR et variations structurales de l'ADN récurrents	3
Figure 3 : Atlas du génome complet des CNVs et des SNPs significatifs identifiés par GWAS	5
Figure 4 : Carte génomique des loci associés aux CNVs sur le chromosome 16	6
Figure 5 : Le locus 16p11.2	7
Figure 6 : Distribution des mesures du quotient intellectuel chez les porteurs de la délétion de la région 16p11.2 et les témoins familiaux	9
Figure 7 : Prévalence des troubles de la production de la parole chez 55 patients porteurs de la délétion 16p11.2	10
Figure 8 : Fréquence des diagnostics psychiatriques, des symptômes psychotiques et de la déficience intellectuelle chez les enfants porteurs de la délétion et la duplication 16p11.2	11
Figure 9 : Patients porteurs de réarrangements de la région 16p11.2 BP4-BP5	12
Figure 10 : Rapport femelle : mâle pour les patients atteints d'autisme ou d'ID / DD (« Developmental Disabilities ») porteurs des CNVs spécifiques	14
Figure 11 : Effets des variations du nombre de copies de la région chromosomique 16p11.2 sur le volume cérébral local et certaines régions du cerveau	16
Figure 12. La voie KCTD13-Cul3-RHOA	20
Figure 13. Voie de signalisation ROCK / RHOA dans les cellules du muscle lisse	21
Figure 14. Effet de l'inactivation du gène Kctd13 sur la longueur dendritique, la ramification et la densité de l'épine dendritique des neurones pyramidaux CA1	22
Figure 15. Les modèles de souris pour les réarrangements 16p11.2	26

Liste de tableaux

Tableau 1 : Carte récapitulative comportementale des phénotypes observés sur les modèles de souris portant des délétions et des duplications des intervalles génétiques Slx1b-Sept1, Coro1a-Spn, et Sult1a1-Spn sur des fonds génétiques hybrides et consanguins	27
--	----

Abréviations

aCGH	Microarray-based Comparative Genomic Hybridization
ADHD	Attention Deficit Hyperactivity Disorder
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ASD	Autism Spectrum Disorder
B6N	C57BL/6N genetic background
B6NC3B	Mixed C57BL/6N-C3H/HeH genetic background
BMI	Body Mass Index
BP	Breakpoint
CAS	Childhood Apraxia of Speech
CMA	Chromosomal Microarray Analysis
CNV	Copy Number Variation
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
<i>Del/+</i>	Animal porteur d'une délétion de la région chromosomique d'intérêt à l'état hétérozygote
<i>Del/Dup</i>	Animal porteur d'une délétion et d'une duplication de la région chromosomique d'intérêt
<i>Dup/+</i>	Animal porteur d'une duplication de la région chromosomique d'intérêt à l'état hétérozygote
DD	Developmental Disabilities
FSIQ	Full-Scale Intelligence Quotients
G	Gramme
GM	Gray Matter
GWAS	Genome Wide Association Study
h	Heure
HapMap	Haplotype Map
ID	Intellectual Disability
IGE	Idiopathic Generalized Epilepsy
IMPC	International Mouse Phenotyping Consortium
kb	Kilobase
<i>Kctd13+/-</i>	Souris porteur de la délétion du gène <i>Kctd13</i> à l'état hétérozygote
KO	Knock-Out

LCRs	Low copy Repeats
Mb	Mégabase
min	Minute
MRI	Magnetic Resonance Imaging
<i>Mvp</i> ^{+/-}	Souris porteur de la délétion du gène <i>Mvp</i> à l'état hétérozygote
NAHR	Non-Allelic Homologous Recombination
NGS	Next-Generation Sequencing
NOL	Novel Object Recognition
NOR	Novel Object Recognition
ODD/CD	Oppositional Defiant Disorder/Conduct Disorder
OF	Open Field
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
pb	Paire de base
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PS	Psychotic Symptoms
qRT-PCR	Real-time reverse transcription PCR
RNA-seq	Séquençage nouvelle génération de l'ARN
Rpm	Rotation par minute
s	Seconde
SD	Segment génomique Dupliqué
SD	Sprague-Dawley genetic background
<i>Sez6l2tm1a</i> ^{+/+}	Souris porteur de l'allèle tm1a pour la délétion de <i>Sez6l2</i> à l'état hétérozygote
<i>Sez6l2tm1b</i> ^{+/+}	Souris porteur de l'allèle tm1b pour la délétion de <i>Sez6l2</i> à l'état hétérozygote
<i>Sez6l2</i> ^{+/-}	Souris porteur de la délétion du gène <i>Sez6l2</i> à l'état hétérozygote
SEM	Erreur standard de la moyenne
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SNParray	Microarray-based Single Nucleotide Polymorphism genotyping
vs	Versus
WM	White Matter
wt	Wild-type
µm	Micromètre

Introduction Générale

Comprendre les bases génétiques de la variation phénotypique responsable de pathologies dans les populations humaines est actuellement l'un des objectifs majeurs de la génétique humaine. Les travaux de recherche menés au cours des dernières années nous ont permis de comprendre que les variations du nombre de copies du génome constituent un facteur de risque important dans l'apparition de problèmes neuro développementaux chez l'humain et par conséquent la manifestation de troubles neuropsychiatriques.

I. Les modifications génomiques, une source de variabilité phénotypique

Les modifications génétiques ont favorisé l'évolution humaine depuis des millions d'années et contribuent à la variabilité entre les populations. Cependant, certaines altérations de l'architecture génétique sont impliquées dans diverses pathologies. Initialement, les études d'association génétique à partir de variables phénotypiques pathologiques étaient basées sur des altérations génétiques facilement identifiables. Parmi elles, on retrouve les aneuploïdies, les variations structurales visibles au microscope et les polymorphismes nucléotidiques (SNPs, pour « Single Nucleotide Polymorphisms ») identifiables grâce à des techniques bien connues, comme le séquençage par amplification en chaîne par polymérase. La compréhension de ces associations fut facilitée par la validation de millions de SNP par le projet International HapMap (pour « Haplotype Map ») (Consortium, 2003; Consortium, 2005; McCarroll *et al.*, 2006).

Cependant, le développement de nouvelles techniques d'analyses génétique a permis d'améliorer la détection de nouvelles variations structurales comme le montre la figure 1. Spécifiquement la technologie de puce d'hybridation génomique comparative (aCGH pour « Array Comparative Genomic Hybridization ») (Albertson et Pinkel, 2003; Barrett *et al.*, 2004; Jong *et al.*, 2004; Vissers *et al.*, 2003), ainsi que le révolutionnaire séquençage de nouvelle génération (NGS pour « Next-Generation Sequencing ») (Fromel *et al.*, 2012; Handsaker *et al.*, 2011) permettent la détection et l'étude des variations du nombre de copies du génome (CNVs pour « Copy Number Variations »). Ces réarrangements structuraux englobent une fraction génomique supérieure aux SNPs et représentent la proportion majeure du polymorphisme génétique et de la variabilité humaine (Conrad *et al.*, 2010; Craddock *et al.*, 2010; Feuk *et al.*, 2006; Redon *et al.*, 2006). Les preuves indiquent que ces variantes structurales peuvent comprendre des millions de nucléotides d'hétérogénéité au sein de chaque génome et sont susceptibles d'apporter une contribution importante à la diversité humaine et à la susceptibilité aux maladies à cause d'une influence directe ou indirecte sur le dosage génétique.

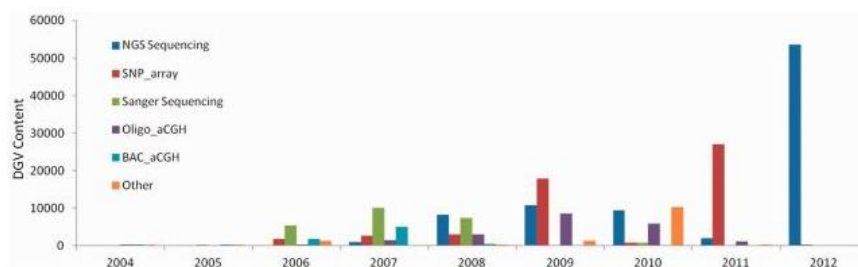


Figure 1 : Augmentation du nombre des variations génétiques référencées dans les bases de données de génétique humaine

Le graphique montre l'augmentation des polymorphismes identifiés grâce au développement des techniques aCGH, SNParray et le révolutionnaire séquençage de nouvelle génération à partir de 2008 (Tiré de McDonald *et al.*, 2014).

Les CNVs constituent des polymorphismes au niveau de la structure chromosomique associés à la perte ou le gain de segments génomiques de taille variant de quelques dizaines de paires de bases (pb) à plusieurs mégabases (Mb). Ces réarrangements génétiques incluent les délétions, les duplications, les triplications, les insertions et les translocations et ils peuvent être classés en deux catégories principales : récurrents et non-récurrents.

II. Les études de génétique humaine

Au début des années 2000, les premières études sur la proportion et la distribution des CNVs sur la population normale furent réalisées en considérant la pertinence des variations structurales de type CNVs dans la génétique et l'identité humaine.

La première étude de la distribution des CNVs sur le génome de 20 personnes sans pathologies utilisant la technique aCGH révéla un total de 221 variations du nombre de copies représentant 76 loci uniques (Sebat *et al.*, 2004). En moyenne, les individus présentaient un déséquilibre génomique de 11 CNVs avec une longueur moyenne de 465 Kilobases (kb). En outre, les gènes compris dans les intervalles de ces CNVs étaient impliqués dans la fonction neurologique, la régulation de la croissance cellulaire, la régulation du métabolisme et certaines maladies. Au cours de cette même période, une autre étude aboutit à l'identification de 255 loci dans le génome humain contenant des déséquilibres génomiques entre 55 individus non apparentés (lafrate *et al.*, 2004). De plus, il est intéressant de noter que 25,5% des CNVs récurrentes identifiées furent assignées aux régions chevauchant des segments dupliqués (SDs) précédemment reconnus.

Les SDs ou LCRs (« Low Copy Repeat ») sont des fractions de séquence d'ADN d'une taille généralement comprise entre 10 et 300 kb placées sur plus d'un site du génome avec une identité de séquence supérieure à 90% (Bailey *et al.*, 2002; Eichler, 2001). Ces segments d'ADN prédisposent à l'apparition des CNVs par l'événement de recombinaison homologue non-allélique (NAHR, pour « Non-Allelic Homologous Recombination »). La NAHR est un mécanisme qui génère des variations structurales à partir de l'entrecroisement inégal entre

des régions d'homologie ayant une identité de séquence élevée, comme les SDs. Ce mécanisme aboutit à différents réarrangements structuraux (Liu *et al.*, 2012) en fonction de l'orientation des SDs (directe ou indirecte) et du type de recombinaison (en *cis* : intra-chromatide ou en *trans* : inter-chromosomique et intra-chromosomique) (Figure 2).

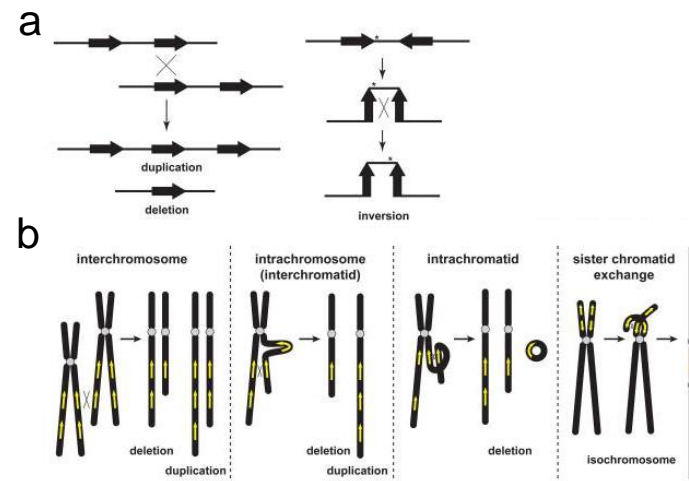


Figure 2 : Mécanisme NAHR et variations structurales de l'ADN récurrents

- L'entrecroisement *en trans* entre SDs d'orientation directe génère des réarrangements de type délétion et duplication réciproque. L'entrecroisement *en cis* entre des SDs d'orientation indirecte induit une inversion.
- La recombinaison entre SDs d'orientation directe conduit à des délétions et duplications par l'entrecroisement inter-chromosomique, intra-chromosomique et intra-chromatide. Le NAHR entre SDs d'orientation inversée de chromatides sœurs aboutit à la formation d'un isochromosome (Adapté de Liu *et al.*, 2012).

Un an plus tard, l'évaluation du rôle des segments dupliqués dans la variabilité génétique des 47 individus sains représentant des populations de 4 continents, a révélé un enrichissement de CNVs sur les intervalles génétiques délimitées par des SDs (Sharp *et al.*, 2005). Cette recherche a confirmé l'implication de ces séquences dans la médiation de la variabilité humaine et elle suggère que la considération des SDs pourrait améliorer de manière significative la détermination des réarrangements à grande échelle.

En 2006, une autre étude a utilisé des données de l'analyse génotypique de ~1,3 millions de SNPs provenant de 60 trios du consortium international HapMap (Consortium, 2003) pour l'identification des délétions (Conrad *et al.*, 2006). Les résultats ont identifié par aCGH un total de 586 loci associés à des délétions dans une ou plusieurs familles. Notamment, il a été estimé que chaque individu présentait entre 30 et 50 délétions supérieures à 5 kb à l'état hétérozygote, totalisant entre 550 et 750 kb de séquence euchromatique sur leur génome. Les délétions détectées couvraient un total de 267 gènes connus et prévus. En général, ces régions étaient relativement pauvres en gènes. Ceci est compatible avec l'action de purification de la sélection contre les délétions. De plus le

chromosome X des individus présentait un léger déficit du nombre de délétions pouvant refléter une pression de sélection par rapport aux hommes.

La même année, la première carte de la distribution globale des CNVs du génome humain fut réalisée par l'analyse de l'ADN de 270 individus de quatre populations d'ascendance européenne, africaine et asiatique (collection HapMap). Cette étude a ciblé les CNVs par la combinaison des techniques aCGH et SNParray (Consortium, 2005; Redon *et al.*, 2006). 12% du génome de ces populations correspondait à des variables génomiques englobant des gènes, des locus associés à des syndromes du développement, des éléments fonctionnels et des SDs. Ces études signalent l'importance de la considération et l'identification des CNVs pour l'étude des maladies.

L'amélioration de la résolution de la détection des CNVs obtenue à partir des évolutions technologiques a permis récemment la création de cartes de distribution des CNVs plus réelles. Une étude inédite menée en 2010 a utilisé la technique aCGH incluant 42 millions de sondes (56 pb d'espacement moyen) pour l'identification de CNVs dont 70% des loci associés n'avaient pas été détectés dans les études précédentes. Il fut révélé également l'impact fonctionnel pathogène exacerbé des délétions par rapport aux autres CNVs, dont moins de 10% chevauchent des régions codantes (Conrad *et al.*, 2010). Finalement l'amélioration du séquençage des CNVs grâce à la résolution des nucléotides a facilité l'analyse de leur origine et de leur impact fonctionnel (Mills *et al.*, 2011).

III. Les études d'association aux traits phénotypiques

Les études d'association génétique permettent de déterminer si une altération génétique peut être considérée comme un élément déclencheur de l'apparition d'un ou plusieurs traits phénotypiques, fondamentalement des syndromes d'une pathologie complexe. L'objectif principal de ces études est d'analyser si la fréquence allélique d'un marqueur génétique diffère entre un groupe d'individus présentant un phénotype particulier et un groupe témoin d'individus sains. Bien que les études d'association offrent une grande résolution pour la détection de polymorphismes, un grand nombre d'échantillons est requis afin d'éviter des faux positifs (Risch et Merikangas, 1996). Au cours des dernières années, notre compréhension de la variation du nombre de copies dans le génome humain et sa relation avec certaines maladies a rapidement évolué. Depuis 2005, l'étude d'association pangénomique (GWAS, pour « Genome-Wide Association Study ») a permis de découvrir que de nombreux CNVs et SNPs sont liés aux désordres neurodéveloppementaux qui affectent au fonctionnement cérébral cognitif, neurologique ou psychiatrique (Figure 3). L'absence de cas bien définis et de groupes témoins, la taille insuffisante de l'échantillon, le contrôle pour les tests multiples et le contrôle pour la stratification de la population sont des limitations courantes associées à ces études (Pearson *et al.*, 2008). En plus, la grande diversité de réponses individuelles ou de mécanismes compensatoires à un état pathologique annule et masque des gènes potentiels ou des variantes causales associées à une maladie (Santolini *et al.*, 2018). Pour cette raison, toutes ces limitations sont considérées par les chercheurs dans des recherches récentes.

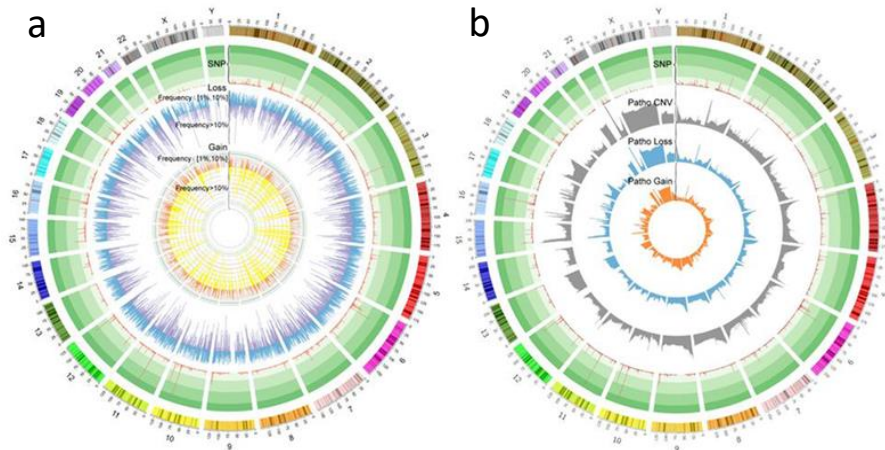


Figure 3 : Atlas du génome complet des CNVs et des SNPs significatifs identifiés par GWAS

Cette représentation est utilisée pour représenter la coexistence de SNPs, qui ont été associés à certains états cliniques ou phénotypes et à des CNVs communs ou pathologiques. Les SNPs significatifs ont été obtenus à partir du catalogue GWAS publié par le National Human Genome Research Institute, les CNVs courants ont été acquis à partir de la base de données en ligne des variantes génomiques et les CNVs pathogènes ont été acquis à partir de la base de données UCSC (<https://genome.ucsc.edu>).

- ~ 10% des SNPs significatifs (2.042 sur 20.726) identifiés par GWAS sont co-localisés avec les CNVs communs observés dans seulement 4,2% du génome humain. La hauteur de chaque rayonnement représentait la fréquence de chaque SNP ou CNV.
- La plupart des SNPs significatifs (99,69%) identifiés par GWAS sont co-localisés avec les CNVs associées avec des pathologies, alors que les CNVs pathogènes ont été observées dans 97,63% du génome humain (Tiré de Liu *et al.*, 2018).

IV. Le chromosome 16 humain

Le travail de recherche présenté dans ce manuscrit se focalise sur les variations du nombre de copies incluant le locus 16p11.2, une région d'environ 600 kb sur le bras court du chromosome humain numéro 16.

Le chromosome 16 est une structure métacentrique de petite taille appartenant au groupe E qui englobe 90,4 Mb avec un grand nombre de répétitions et de variations structurales localisées principalement sur l'hétérochromatine centromérique (Figure 4) (Redaelli *et al.*, 2019; Scherer, 2010). Cet élément présente une densité génétique élevée (Fatakia *et al.*, 2016). A l'intérieur, il existe 2260 gènes selon la base de données biologiques VEGA pour « Vertebrate and Genome Annotation » et 2006 gènes conformément aux données du NCBI pour « National Center for Biotechnology Information ». Ce chromosome contient également plusieurs gènes paralogues analogues à l'immunoglobine, un type de gène qui subit des duplications suivies de mutations aléatoires en tant que méthode évolutive, car ils jouent un rôle dans l'adaptation aux antigènes potentiels. En outre, curieusement, 9,89% du chromosome 16 est constitué de segments dupliqués (SDs) (identifié

de séquence $\geq 90\%$ et longueur ≥ 1 kb), l'un des plus hauts niveaux de séquences dupliquées en segments parmi les autosomes humains et un pourcentage similaire correspond à l'ADN non séquencé de ce chromosome (Martin *et al.*, 2004). Par conséquent, cette architecture complexe conduit à une forte instabilité et à une prédisposition aux mécanismes de réarrangement récurrent. L'étude des CNVs associées à ce chromosome a démontré que ces variations augmentent la susceptibilité de manifester des maladies développementales (Niarchou *et al.*, 2018).

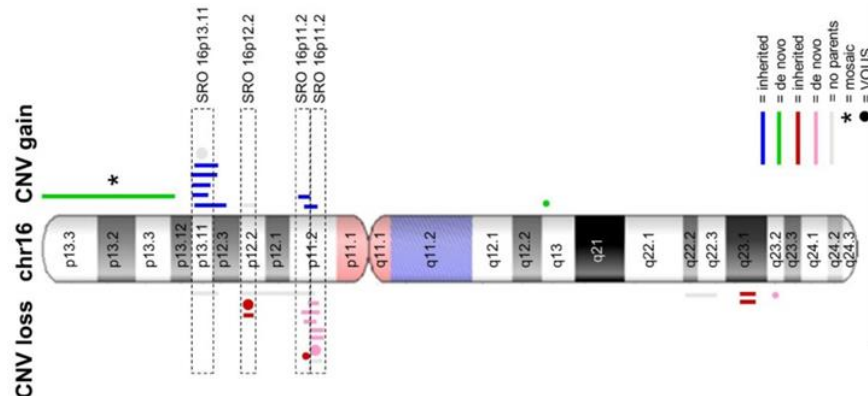


Figure 4 : Carte génomique des loci associés aux CNVs sur le chromosome 16

Le coté supérieur du chromosome inclut les CNVs identifiées aboutissant au gain du matériel génétique, alors que la partie inférieure du chromosome inclut les CNVs associées à la perte des segments génomiques (Adapté de Redaelli *et al.*, 2019).

V. Les CNVs de la région chromosomique 16p11.2

L'intervalle génétique 16p11.2 se localise dans la zone péracentromérique du chromosome mentionné précédemment, une région enrichie en SDs (Liu *et al.*, 2012) prédisposant directement à l'apparition des CNVs par le mécanisme de recombinaison homologue non-allélique.

Les variations structurales les plus fréquemment identifiées de la région 16p11.2 sont la délétion et la duplication générées par l'entrecroisement entre SDs proximaux d'orientation directe au niveau des points de cassure BP (pour « Breakpoint ») 4 et 5 (Figure 5). Les 34 gènes de cet intervalle génique sont : *BOLA2*, *SLX1B*, *SULT1A4*, *SPN*, *QPRT*, *C16orf54*, *ZG16*, *KIF22*, *MAZ*, *PRT2*, *PAGR1*, *MVP*, *CPIPT*, *CPIPT-AS*, *SEZ6L2*, *ASPHD1*, *KCTD13*, *TMEM219*, *TAOK2*, *HIRIP3*, *INO80E*, *DOC2A*, *C16orf92*, *FAM57B*, *ALDOA*, *PPP4C*, *TBX6*, *YPEL3*, *GDPD3*, *MAPK3*, *CORO1A*, *BOLA2B*, *SLX1A*, *SULT1A3* (Zufferey *et al.*, 2012).

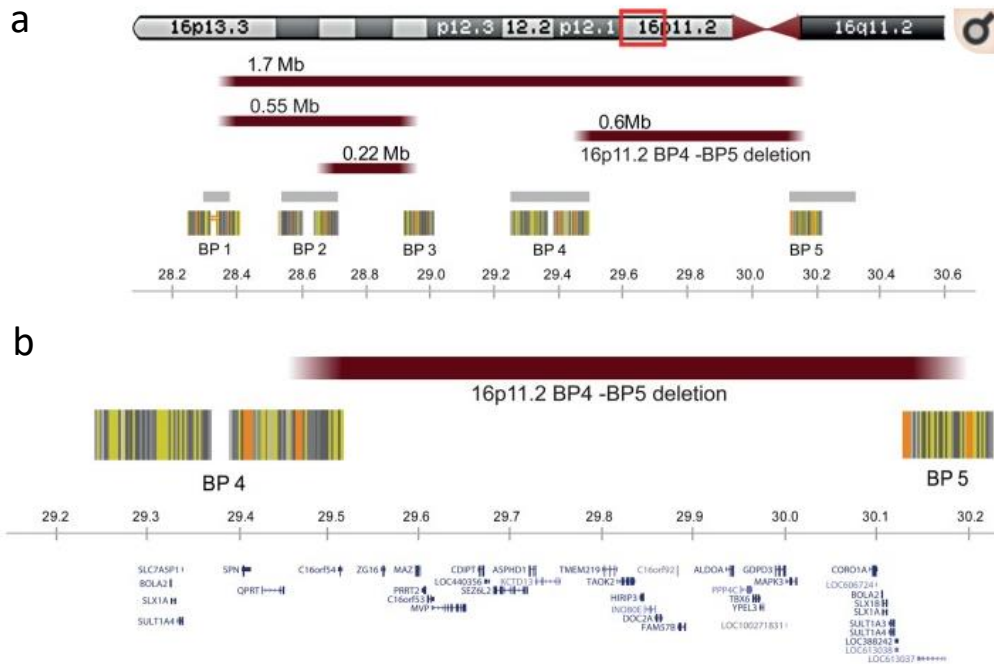


Figure 5 : Le locus 16p11.2

- Représentation du locus 16p11.2 ainsi que les différents SDs présents sur la région prédisposant à l'apparition des CNVs cliniques par NAHR. Les réarrangements récurrents de l'intervalle sont schématisés par des bandes bordeaux.
- Les réarrangements de la région délimitée par les points de cassure BP4 et BP5 d'une taille de 600 kb comprenant 34 gènes sont fréquemment identifiés et associés aux troubles du développement. Les positions génomiques proviennent du « browser hg18/NCB136 » (Adapté de Zufferey *et al.*, 2012).

VI. Des CNVs 16p11.2 aux phénotypes associés

1. Les syndromes 16p11.2

Les résultats des études d'association pangénomique mettent en évidence la grande complexité des désordres neuropsychiatriques. Son étiologie implique fondamentalement des facteurs génétiques incluant une multitude de variations de pénétrance incomplète. Néanmoins, ces analyses signalèrent l'effet pathogène des larges délétions. Des nombreuses différences alléliques aboutissant à l'haplo-insuffisance mais aussi la surexpression des gènes impliqués dans le neurodéveloppement peuvent augmenter la possibilité de manifester de nombreuses conditions neuropsychiatriques.

En particulier, les réarrangements de la région chromosomique 16p11.2 plus fréquemment identifiés, la délétion et la duplication réciproque entre les points de cassure BP4 et BP5 supposent un facteur de risque important pour le diagnostic des désordres neurodéveloppementaux (Chawner *et al.*, 2019; Cooper *et al.*, 2011; Grayton *et al.*, 2012). Ces CNVs atteignent une prévalence dans la population de 1/1500 (Jacquemont *et al.*, 2011).

Environ 71 % des délétions de la région se produisent *de novo* alors que la plupart des duplications 16p11.2 (70%) sont héréditaires (D'Angelo *et al.*, 2016). Ce fait est compatible avec la notion selon laquelle la délétion de 16p11.2 a un impact plus important sur le fonctionnement, entraînant une réduction de la fécondité (Rosenfeld *et al.*, 2010). Les deux réarrangements concernent entre 1 et 1,5% des patients atteints de la déficience intellectuelle (ID pour Intellectual Disability) (Cooper *et al.*, 2001; Weiss *et al.*, 2008) et les troubles du spectre autistique (ASD pour « Autism Spectrum Disorder »). En plus, ces variations structurales de l'ADN ont été également associées à des autres désordres neuropsychiatriques, des anomalies de la taille de la tête ainsi que des altérations de l'indice de la masse corporelle (BMI pour « Body Mass Index »), comme nous allons le développer par la suite.

2. Phénotypes cliniques

Les variations du nombre de copies de la région BP4-BP5 furent initialement identifiées chez les patients avec une déficience intellectuelle et des troubles du spectre autistique. La déficience intellectuelle est une altération du développement de l'être humain caractérisée par des limitations significatives du fonctionnement intellectuel et des comportements d'adaptation avec un quotient intellectuel égal ou inférieur à 70 (Chelly *et al.*, 2006). La prévalence dans la population atteint 1 à 3% et ce trouble présente une prédominance chez l'homme avec un sex-ratio 2 : 1 hommes : femmes (Ropers *et al.*, 2008). Alors que les troubles du spectre autistique incluent un ensemble très variable d'anomalies comportementales caractérisées par une diminution des interactions sociales, des déficits de communication verbale et non verbale, ainsi que la stéréotypie. La prévalence dans la population augmente avec les années en raison de l'amélioration des techniques de diagnostic et atteint 1% (Lai *et al.*, 2014) avec une prédominance profonde chez les hommes avec un ratio 4 : 1 homme : femme (Scott *et al.*, 2002).

En 2007 l'étude menée par Sebat *et al.*, identifia une personne porteuse de la délétion entre 118 patients en ségrégation avec l'ASD. Un an plus tard, une étude similaire qui recueille des données d'une population de 180 patients identifia deux porteurs de cette CNV (Kumar *et al.*, 2008). La même année, deux autres études indépendantes ont signalé non seulement la délétion de la région, mais aussi la duplication réciproque à une fréquence similaire de 1% entre les patients étudiés avec ASD (Marshall *et al.*, 2008; Weiss *et al.*, 2008).

Des cas de sujets porteurs des microdélétions de 16p11.2 ont été rapportés également en absence d'autisme. En 2006 Rosenberg *et al.*, a signalé la délétion chez un patient présentant un retard mental léger, un retard de la parole grave et une dysmorphie faciale. Un an plus tard, une autre étude a identifié la délétion sur des jumeaux monozygotes présentant un retard mental léger, un dysmorphisme léger, un trouble convulsif et une maladie de la valve aortique (Ghebranious *et al.*, 2007) sans une symptomatologie autistique. En 2009, l'analyse de Bijlsma *et al.*, de 4284 patients atteints de retard mental et/ou d'anomalies congénitales multiples, a détecté 22 personnes avec des délétions sur la

région 16p11.2 BP4-BP5. Une autre étude plus récente réalisée à partir de l'analyse de 55 sujets porteurs de la délétion et 153 personnes familiales témoins a montré que les patients porteurs présentaient des taux élevés de troubles psychiatriques et du développement. Les résultats ont révélé une diminution des quotients intellectuels à grande échelle (FSIQ pour « Full-Scale Intelligence Quotients ») chez les porteurs par rapport aux témoins (Figure 6). En 2011, la délétion ainsi que la duplication ont été également associées à la déficience intellectuelle dans une analyse des échantillons de 15.767 enfants présentant une déficience intellectuelle et diverses anomalies congénitales (Cooper *et al.*, 2011).

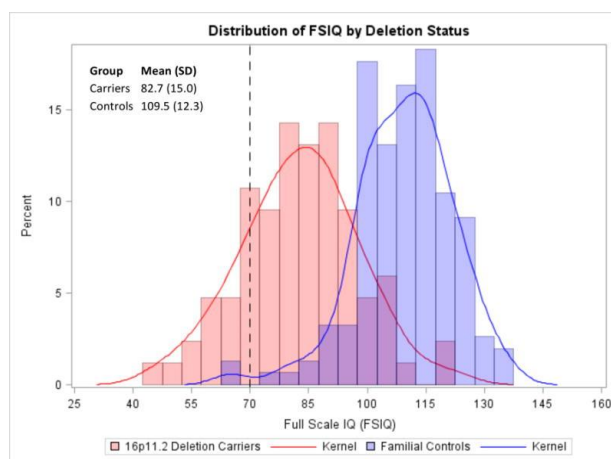


Figure 6 : Distribution des mesures du quotient intellectuel chez les porteurs de la délétion de la région 16p11.2 et les témoins familiaux

Le graphique montre une réduction de deux écarts-types chez les porteurs 16p11.2 (barres roses) par rapport aux témoins familiaux (barres violettes). La ligne pointillée représente la valeur limite de la déficience intellectuelle (Tiré de Hanson *et al.*, 2015).

Cependant, bien que l'effet de la duplication sur la capacité cognitive soit similaire à celui généré par la délétion, la duplication est associée à une expressivité phénotypique significativement plus variable car des sous-groupes avec des effets graves ou légers ne sont observés que pour la duplication. Ces résultats suggèrent que des facteurs génétiques et familiaux supplémentaires contribuent à cette variabilité (D'Angelo *et al.*, 2016).

En addition de ces deux désordres neuropsychiatriques, la duplication 16p11.2 BP4-BP5 est également associée à la schizophrénie et à d'autres troubles neuro-développementaux. La schizophrénie est un trouble mental sévère et chronique appartenant à la classe des troubles psychotiques caractérisé par des hallucinations, un déficit cognitif, et un trouble du comportement évoluant entre des phases aiguës alternées et des phases quasi asymptomatiques (Sullivan *et al.*, 2003) avec une prévalence dans la population de 0,4 à 0,7% (Saha *et al.*, 2005). En 2008, deux porteurs de la duplication dans un groupe de 150 patients avec des symptômes schizophréniques furent identifiés par Walsh *et al.* L'année suivante, une étude a associé la micro-duplication avec un risque accru du diagnostic de la schizophrénie (McCarthy *et al.*, 2009). Dans la même étude, une méta-analyse de données

de GWAS pour de nombreux désordres psychiatriques a permis l'association de la duplication 16p11.2 à l'autisme, la schizophrénie mais aussi le trouble bipolaire alors que la délétion de la région était associée à l'autisme et aux désordres du développement. En plus, des différences de la taille du crâne furent observées entre les patients porteurs de la délétion par rapport aux patients porteurs de la duplication.

Les variations structurales de la région 16p11.2 BP4-BP5 sont également liées à l'épilepsie. L'épilepsie est un désordre neuropsychiatrique présentant une prévalence qui varie selon les études, mais concerne généralement entre 0,4 et 1% des habitants (Swinkels *et al.*, 2005). Comme nous l'avons mentionné précédemment, dans l'étude réalisée en 2007 par Ghebranious *et al.*, la délétion 16p11.2 fut associée à l'épilepsie chez des jumeaux monozygotes présentant une déficience intellectuelle, une anomalie de la valve aortique et des crises épileptiques. Plus récemment il a été montré que 24% d'un total de 285 patients porteurs de la délétion présentait des crises épileptiques (Zufferey *et al.*, 2012). La duplication réciproque a été associée avec l'Épilepsie généralisée idiopathique (IGE pour « Idiopathic Generalized Epilepsy ») dans une étude menée en 2010 (Bedoyan *et al.*, 2010). Quatre ans plus tard, cette variation génétique a été également associée à l'épilepsie Rolandique (Reinthal et al., 2014).

Les déficits de la parole et de la communication peuvent avoir un impact important sur l'apprentissage et le développement des patients. Au cours de la dernière décennie le phénotype du syndrome de la micro délétion 16p11.2 BP4-BP5 a été étendu pour inclure des retards et troubles de la parole et du langage (Hanson *et al.*, 2015), atteignant 71% du diagnostic chez personnes porteurs de ce réarrangement. La délétion a été également associée à l'apraxie du langage chez les enfants (CAS pour « Childhood Apraxia of Speech »), rare, sévère et persistante (Figure 7) (Fedorenko *et al.*, 2016; Laffin *et al.*, 2012; Mei *et al.*, 2017; Raca *et al.*, 2013). Mais ce n'est qu'en 2018 qu'il a été démontré une association directe de ces déficiences de la parole et du langage à des anomalies dans des régions cérébrales. En particulier, des individus porteurs de la délétion 16p11.2 atteints des troubles de la parole ont présenté des anomalies corticales focales (Blackmon *et al.*, 2018).

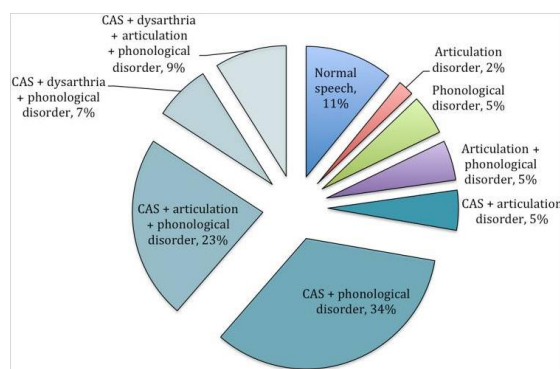


Figure 7 : Prévalence des troubles de la production de la parole chez 55 patients porteurs de la délétion 16p11.2

Le graphique à secteurs représente le pourcentage de troubles de la parole diagnostique chez un total de 55 patients porteurs du réarrangement 16p11.2 (Tiré de Mei *et al.*, 2017).

Récemment, une étude a été proposée pour évaluer la nature et la prévalence de la psychopathologie associée aux CNVs 16p11.2 en comparant des enfants porteurs de la délétion et de la duplication avec des témoins familiaux (Figure 8). Les enfants porteurs de la délétion présentaient une fréquence plus élevée de troubles psychiatriques en général, de troubles du déficit de l'attention avec hyperactivité (ADHD pour « Attention-Deficit Hyperactivity Disorder ») et de troubles du spectre autistique (ASD) que les témoins. Alors que les enfants porteurs de la duplication présentaient une fréquence plus élevée de diagnostics psychiatriques en général et d'ADHD que les témoins. La comparaison des deux groupes de CNVs indiquait une fréquence plus élevée d'ADHD associée à la duplication qu'à la délétion ainsi qu'une fréquence plus élevée de troubles psychiatriques et de symptômes psychotiques (PS pour « Psychotic Symptoms ») en général. Cependant, aucune différence n'a été trouvée entre les porteurs de délétion et de la duplication dans la prévalence des ASD ni ID (Niarchou *et al.*, 2019).

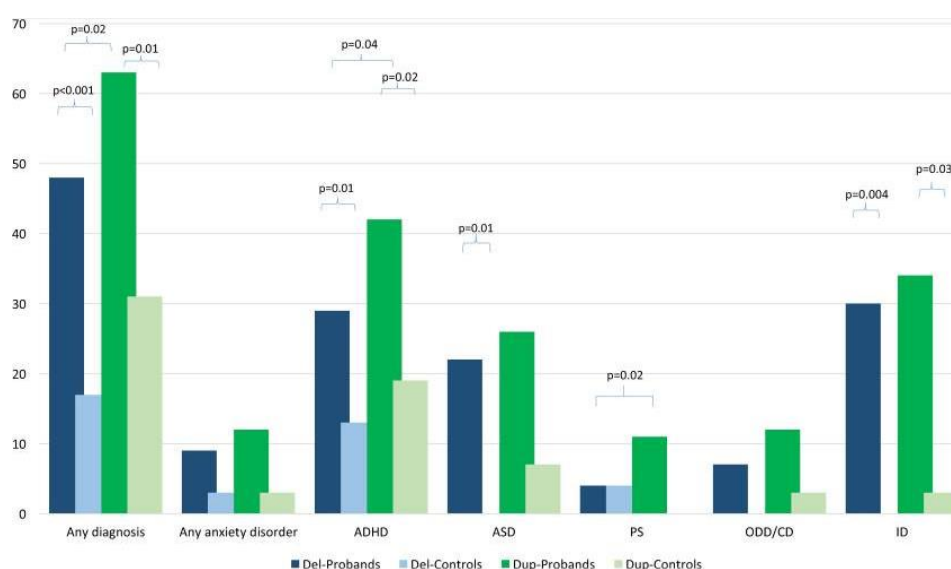


Figure 8 : Fréquence des diagnostics psychiatriques, des symptômes psychotiques et de la déficience intellectuelle chez les enfants porteurs de la délétion et la duplication 16p11.2

Les acronymes signifient : ADHD pour « Attention Deficit Hyperactivity Disorder », ASD pour « Autism Spectrum Disorder », ID pour « Intellectual Disability », ODD/CD pour « Oppositional Defiant Disorder/Conduct Disorder », PS pour « Psychotic Symptoms ». La couleur bleue représente les patients porteurs de la délétion alors que la couleur verte représente les patients porteurs de la duplication. Les tonalités plus claires représentent les témoins familiaux pour chaque CNVs. (Tiré de Niarchou *et al.*, 2019).

La caractérisation clinique en 2010 de 27 patients porteurs de la délétion 16p11.2 BP4-BP5 et 18 patients porteurs de la duplication réciproque révéla pour les deux réarrangements des cas récurrents de retard psychomoteur, d'épilepsie, d'anomalies congénitales et des désordres comportementaux par rapport à l'activité. Cette observation confirme l'interconnexion entre des différentes conditions neuropsychiatriques.

De plus, dans cette même étude des phénotypes du volume crânien ont été rapportés également de manière opposée pour les deux CNVs. Les porteurs de la délétion ont été caractérisés avec de la macrocéphalie alors que la duplication a été liée avec de la microcéphalie (Figure 9). Une diminution de la taille des patients porteurs de la délétion a été également observée (Shinawi *et al.*, 2010).

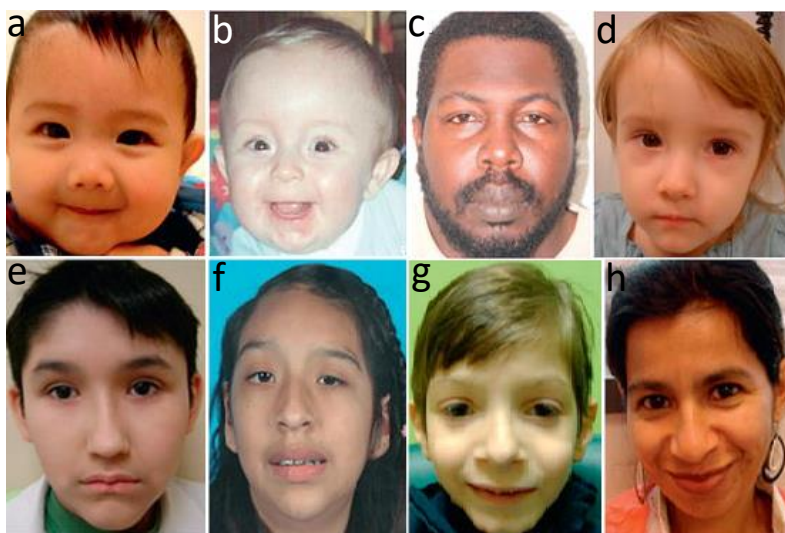


Figure 9 : Patients porteurs de réarrangements de la région 16p11.2 BP4-BP5

a-d. Patients porteurs de la délétion 16p11.2 présentant un phénotype de macrocéphalie.

e-h. Patients porteurs de la duplication 16p11.2 présentant un phénotype de microcéphalie (Adapté de Shinawi *et al.*, 2010).

En plus des désordres neuropsychiatriques décrits et des phénotypes de la taille de la tête, les CNVs de l'intervalle génétique 16p11.2 engendrent également des altérations profondes du BMI « Body Mass Index » des patients. Initialement, la délétion fut liée à l'obésité. En 2010 une étude réalisée sur 312 patients présentant une obésité associée au retard développemental a identifié par aCGH neuf (2,9%) patients porteurs d'une délétion 16p11.2 (Walter *et al.*, 2010). Une autre analyse parallèle récapitulée dans la même étude a été menée à partir de 3947 patients présentant un retard développemental mais sans sélection du phénotype d'obésité. Vingt-deux (0,6%) cas porteurs d'une délétion similaire ont été identifiés par aCGH et SNP-CGH, ceci étant une proportion significativement inférieure à la cohorte qui comprenait exclusivement des sujets obèses. En outre, l'analyse des données cliniques disponibles sur 22 nouveaux porteurs a révélé qu'en plus des troubles neuropsychologiques et les troubles du comportement, comprenant l'hyperphagie chez 9 personnes, la délétion était associée à l'obésité chez l'adulte avec un phénotype plus variable durant l'enfance. En parallèle l'analyse des auteurs des données de GWAS de 16053 sujets incluant des cas d'obésité / obésité morbide et des témoins a permis à l'identification de dix-neuf porteurs.

En 2011 la duplication 16p11.2 fut associée à des altérations du BMI. En particulier, une étude phénotypique a utilisé des mesures de la taille, de la masse, du BMI et du volume crânien de 106 porteurs de la duplication comparés aux données de référence d'une population de sexe et âge similaires. Sur le total, onze patients présentaient un comportement restrictif et sélectif de l'alimentation. Les résultats montraient une réduction de la taille de la tête ainsi qu'une réduction du BMI et de la masse corporelle liées à la duplication de la région (Jacquemont *et al.*, 2011).

Une autre étude a permis d'analyser le comportement alimentaire, les traits cognitifs et leurs relations avec le BMI chez les porteurs des CNVs 16p11.2. Cette étude a démontré que la réponse anormale à la satiété contribue fortement au déséquilibre énergétique chez les porteurs de la délétion 16p11.2. Une altération de la sensation de satiété chez les enfants précède à l'augmentation du BMI observée à l'adolescence (Maillard *et al.*, 2016). En 2017 une analyse a été menée par Macé *et al.*, afin d'augmenter le nombre d'associations robustes entre les CNVs rares et les traits humains complexes à partir d'une méta-analyse de données de GWAS. L'association des réarrangements de la région au phénotype miroir du BMI a été confirmée. En 2018, un patient porteur de la délétion de la région 16p11.2 BP4-BP5 a été identifié grâce à la technique CMA « Chromosomal Microarray Analysis » sur 279 patients présentant le phénotype de l'obésité (D'Angelo *et al.*, 2018). Une autre étude menée plus récemment a montré que les CNVs détectés sur la région 16p11.2 peuvent expliquer le phénotype de la déficience intellectuelle et / ou de l'autisme avec une altération grave du BMI de 1,6% de la cohorte analysée (680 enfants). Cette recherche démontre la prévalence élevée de cette étiologie. De plus, cette même étude suggère également que le gène *KCTD13* parmi l'ensemble des gènes OMIM (Base de données génétique « Online Mendelian Inheritance in Man ») identifiés dans la région chromosomique est éventuellement responsable du phénotype du BMI observé (Gimeno-Ferrer *et al.*, 2019).

En global, les délétions et duplications de la région chromosomique 16p11.2 BP4-BP5 sont considérées comme étant un facteur de risque dans l'apparition des troubles neurodéveloppementaux incluant l'ASD, l'ID, l'épilepsie, l'ASDH, les troubles du langage, la schizophrénie et les troubles bipolaires. Ces réarrangements ont été également liés aux phénotypes du volume crânien et le BMI de manière opposée : la macrocéphalie et l'obésité pour la délétion et la microcéphalie et l'insuffisance pondérale pour la duplication suggérant que la région 16p11.2 pourrait contenir des gènes sensibles au dosage génétique responsables des phénotypes associés à ces mutations. Cependant l'interprétation clinique du locus 16p11.2 est problématique à cause de plusieurs raisons. Premièrement, les CNVs associées à cette région sont rares et il est généralement nécessaire d'analyser des échantillons extrêmement volumineux. En deuxième lieu, l'identification des gènes présents dans l'intervalle génétique responsables des phénotypes observés est toujours un défi à cause de la grande densité génétique de la région, spécifiquement 34 gènes codants pour ~600 kb. Finalement, on observe souvent des variations considérables de l'expressivité phénotypique, ainsi une même lésion génétique peut déclencher différents troubles ou anomalies.

3. Le biais sexuel dans les troubles neurodéveloppementaux

Les troubles neurodéveloppementaux tels que l'autisme et les déficiences intellectuelles présentent une différence de fréquence de diagnostic entre les sexes et sont plus fréquents chez les hommes (Scott *et al.*, 2002; Gillberg *et al.*, 2006; Ropers *et al.*, 2008). Diverses hypothèses ont été proposées afin d'expliquer ce biais sexuel chez l'humain. Parmi elles, nous voudrions souligner la théorie « Empathie-Systématisation », selon laquelle les différences psychologiques sexuelles reflètent un renforcement de la systématisation chez le mâle et un renforcement de l'empathie chez la femelle. Et dans le cadre des ASD, cette théorie a une extension dénommée « cerveau mâle extrême » selon laquelle les individus sont caractérisés par des déficiences de l'empathie avec une systématisation intacte ou augmentée (Baron-Cohen *et al.*, 2005). Une constatation clé qui appuie cette prédiction est que les garçons ont en moyenne une taille cérébrale plus grande que les filles (Gilmore *et al.*, 2007) et que les enfants autistes présentent un cerveau encore plus grand (Courchesne *et al.*, 2011). Deux mécanismes plausibles pouvant donner lieu à un dimorphisme sexuel, une hyper-masculinisation et / ou à l'absence de dimorphisme sexuel typique au niveau du cerveau, de la cognition et du comportement sont les effets de la testostérone fœtale sur les domaines sociaux et des facteurs génétiques liés au chromosome X ou au chromosome Y (Baron-Cohen *et al.*, 2011).

En 2015 une étude a connecté les données cliniques incluant les indications du diagnostic et l'historique familial, avec les données génomiques de divers CNVs chez 32.155 personnes présentant des traits autistes et des caractères d'ID afin d'évaluer systématiquement ce biais. Les résultats de cette analyse montrent un rapport 1,3 : 1 homme : femme entre les individus autistes et un rapport 1,6 : 1 homme : femme parmi les individus avec l'ID portant la délétion 16p11.2 (Figure 10) (Polyak *et al.*, 2015).

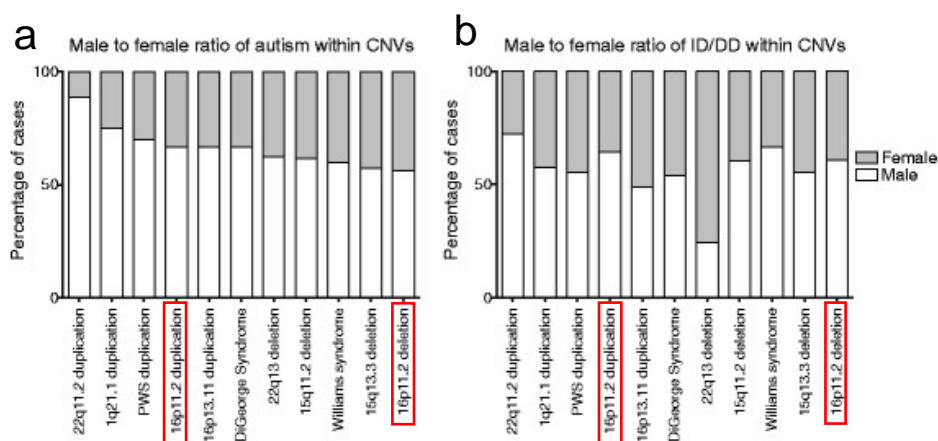


Figure 10 : Rapport femelle : mâle pour les patients atteints d'autisme ou d'ID / DD (« Developmental Disabilities ») porteurs des CNVs spécifiques

Les graphiques représentent le pourcentage de cas de femmes (gris) et de mâles (blanc) porteurs des CNVs génétiques avec l'autisme (gauche) ou l'ID / DD (droite). Les CNVs pour la duplication et délétion 16p11.2 sont signalés en rouge (Tiré de Polyak *et al.*, 2015).

4. Anomalies cérébrales associées aux CNVs 16p11.2

Le phénotype du volume crânien lié à la délétion ou à la duplication de la région chromosomique BP4-BP5 de ~600 kb a suggéré aux chercheurs que ces réarrangements pourraient avoir également un effet pathogène sur la morphologie du cerveau.

En 2014, une analyse clinique d'un groupe constitué de 25 porteurs de la délétion, 17 porteurs de la duplication et 62 témoins d'âge similaire a montré l'apparition des phénotypes opposés de la taille cérébrale chez les porteurs des deux réarrangements. Spécifiquement, la délétion fut associée à une augmentation de la taille du cerveau alors que la duplication fut associée à une diminution de la taille cérébrale. Ces phénotypes étaient étendus à partir des mesures globales du volume intracrânien et des mesures compartimentales de la matière grise et de la substance blanche des structures sous-corticales incluant l'hippocampe et le cervelet. Quantitativement, l'effet le plus important a été retrouvé sur le thalamus, bien que les résultats collectifs suggèrent un effet généralisé. De plus, il a été détecté un effet important du dosage génétique de la région 16p11.2 pour les mesures de la matière grise présente dans la surface corticale (Qureshi *et al.*, 2014).

En 2015, une autre analyse a été menée dans le but d'étudier les structures anatomiques cérébrales et les mécanismes cellulaires responsables des troubles neuropsychiatriques associés aux réarrangements 16p11.2. Cette approche de neuro-imagerie a vérifié la corrélation négative entre le nombre de copies génomiques de la région 16p11.2 et le volume de matière grise (GM pour « Gray Matter ») ainsi que l'intégrité de la substance blanche (WM pour « White Matter ») dans les régions cortico-souscorticales (Figure 11). Ces zones affectées sont impliquées dans le système de récompense, le langage et la cognition sociale (Maillard *et al.*, 2015).

En 2016, Steinman *et al.*, ont réalisé une étude de caractérisation neurologique à partir d'une grande cohorte formée par 136 porteurs de la délétion 16p11.2 BP4-BP5 et 110 porteurs de la duplication réciproque. Le phénotype associé à la délétion englobait une augmentation de la taille de la tête / macrocéphalie ainsi qu'une malformation de l'amygdale cérébelleuse (la malformation de Chiari I). Alors que le phénotype associé à la duplication correspondait à une diminution de la taille de la tête / microcéphalie, des anomalies volumétriques de la substance blanche et du corps calleux cérébral ainsi qu'une hypertrophie ventriculaire. En outre, des malformations corporelles et des troubles neuro psychiatriques tels que l'épilepsie ou des anomalies d'articulation, ont été retrouvés chez les patients porteurs des deux réarrangements.

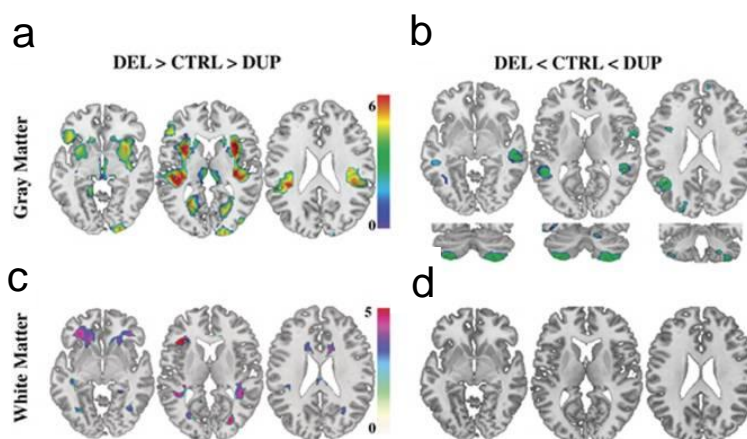


Figure 11 : Effets des variations du nombre de copies de la région chromosomique 16p11.2 sur le volume cérébral local et certaines régions du cerveau

Les résultats des analyses « Voxel-based Whole-brain General Linear » montrent :

- Une corrélation négative entre le dosage des gènes de la région (DEL > CTRL > DUP) et le volume de la GM dans le striatum ventral, le thalamus, la région temporale supérieure, le gyrus fusiforme, le précuneus, le cortex insulaire et la scissure calcarine bilatéralement ainsi que la région occipitale droite.
- Une corrélation positive entre le nombre de copies de la région (DEL < CTRL < DUP) et le volume de la GM dans le gyrus temporal moyen et les lobules cérébelleux.
- L'effet négatif du dosage génétique de la région sur le volume de la WM dans les projections fronto-striatales et certaines régions du thalamus.
- L'absence d'altérations du volume de la WM à cause de l'effet positif du dosage génétique du locus 16p11.2. Les barres de couleur représentent les scores T. DEL : individus porteurs de la délétion; CTRL : individus témoin intrafamiliaux ; DUP : patients porteurs de la duplication. GM : matière grise; WM : substance blanche (Adapté de Maillard *et al.*, 2015).

Dans une étude postérieure, une analyse a été réalisée à partir de la technique d'imagerie par résonance magnétique (MRI pour « Magnetic Resonance Imaging ») sur deux cohortes porteuses des CNVs 16p11.2 avec des témoins familiaux ou non apparentés, comprenant un total de 361 participants. Les résultats montraient une corrélation négative entre le nombre de copies de l'intervalle génétique et la taille du cortex insulaire (délétion > témoin > duplication). En plus, des autres régions étaient affectées par ces réarrangements. En particulier, les auteurs ont retrouvé des altérations dans la taille de la scissure calcarine, du gyrus temporal transverse (délétion > témoin), du gyrus temporal moyen et supérieur (délétion < témoin), du noyau caudé et de l'hippocampe (duplication < témoin). Cependant, dans cette étude les auteurs ne pouvaient pas démontrer la corrélation entre ces altérations de l'anatomie du cerveau et la présence de troubles neuropsychiatriques. Cette recherche suggère que la combinaison d'autres facteurs pourrait être fondamentale pour le développement de ces troubles (Martin-Brevet *et al.*, 2018).

Néanmoins une étude récente a proposé une hypothèse selon laquelle la neurophysiologie anormale du cortex décrite précédemment pour l'haplo-insuffisance des gènes de la région pourrait être liée à certains troubles du comportement associés à la délétion. Cette analyse a été menée à partir d'images magnéto-encéphalographiques. Les résultats montraient une augmentation de l'activité du réseau du cortex sensorimoteur chez

les porteurs de la délétion par rapport aux individus avec un développement typique et aux porteurs de la duplication. Les auteurs ont démontré que cette hyperactivité neurale était le résultat d'une augmentation de la modulation des oscillations bêta associée à des altérations de la parole et du contrôle moteur manuel (Hinkley *et al.*, 2019).

VII. L'intervalle génétique 16p11.2 BP4-BP5

1. Des études du transcriptome humain

Jusqu'à ce point du manuscrit, nous avons décrit l'association pertinente des CNVs 16p11.2 à divers troubles neurodéveloppementaux et certains phénotypes anatomiques. Cependant, il est également essentiel d'expliquer l'impact de ces variations structurales sur l'expression des gènes de la région. Cette connaissance nous permettra d'identifier des gènes candidats responsables des phénotypes observés et de comprendre l'impact fonctionnel des variations structurales 16p11.2 sur le neuro-développement des patients affectés.

Afin de découvrir quels gènes sont dérégulés à l'intérieur ou à proximité de la région 16p11.2 ou s'il existe une signature d'expression commune pour les réarrangements 16p11.2, plusieurs recherches ont été menées. En particulier, une étude a utilisé l'intégration de l'expression et les données génomiques des lymphoblastes (en substitution du tissu cérébral très rare) de patients porteurs de la délétion et la duplication (Luo *et al.*, 2012). L'analyse a montré une corrélation positive significative entre le niveau d'expression génétique et le nombre de copies de la région. De plus, les résultats ont signalé des gènes présentant des altérations plus consistantes. Spécifiquement, il s'agit des loci *KCTD13* (« Potassium Channel Tetramerisation Domain Containing 13 »), *ALDOA* (« Aldolase A, Fructose-bisphosphate ») et *MAZ* (« MYC-Associated Zinc Finger Protein »). Ces gènes sont impliqués dans le métabolisme synaptique, la libération de neurotransmetteurs et la différenciation neuronale. En outre, la même étude a démontré une corrélation significative entre le volume crânien et l'expression de plusieurs gènes de la région chromosomique. *TAOK2* est l'un de ces loci qui a montré la plus grande corrélation. Ce gène interagit avec une voie impliquée dans le contrôle de la survie, la prolifération et la différenciation des cellules composant le système nerveux central et périphérique.

En 2014, une autre étude a confirmé la variation de l'expression de tous les gènes de la région en fonction du nombre de copies d'ADN, en absence des preuves de compensation du dosage. Cette analyse a utilisé le séquençage de l'ARN des lignées de lymphoblastes de 34 membres de 7 familles porteurs des CNVs 16p11.2 avec les ASD et du cortex cérébral de modèles murins. Les auteurs ont suggéré également que l'altération de l'expression génétique de la région 16p11.2 perturbe des autres gènes impliqués dans des voies de signalisation associées aux ASD. Cette perturbation pourrait apparaître à cause d'une combinaison d'effets régulateurs indirects et directs sur l'architecture nucléaire. La recherche suggère un chevauchement des mécanismes cellulaires causant de la pathogenèse (Blumenthal *et al.*, 2014).

Une étude plus récente a évalué l'effet du dosage des gènes du locus 16p11.2 sur l'expression génétique du profil transcriptomique des cellules lymphoblastoïdes (Kusenda *et al.*, 2015). Bien que l'effet des changements du dosage génétique de la région ne soit pas très évident dans cette lignée cellulaire, ce type de cellules a été sélectionné en raison de la facilité d'obtention d'échantillons de sang. L'analyse a été menée à partir de patients porteurs de la délétion (6), la duplication (15) et des témoins (15). En plus de la confirmation de la corrélation entre le nombre de copies et l'expression génétique, les auteurs ont constaté les effets du dosage génétique les plus importants pour les gènes *HIRIP3*, *KIF22* et *KCTD13* et la corrélation relative entre l'expression génétique et le phénotype avec la tête la plus grande pour *SULT1A3 / 4*, *IMAA* et *KCTD13*.

L'implication de plusieurs gènes dans les phénotypes liés aux réarrangements 16p11.2 est cohérente avec une publication récente qui démontre la modulation des anomalies du développement neurologique associées à la délétion de 16p11.2 par des interactions entre les gènes de la région sur le modèle de *Drosophila melanogaster* (Iyer *et al.*, 2018).

Toutes les études citées démontrent une corrélation entre le nombre de copies de l'intervalle génétique 16p11.2 BP4-BP5 et l'expression des gènes de la région et certaines recherches remarquent la présence des gènes candidats à partir de l'analyse du transcriptome des cellules lymphoblastoïdes. Cependant, l'ampliation de la recherche à partir des études utilisant directement des cellules neuronales ou des modèles animaux est nécessaire afin d'élucider les voies de signalisation qui influencent le développement du cerveau affecté par cette altération génétique.

2. Gènes de la région

Afin de comprendre comment les modifications de l'expression génétique de l'intervalle 16p11.2 déclenchent des troubles neurocognitifs chez l'homme, il est nécessaire de connaître la fonction des gènes présents dans la région. Dans cette partie du manuscrit, nous nous centrerons sur la description des gènes candidats connue à partir des résultats des études génétiques chez l'humain, les modèles animaux et des études réalisées à partir des cultures cellulaires.

Le gène *QPRT* (« Quinolate Phosphoribosyltransferase ») code pour une enzyme liée au métabolisme du tryptophane qui utilise le quinolate comme substrat. Le quinolate est un intermédiaire dans la voie de synthèse *de novo* du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) à partir du tryptophane (la voie de la kynurénine). Cette molécule agit comme une excitotoxine endogène puissante grâce à l'hyperstimulation du récepteur N-méthyl D-aspartate dans les neurones (Guillemin *et al.*, 2007). L'élévation des niveaux de quinolate dans le cerveau humain pourrait être considérée comme responsable de la pathogenèse des troubles neurodégénératifs et des crises épileptiques (Nemeth *et al.*, 2005). En outre, la réduction de QPRT provoque une altération de la différenciation neuronale *in vitro* des cellules SH-SY5Y affectant la complexité des neurites. Cette protéine contrôle également la régulation des gènes et des réseaux génétiques impliqués dans le

développement du cortex préfrontal dorsolatéral, de l'hippocampe et de l'amygdale, précédemment associé aux ASD (Haslinger *et al.*, 2018).

Le gène *KIF22* (« Kinesin-like DNA-binding Protein ») code pour un moteur moléculaire de liaison aux microtubules et à l'ADN, important pour l'alignement (Santamaria *et al.*, 2008) et le compactage (Ohsugi *et al.*, 2008) des chromosomes pendant la division cellulaire. Bien que *KIF22* n'a jamais été associé aux troubles neurodéveloppementaux, ce gène pourrait être nécessaire pour la formation de progéniteurs neuraux (Blaker-Lee *et al.*, 2012).

Le produit du gène *MAZ* (« Myc-associated Zinc Finger Protein ») renforce l'activité des sous-unités de type 1 du récepteur NMDA au cours de la différenciation neuronale (Okamoto *et al.*, 2002).

Le gène *PRRT2* (« Proline-rich Transmembrane Protein 2 ») code pour une protéine transmembranaire associée à la suppression de la croissance cellulaire. De plus, cette molécule interagit avec la protéine SNAP25 impliquée dans la fusion de vésicules synaptiques et la libération de neurotransmetteurs (Jarvis et Zamponi, 2005). En outre, certaines études ont suggéré une implication du gène dans la modulation fonctionnelle de canaux ioniques et son association aux phénotypes épileptiques (Chen *et al.*, 2011, Lee *et al.*, 2012; Michetti *et al.* 2017; Vlaskamp *et al.*, 2019).

Le gène *MVP* (« Major Vault Protein ») code pour le composant majeur du complexe Vault. Cette structure de ribonucléoprotéines à multi-sous-unités est impliquée dans le transport nucléo-cytoplasmique de l'ARN. De plus, MVP est une protéine d'échafaudage qui régule partiellement la voie MAPK / ERK grâce à l'interaction avec Shp2 (Berger *et al.*, 2009; Kolli *et al.*, 2004). La voie de signalisation ERK a un rôle important dans la prolifération cellulaire et ce mécanisme se trouve impliqué dans les fonctions neuronales, comprenant la plasticité synaptique et la consolidation de la mémoire à long terme (Sweatt *et al.*, 2004). L'haplo-insuffisance du gène *MVP* provoque une activation excessive de la voie ERK / MAPK. Cette hyperactivation est associée à des anomalies de la corticogenèse dues à des altérations de la dynamique du cycle cellulaire de la population des progéniteurs neuraux (Pucilowska *et al.*, 2015). Pourtant, il est probable que plusieurs gènes de la région 16p11.2 convergent sur la voie ERK. A ce jour, l'implication du gène *MVP* dans les mécanismes pathophysiologiques affectés dans les syndromes 16p11.2 reste encore inconnue.

Le gène *SEZ6L2* (« Seizure related 6 homolog (mouse)-Like2 ») code pour une protéine de membrane type 1 qui contient les domaines du complément C1r / C1s, Uegf et Bmp1 (CUB) et le domaine de la protéine de contrôle du complément (CCP) (Miyazaki *et al.*, 2006). Les protéines contenant ces domaines constituent une famille de protéines capables de moduler la localisation ou la fonction des récepteurs des neurotransmetteurs (Nakayama *et al.*, 2011). *SEZ6L2* est l'une des sous-unités auxiliaires du récepteur AMPA et agit comme une protéine d'échafaudage pour lier GluR1 à Adducin (ADD). De plus, la surexpression de *Sez6l2* régule positivement la phosphorylation d'ADD, alors que sa régulation négative empêche la phosphorylation d'ADD, en suggérant que *Sez6l2* module la transduction du signal AMPA-ADD (Yaguchi *et al.*, 2017). *SEZ6L2* sert également de récepteur qui permet le tri de la cathepsine D en endosomes et le clivage protéolytique de *SEZ6L2* par la cathepsine D pourrait être impliqué dans la modulation de la différenciation neuronale (Boonen *et al.*, 2016). Ce locus a été considéré comme un gène candidat pour les ASD en raison de son

niveau élevé d'expression dans le cerveau, spécifiquement dans l'hippocampe, le cortex cérébelleux, l'amygdale et le thalamus et à cause de l'importante identité de séquence avec le gène SRPX2 (pour « Sushi-repeat-containing protein, X-linked »), dont les mutations provoquent de l'épilepsie et des troubles du langage (Roll et al., 2006). En outre, le SNP R386H du gène est associé aux ASD (Kumar et al., 2009).

KCTD13 (« Potassium Channel Tetramerization Domain containin 13 ») est l'un des gènes de l'intervalle dont nous disposons plus d'information. Il code pour la protéine PDIP1 (pour « Polymerase Delta-Interacting Protein 1 ») interagissant avec PCNA (pour « Proliferating Cell Nuclear Antigen ») qui est le facteur de processivité de l'ADN polymérase delta. PCNA est impliqué dans la régulation du cycle cellulaire durant la neuro-genèse en régulant la réplication de l'ADN (He et al., 2001). Ce gène a été identifié comme le principal responsable de l'apparition d'anomalies neuro-anatomiques similaires aux humains chez le poisson zèbre (Golzio et al., 2012). En plus, ces résultats soulignent l'importance de *Kctd13* pour la prolifération cellulaire des neurones dans les cerveaux de poisson zèbre et de souris en développement. Cependant, contrairement à ces études, des autres recherches plus récentes n'ont pas détecté ce phénotype chez le poisson zèbre ni chez la souris lorsque le locus *Kctd13* a été inactivé sur ces modèles animaux (Escamilla et al., 2017). De nouvelles analyses chez la souris indiquent que des modifications du dosage de *Kctd13* et des gènes *Mvp* ou *Lat* (pour « Linker for Activation of T cell ») pourraient avoir des effets épistatiques sur le volume de l'hippocampe et le striatum (Arbogast et al., 2019).

Une autre étude pertinente a identifié KCTD13 comme un adaptateur de la protéine Cullin-3 permettant l'ubiquitination et la dégradation de la protéine RHOA, une petite protéine GTPase régulatrice du cytosquelette d'actine et essentielle dans le développement neuronal et la fonction synaptique (Figure 12) (Chen et al., 2009; Gladwyn-Ng et al., 2016; Lin et al., 2015).

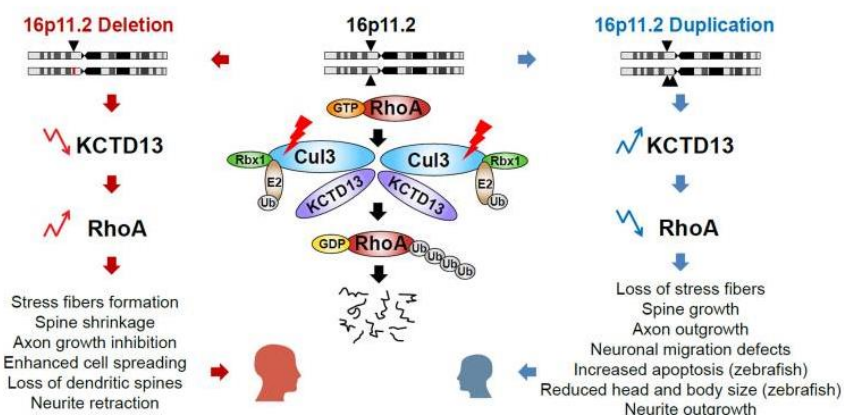


Figure 12. La voie KCTD13-Cul3-RHOA

Hypothèse proposée selon laquelle la voie de signalisation RHOA / ROCK pourrait être affectée par des modifications de la formation du complexe Cul3-KCTD13 chez des individus porteurs des CNVs 16p11.2. L'altération des niveaux de RHOA par une diminution ou une augmentation des niveaux de KCTD13 chez les individus porteurs de la délétion (gauche) ou duplication (droite) peut avoir des conséquences fonctionnelles opposées pendant le développement du cerveau provoquant des phénotypes du volume crânien (Adapté de Lin et al., 2015).

La protéine RHOA intervient dans l'activation de la kinase Rho (ROCK), ce qui entraîne la phosphorylation de la sous-unité de liaison de la myosine MYPT-1 (« Myosin phosphatase target subunit 1 ») de la phosphatase MLCP (« Myosin-light-chain phosphatase »), ce qui la rend inactive, préservant ainsi la phosphorylation de MLC (« Myosin Light Chain ») et maintenant les contractions musculaires (Figure 13) (Wirth., 2010). Dans les cellules neuronales RHOA contrôle la dynamique du cytosquelette en modulant ainsi la plasticité synaptique.

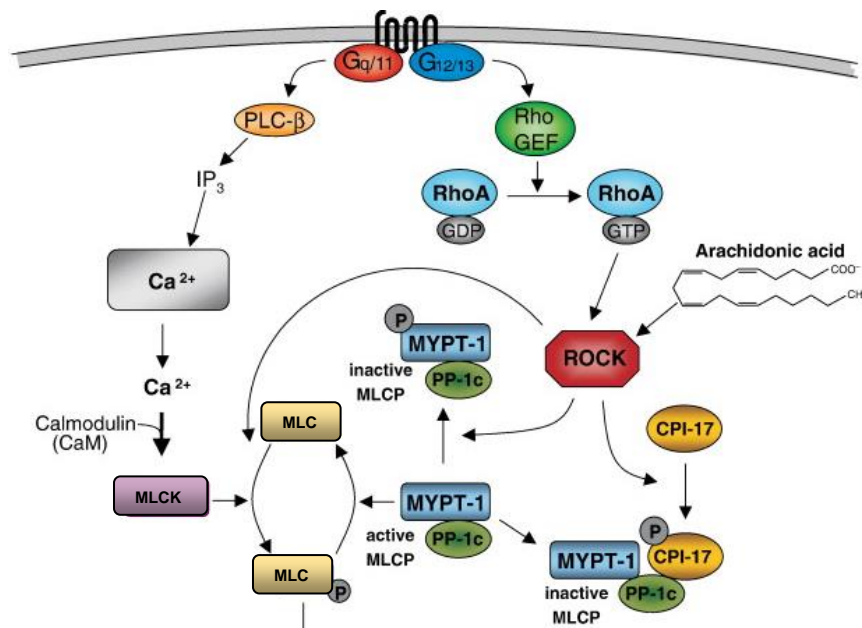


Figure 13. Voie de signalisation ROCK / RHOA dans les cellules du muscle lisse

Le contrôle du cytosquelette d'actine des cellules musculaires lisses est principalement déterminé par le niveau de phosphorylation de MLC, régulé par les deux enzymes myosine : MLCK et MLCP. MLCP est contrôlée par l'activation de la voie RHOA / ROCK (Adapté de Wirth., 2010).

La perturbation des niveaux de RHOA à cause de l'inactivation de *Kctd13* entraîne la perte d'épines dendritiques et une réduction de la transmission synaptique dans l'hippocampe d'un modèle de souris (Figure14) (Escamilla *et al.*, 2017). Cependant, l'analyse d'un autre modèle de souris a montré des altérations de la densité des épines dendritiques et des déficits de mémoire de reconnaissance associés à l'inactivation du gène, mais l'absence de changements détectables dans les niveaux d'expression de RHOA. Pourtant, les analyses d'ARN-seq des profils d'expression génique du cortex et de l'hippocampe de ce modèle ont révélé des voies de signalisation altérées essentielles au développement neurologique comprenant la formation synaptique (Arbogast *et al.*, 2019). Le rôle mécaniste de RHOA dans les syndromes 16p11.2 reste toujours à explorer.

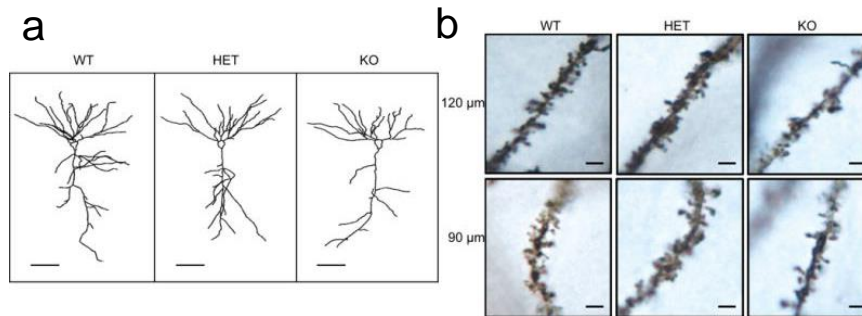


Figure 14. Effet de l'inactivation du gène *Kctd13* sur la longueur dendritique, la ramification et la densité de l'épine dendritique des neurones pyramidaux CA1

- Représentation des tracés dendritiques des neurones pyramidaux chez les souris témoins (WT), déficients pour *Kctd13* hétérozygotes (HET) et déficients pour *Kctd13* homozygotes (KO). La barre d'échelle équivaut à 50 µm.
- Images neuronales de la technique de Golgi ; La barre d'échelle équivaut à 2 µm (Adapté de Escamilla *et al.*, 2017).

Le gène *TAOK2* (« Thousand-And-One-amino acid Kinase 2 ») code pour une protéine kinase sérine / thréonine qui active les molécules MAPK, des protéines kinases activées par le mitogène (Moore *et al.*, 2000) et régule la transcription génétique. Le produit de *TAOK2* interagit avec Neuropilin 1, impliqué dans le guidage axonal et l'arborisation dendritique (Chen *et al.*, 2014) et il est impliqué dans l'assemblage synaptique et la signalisation (Betancur *et al.*, 2009). De plus, son implication a été démontrée dans la formation dendritique à partir du contrôle de l'activation de la protéine JNK 1 (« c-Jun N-terminal kinase 1 ») dans des cultures neuronales de souris où le gène a été réprimé ou surexprimé (de Anda *et al.*, 2012). Des études récentes sur des modèles murins ont montré que l'altération de l'activité de *TAOK2* entraîne des troubles de la cognition, de l'anxiété et des interactions sociales. Ce modèle présentait également des phénotypes de la taille du cerveau et de la connectivité neuronale dans plusieurs régions, des altérations dans la stratification corticale, des altérations dans la formation des dendrites et de la synapse et une réduction de la neurotransmission excitatrice. En plus, l'inactivation du gène était associée à une réduction de l'activation de RHOA et l'amélioration pharmacologique de l'activité de RHOA normalisait les phénotypes synaptiques (Richter *et al.*, 2019). Ces résultats montrent l'implication d'un autre gène de la région 16p11.2 dans la régulation de la voie de signalisation RHOA / ROCK.

Le produit du gène *DOC2A* (« Double C2-like domains Alpha ») est une protéine cytoplasmique principalement exprimée dans le cerveau qui se lie à des phospholipides en présence de calcium (Kojima *et al.*, 1996). Il est impliqué dans la libération de neurotransmetteurs et dans le développement du système nerveux, la transmission synaptique, l'exocytose des vésicules de sécrétion et le transport cellulaire (Duncan *et al.* 2000; Groffen *et al.*, 2006). Bien que le rôle de *DOC2A* dans l'épilepsie et le développement humain ne soit pas clair, les souris porteuses de la délétion du gène présentent des

altérations de la transmission synaptique et des déficits d'apprentissage et de comportement (Sakaguchi *et al.*, 1999).

Le gène *ALDOA* code pour une enzyme glycolytique qui catalyse la conversion du fructose-1,6-bisphosphate en glycéraldéhyde-3-phosphate et dihydroxyacétone phosphate. Ce rôle est essentiel pour la glycolyse et l'équilibre énergétique, ce qui est important pour le métabolisme synaptique et la libération des neurotransmetteurs (Pellerin *et al.*, 2010). Plusieurs autres fonctions ont été attribuées à *ALDOA*, notamment l'inhibition de la phospholipase D2, la liaison au cytosquelette et l'activité RNase (Canete-Soler *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2002; Kusakabe *et al.*, 1997). *ALDOA* est également un régulateur partiel de la voie de signalisation MAPK / ERK (von Kriegsheim *et al.*, 2009). En outre, un cas présentant un retard mental (Beutler *et al.*, 1973), et un autre patient avec une microcéphalie et un retard de langage (Kreuder *et al.*, 1996) ont été associés à des mutations ponctuelles et à une activité réduite de l'*ALDOA*. De plus, l'expression d'*ALDOA* est régulée positivement dans le cortex des personnes atteintes de schizophrénie et de dépression (Beasley *et al.*, 2006). *ALDOA* a été identifié comme partenaire de liaison de la protéine SHANK3 associée aux ASD grâce à une étude d'interactions protéiques (Sakai *et al.*, 2011), ainsi que dans le cadre d'une étude impliquant des complexes de signalisation postsynaptiques à l'ASD (Kirov *et al.*, 2012).

Le gène *TB6X* (« T-box 6 gene ») code pour un facteur de transcription impliqué dans la formation du mésoderme (Papapetrou *et al.*, 1999; Takemoto *et al.*, 2011; Yasuhiko *et al.*, 2008). Les études de génétique humaine ont impliqué ce gène dans le phénotype des malformations vertébrales associées à la délétion 16p11.2 (Shen *et al.*, 2011 ; Shimojima *et al.*, 2009) ainsi que dans la syringomyélie associée aux deux réarrangements 16p11.2. En plus, le modèle murin homozygote pour l'allèle mutant de *Tbx6* est inviable et ses embryons sont dépourvus de somites du tronc, ils ont des malformations de la queue et des tubes neuronaux pliés (Chapman et Papaioannou, 1998). Une autre analyse a montré que *Tbx6* est associé à des fusions des côtes, des fusions de la colonne vertébrale et à des irrégularités du corps vertébral chez les souris homozygotes (Watabe-Rudolph *et al.*, 2002).

Le gène *MAPK3* (« Mitogen-Activated Kinase 3 ») ou ERK1 (« Extracellular signal-Regulated Kinase 1 ») code pour une protéine sérine / thréonine kinase impliquée dans la voie Ras / MAPK. Cette voie de signalisation est contrôlée partiellement par les gènes de la région *ALDOA*, *MVP* et *TAOK2* et est impliquée dans l'angiogenèse, la régulation, la différenciation, la migration, la prolifération et la survie cellulaire. Certains modèles animaux nous ont apporté des informations sur le rôle de cette voie de signalisation dans le développement neurologique. Précisément, à partir du modèle de la souris il a été démontré l'exigence de cette voie pour la formation du néocortex et les effets généraux sur l'excitabilité corticale des neurones pyramidaux. Un autre modèle murin pour la délétion de la région entière 16p11.2 a montré une signalisation ERK accrue pouvant contribuer à la cytoarchitecture corticale anormale, la taille cérébrale plus petite, le comportement anormal de type anxieux et l'hyperactivité associés à ce modèle (Pucilowska *et al.*, 2015). En outre, il a été suggéré un rôle essentiel de la protéine MAPK3 dans la formation correcte de l'architecture synaptique en régulant le ciblage précis des axones présynaptiques sur les cibles post-synaptiques appropriées dans les jonctions neuromusculaires larvaires de

Drosophile. Cette étape peut être modifiée de manière significative dans le cas de l'ASD (Park *et al.*, 2017).

Comme nous avons mentionné précédemment l'étude et la compréhension des syndromes 16p11.2 est encore complexe et incomplète à cause de la grande variabilité phénotypique de pénétrance incomplète que l'on trouve entre les patients affectés ainsi que la grande densité génétique de la région. La plupart des gènes décrits dans cette partie du manuscrit sont exprimés dans le cerveau et ont un rôle potentiel dans le développement neurologique. Bien qu'aucune mutation spécifique de la plupart de ces gènes n'ait été associée à une pathologie humaine, une petite délétion de 118 kb comprenant les gènes *MVP*, *CDIPT*, *SEZ6L2*, *ASPH1* et *KCTD13* a été identifiée dans une famille de trois générations en ségrégation avec l'ASD (Crepel *et al.*, 2011). Cette étude signale le rôle potentiel clé de ces 5 gènes dans le développement de ce trouble neuropsychiatrique associée aux syndromes 16p11.2 BP4-BP5.

VIII. La modélisation des CNVs 16p11.2 BP4-BP5

1. Les modèles murins

En parallèle aux études de génétique humaine les modèles animaux ont été développés afin de faciliter la compréhension de la relation entre le génotype et le phénotype. L'utilisation de souris comme organismes modèles pour l'étude de la biologie humaine est basée sur les similitudes du point de vue génétique, moléculaire et physiologique entre les deux espèces. Dans le cadre génétique, plus de 90% du génome humain et du génome murin peuvent être divisés en régions correspondantes de synténie conservées (segments d'ADN pour lesquels la séquence génique du plus récent ancêtre commun est conservée entre deux espèces) et environ 80% des gènes de la souris ont leur séquence génétique homologue dans le génome humain (Waterson *et al.*, 2002). Dans le contexte comportemental, ces rongeurs développent des comportements d'anxiété, d'apprentissage et de mémoire, des instincts sociaux ainsi que des autres réactions émotionnelles. Cette caractéristique a encouragé son utilisation dans des études visant à imiter les réponses comportementales humaines dans des conditions physiologiques ou pathologiques associées à des troubles neuropsychiatriques. Dans ces études, des lignées pures et consanguines sont souvent utilisées, c'est-à-dire des modèles de souris homozygotes à tous les locus de leur génome. Ce fond génétique permet d'obtenir une reproductibilité d'un animal à l'autre et évite des altérations à cause des différences génétiques. En plus, il est essentiel de maintenir les conditions environnementales strictement contrôlées afin d'éviter que le comportement des animaux puisse être altéré.

L'édition du matériel génétique murin pour générer des délétions et des duplications d'une taille variable nous a permis la modélisation des syndromes de variations du nombre de copies génétiques (Brault *et al.*, 2006). En outre, les modèles de souris permettent d'étudier l'action d'un gène particulier dans la biochimie et la physiologie d'un organisme à

travers des techniques comme l'insertion de cassettes de piégeage (Skarnes *et al.*, 2011) ou des techniques plus récentes telles que CRISPR / Cas9 (Birling *et al.*, 2017). De plus, l'inactivation génétique permet la compréhension de mécanismes biomoléculaires déclencheurs des phénotypes spécifiques et le développement des futures thérapies précliniques pouvant être utilisées chez l'homme et contribuer à améliorer la vie des patients.

Des autres modèles animaux ont été également générés et développés parce qu'ils présentent certaines avantages par rapport à la souris comme dans le cas particulier de l'espèce du rat. En ce qui concerne au domaine comportemental pour l'étude des désordres du neuro développement, les rats sont plus intelligents que les souris et performant mieux dans les tests d'apprentissage, de mémoire et de dépendance (Ellenbroek et Youn, 2016). Les rats présentent également un instinct social plus important que les souris, ce qui permet d'évaluer des troubles du comportement et l'interaction sociale associés aux traits autistiques humains. Ces rongeurs présentaient aussi des comportements sophistiqués très surprenants tels que l'empathie. En outre, les rats sont plus dociles, ce qui facilite leur manipulation et évite leur stress. De plus, ils ont une taille plus grande ce qui facilite les chirurgies et permet d'obtenir de plus grands volumes d'échantillons.

La publication du génome de rat en 2004 (Gibbs *et al.* 2004) et la disponibilité d'outils d'édition de gènes ont permis la création de quelques modèles de rats transgéniques, principalement destinés à la recherche en neurobiologie. En 2017, une étude sur le syndrome de Phelan-McDermid (Harony-Nicolas *et al.* 2017) associé à des traits autistiques, de graves retards de langage, des déficits de l'attention et une déficience intellectuelle en présence d'une mutation du gène *SHANK-3* a utilisé un modèle de rat déficient pour la protéine SHANK-3. Cette recherche a permis le développement d'un traitement pour les patients atteints de ce syndrome à base d'ocytocine.

Effectivement, la modélisation murine des principaux syndromes des CNVs associés à l'ID, l'ASD et des autres désordres neuropsychiatriques ont abouti à l'observation des altérations cognitives et du comportement associées à la symptomatique humaine et offrent des perspectives très importantes pour la santé humaine.

2. Les modèles de souris pour les réarrangements 16p11.2

La région de synténie 16p11.2 BP4-BP5 a été retrouvée sur le chromosome 7F3 de la souris (Figure16). Les premiers modèles de souris des réarrangements 16p11.2 BP4-BP5 porteurs de la délétion et la duplication de la région *Six1b-Sept1* ont été caractérisés en 2011 afin de vérifier si la région 16p11.2 contient des gènes sensibles au dosage génétique responsables des phénotypes observés (Horev *et al.*, 2011). L'analyse comportementale de ces rongeurs maintenus sur un fond hybride B6N129Sv porteurs de la délétion a révélé un faible taux de survie, un faible poids corporel, une hyperactivité dans la cage d'hébergement ainsi que dans les tests de champs ouvert et l'activité circadienne, une stéréotypie d'escalade et une descente inhabituelle du plafond de la cage chez certains individus (Brunner *et al.*, 2015; Horev *et al.*, 2011). Ces souris ont montré également des déficits dans le test de

conditionnement à la peur, le test d'évitement passif et la reconnaissance d'objet. Cependant, une sociabilité normale et une préférence pour la nouveauté sociale ont été observées chez ces souris dans le test de préférence sociale à trois chambres (Brunner *et al*, 2015; Pucilowska *et al*, 2015; Tian *et al*, 2015). Alors que la caractérisation des animaux porteurs de la duplication a révélé uniquement une hypoactivité locomotrice en test d'activité circadienne. Les auteurs ont également observé des augmentations du volume de certaines régions cérébrales pour les animaux porteurs de la délétion et des observations opposées pour les porteurs de la duplication (Horev *et al.*, 2011). L'intervalle *Slx1b-Sept1* ciblé inclut 4 gènes (*Cd2bp2*, *Tbc1d10b*, *Mylpf* et *Sept1*) qui ne sont pas associés à la région de syntenie humaine 16p11.2 BP4-BP5. Ceci induit donc un biais dans la modélisation de la pathologie humaine.

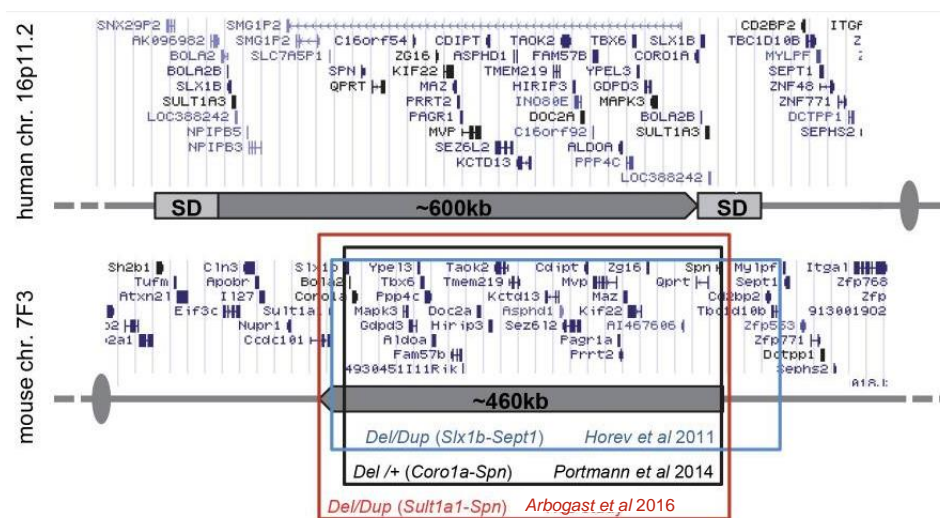


Figure 15. Les modèles de souris pour les réarrangements 16p11.2

Dans la partie supérieure de l'image on trouve l'intervalle génétique 16p11.2 BP4-BP5 associé à la pathologie humaine. Dans la partie inférieure de la figure on trouve la région de syntenie placée dans la région 7F3 du chromosome de la souris ainsi que les modèles de souris pour les CNVs 16p11.2 développés dans les études précédentes (Adapté de Arbogast *et al.*, 2016).

En 2014 un deuxième modèle de souris pour la délétion de la région 16p11.2 *Coro1a-Spn* sur un fond hybride B6N129Mo a été créé (Portmann *et al.*, 2014). Sa caractérisation a montré des altérations neuronales et volumétriques des ganglions de la base, un faible taux de survie, un poids corporel faible, ainsi que des phénotypes comportementaux incluant une hyperactivité locomotrice, un déficit dans la mémoire de reconnaissance d'objets et la mémoire de reconnaissance de localisation d'objets et une incapacité à nager dans la piscine de Morris. Les comportements sociaux étaient normaux à la fois dans le test de sociabilité à trois chambres et dans le test d'interactions sociales réciproques juvéniles. Cependant, ce modèle montrait des altérations dans les interactions sociales réciproques entre mâles et femelles et les vocalisations ultrasonores ainsi que l'absence de réponse à des stimulus sonores (Portmann *et al*, 2014; Yang *et al*, 2015). Pourtant les auteurs ont indiqué que les

animaux mutants présentait une surdité sévère d'origine indéterminée qui pourrait affecter aux phénotypes observés.

Finalement, des modèles pour la délétion et duplication de la région 16p11.2 *Sult1a1-Spn*, correspondant à la région synténique BP4-BP5 humaine, ont été créés par notre laboratoire en 2016 (Arbogast *et al.*, 2016). L'analyse de ces modèles a montré une diminution du poids et de l'adipogenèse, une hyperactivité locomotrice, une présence de comportements répétitifs et un déficit de la mémoire de reconnaissance d'objets chez les souris porteuses de la délétion. Par contre, les souris porteuses de la duplication ont montré des phénotypes opposés incluant une augmentation du poids et de l'adipogenèse, une hypoactivité locomotrice et une amélioration de la mémoire de reconnaissance d'objets. Des déficits de l'interaction sociale ont été aussi identifiés pour la délétion et la duplication sur un fond hybride B6NC3B (Table1).

	<i>Del/+</i> B6N129Sv Horev et al.	<i>Dup/+</i> B6N129Sv Horev et al.	<i>Del/+</i> B6N129Mo Portmann et al.	<i>Del/+</i> B6N Arbogast et al.	<i>Dup/+</i> B6N Arbogast et al.	<i>Del/+</i> B6NC3B Arbogast et al.	<i>Dup/+</i> B6NC3B Arbogast et al.
Activité circadienne							
Activité en champs ouvert							
Stéréotypie							
Mémoire de reconnaissance							
Interactions sociales			Mâle-femelle				
Préférence sociale							
Conditionnement à la peur							

Tableau 1: Carte récapitulative comportementale des phénotypes observés sur les modèles de souris portant des délétions et des duplications des intervalles génétiques *Slx1b-Sept1*, *Coro1a-Spn*, et *Sult1a1-Spn* sur des fonds génétiques hybrides et consanguins

Les carrés verts indiquent la présence d'un phénotype significativement supérieur chez les mutants par rapport aux animaux témoins. Les carrés rouges indiquent un phénotype significativement inférieur chez les mutants par rapport aux souris témoins. Les carrés gris indiquent l'absence d'anomalies. Finalement, les carrés blancs indiquent que le phénotype n'a pas été analysé. (Adapté de Arbogast *et al.*, 2016).

IX. Projet de recherche

Le travail de recherche exposé dans ce manuscrit vise à comprendre et atténuer les conséquences de la délétion et de la duplication de la région 16p11.2. Ainsi nous avons entrepris cinq études présentées en différents chapitres afin d'identifier des gènes candidats et des mécanismes moléculaires impliqués dans la physiopathologie, dans le but ultime de développer des stratégies thérapeutiques pour aider à améliorer les capacités cognitives et les relations sociales des patients. Nous avons focalisé notre attention sur une plus petite délétion de 118-kb englobant cinq gènes de la région *MVP*, *CDIPT*, *SEZ6L2*, *ASPHD1* et *KCTD13* qui avait été identifiée dans une famille de trois générations avec l'ASD

(Crepel *et al.*, 2011), mettant en évidence un rôle clé de ces cinq gènes dans les caractéristiques neuro psychiatriques associées. Dans ces recherches nous avons utilisé deux modèles animaux différents: la souris et le rat.

Grâce aux études précédentes décrites dans les sections antérieures, actuellement nous avons pu acquérir des connaissances très utiles par rapport à certains gènes de l'intervalle génétique 16p11.2. Afin d'identifier des mécanismes impliqués dans le développement neural comme étant des déterminants potentiels des phénotypes associés aux CNVs 16p11.2, nous avons développé deux approches pharmacologiques.

La première étude de ces approches pharmacologiques inclut l'inhibition pharmacologique de la voie de signalisation RHOA / ROCK dépendante de l'interaction entre KCTD13 et CULLIN sur les modèles *Kctd13*^{+/-} et 16p11.2 *Del/+* (Arbogast *et al.*, 2016). La connaissance des fonctions importantes de la voie de signalisation de RHOA GTPase, a permis de proposer que des variations du dosage de *KCTD13*, comme résultat des réarrangements de la région chromosomique 16p11.2 BP4-BP5, ont un impact fonctionnel dans la morphogenèse du cerveau et la migration cellulaire, à cause de la dérégulation de la voie RHOA / ROCK. Cette hypothèse a été confirmée grâce aux résultats récents qui montrent une réduction de la transmission synaptique dans l'hippocampe de souris déficientes pour *Kctd13*, comme conséquence de l'augmentation de la protéine RHOA (Escamilla *et al.*, 2018). Cependant, le rôle mécaniste de RHOA dans les syndromes 16p11.2 reste toujours incompris. Pour cette raison nous avons décidé d'évaluer l'implication de la voie RHOA, régulée par KCTD13, dans les phénotypes associés aux syndromes 16p11.2. Avec cet objectif, nous avons étudié les effets thérapeutiques de l'inactivation de la voie de signalisation RHOA / ROCK par l'administration chronique de la drogue fasudil (HA1077), un inhibiteur de la protéine kinase Rho (ROCK) sur le modèle de souris porteur de la délétion du gène *Kctd13*, ainsi que sur le modèle correspondant à la délétion de la région complète 16p11.2 BP4-BP5.

Cette étude est présentée sous la forme d'un manuscrit intitulé: « Targeting the RHOA pathway through fasudil treatment improve learning and memory phenotypes in *Kctd13* and 16p11.2 deletion mouse models » ; Sandra MARTIN LORENZO, Marie Christine BIRLING, Claire CHEVALIER, Yann HERAULT.

La deuxième approche pharmacologique inclut une étude multicentrique de validation de l'effet de l'arbaclofen sur le modèle 16p11.2 *Del/+*. Avant cette recherche, il a été suggéré la possibilité d'un certain chevauchement entre les mécanismes de la physiopathologie du syndrome de la microdélétion 16p11.2 et du syndrome de l'X fragile (Tian *et al.*, 2015). Des améliorations dans la symptomatologie associée au syndrome de l'X fragile et l'autisme idiopathique, ont été observées après un traitement chronique avec la drogue arbaclofen, un agoniste sélectif du récepteur GABA-β (Henderson *et al.*, 2012; Veenstra-VanderWeele *et al.*, 2017). Ces données soulèvent la possibilité intrigante que l'arbaclofen puisse être bénéfique pour le syndrome de délétion 16p11.2. Nous avons donc décidé de participer à une étude multicentrique avec 3 laboratoires indépendants travaillant sur 3 modèles

différents de la délétion 16p11.2 pour confirmer l'action de l'arbaclofen sur le comportement et l'apprentissage.

Cette étude n'est pas présentée dans ce travail de recherche car les résultats des 3 laboratoires sont en cours de regroupement sous la forme d'un manuscrit.

Ensuite, le modèle de souris a été également utilisé pour continuer à décrypter le rôle de certains gènes de la région 16p11.2 dans les phénotypes comportementaux associés à la délétion de l'intervalle génétique. Nous avons étudié particulièrement deux gènes candidates de la région *MVP-KCTD13*: *Mvp* et *Sez6l2*.

A cette fin nous avons sélectionné des mutations nulles affectant chacun des 2 gènes chez la souris sur un fond génétique pure. Ensuite, nous avons conduit une étude phénotypique de l'impact de ces mutations à l'état hétérozygote sur des animaux de 12 semaines. Notre analyse est basée sur les phénotypes observés chez les souris mâles porteuses de la délétion 16p11.2 *Sult1a1-Spn* (Arbogast *et al.*, 2016) correspondant à la région synténique BP4-BP5 humaine. Le protocole de caractérisation comportementale a évalué l'activité, le comportement répétitif et les phénotypes d'apprentissage et de mémoire. Cette recherche nous permettra de comprendre l'implication de ces loci dans l'apparition des anomalies cognitives à cause de ce réarrangement génétique. Notre étude permettra également de cibler les mécanismes moléculaires régulés directement ou indirectement par ces gènes associés aux désordres neuropsychiatriques et aux anomalies congénitales identifiées chez les patients.

Le prochain chapitre décrit la modélisation des syndromes de variation du nombre de copies de la région 16p11.2 chez le rat. Afin de générer un modèle des réarrangements 16p11.2 plus relevant pour l'autisme, nous avons développé des modèles de délétion et de duplication de la région homologue à l'intervalle génétique humain 16p11.2 chez le rat, un animal plus sociable que la souris. Les gènes de la région 16p11.2 BP4-BP5 sont hautement conservés sur le chromosome 1 du rat.

Ces modèles de rats ont été créés sur la lignée hybride Sprague-Dawley (SD) non consanguin, afin de mieux comprendre la variabilité (pénétrance et expressivité) des phénotypes associés à ces syndromes chez les patients. Pour déchiffrer plus en détail les fonctions cognitives spécifiques et les traits autistiques sur les modèles de rat 16p11.2, nous avons mené une caractérisation phénotypique chez le mâle et la femelle à partir d'un protocole basé sur les tests où les modèles de souris montraient des phénotypes robustes: l'augmentation de l'activité dans le test de champ ouvert, les déficits dans la mémoire de reconnaissance et l'interaction sociale.

Cette étude est présentée sous la forme d'un manuscrit intitulé « Sexual dimorphism in rat models of 16p11.2 deletion and duplication syndromes » ; Sandra MARTIN LORENZO, Valérie NALESSO, Séverine MENORET, Jean-Paul CONCORDET, Ignacio ANEGO, Yann HERAULT.

En parallèle nous avons contribué avec nos modèles de rat, à une analyse phénotypique multi-espèces des malformations craniofaciales induites par les CNVs de la région 16p11.2. Cet étude est également présentée sous la forme d'un manuscrit accepté pour le journal «

Cell Reports » : intitulé: « Oligogenic effects of 16p11.2 copy number variation on craniofacial development » ; Yuqi QIU, Thomas ARBOGAST, Sandra MARTIN LORENZO, Hongying LI, Shih C. TANG, Ellen RICHARDSON, Oanh HONG, Shawn CHO, Omar SHANTA, Timothy PANG, Christina CORSELLO, Curtis K. DEUTSCH, Claire CHEVALIER, Erica E. DAVIS, Lilia M. IAKOUCHEVA, Yann HERAULT, Nicholas KATSANIS, Karen MESSER, Jonathan SEBAT.

La grande différence d'expressivité phénotypique observée entre le sexe masculin et le sexe féminin sur le modèle de rat nous a motivé à évaluer la modélisation de la délétion de la région 16p11.2 pour le sexe féminin chez la souris. La dernière partie de ce travail de recherche décrit la caractérisation comportementale du modèle de souris *Del/+* 16p11.2 BP4-BP5 *Sult1a1-Spn* chez la femelle afin de vérifier la robustesse des phénotypes associés à la modélisation de la délétion 16p11.2 pour les 2 sexes. Considérant le biais sexuel par rapport aux désordres neurocognitifs associés aux réarrangements 16p11.2 chez l'humain ainsi que les différences entre les sexes dans l'impact de la délétion sur la signalisation intracellulaire dans le cerveau et les phénotypes d'apprentissage chez la souris (Grissom *et al.*, 2017), nous avons développé un protocole de caractérisation pour ce sexe. Ce protocole est basé sur les phénotypes observés chez les souris mâles porteurs de la délétion 16p11.2 *Sult1a1-Spn*. Le modèle féminin sur un fond consanguin B6N a été analysé pour les phénotypes de l'activité locomotrice en champ ouvert, l'activité circadienne, la présence des comportements répétitifs et la mémoire de reconnaissance d'objets.

Partie 1

Etude de l'inhibition pharmacologique
de la voie de signalisation RHOA/ROCK
dépendante de l'interaction entre
KCTD13 et CULLIN sur les modèles
16p11.2 *Del/+* et *Kctd13^{+/-}*

Introduction

Malgré les progrès accomplis par rapport à la compréhension de la corrélation entre les modifications génétiques 16p11.2 et les anomalies phénotypiques chez les patients affectés et les organismes modèles, certaines questions restent à élucider. En particulier, les régions spécifiques du cerveau, les périodes de développement, le rôle spécifique de chaque gène et leur implication individuelle dans les désordres associés aux CNVs 16p11.2, ainsi que les voies de signalisation impactées par ces réarrangements restent inconnus.

Les systèmes modèles du poisson zèbre et de la souris sont présentés comme une aide pour comprendre les contributions individuelles des nombreux gènes présents dans la région 16p11.2 aux syndromes de délétion / duplication du locus. Spécifiquement, les résultats de la modification individuelle de l'expression de chacun des gènes chez des embryons de poisson zèbre ont identifié un seul gène, *KCTD13*, capable d'induire des phénotypes anatomiques observés chez l'humain (Golzio *et al.*, 2012).

L'importance de *KCTD13* pour la prolifération cellulaire a été confirmée dans des cerveaux des souris en développement. Contrairement à ces études, des autres recherches n'ont pas détecté d'augmentation de la taille du cerveau ou de la neurogenèse chez la souris ou le poisson zèbre lorsque le locus *Kctd13* entier a été supprimé sur ces modèles animaux (Escamilla *et al.*, 2017). La différence entre ces deux lignes de données peut être due à des mécanismes de compensation différents entre la technique d'inactivation du gène et la suppression génétique, des différences phénotypiques possibles entre l'inactivation de *Kctd13* dans seulement un sous-ensemble de progéniteurs neuronaux et la suppression génétique complète du locus, ou bien des contributions d'autres gènes situés à l'intérieur ou ailleurs de l'intervalle 16p11.2.

Des études récentes suggèrent que des modifications dans le dosage de *Kctd13* et des gènes *Lat* ou *Mvp*, placé aussi dans la région 16p11.2, pourraient avoir des effets épistatiques sur la taille du cerveau (Arbogast *et al.*, 2019).

Avant ce travail de recherche, il a été rapporté que la protéine *KCTD13* interagit physiquement avec la protéine CULLIN3 dans la couche corticale interne quatre chez l'humain. Cette union forme un complexe qui permet l'ubiquitination et la régulation des niveaux de la protéine RHOA (Lin *et al.*, 2015). RHOA est une petite GTPase qui intervient dans l'activation de la kinase Rho (ROCK), ce qui entraîne la phosphorylation de la sous-unité de liaison de la myosine MYPT-1 (« Myosin phosphatase target subunit 1 ») de la phosphatase MLCP (« Myosin-light-chain phosphatase »), ce qui la rend inactive, préservant ainsi la phosphorylation de MLC (« Myosin Light Chain ») et maintenant les contractions musculaires (Wirth., 2010). La connaissance des fonctions importantes de la voie de signalisation de RHOA GTPase, ont permis de proposer que des variations du dosage de *KCTD13*, résultantes des réarrangements de la région 16p11.2 BP4-BP5, ont un impact fonctionnel dans la morphogenèse du cerveau et la migration cellulaire, à cause de la dérégulation de la voie RHOA / ROCK. Cette hypothèse a été confirmée grâce à des études

récentes qui montrent la perte d'épines dendritiques et la réduction de la transmission synaptique dans la région CA1 de l'hippocampe des souris déficientes pour *Kctd13*, comme conséquence de l'augmentation de la protéine RHOA. Dans ce cas, la délétion complète du gène *Kctd13* n'induisait pas de déficits de mémoire de reconnaissance chez la souris (Escamilla *et al.*, 2018). Cependant, une autre modèle de souris pour la délétion de l'exon 2 de *Kctd13*, et donc l'inactivation du gène, présentait des altérations de la densité des épines dendritiques et des déficits de mémoire de reconnaissance, mais en absence de changements détectables sur les niveaux d'expression de RHOA. Pourtant, les analyses d'ARN-seq des profils d'expression génique du cortex et de l'hippocampe de ce modèle ont révélé des voies de signalisation altérées essentielles pour le développement neurologique, incluant la formation synaptique (Arbogast *et al.*, 2019).

La compréhension des mécanismes physiopathologiques sous-jacents aux CNVs 16p11.2 nous a motivé à évaluer l'implication de la voie RHOA / ROCK dans les phénotypes associés aux syndromes 16p11.2. Avec cet objectif, nous avons décidé d'étudier les effets thérapeutiques de l'administration chronique de la drogue fasudil (HA1077), un inhibiteur de la kinase Rho (ROCK) sur le modèle de souris pour la délétion du gène *Kctd13*, ainsi que sur le modèle pour la délétion de la région complète 16p11.2 BP4- BP5 (Arbogast *et al.*, 2016). Notre étude a montré que le traitement chronique par le fasudil de souris adultes parvient à rétablir la mémoire de reconnaissance chez deux modèles de souris, portant l'inactivation hétérozygote de *Kctd13* ou la délétion de la région *Sult1a1-Spn1* (Arbogast *et al.*, 2016). Ces résultats confirment la cible KCTD13 et valide la voie RHOA / ROCK comme voie d'intervention pour réduire certains déficits de mémoire associés au syndrome de délétion de la région 16p11.2.

Targeting the RHOA pathway through fasudil treatment improve learning and memory phenotypes in *Kctd13* and 16p11.2 deletion mouse models.

Authors

Sandra MARTIN LORENZO¹, Valérie NALESSO¹, Claire CHEVALIER¹, Marie Christine BIRLING², and Yann HERAULT^{1,2,*}.

Affiliations

¹ Université de Strasbourg, CNRS, INSERM, Institut de Génétique Biologie Moléculaire et Cellulaire, IGBMC - UMR 7104 - Inserm U1258, 1 rue Laurent Fries, 67404 ILLKIRCH cedex

² Université de Strasbourg, CNRS, INSERM, CELPHEDIA-PHENOMIN-ICS, Institut Clinique de la Souris, 1 rue Laurent Fries, 67404 ILLKIRCH cedex

*Corresponding author: Yann HERAULT, herault@igbmc.fr

Keywords: Copy number variation, neurodevelopment, intellectual disability, autism spectrum disorders, KCTD13, mouse model, recognition memory.

Running title: Therapeutic effects of fasudil in *Kctd13* and 16p11.2 deficient mouse models.

ABSTRACT

Copy number variants have an important role in the appearance of neurodevelopmental disorders. Particularly, the deletion of 16p11.2 locus is found in patients with autism spectrum disorders, intellectual disability and several other features. Previous studies highlight the implication of *Kctd13* genetic imbalance in the 16p11.2 deletion through the regulation of RHOA pathway. Thus, we decided to target this RHOA pathway to rescue the cognitive phenotypes found in 16p11.2 mouse models. We used a chronic administration of fasudil (HA1077), an inhibitor of the Rho-associated protein kinase (ROCK), in the mouse model with a heterozygous inactivation of *Kctd13*, and in the model carrying the deletion of the entire region 16p11.2 BP4-BP5 and we focus our attention on the most robust cognitive phenotypes affecting the novel object recognition. Our results showed that a chronic fasudil treatment can restore the object recognition memory in both mouse models. These findings confirm the KCTD13 as a target for the 16p11.2 deletion and the involvement of the RHOA / ROCK pathway dysregulation in cognitive deficits linked to 16p11.2 CNV.

INTRODUCTION

Genetic copy number variants (CNV) of the 16p11.2 locus are an important risk factor for multiple neurodevelopmental disorders^{1,2,3}. The most recurrent 16p11.2 rearrangements, deletion and reciprocal duplication, induces intellectual disability (ID)⁴ and Autism Spectrum Disorder (ASD)^{5,6,7,8}. In addition, they are associated with other neuropsychiatric disorders, such as epilepsy⁹, attention deficit / hyperactivity disorder¹⁰, schizophrenia and bipolar trouble¹¹. Body mass index phenotypes and abnormal head size have also been reported in these 16p11.2 mutation^{9,10,12,13,14}.

The most frequent event of the 16p11.2 CNVs corresponds to the genetic interval between *SULT1A1* and *SPN1* encompassing 600 kb and 32 genes. A study conducted in 2011 found a microdeletion of the 118 kb *MVP-KCTD13* region inside the 16p11.2 genetic interval, segregating with ASD in a family of three generations¹⁵, highlighting a potential key role of these genes in the neuropsychiatric syndrome linked to this mutation.

The modelling of the 16p11.2 rearrangements, through animal models, supplies some mechanism supporting the human genetic data. Indeed, three mouse models have been developed carrying deletion of the 16p11.2 homologous genetic interval and they shared common phenotypes with hyperactivity, repetitive behaviors, and deficits in spatial or recognition object memory^{16,17,18}.

To find the specific brain regions, developmental periods, networks and pathways impacted by the 16p11.2 deletion, several studies have been carried out. In particular, the development of dynamic spatio-temporal networks of 16p11.2 genes, by integrating data from brain developmental transcriptome with physical interactions of 16p11.2 proteins, allowed to elucidate the role of *KCTD13* as protein that complexes with CULLIN 3 (*Cul3*) ubiquitin ligase regulating the Ras homolog family, member A (*RHOA*) protein levels¹⁹. The known important functions of Rho GTPase signaling pathway in brain morphogenesis at early stages of brain development, allowed to propose that *KCTD13* dosage changes in 16p11.2 deletion or duplication carriers may influence *RHOA* levels and lead to impaired brain morphogenesis and cell migration during fetal stages of brain development¹⁹. This hypothesis agrees with precedent studies in which it was demonstrated that *KCTD13* is implicated in abnormal brain size associated to 16p11.2 CNVs in zebrafish²⁰.

Based on these findings, *Kctd13*^{+/-} mouse model showed a reduction of the functional synapses number, due to a diminution of dendritic length, complexity and dendritic spine density by increasing levels of *RHOA*²¹. This alteration was reversed by *RHOA* inhibition with rhosin, which present the potential role of *RHOA* as therapeutic target. Also, recent studies revealed dendritic spine maturation alterations of hippocampal pyramidal neurons in another *Kctd13*^{+/-} mouse model²². This model also presented a deficit in recognition and location memory, in the same paradigm with two objects as previously observed in the 16p11.2 *Del/+* mouse model^{16,17,18} whereas the recognition deficit was not observed in

another paradigm with 3 objects²¹. Surprisingly, in the last case this deficit did not seem to be related to a change in RHOA protein level.

Despite intense investigations, how the level of KCTD13 can regulates the RHOA signaling pathway, as well as its implication in the phenotypes associated with the 16p11.2 CNVs remain unclear. Thus, we decided to explore the role of *Kctd13* by engineering a third knock-out with CRISPR / Cas9 and we characterized the novel heterozygous mouse model and compared its outcome with the 16p11.2 deletion.

Furthermore, the integration of all the previous studies let us to hypothesis that the functional of 16p11.2 deletion may lead to an over-activation of the KCTD13-CUL3-dependent RHOA pathway. So, if we assume that the RHOA / ROCK pathway over-activation causes some behavioural and learning alterations in the 16p11.2 deletion, inhibiting this pathway should improve the *Kctd13*^{+/-} and the 16p11.2 *Del/+* associated phenotypes. We decided therefore, to treat our mice with fasudil (HA1077), an inhibitor of the RHOA / ROCK pathway that we already used to reverse the behavioral impairments of the Oligophrenin-1 mouse model of intellectual disability²⁶. Thus we planned first to characterize the behavior phenotypes of the new *Kctd13* haploinsufficient model and to compare the outcome with the 16p11.2 *Del/+* mice. Then we set up a chronic administration of fasudil (HA1077) in adult *Kctd13*^{+/-} and 16p11.2 *Del/+* 18 mice and evaluate the behavior of the treated versus the non-treated animals. This evaluation was carried out based on a phenotypic analysis, focusing on open field activity and object memory (both location and recognition) and additional molecular analysis of key elements linked to the RHOA pathway.

MATERIALS AND METHODS

Mouse lines, genotyping and ethical statement

Two mouse models were used in the study. The 16p11.2 mouse model corresponds to the *Del(7Sult1a1-Spn)6Yah* mouse model¹⁸, previously described and noted here *Del/+*. The line was maintained on a pure C57BL/6N inbred genetic background. The deletion allele was identified by PCR using primers Fwd1 (5'-CCTGTGTGTATTCTCAGCCTCAGGATG-3') and Rev2 (5'-GGACACACAGGAGAGCTATCCAGGTC-3') to detect a specific band of 500 bp while the wild-type allele was identified using Fwd1 and Rev1 (5'-GGACACACAGGAGAGCTATCCAGGTC-3') primers to detect the presence of a 330 bp fragment. PCR program was: 95 °C / 5 min; 35× (95 °C / 30 s, 65 °C / 30 s, 70 °C / 1 min), 70 °C / 5 min.

The *Kctd13*^{Yah1} knock out mice was generated by the CRISPR / Cas9 technology²³. Two pairs of sgRNAs, one pair located upstream and the other pair downstream of the target region, were selected to delete the exon 3 and 4 of the gene. Both pairs of sgRNAs (showing a cut) and Cas9 mRNA were microinjected in fertilized eggs of superovulated sexually immature female C57BL/6 N mice (4–5 weeks olds). Injected embryos cultured *in vitro* were implanted into the oviducts of pseudo-pregnant females.

The deletion of *Kctd13* (*Kctd13*^{+/-}) was confirmed by PCR using primers Ef (5'-ACCTCTTAGCTGGGCATGCTAAATT-3') and Xr (5'-AGCCTATGCTAACTATTATCACAGG-3') and the sequence of the deleted fragment. PCR reaction gave deletion and wild-type products of 429 and 668 bp long respectively. PCR program was: 94°C / 5 min, 35 X (94°C / 30 sec; 60°C / 30 sec; 72°C / 30 sec), 72°C / 5 min. This set of primer were also used for genotyping.

Experimental procedures for the use of animals for research were approved by the Ministry of National Education, Superior Learning and Research and with the agreement of the local ethical committee Com'Eth (n° 17) under the accreditation number APAFIS#3590-2016011510199843 v4 with YH as the principal investigator (accreditation 67-369).

Chronic fasudil treatment

In this study, we developed a protocol for a pre-clinical treatment with the tolerated drug fasudil hydrochloride or HA1077 (F4660, LC laboratories Boston, MA, USA). At weaning, control littermate of heterozygous male mice from the *Kctd13* or the *Del/+* lines were collected from several litters and housed in groups of 4-2 individuals in ventilated cages (Green Line, Techniplast, Italy), where they had free access to water and diet (D04 chow diet, Safe, Augy, France). Animal bedding (Litiere peuplier AB 3 autoclavable, AniBed, Pontvallain, France) were changed once a week. At 11 weeks old animals were transferred from the animal facility to the phenotyping area. The constant temperature was kept at 21±2 °C, and the light cycle was controlled as 12 h light and 12 h dark (lights on at 7 am).

Three independent cohorts of mice for each line at 12 weeks old were subjected to a battery of behavioral tests (see below) for 2 weeks. Then, 14 weeks old mice were randomly divided into 2 groups, one treated with fasudil administrated orally *ad libitum* in drinking water (100mg/kg/day) and a second with no treatment. Four weeks after the start of the treatment 18 weeks old mice underwent again the same battery of behavioral tests (see below) and were kept under the same treatment condition (Figure 1). The experiments were conducted blindly for genotype information to the animal caretakers and investigators as recommended by the ARRIVE guidelines^{24,25}. A second batch of three independent cohorts were processed similarly but without behavior test for the molecular analysis of the hippocampal region from treated and non-treated mice. In this case, treated animals started directly the fasudil treatment at 12 weeks old during 6 weeks. Samples were quickly recovered from 18 weeks old mice after euthanasia by cervical dislocation and snap frozen for subsequent molecular analyses.

Behavioral analysis

Three behavior tests were used to evaluate the exploration activity in the open field test, and the learning and memory in the novel object location and the novel object recognition tasks in mice¹⁸.

For the open-field (OF) mice were tested in automated open field (44.3 x 44.3 x 16.8 cm) made of PVC with transparent walls and a black floor, and covered with translucent PVC (Panlab, Barcelona, Spain). The arena was divided into central and peripheral regions and homogeneously illuminated at 150 Lux. Each mouse was placed on the periphery of the open field and allowed to explore the apparatus freely for 30 min. During each session we could measure the total distance travelled, evaluate the habituation of the animal over time, by splitting the data in 10-minute intervals and assess the vertical activity through the number of rears.

The novel object location (NOL) memory task was carried out in an open field arena as previously described. In the first day, mice were habituated to the arena for 30 min at 150 Lux. On the following day, animals were submitted to the first 10-min acquisition trial during which they were individually presented to 2 similar objects A (cylinder). Each object was placed 10 cm away from each one of the corners on the north side of the box. The exploration time of objects A (when the animal's snout was directed towards the object at a distance ≤ 1 cm) was recorded. Minimum exploration time was set to 3 s, and mice that did not reach this criterion were excluded from the study. A 10-min retention trial (second trial) was conducted 5 min later, when one of the familiar objects was displaced to a novel location (B) on the south side and the exploration time (t) of the two objects was recorded for 10 min. In this session, minimum exploration time was set also to 3 s, and mice that did not reach this criterion were excluded from the study. The recognition index (RI) was defined as $(t_B / (t_A + t_B) \times 100)$. A RI of 50% corresponds to chance level and a significantly higher RI reflects good novel object location memory.

The novel object recognition (NOR) memory task is based on the innate preference of rodents to explore novelty. The test was performed in a circular open field of PVC white with opaque walls and floor of 30 cm high and 50 cm diameter. On the first and second days, each mouse was habituated to the arena for 15 minutes at 60 Lux. The following day, we started the NOR sessions. First, each animal was individually submitted to a 10 minutes acquisition trial during which occurs the presentation of two identical objects A (marble or dice) placed at the northeast or northwest of the open field arena. The exploration time of both objects A was recorded. 3 hours later (retention delay in home cages), a 10 minutes retention trial (second trial) was performed. One of the identical object A was changed for other novel object B at the same position. The exploration time of the two objects (familiar object and novel object) was recorded. The recognition index (RI) was defined as $(tB / (tA + tB) \times 100)$. A RI of 50% corresponds to chance level and a significantly higher RI reflects good recognition memory. All mice that did not explore the objects for more than 3 seconds during the acquisition trial or the retention trial were excluded from the analysis.

Western blot

Fresh hippocampal tissue was isolated by rapid decapitation/dissection of tested mice and snap frozen. Then, it was lysed in ice-cold sonication buffer supplemented with Complete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche). Individual samples were disaggregated, centrifuged at 4°C for 30 minutes at 14000 rpm, diluted in 4 X Laemmli sample buffer containing β -mercaptoethanol (Bio-Rad), and incubated at 95 °C for 5 min. Protein concentration was determined by Pierce™ BCA Protein Assay Kit (23225, ThermoScientific). Samples was diluted with sample buffer such that 30 μ g of protein were loaded per lane onto 15% polyacrylamide gel. Gels were run and then transferred to nitrocellulose membranes by Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (BioRad) through MIXED MW Bio-Rad Preprogrammed Protocol. Then they were blocked in 5% BSA, 1 X Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20 (TBS-T) and incubated with primary antibody during 10 minutes. Membranes were washed in TBS-T followed by a 10 minutes secondary antibody incubation using GOXRB HRP AFFINITY (A16096, Invitrogen) at 2:10,000 through SNAP i.d.® 2.0 Protein Detection System (C73105, Merck). This apparatus has a vacuum-driven technology and a built-in flow distributor that actively drive reagents through the membrane.

Total levels of RHOA protein and Myosin Light Chain phosphorylation by Myosin Light Chain Kinase via RHOA pathway were analysed using Western Blot. Proteins were visualized with Amersham™ Imager 600. Signals were quantified using ImageJ and analysed using Microsoft Excel and GraphPad Prism. We used the primary antibodies: RHOA (2117, Cell Signaling, USA, 1:1,000) and pMLC (Thr18/Ser19 #3674, Cell signaling, Boston, MA, USA, 1:1,000). The ratio of protein or phosphorylation densities against control β -actin protein (monoclonal Anti- β -Actin–Peroxidase antibody produced in mouse (A3854 Sigma)) was normalized to untreated wt sample mean.

Statistical analysis

The statistical analysis was carried out using standard statistical procedure operated by Sigma Plot software (Starcom Information Technology Ltd, Bangalore, INDIA). All outliers were identified using the Grubbs' test from calculator GraphPad (GraphPad Software, San Diego). Acquired data from pre-treatment behavioral characterization of *Kctd13*^{+/-} and 16p11.2 *Del*/⁺ mouse models were analyzed through the Student t-test. One sample t-test were used to compare recognition index values to the set chance level (50%). Data from post-treatment behavioral phenotyping of both genetic lines were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test whenever data presented normal distribution and equal variance. Otherwise, we used the non-parametric Kruskal-Wallis one-way analysis of variance and Mann-Whitney *U* test. One sample t-test were used also to compare recognition index values to the set chance level (50%). Data from western blot technique were analyzed using the Kruskal-Wallis one-way analysis of variance test between groups followed by Mann-Whitney *U* test or Student t-test depending of data distribution. Data are represented as the mean \pm SEM and the significant threshold was $p < 0.05$.

RESULTS

Phenotypic characterization of the new *Kctd13*^{+/-} mouse model and comparison with the 16p11.2 *Del/+* mouse model

We created a new *Kctd13* KO mouse model with the deletion of exon 3 and 4, and we evaluated its behavior in three tasks and compared the results obtained with the characterization of 16p11.2 *Del/+* model (Figure 2). First, we did not observe significant differences in the open field test, when we measured the total distance travelled by *Kctd13*^{+/-} mice compared to wt littermates. This result was different from the phenotype of the *Del/+* mice. Indeed *Del/+* mutant mice were more active with a significant increase in the distance travelled compared to their wt littermate. Then, we analyzed the distance travelled in 5-minute intervals, in order to detect the habituation to a new environment during the test. We found that the *Kctd13* mutant mice experience a similar habituation to the control individuals. Here too, significant difference was observed in the 16p11.2 *Del/+* carrier mice compared to their wild-type littermates. Finally, we evaluated the vertical activity with the numbers of rears, and we did not observe any significant differences in the two lines.

Then we analyzed the memory for the location of objects (Figure 3). For this test, animals must distinguish between an object whose position has been changed and an unmoved object presented previously, after a retention delay of 5 min. When comparing the recognition index of the novel location object to the level of chance (50%), we observed that both mutant mice, *Kctd13*^{+/-} and 16p11.2 *Del/+*, were not able to differentiate between the novel and familiar location compared to their respective wt littermates.

Finally, we investigated whether *Kctd13*^{+/-} mice could discriminate a novel object from a previously explored set of two objects after a retention delay of 3 hours in the NOR task. Whereas wt animals were able to differentiate objects showing a novel object preference, *Kctd13*^{+/-} mice were not able to discriminate the novel from the familiar object. The deficit was like the one observed in the 16p11.2 *Del/+* mice. Overall our behavioral analysis showed that the *Kctd13* haploinsufficiency in the pure C57BL/6N genetic background phenocopied the object location and recognition memory deficits observed in the 16p11.2 deletion model. However, the increased exploration activity found in the 16p11.2 *Del/+* mice was not observed in the *Kctd13*^{+/-} mutant mice.

Fasudil treatment reverses partially the cognitive impairment in the *Kctd13*^{+/-} and in the 16p11.2 *Del/+* mouse models

Thus, after the behavior characterization of the *Kctd13*^{+/-} and 16p11.2 *Del/+* mouse models, we subdivided both genotypes (wt and mutant) into two groups where individuals were randomly affected to one treated group with fasudil and a control group not treated for one month prior to further testing (Figure 1).

First, we noticed that the Fasudil treatment did not change the locomotor exploration activity since both genotypes maintained a total travelled distance. We also found a similar habituation to a new environment for the *Kctd13*^{+/-} individuals but the habituation was altered for the *Del/+* model. (Figure 4).

Then we performed the novel object location memory test (Figure 5 top). Interestingly, one month after the first phenotypic characterization, we remarked on this occasion that non treated *Kctd13*^{+/-} mice were able to differentiate between the novel and familiar located objects at 18 weeks of age. Nevertheless at the same age the non-treated and the treated 16p11.2 *Del/+* were impaired in the novel object location memory.

A week after, we found that the wt groups, treated and non-treated, as well as the fasudil-treated mutant, except non-treated *Kctd13*^{+/-}, showed recognition performance in the NOR memory test. This observation confirmed the altered recognition memory in mutants at 19 weeks, observed previously at 12 weeks, and demonstrated the protective effect of fasudil treatment in the *Kctd13*^{+/-} and the 16p11.2 *Del/+* models (Figure 5 bottom).

Molecular analyses of RHOA / ROCK signaling pathway in the *Kctd13*^{+/-} and the 16p11.2 *Del/+* mouse models

Then we checked whether the RHOA / ROCK signaling pathway was over-activated due to increased levels of RHOA protein because of the *Kctd13* deficit in both mouse models. In addition, we wanted to verify if the therapeutic effect of Fasudil on the behavioral phenotypes found in these models was due to the inhibition of the signaling pathway. For that purpose, total levels of RHOA protein as well as the phosphorylation of the Myosin Light Chain (MLC), a protein targeted by the RHOA/ROCK pathway, were quantified using Western Blot in *Kctd13*^{+/-} and 16p11.2 *Del/+*, with or without fasudil treatment in naïve mice (Figure 6).

In agreement with the paper of Arbogast *et al.*²² our mouse model for the deficiency of *Kctd13* did not show increased levels of RHOA in the hippocampal region at 18 weeks of age. As expected, the fasudil treatment did not modify RHOA expression levels (Figure 6). Nevertheless, this model showed an over activation of the RHOA / ROCK pathway with an increased MLC phosphorylation in the hippocampus. Interestingly the fasudil treatment normalized MLC phosphorylation levels in *Kctd13* mutant individuals. For the 16p11.2 *Del/+* line, we observed that the loss of one copy of the complete chromosomal region did not induce RHOA levels changes. Likewise, we did not find either alterations on the levels of this protein in the hippocampus of treated mice.

As for the *Kctd13* ^{+/-} model, we found that 16p11.2 deficient present increased phosphorylated MLC protein. Fasudil restored abnormal MLC phosphorylation in treated mutant mice but rather surprisingly induced increased MLC phosphorylation in wt mice to a degree comparable to non-treated 16p11.2 *Del/+* mice.

DISCUSSION

In this manuscript we described the phenotypes of a new *Kctd13*^{+/-} mouse lines that replicates some of the defects seen in young mouse models carrying the 16p11.2 deletion and we explored a treatment aiming at reducing the activity of the RHOA / ROCK pathway on cognition.

With the new *Kctd13*^{+/-} mouse line, we were able to detect changes in the NOL and NOR but no effect on the exploration activity compared to the 16p11.2 *Del/+* mouse model. These results agreed with a recent study²² highlighting the role of KCTD13 in the 16p11.2 deletion syndromes. The loss of one copy of *Kctd13* gene did not cause alterations on exploration or vertical activity of mice in open field test. However, the hemi-deletion of entire 16p11.2 region induce hyperactivity in these animals. This observation lead us to propose that *Kctd13* genetic dosage is not involved in the increased exploration activity associated with 16p11.2 deletion. Accordingly, we did not found improvement on the hyper locomotion showed by the 16p11.2 *Del/+* mice with chronic fasudil administration. This finding suggests that there could be other genes of the region involved on this phenotype. For this reason, the treatment with an inhibitor of the RHOA / ROCK pathway, deregulated because of *Kctd13* decreased levels in 16p11.2 deficient, did not produce any response.

When we analyzed the NOL in *Kctd13* mutant mice, we saw that the mutant mice developed impaired novelty detection in NOL test at 12 weeks of age. However, at 18 weeks when we repeated the test again, the non-treated mutant mice did not show any defect. This observation may show that either there is a maturation deficit that is recovered in older mice, may be through compensatory effect or there is an effect in the repetition of the test. We favor the first hypothesis as the NOR phenotypes in this line in found as both age and the NOL phenotype is also observed at both ages in the 16p11.2 deletion. Indeed, we found a profound NOL deficit for the 16p11.2 *Del/+* mice at 12 weeks, that was still observed at 18weeks, with no recovered by chronic administration of fasudil for 4 weeks. So, future research will be necessary to analyze how this *Kctd13* NOL phenotype is rescued in 18 weeks old naïve mice. This finding confirms that the NOL-phenotype associated to 16p11.2 rearrangement is not completely dependent on *Kctd13* dosage and on the effect in the RHOA / ROCK pathway.

The object recognition memory is the cognitive ability that allows us to retrieve object information stored in memory and compare it with the object information presented to us, and we can evaluate it from new object recognition test in mouse model. This defect is one of the most robust and reproducible phenotypes associated with 16p11.2 deficient mice. In agreement with precedent research, our *Kctd13*^{+/-} mouse model developed deficits in novelty detection in NOR test. Furthermore, our study showed that fasudil treatment significantly improved this impairment in mutant mice. In agreement with the initial study of characterization of 16p11.2 *Sult1a-Spn* mouse model¹⁸, in the present investigation we observed a NOR phenotype in the mutant individuals. Likewise, fasudil chronic treatment

completely restored the observed phenotype in 16p11.2 deficient mice. Thus KCTD13 is probably a major driver of object recognition phenotype associated with 16p11.2 deletion. In addition, the therapeutic effects of fasudil on *Kctd13* deficient and 16p11.2 deletion mice highlight the RHOA/ROCK signaling pathway as the main mechanism responsible of this phenotype.

Interestingly deficient individuals for the *Kctd13* gene showed no change in expression levels of the RHOA protein and the fasudil treatment did not modify RHOA protein expression in mutant and control mice. Likewise, the carriers of the 16p11.2 hemi-deletion did not display either alterations in the amount of this protein. Even if we were not able to detect change in the RHOA protein level, *Kctd13* mutants as well as 16p11.2 deficient mice had increased phosphorylated-MLC levels. This observation confirms that RHOA / ROCK pathway outcome is over-activated probably due to a loss copy of *Kctd13* in *Kctd13* and 16p11.2 mutants.

Furthermore, our study showed that the therapeutic effect of fasudil in recognition memory phenotype associated to 16p11.2 CNV was due to the normalizing action of the drug in both mouse models.

At this point, we can highlight the clinical relevance of treatment because of its potential as a cognitive enhancer in humans with memory and learning dysfunction related to neurodevelopmental disorders. However, more work is necessary to understand what elements in the molecular mechanism affected by the loss of the *Kctd13* gene are responsible for the over activation of the RHOA / ROCK pathway.

ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to the animal care-takers for their services at PHENOMIN-ICS and to members of the research groups involved and staff of the IGBMC laboratory for their helpful suggestions and discussions. This work has been supported by the National Centre for Scientific Research (CNRS), the French National Institute of Health and Medical Research (INSERM), the University of Strasbourg (Unistra), the French state funds through the “Agence Nationale de la Recherche” under the frame programme Investissements d’Avenir labelled ANR-10-IDEX-0002-02, ANR-10-LABX-0030-INRT, ANR-10-INBS-07 PHENOMIN to YH). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

REFERENCES

1. Conrad, D.F. *et al.* Mutation spectrum revealed by breakpoint sequencing of human germline CNVs. *Nat Genet* 42, 385-391 (2010).
2. Cook EH Jr, Scherer SW. Copy-number variations associated with neuropsychiatric conditions. *Nature* 455: 919-923 (2008).
3. Rendon R. *et al.* Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 444(7118):444-54 (2006).
4. Cooper, G.M. *et al.* A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nature Genetics* 43, 838-U844 (2011).
5. Fernandez, B.A. *et al.* Phenotypic spectrum associated with de novo and inherited deletions and duplications at 16p11.2 in individuals ascertained for diagnosis of autism spectrum disorder. *Journal of Medical Genetics* 47, 195-203 (2010).
6. Hanson, E. *et al.* The cognitive and behavioral phenotype of the 16p11.2 deletion in a clinically ascertained population. *Biol Psychiatry* 77(9):785-93 (2015).
7. Marshall, C.R. *et al.* Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *American Journal of Human Genetics* 82, 477-488 (2008).
8. Weiss, L.A. *et al.* Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. *New England Journal of Medicine* 358, 667-675 (2008).
9. Zufferey, F. *et al.* A 600 kb deletion syndrome at 16p11.2 leads to energy imbalance and neuropsychiatric disorders. *J. Med. Genet* 2012;49:660–668 (2012).
10. Shinawi, M. *et al.* Recurrent reciprocal 16p11.2 rearrangements associated with global developmental delay, behavioral problems, dimorphism, epilepsy, and abnormal head size. *Journal of Medical Genetics* 47, 332-341 (2010).
11. McCarthy, S.E. *et al.* Microduplications of 16p11.2 are associated with schizophrenia. *Nat Genet* 41:1223–1227 (2009).
12. Bochukova, E.G. *et al.* Large, rare chromosomal deletions associated with severe early-onset obesity. *Nature*, 463, 666-670 (2010).
13. Jacquemont, S. *et al.* Mirror extreme BMI phenotypes associated with gene dosage at the chromosome 16p11.2 locus. *Nature* 478(7367): 97–102 (2011).
14. Walters, R.G., *et al.* A new highly penetrant form of obesity due to deletions on chromosome 16p11.2. *Nature*, 463, 671-U104 (2010).
15. Crepel, A. *et al.* Narrowing the Critical Deletion Region for Autism Spectrum Disorders on 16p11.2. *American Journal of Medical Genetics Part B-Neuropsychiatric Genetics* 156B, 243-245 (2011).
16. Horev, G. *et al.* Dosage-dependent phenotypes in models of 16p11.2 lesions found in autism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 17076-17081, doi:10.1073/pnas.1114042108 (2011).
17. Portmann, T. *et al.* the Basal Ganglia of a Mouse Model of 16p11.2 Deletion Syndrome. *Cell Reports* 7, 1077-1092 (2014).

18. Arbogast, T. *et al.* Reciprocal Effects on Neurocognitive and Metabolic Phenotypes in Mouse Models of 16p11.2 Deletion and Duplication Syndromes. *PLoS Genet* 12, e1005709, doi:10.1371/journal.pgen.1005709 (2016).
19. Lin, G.N. *et al.* Spatiotemporal 16p11.2 Protein Network Implicates Cortical Late Mid-Fetal Brain Development and KCTD13-Cul3-RHOA Pathway in Psychiatric Diseases. *Neuron* 85(4): 742–754 (2015).
20. Golzio, C. *et al.* KCTD13 is a major driver of mirrored neuroanatomical phenotypes of the 16p11.2 copy number variant. *Nature*, 485, 363-367 (2012).
21. Escamilla, C. *et al.* Kctd13 deletion reduces synaptic transmission via increased RHOA. *Nature* 551(7679): 227–231 (2017).
22. Arbogast, T. *et al.* Kctd13-deficient mice display short-term memory impairment and sex-dependent genetic interactions. *Hum Mol Genet.* 28(9):1474-1486 (2019).
23. Birling M.-C., Schaeffer L., André P., Lindner L., Maréchal D., Ayadi A., Sorg T., Pavlovic G. and Héroult Y. Efficient and rapid generation of large genomic variants in rats and mice using CRISMERE. *Sci. Rep.* 7, 43331 10.1038/srep43331 (2017).
24. Karp, N.A. *et al.* Applying the ARRIVE guidelines to an in vivo database. *PLoS Biol* 13, e1002151 (2015)
25. Kilkenney, C., Browne, W.J., Cuthill, I.C., Emerson, M. and Altman, D.G. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*, 8, e1000412 (2010).
26. Meziane, H. *et al.*, fasudil treatment in adult reverses behavioural changes and brain ventricular enlargement in Oligophrenin-1 mouse model of intellectual disability. *Hum Mol Genet.* 25(11):2314-2323 (2016).

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Representation of the behavioral pipeline used for investigating the therapeutic effects of fasudil drug in *Kctd13* deficient and 16p11.2 deletion mouse models. We used 3 cohorts of animals for each genetic line. 12-week-old mice were subjected to different behavior and learning tests, after a previous habituation to the phenotyping zone. At 14 weeks old, each cohort was divided into two groups. The first group started the fasudil treatment and the second group followed the cognitive characterization without treatment.

Figure 2. Exploration activity in the Open field test of the *Kctd13*^{+/-} (A) and the 16p11.2 *Del/+* (B) mouse models at 12 weeks of age. Male mice from the *Kctd13*^{+/-} line (A : wt (n=20) and *Kctd13*^{+/-} (n=19)) or from the 16p11.2 *Del/+* line (B : wt (n=38) and 16p11.2 *Del/+* (n=32)) were free to explore the open field for 30 min as a new environment. First, the exploration activity was analyzed from the total distance (m) traveled during the test. Next, the adaptation of the mice to the environment was evaluated by dividing the test into periods of 5 minutes. The central graph shows the distance traveled each 5 min for both genotypes. Finally, we analyzed the numbers of rears for evaluate vertical activity. The *Kctd13*^{+/-} animals (A) showed no alterations in the different variables compared to their wt littermate whereas the 16p11.2 *Del/+* mice (B) showed increase exploratory activity in the distance travelled compared to wt (Student t-test, Total distance : wt vs. *Del/+* $t_{(68)} = -4.096$; $p < 0.001$). However, the *Del/+* mutant individuals displayed a decreased of the arena exploration during the test and thus a normal habituation to the new environment (Student t-test, T_{25-30} : wt vs. *Del/+* $t_{(68)} = -1.336$; $p = 0.186$). In addition, the mutant mice developed a tendency to the appearance of repetitive behavior, measured from the number of rears with 8 *Del/+* animals having a strong rearing activity but as a group it was not significant (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Figure 3. Novel object location (top) at 12 weeks and novel object recognition (bottom) at 13 weeks in the *Kctd13*^{+/-} (A) and the 16p11.2 *Del/+* (B) mouse models. In the NOL test (top), the recognition index reflects the ability of mice from the two lines *Kctd13*^{+/-} (wt (n=20) and *Kctd13*^{+/-} (n=21) littermates); and 16p11.2 *Del/+* (wt (n=28) and 16p11.2 *Del/+* (n=27) littermates) to distinguish the new located object from the familiar one after a 5 min retention delay. The *Kctd13*^{+/-} and the 16p11.2 *Del/+* male mice showed a deficit in object location recognition memory compared to their wt littermate (One sample t test for the *Kctd13*^{+/-} line : wt ($t_{(19)} = 4.4607$; $p = 0.0003$), *Kctd13*^{+/-} ($t_{(20)} = 0.8648$; $p = 0.3974$); and the 16p11.2 *Del/+* model: wt ($t_{(27)} = 3.2299$; $p = 0.0032$), *Del/+* ($t_{(26)} = 1.8372$; $p = 0.0776$)). In the NOR test (Bottom), the animals (wt (n=24) and *Kctd13*^{+/-} (n=23) littermates; and (wt (n=29) and 16p11.2 *Del/+* (n=29)) littermates) were challenged to recognize the new object from the familiar object after a 3 h delay. *Kctd13*^{+/-} and the 16p11.2 *Del/+* mice showed a poor object recognition memory compared to their respective wt littermates (One sample t test for the *Kctd13*^{+/-} model : wt ($t_{(23)} = 3.0558$; $p = 0.0056$), *Kctd13*^{+/-} ($t_{(22)} = 0.0805$; $p = 0.9366$);

and the 16p11.2 *Del/+* model: wt ($t_{(28)} = 2.6891$; $p = 0.0119$), *Del/+* ($t_{(28)} = 0.9147$; $p = 0.3682$)). (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Figure 4. Exploration activity in the Open field test of the *Kctd13*^{+/-} (A) and the 16p11.2 *Del/+* (B) mouse models with or without fasudil treatment at 18 weeks of age. Male mice from the *Kctd13*^{+/-} line (A: non treated wt (n=11), treated wt (n=9), non treated *Kctd13*^{+/-} (n=10) and treated *Kctd13*^{+/-} (n=9)) or from the 16p11.2 *Del/+* line (B: non treated wt (n=20), treated wt (n=19), non treated 16p11.2 *Del/+* (n=15) and treated 16p11.2 *Del/+* (n=14)) explored the open field for 30 min. The exploration activity was measured with the total distance (m) traveled during the test. Next, the habituation of the mice to the environment was evaluated by dividing the test into periods of 5 minutes. The central graph shows the distance traveled each 5 min for both genotypes. Finally, we analyzed the numbers of rears for vertical activity. The *Kctd13*^{+/-} animals (A) showed no alterations in the different variables compared to their wt littermate whereas the 16p11.2 *Del/+* mice (B) showed increased exploratory activity in the distance travelled which was not affected by the fasudil treatment (One way ANOVA between groups : $F_{(3,64)} = 10$; $p < 0.001$; Tukey's post hoc tests : non treated wt vs. treated wt : $p = 0.745$, non treated *Del/+* vs. treated *Del/+* : $p = 0.54$, non treated wt vs. treated *Del/+* : $p = 0.001$, treated wt vs. non treated *Del/+* : $p = 0.005$ and treated wt vs. treated *Del/+* : $p < 0.001$). Nevertheless, non-treated and treated *Del/+* individuals experienced a decreased activity less pronounced throughout the test (One way ANOVA between groups, T_{25-30} : $F_{(3,64)} = 11.228$; $p < 0.001$; Tukey's post hoc tests: non treated wt vs. non treated *Del/+* : $p = 0.022$, non treated wt vs. treated *Del/+* : $p < 0.001$, treated wt vs. non treated *Del/+* : $p = 0.003$; treated wt vs. treated *Del/+* : $p < 0.001$). The treatment did not have either effect for any genotype on the vertical activity (Kruskal-Wallis one-way analysis of variance: $H_{(3)} = 7.274$; $p = 0.064$). (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Figure 5. Novel object location (top) at 18 weeks and novel object recognition (bottom) at 19 weeks in the *Kctd13*^{+/-} (A) and the 16p11.2 *Del/+* (B) mouse models. For NOL test (Top), recognition index reflects the ability of mice from the two lines *Kctd13*^{+/-} (A : non treated wt (n=12), treated wt (n=13), non treated *Kctd13*^{+/-} (n=13) and treated *Kctd13*^{+/-} (n=10) littermates) and the 16p11.2 *Del/+* (B : non treated wt (n=13), treated wt (n=15), non treated 16p11.2 *Del/+* (n=8) and treated 16p11.2 *Del/+* (n=15) littermates) lines to distinguish the new location of an object from the familiar one after a 5 min retention delay. In the top panel, we observed again that the 16p11.2 *Del/+* male mice showed a deficit in object location memory compared to their wt littermate but the *Kctd13* heterozygotes were no more defective (One sample t test : non treated wt ($t_{(11)} = 3.9860$; $p = 0.0021$), treated wt ($t_{(12)} = 4.4858$; $p = 0.0007$), non treated *Kctd13*^{+/-} ($t_{(12)} = 2.3628$; $p = 0.0359$), treated *Kctd13*^{+/-} ($t_{(9)} = 6.2928$; $p = 0.0001$)) and the fasudil treatment was not able to restore this ability in the 16p11.2 *Del/+* model (One sample t test : non-treated wt ($t_{(12)} = 5.9663$; $p < 0.001$), treated wt ($t_{(14)} = 4.8786$; $p < 0.002$), non-treated *Del/+* ($t_{(7)} = 0.9837$; $p = 0.3580$), treated *Del/+* ($t_{(14)} = 2.1021$; $p = 0.0541$)). In the NOR test (Bottom), the mutant animals from the *Kctd13*^{+/-}

line(non treated wt (n=11), treated wt (n=11), non treated *Kctd13*^{+/-} (n=14) and treated *Kctd13*^{+/-} (n=10)) or the 16p11.2 *Del/+* model (non treated wt (n=17), treated wt (n=12), non treated 16p11.2 *Del/+* (n=14) and treated 16p11.2 *Del/+* (n=12)) were challenged to recognize the new object from the familiar object after a 3 h delay. *Kctd13*^{+/-} and the 16p11.2 *Del/+* mutant mice were both impaired to recognize the new object compared to their respective wt littermates in the non treated group. Additionally, fasudil treatment was able to restore the object recognition in the *Kctd13*^{+/-} line (One sample t test : non-treated wt ($t_{(10)} = 2.7976$; $p = 0.0189$), treated wt ($t_{(10)} = 5.7297$; $p = 0.0002$), non-treated *Kctd13*^{+/-} ($t_{(13)} = 1.0142$; $p = 0.3290$), treated *Kctd13*^{+/-} ($t_{(9)} = 3.1937$; $p = 0.0109$)) and in the 16p11.2 *Del/+* model (One sample t test: non-treated wt ($t_{(16)} = 2.3736$; $p = 0.0305$), treated wt ($t_{(11)} = 2.3905$; $p = 0.0358$), non-treated *Del/+* ($t_{(13)} = 0.1737$; $p = 0.8648$), treated *Del/+* ($t_{(11)} = 2.7517$; $p = 0.0188$)). (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Figure 6. Detection of RHOA (A, C) and of the phosphorylated form of MLC levels (P-MLC, B,D) by western blots in heterozygous *Kctd13*^{+/-} (A,B) and the 16p11.2 *Del/+* (C,D) hippocampal lysates and their control (wt) littermate. (A) The quantification of the western blot (an example is shown below the graph) revealed no changes in RHOA protein levels in the *Kctd13*^{+/-} (A) or in the 16p11.2 *Del/+* (C) mutant lines compared to their wt littermate. As expected, fasudil treatment did not cause changes in RHOA protein levels in the two mutant lines (wt non treated (n=22), wt treated (n=11), *Kctd13*^{+/-} non treated (n=21) and *Kctd13*^{+/-} treated (n=7); and wt non treated (n=17), wt treated (n=8), 16p11.2 *Del/+* non treated (n=11) and 16p11.2 *Del/+* treated (n=11)). However, *Kctd13* deficient mice showed an increase in the levels of phosphorylated MLC protein (B) and the loss of a copy of 16p11.2 region caused an increase in the levels of phosphorylated MLC protein (D). The treatment with fasudil reversed this alteration in *Kctd13*^{+/-} (wt non treated (n=21), wt treated (n=10), *Kctd13*^{+/-} non treated (n=23) and *Kctd13*^{+/-} treated (n=9)) (Kruskal-Wallis one-way analysis of variance between groups : $H_{(3)} = 21.731$; $p < 0,001$; Mann-Whitney Test : non treated wt vs. non treated *Kctd13*^{+/-} : $p = 0.009$; non treated wt vs. treated *Kctd13*^{+/-} : $p = 0.702$; non treated *Kctd13*^{+/-} vs. treated *Kctd13*^{+/-} : $p = 0.049$) and in the 16p11.2 *Del/+* mutant line (wt non treated (n=17), wt treated (n=8), 16p11.2 *Del/+* non treated (n=14) and 16p11.2 *Del/+* treated (n=10)) (Kruskal-Wallis one-way analysis of variance between groups : $H_{(3)} = 8.457$; $p = 0.037$; Mann-Whitney Test : non treated wt vs. treated wt : $p = 0.008$; t-test : non treated wt vs. non treated *Del/+* : $p = 0.047$, non treated wt vs. treated *Del/+* : $p = 0.364$). (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

FIGURES

Figure 1. Representation of the behavioral pipeline used for investigating the therapeutic effects of fasudil drug in Kctd13 deficient and 16p11.2 deletion mouse models

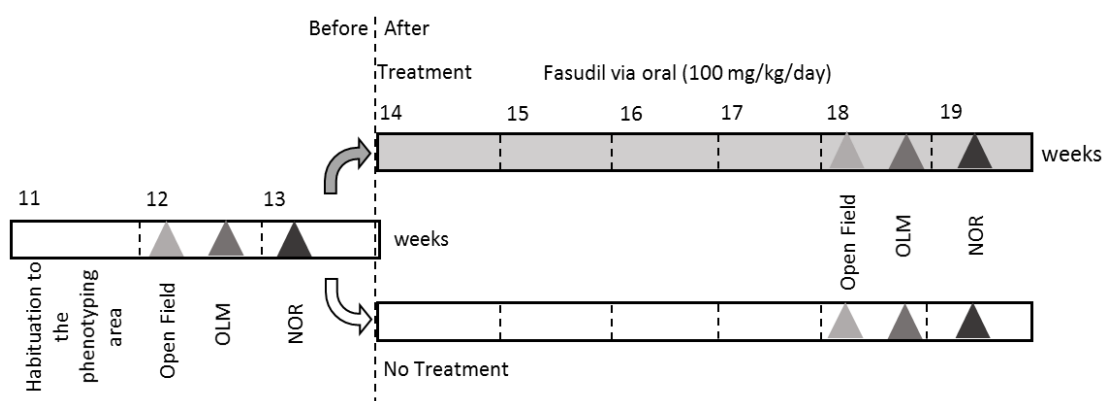


Figure 2. Exploration activity in the Open field test of the *Kctd13*^{+/-} and the 16p11.2 *Del/+* mouse models at 12 weeks of age

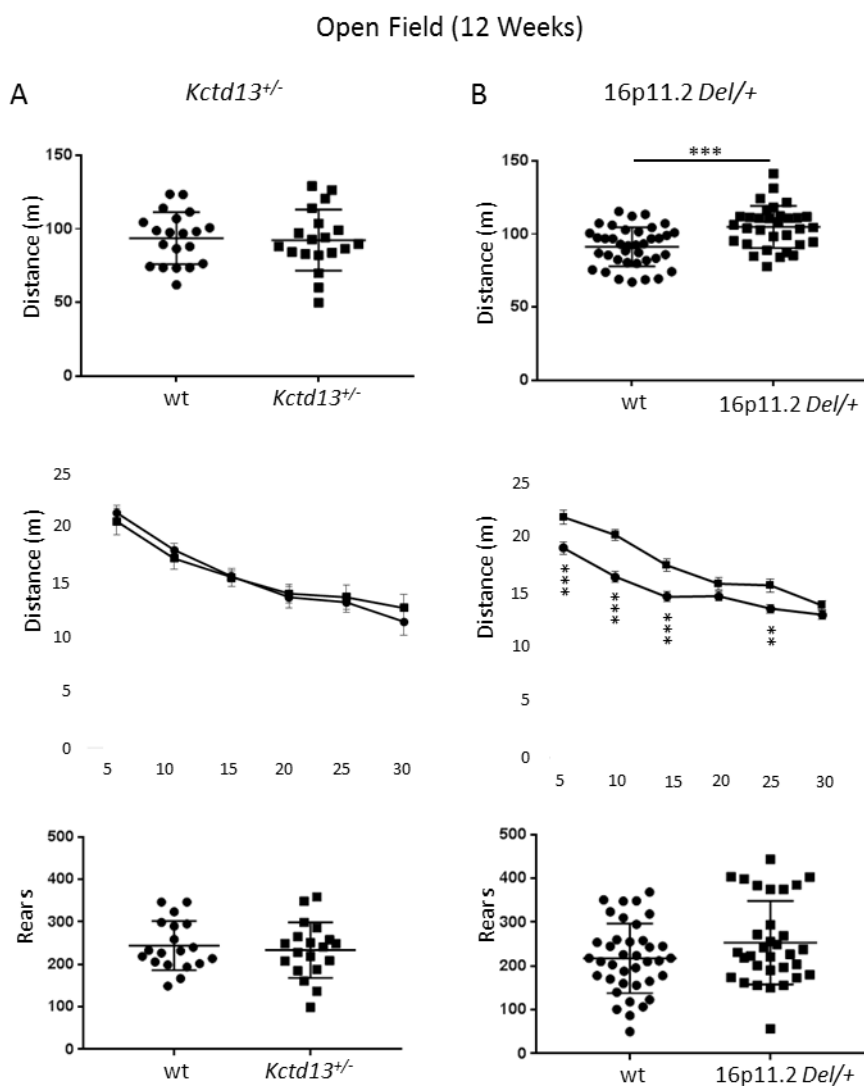


Figure 3. Novel object location at 12 weeks and novel object recognition at 13 weeks in the *Kctd13*^{+/-} and the 16p11.2 *Del*/⁺ mouse models

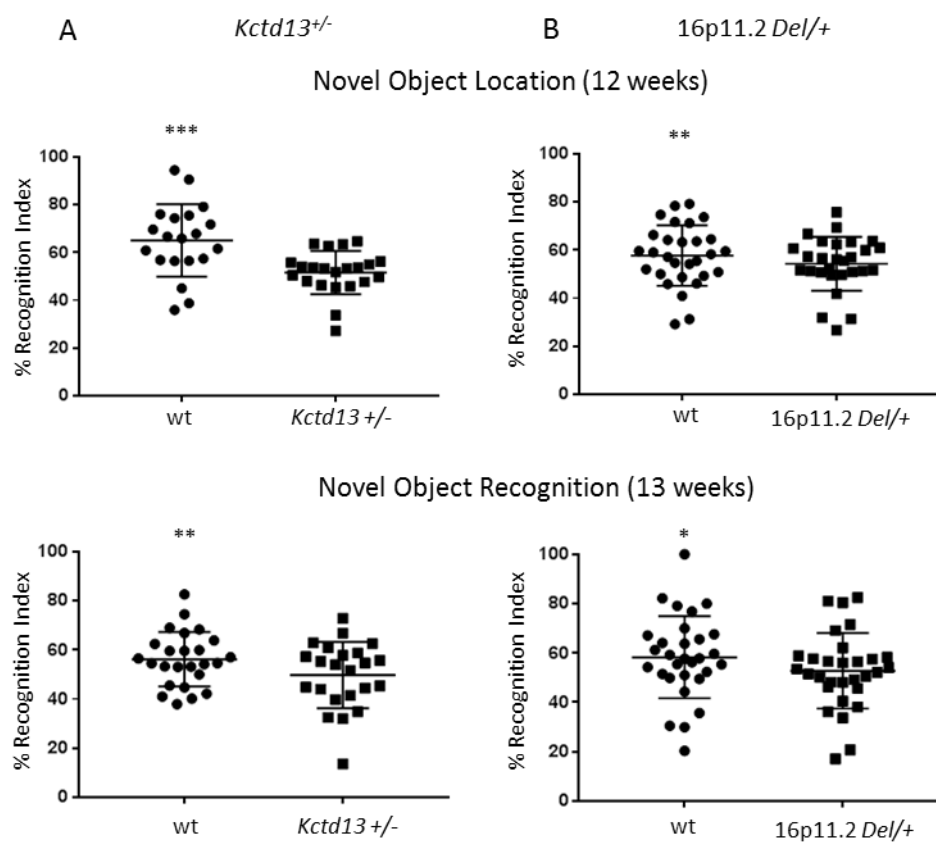


Figure 4. Exploration activity in the Open field test of the *Kctd13*^{+/-} and the *16p11.2 Del/+* mouse models with or without fasudil treatment at 18 weeks of age

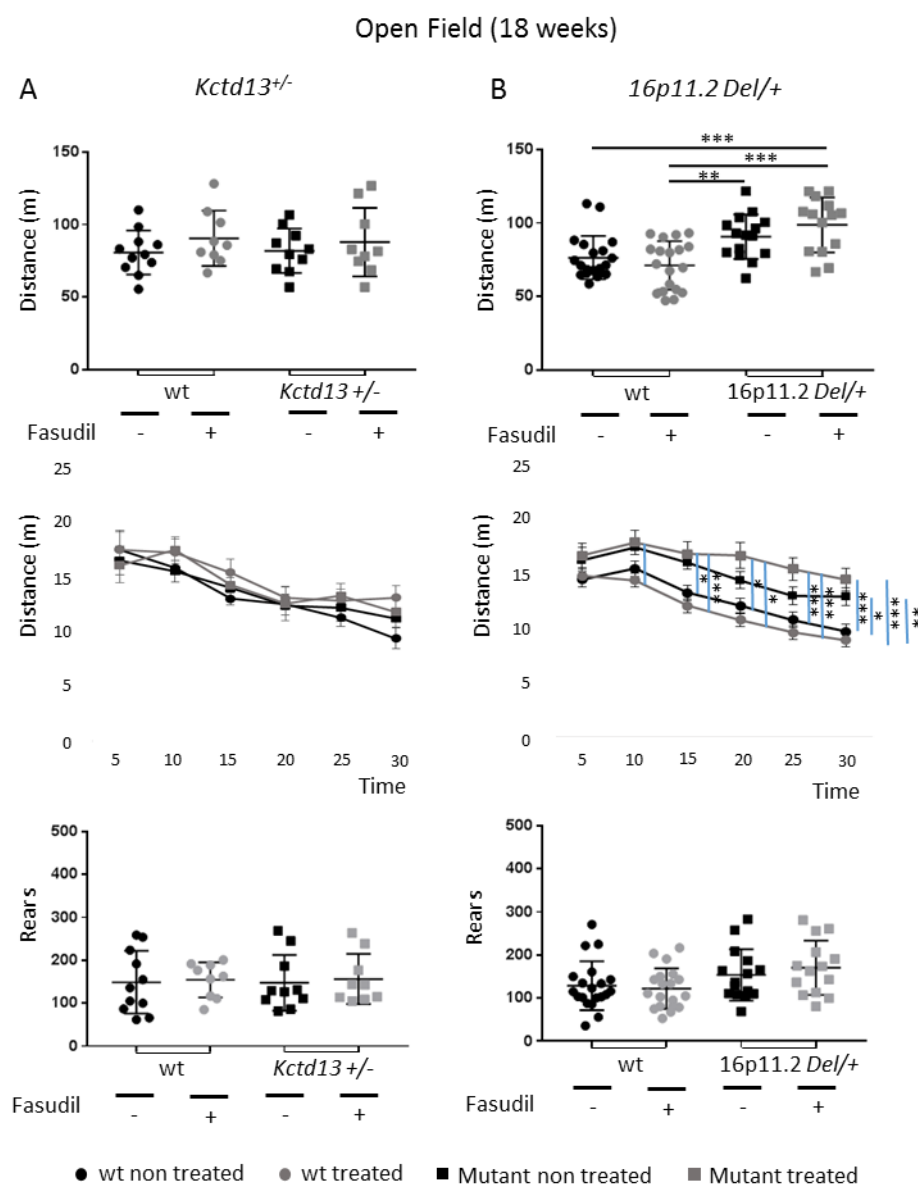


Figure 5. Novel object location at 18 weeks and novel object recognition at 19 weeks in the *Kctd13*^{+/-} and the *16p11.2 Del*/⁺ mouse models

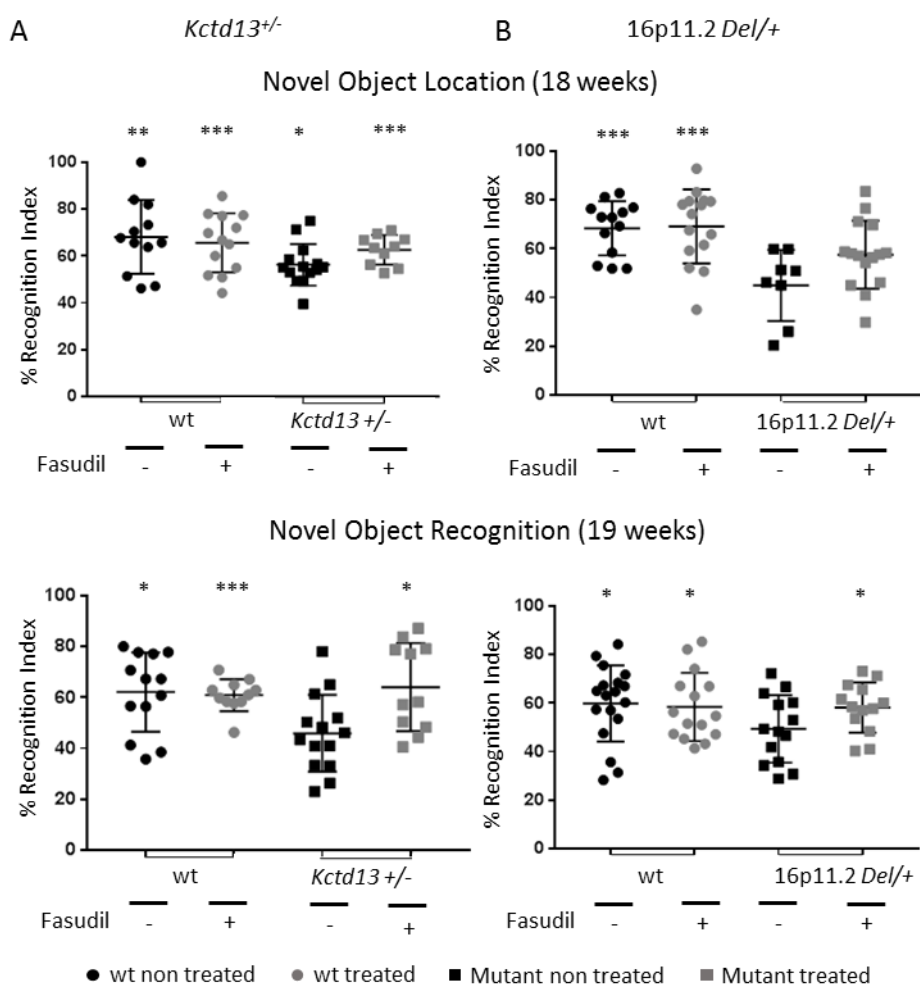
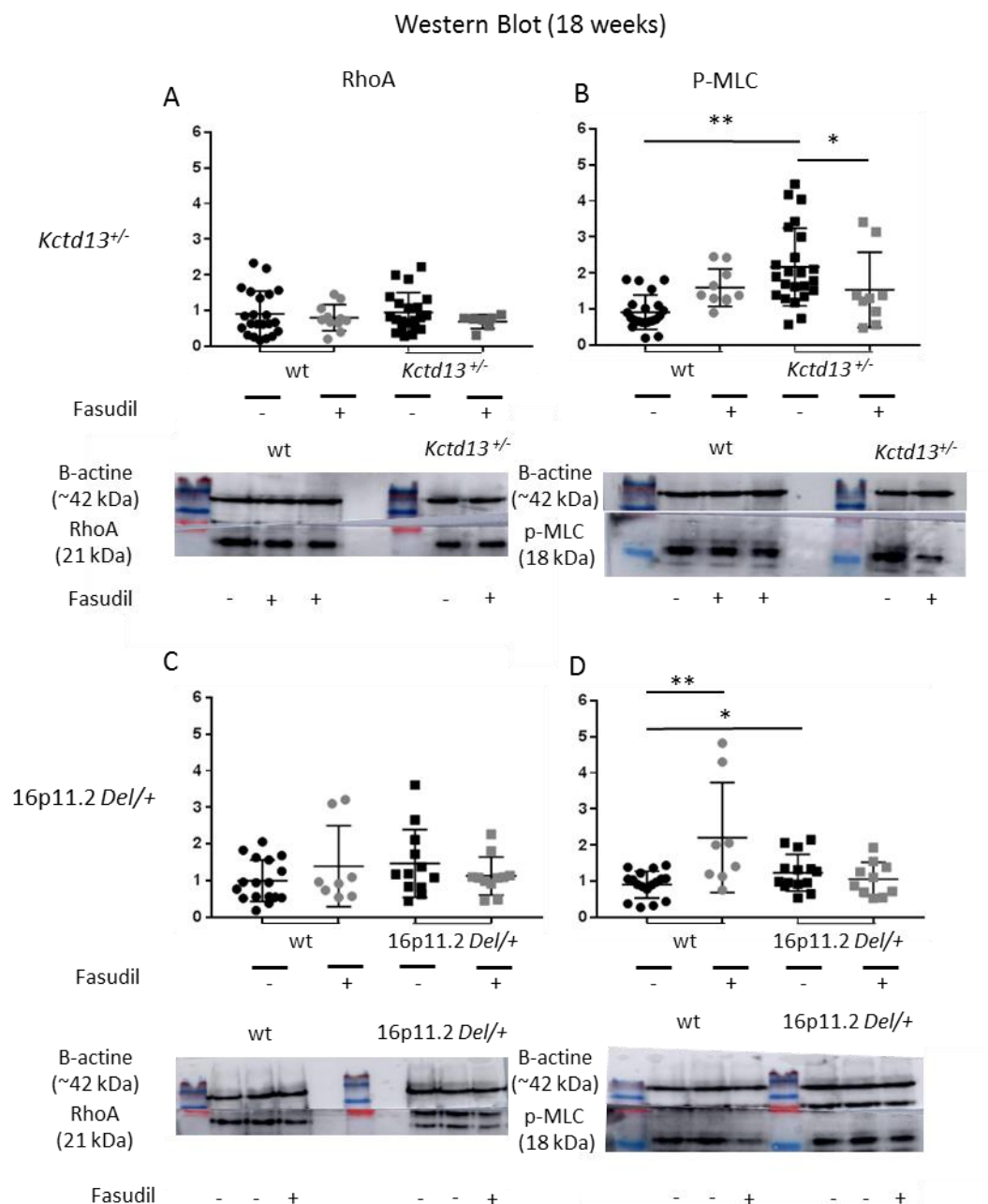


Figure 6. Detection of RHOA and of the phosphorylated form of MLC (P-MLC) by western blots in heterozygous *Kctd13*^{+/-} and the 16p11.2 *Del*/+ hippocampal lysates and their control (wt) littermate



TABLES

Test	Parameter	Pre treatment		Post treatment			
		wt	<i>Kctd13</i> ^{+/-}	wt		<i>Kctd13</i> ^{+/-}	
				Non treated	Treated	Non treated	Treated
Open Field	Total distance (m)	94 ± 4	92 ± 5	81 ± 5	91 ± 6	82 ± 5	88 ± 8
	Distance t 0-05 (m)	22 ± 7	21 ± 1	18 ± 2	18 ± 2	17 ± 1	16 ± 2
	Distance t 05-10 (m)	18 ± 1	17 ± 1	16 ± 1	17 ± 1	16 ± 1	18 ± 1
	Distance t 10-15 (m)	16 ± 1	16 ± 1	13 ± 1	16 ± 1	14 ± 1	14 ± 1
	Distance t 15-20 (m)	14 ± 1	14 ± 1	13 ± 1	13 ± 1	13 ± 1	13 ± 2
	Distance t 20-25 (m)	13 ± 1	14 ± 1	11 ± 1	13 ± 1	12 ± 1	13 ± 1
	Distance t 25-30 (m)	12 ± 1	13 ± 1	10 ± 1	13 ± 1	11 ± 1	12 ± 1
	Rears (count)	244 ± 13	234 ± 15	149 ± 22	155 ± 14	148 ± 21	157 ± 20
Novel Object Location Recognition 5 min delay	S1 object exploration (s)	9 ± 1	10 ± 1	7 ± 1	6 ± 1	8 ± 1	7 ± 1
	S2 non-displaced object exploration (s)	3 ± 0,4	6 ± 1*	2 ± 0,4	3 ± 0,4	4 ± 1	3 ± 0,4
	S2 displaced object (s)	6 ± 1	6 ± 1	4 ± 0,4	6 ± 1	5 ± 1	6 ± 1
	Recognition Index (%)	65 ± 3 ^{§§§}	52 ± 2***	68 ± 5 ^{§§}	66 ± 3 ^{§§§}	55 ± 2 [§]	64 ± 2 ^{§§§}
Novel Object Recognition 3 hours delay	S1 object A exploration (s)	18 ± 2	19 ± 3	13 ± 2	30 ± 5*	19 ± 4	16 ± 3
	S2 object A exploration (s)	5 ± 1	7 ± 1	6 ± 1	5 ± 1	6 ± 1	4 ± 1
	S2 object B exploration (s)	7 ± 1	5 ± 1	10 ± 2	8 ± 2	7 ± 2	8 ± 2
	Recognition Index (%)	57 ± 2 ^{§§}	50 ± 3	62 ± 4 [§]	61 ± 2 ^{§§§}	46 ± 4	66 ± 5 [§]

Table 1. Behavioral characterization of the *Kctd13*^{+/-} mouse model before and after fasudil chronic treatment. In the open field test, no change of horizontal (total distance) or vertical activity (rears) was detected because the inactivation of the gene pre or post treatment. Recognition memory was analyzed through the novel object location and object recognition test. *Kctd13*^{+/-} mice showed a deficit for displaced object discrimination and novel object recognition. Mutant males presented no recognition indexes significantly higher than the level of chance 50%. Data are mean ± SEM. Test de Student, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. One Sample T. Test, ^{§§} $p < 0.01$, ^{§§§} $p < 0.001$ compared with the chance level (50%). Each genotype was divided into 2 groups, non-treated and treated mice. Non-treated *Kctd13*^{+/-} mice showed 4 weeks later improvements for novel object location recognition index. In the novel object recognition test, non-treated *Kctd13*^{+/-} mice showed 4 weeks later a deficit for novel object recognition index whereas treated *Kctd13* +/- mice recovered the object recognition memory. Data are mean ± SEM. Tukey's test, * $p < 0.05$. One Sample T. Test, [§] $p < 0.05$, ^{§§} $p < 0.01$, ^{§§§} $p < 0.001$ compared with the chance level (50%).

Test	Parameter	Pre treatment		Post treatment			
		wt	16p11.2 <i>Del/+</i>	wt		16p11.2 <i>Del/+</i>	
				Non treated	Treated	Non treated	Treated
Open Field	Total distance (m)	91 ± 2	105 ± 3***	76 ± 3	71 ± 4	91 ± 4	99 ± 5***
	Distance t 0-05 (m)	19 ± 1	22 ± 1***	15 ± 1	15 ± 1	16 ± 1	17 ± 1
	Distance t 05-10 (m)	16 ± 1	20 ± 1***	16 ± 1	15 ± 1	18 ± 1	18 ± 1
	Distance t 10-15 (m)	15 ± 1	17 ± 1***	13 ± 1	12 ± 1	16 ± 1	17 ± 1*
	Distance t 15-20 (m)	15 ± 0,4	16 ± 1	12 ± 1	11 ± 1	15 ± 1	17 ± 1*
	Distance t 20-25 (m)	14 ± 0,4	16 ± 1**	11 ± 1	10 ± 1	13 ± 1	16 ± 1***
	Distance t 25-30 (m)	13 ± 0,4	14 ± 1	10 ± 1	9 ± 1	13 ± 1*	15 ± 1***
	Rears (count)	217 ± 13	253 ± 17	129 ± 13	122 ± 11	154 ± 15	171 ± 17
Novel Object Location Recognition 5 min delay	S1 object exploration (s)	10 ± 1	16 ± 2**	7 ± 1	9 ± 1	12 ± 2	10 ± 1
	S2 non-displaced object exploration (s)	4 ± 0,4	6 ± 1**	3 ± 0,4	2 ± 0,4	5 ± 1**	4 ± 1
	S2 displaced object (s)	5 ± 1	7 ± 1	6 ± 1	6 ± 1	4 ± 1	6 ± 1
	Recognition Index (%)	58 ± 2 ^{§§}	54 ± 2	68 ± 3 ^{§§§}	69 ± 4 ^{§§§}	45 ± 5**	58 ± 4
Novel Object Recognition 3 hours delay	S1 object A exploration (s)	16 ± 2	20 ± 2	15 ± 2	11 ± 2	30 ± 5*	24 ± 5
	S2 object A exploration (s)	5 ± 1	9 ± 1**	4 ± 1	4 ± 1	10 ± 2*	6 ± 1
	S2 object B exploration (s)	6 ± 1	8 ± 1	6 ± 1	6 ± 1	9 ± 2	9 ± 1
	Recognition Index (%)	58 ± 3 [§]	52 ± 3	59 ± 4 [§]	59 ± 4 [§]	49 ± 4	59 ± 3 [§]

Table 2. Behavioral characterization of the 16p11.2 *Del/+* mouse model before and after fasudil chronic treatment. In the pre-treatment open field test, the mutant mice showed increased horizontal activity during the 30 minutes of test (total distance) and during the first time intervals. Recognition memory was analyzed in our mouse model through the novel object location and object recognition test. In general, *Del/+* mice spent more time exploring the objects during session S1. This higher exploration is probably due to the increased exploration activity associated with the loss of one copy of the 16p11.2 region. *Del/+* mice showed a deficit for displaced object discrimination and novel object recognition. Data are mean ± SEM. Test de Student, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. One Sample T. Test, [§] $p < 0.05$, ^{§§} $p < 0.01$ compared with the chance level (50%). Our animals were divided into 4 different groups depending on their genotype and treatment. Post-treatment analyses showed for the open field test a higher difference in exploration activity between the treated mutant group and the control group. In the novel object location test, non-treated *Del/+* animals showed a deficit for displaced object recognition. Treatment in mutant mice increased recognition index but it was not significantly higher than the level of chance (50%). Data are mean ± SEM. Tukey's test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. One Sample T. Test, ^{§§§} $p < 0.001$ compared with the chance level (50%). In novel object recognition test, non-treated mutant mice showed 4 weeks later a deficit for novel objet recognition index whereas fasudil treatment rescued the object recognition memory in mutant mice. Data are mean ± SEM. Mann-Witney *U* test, * $p < 0.05$. One Sample T. Test, [§] $p < 0.05$ compared with the chance level (50%).

Protein	wt		<i>Kctd13</i> ^{+/-}	
	Non treated	Treated	Non treated	Treated
RHOA	0.91 ± 0.14	0.81 ± 0.11	0.96 ± 0.12	0.7 ± 0.07
p-MLC	0.92 ± 0.1	1.6 ± 0.17	2.17 ± 0.22**	1.54 ± 0.35

Protein	wt		16p11.2 <i>Del</i> /+	
	Non treated	Treated	Non treated	Treated
RHOA	1 ± 0.14	1.4 ± 0.4	1.47 ± 0.27	1.13 ± 0.16
p-MLC	1 ± 0.1	2.42 ± 0.59**	1.36 ± 0.15*	1.16 ± 0.16

Table 3. RHOA protein and MLC phosphorylation levels analyzed by western blot from hippocampal regions of *Kctd13*^{+/-} mouse model treated or non-treated with fasudil Chronic treatment. The intensity of each interest protein bands normalized with the intensity of the corresponding control protein band was again normalized with the mean of all samples of the untreated control individuals. Non-treated *Kctd13*^{+/-} hippocampus presented increased phosphorylation levels of MLC protein whereas mutant treated with fasudil didn't present significant increased phosphorylation levels of protein. In the case of the mouse model for the deletion of the 16p11.2 region, we also observed an increased phosphorylation levels of MLC. These levels were normalized with the treatment. Mann-Witney *U* test, * *p* < 0.05, ** *p* < 0.01.

Discussion et conclusion

Pour ce projet de recherche on a développé un approche préclinique dans lequel nous avons évalué les effets thérapeutiques de l'inactivation de la voie RHOA / ROCK sur les phénotypes associés à la délétion 16p11.2. A cette fin, notre laboratoire a mis en place un protocole de caractérisation du modèle de souris pour la délétion du gène *Kctd13* et du modèle de la délétion de la région 16p11.2 à l'âge de 12 semaines. Après 4 semaines de traitement chronique avec la drogue fasudil, nous avons vérifié si les phénotypes observés chez ces modèles sont normalisés.

Caractérisation des modèles de souris *Kctd13*^{+/-} et 16p11.2 *Del/+* précédente à l'inactivation de la voie de signalisation RHOA / ROCK

La caractérisation du modèle murin pour l'inactivation du gène *Kctd13* par l'hémi-délétion de l'exon 3 et 4 à partir de la technologie CRISPR / Cas9 a révélé la présence des phénotypes de déficit dans la mémoire de localisation et dans la mémoire de reconnaissance d'objet à 12 et 13 semaines respectivement. Nos résultats coïncident avec la caractérisation phénotypique du modèle d'Arbogast *et al.*, obtenu à partir de la délétion de l'exon 2 du génome de la souris. Les auteurs ont également observé un déficit dans la mémoire de reconnaissance d'objet à 13 semaines et dans la mémoire de localisation d'objet à 15 semaines (Arbogast *et al.*, 2019). Cependant, notre modélisation ne partage pas les mêmes phénotypes avec le modèle développé par Escamilla *et al.*, à partir d'une construction conçue pour remplacer le gène entier *Kctd13*. Dans cette étude les souris mutantes ne présentent pas des phénotypes de mémoire de localisation ou reconnaissance d'objet à l'âge adulte (Escamilla *et al.*, 2017). Cette divergence pourrait s'expliquer par l'utilisation de protocoles différents pour établir la mémoire de reconnaissance entre cette étude et notre analyse.

De plus, ces deux phénotypes ont été également observés sur le modèle pour la délétion de la région complète 16p11.2. Ces résultats sont compatibles avec l'étude de Arbogast *et al.*, en 2016. Notre observation indique que *Kctd13* a une responsabilité dans le développement de la capacité de reconnaissance et localisation d'objet.

En outre, nous avons décidé d'examiner l'implication de *Kctd13* dans un autre phénotype robuste associé au réarrangement 16p11.2 (Arbogast *et al.*, 2016), l'activité d'exploration. Les souris *Kctd13*^{+/-} n'ont pas présenté des altérations significatives. Pour cette raison, nous concluons que ce gène n'a pas d'implication pertinente dans l'apparition d'hyperactivité liée à la délétion 16p11.2.

Effet de fasudil dans les phénotypes cognitifs associés à la délétion de *Kctd13* et à la délétion de la région 16p11.2

Cette approche préclinique nous a permis de constater que le traitement chronique de fasudil pendant quatre semaines normalise le phénotype de la mémoire de reconnaissance d'objet observé chez le modèle *Kctd13*^{+/-} et le modèle 16p11.2 *Del/+*. Ces résultats nous indiquent que la sur activation de la voie RHOA est clé pour l'apparition de ce phénotype associé à la perte de KCTD13 à cause de la délétion 16p11.2. Pour cette raison, l'inactivation de la voie a des effets thérapeutiques sur ces deux modèles.

Par rapport à la mémoire de localisation d'objet, ce phénotype n'était plus présent pendant la deuxième caractérisation post-fasudil chez les souris *Kctd13*^{+/-} non traitées à l'âge de 18 semaines. Cette divergence pourrait s'expliquer par la possible habitude des animaux au test ou par la possibilité que la déficience du gène provoquerait un retard du développement à l'âge adulte précoce de 12 semaines qui est rattrapé ou compensé à 18 semaines. Pour cette raison, nous considérons l'évaluation de ce phénotype chez les souris *Kctd13*^{+/-} de 18 semaines naïves pour des recherches futures. De plus, le traitement avec fasudil n'a pas eu des effets de normalisation dans le phénotype de la mémoire de localisation d'objet sur le modèle 16p11.2 *Del/+*. Ces résultats indiquent que la dérégulation de la voie RHOA / ROCK par la perte d'une copie de *Kctd13* n'est la cause principale de l'apparition du phénotype de mémoire de localisation associée à la délétion 16p11.2.

En outre, les souris déficientes pour la région 16p11.2 n'ont pas montré une normalisation de l'hyperactivité après traitement. Ces résultats sont compatibles avec le fait que *Kctd13* n'est pas impliqué dans ce phénotype.

Analyses moléculaires de la voie de signalisation RHOA / ROCK sur les modèles *Kctd13*^{+/-} et 16p11.2 *Del/+*

Considérant les différences entre les résultats montrés dans les études précédentes par rapport à l'effet de la délétion de *Kctd13* sur les niveaux d'expression de RHOA, nous avons décidé d'analyser le niveau d'expression de la protéine sur nos modèles murins. Notre modèle pour l'inactivation du gène *Kctd13* n'a pas montré d'altérations du niveau d'expression de la protéine. Ces résultats ont été également observés sur le modèle d'inactivation de *Kctd13* dans l'étude d'Arbogast *et al.*, en 2019. Par contre, le modèle pour la suppression génétique complète du locus analysé dans l'étude d'Escamilla *et al.*, en 2017 a présenté une augmentation du niveau d'expression de la protéine. Nous considérons que cette divergence entre les études pourrait être expliquée par la différence de stratégies de mutation utilisées. Il est possible que la lésion génétique plus grande utilisée par Escamilla *et al.*, affecte des éléments régulateurs qui pourraient être responsables de certains des observations divergents.

En outre, notre modèle de délétion de la région 16p11.2 n'a pas montré d'altérations du niveau d'expression de la protéine RHOA.

Nous avons décidé également d'analyser l'activation de la voie RHOA / ROCK sur nos modèles, en considérant les effets thérapeutiques dans le phénotype de mémoire de reconnaissance de l'inactivation de RHOA / ROCK *via* l'inhibiteur fasudil. Le paramètre choisi pour cette analyse a été le niveau de phosphorylation de la protéine MLC. Ainsi, nous avons découvert que l'hippocampe des souris *Kctd13*^{+/-} et 16p11.2 *Del/+* présentait un niveau de phosphorylation de MLC accru. Ceci indique que la voie de signalisation RHOA / ROCK est sur activée sur les deux modèles.

De même, nous avons voulu corroborer les effets déjà connus de la drogue fasudil, en tant qu'inhibiteur de ROCK (Huentelman *et al.*, 2009), et donc vérifier si ses effets thérapeutiques sur nos souris sont dus à l'inactivation de la voie de signalisation. fasudil n'a pas altéré les niveaux d'expression de RHOA mais il normalise la sur phosphorylation de MLC observée chez les individus *Kctd13*^{+/-} et 16p11.2 *Del/+* traités.

Conclusion de l'étude

Dans cette étude, nous avons montré qu'un inhibiteur de la voie de signalisation RHOA / ROCK pourrait être utilisé comme traitement pour améliorer l'apprentissage et la mémoire, comme cela observée chez le modèle murin d'inactivation du gène *Kctd13* et le modèle de délétion de la région 16p11.2. Par conséquent, le fasudil pourrait avoir une pertinence clinique en raison de son potentiel comme amplificateur cognitif chez l'homme présentant un dysfonctionnement de la mémoire lié aux désordres neuro développementaux. Cependant, des recherches futures seront nécessaires pour comprendre quels sont les mécanismes moléculaires affectés par la perte du gène *Kctd13*, responsables de la suractivation de la voie RHOA / ROCK.

Partie 2

Implication des gènes *Mvp* et *Sez6l2*
pour les phénotypes comportementaux
des modèles souris de la délétion de la
région 16p11.2

Introduction

Comprendre la base moléculaire des troubles neurodéveloppementaux et neuropsychiatriques associés aux CNVs 16p11.2 présente de nombreux obstacles inhérents à la complexité des syndromes et au manque de modèle. L'objectif de ce projet de recherche est de continuer à décrypter le rôle de certains gènes de la région 16p11.2 *Sult1a1-Spn* dans les phénotypes comportementaux observés dans la délétion et la duplication de cet intervalle génétique. Nous avons focalisé notre attention sur la micro-délétion de 118 kb englobant 5 gènes de la région *MVP*, *CDIPT*, *SEZ6L2*, *ASPHD1* et *KCTD13* qui avait été identifiée dans une famille de trois générations avec ASD (Crepel *et al.*, 2011). Cette recherche mettait en évidence un rôle clé de ces 5 gènes dans les caractéristiques neuropsychiatriques associées aux réarrangements 16p11.2. Dans le chapitre précédent de ce manuscrit nous nous sommes intéressés au gène candidat *Kctd13*. L'inactivation de ce gène chez la souris a provoqué des phénotypes de mémoire de reconnaissance. Ce déficit a été déjà observé dans le modèle pour la délétion complète de la région 16p11.2. Cependant, *Kctd13* n'est pas responsable de tous les phénotypes associés au réarrangement 16p11.2. Pour cette raison, ici nous avons choisi de nous focaliser sur les deux gènes *Mvp* et *Sez6l2*.

Le gène *MVP* (« Major Vault Protein ») code pour le composant majeur du complexe vault. Les vaults sont des structures de ribonucléoprotéines à multi-sous-unités impliquées dans le transport nucléo-cytoplasmique. MVP, en plus de fonctionner en tant que transporteur d'ARN, est une protéine d'échafaudage qui est connue pour réguler la voie MAPK / ERK par des interactions avec Shp2 (Berger *et al.*, 2009; Kolli *et al.*, 2004). En plus de son rôle important dans la prolifération cellulaire, la signalisation ERK est impliquée dans les fonctions neuronales, incluant la plasticité synaptique et la consolidation des mémoires à long terme (Sweatt *et al.*, 2004).

Il est intéressant de noter que les souris hétérozygotes pour la délétion de la région 16p11.2 présentent une activité ERK / MAPK élevée. Cette sur activation est associée à des anomalies de la corticogenèse dues à des altérations de la dynamique du cycle cellulaire de la population des progéniteurs neurales (Pucilowska *et al.*, 2015). Egalement, la perte d'une copie du gène *Mvp* cause une activité ERK / MAPK élevée ainsi que des défauts de plasticité du cortex visuel (Ip *et al.*, 2018). Pourtant, il est probable que plusieurs gènes dans ce locus convergent sur la voie MAPK (Pucilowska *et al.*, 2018; données non publiées). A ce jour, le niveau auquel ce gène est impliqué dans les mécanismes pathophysiologiques affectés dans les syndromes 16p11.2 reste encore inconnu.

Le gène *SEZ6L2* (« Seizure related 6 homolog (mouse)-Like2 ») code pour une protéine de membrane type 1 qui contient les domaines du complément C1r / C1s, Uegf et Bmp1 (CUB) et le domaine de la protéine de contrôle du complément (CCP) (Miyazaki *et al.*, 2006). Les protéines contenant ces domaines peuvent constituer une nouvelle famille de protéines capables de moduler la localisation ou la fonction des récepteurs des neurotransmetteurs (Nakayama *et al.*, 2011). Il est également important de mentionner que *SEZ6L2* est l'une des sous-unités auxiliaires du récepteur AMPA et agit comme une protéine d'échafaudage pour lier la sous-unité 1 du récepteur ionotrope au glutamate de type AMPA (GLUR1) à

ADDUCIN (ADD). ADD est une protéine de terminaison des filaments d'actines associée au recrutement de la spectrine. De plus, la surexpression de *Sez6l2* régule positivement la phosphorylation de l'ADD, alors que la régulation négative de *Sez6l2* médiée par un petit ARN interférent (siRNA) empêche la phosphorylation de l'ADD, suggérant que *Sez6l2* module la transduction du signal AMPA-ADD (Yaguchi *et al.*, 2017). SEZ6L2 sert également de récepteur permettant le tri de la cathepsine D en des endosomes, et son clivage protéolytique par la cathepsine D pourrait être impliqué dans la modulation de la différenciation neuronale (Boonen *et al.*, 2016). Ce gène a été considéré comme un gène candidat pour les TSA en raison du niveau élevé d'expression dans le cerveau, spécifiquement dans l'hippocampe et le cortex cérébelleux, et de la forte homologie entre la protéine et SRPX2 (pour Sushi-repeat-containing protein, X-linked)), dont les mutations génétiques provoquent de l'épilepsie et des troubles du langage (Roll *et al.*, 2006). De plus, le SNP R386H du gène est associé aux TSA (Kumar *et al.*, 2009).

Dans l'ensemble, ces investigations soulignent la signification de ces gènes dans le neurodéveloppement humain. Cependant, il est encore nécessaire de mener des recherches qui permettent l'identification de gènes candidats pouvant être associés aux différents phénotypes montrés par les porteurs des CNVs 16p11.2. Ceci permettra la compréhension des mécanismes moléculaires affectés et la création des premières stratégies thérapeutiques.

Nous avons décidé de développer des modèles de souris porteurs des mutations nulles hétérozygotes affectant chacun des 2 gènes, *Mvp* et *Sez6l2*. Grâce à ces modèles, nous avons conduit une étude phénotypique de l'impact de ces mutations à l'état hétérozygote sur des animaux de 12 semaines d'âge. Comme dans le cas de la caractérisation comportementale des femelles 16p11.2 *Del/+* du chapitre précédent, ces modèles murins ont été soumis à une analyse phénotypique des capacités exploratrices et cognitives basée sur les déficits identifiés chez les souris mâles 16p11.2 (Arbogast *et al.*, 2016). Ainsi, si l'un des modèles récapitule les phénotypes trouvés chez le modèle murin pour la délétion de la région 16p11.2, nous pourrions lier le gène à l'apparition du déficit indiqué.

Matériels et méthodes

Lignes de souris, génotypage et autorisation éthique

Dans ce projet de recherche nous avons évalué le phénotype comportemental des modèles murins d'inactivation des gènes candidats *Mvp* et *Sez6l2*, sur un fond génétique consanguin pur C57BL/6N chez les individus mâles à partir de 12 semaines d'âge. Tout d'abord, pour le modèle d'inactivation du gène *Mvp*, nous avons eu accès à un modèle KO hétérozygote obtenu à partir d'une stratégie de mutation par insertion d'une cassette de piégeage de gènes (Friedel *et al.*, 2017) (Collaboration avec Dr. Yalcin. B.). La cassette virale est placée entre les exons 2 et 3 du gène et doit empêcher la transcription du gène *Mvp* (Figure 1). L'identification de la mutation a été menée grâce à la technique PCR. Les amorces KO (5'- CTTGCAAAATGGCGTTACTTAAGC -3') et WTr (5'- TTTTGCTTGGGATGGCTAAG -3') ont été utilisés pour obtenir une bande spécifique du produit de la délétion du gène de 308 pb et les amorces WTr (5'- AGGACAGAGCCTGGAAGTCA -3') et WTr (5'- TTTTGCTTGGGATGGCTAAG -3') ont été utilisés pour obtenir la bande spécifique du produit témoin de 542 pb. Le programme de PCR a été: 95°C / 4 min, 34 X (94°C / 30 sec; 62°C / 30 sec; 72°C / 1 min), 72°C / 7 min. Cependant, dans certains cas, l'inactivation de certains gènes par cette construction n'est pas assurée. Cette condition se produit lorsque la cassette de piégeage laisse passer la machinerie de transcription. Pour cette raison, nous avons décidé de créer un autre modèle à partir de la stratégie de mutation CRISPR / Cas9 (Figure 1). Cette technique a permis la création d'un allèle nul à partir de l'inactivation du gène en éliminant les exons 4 et 5. La mutation a été menée à partir de une micro-injection contenant deux paires d'ARN guide simple brin (« single guide RNA » ou sgRNA), une paire située en amont et l'autre en aval de la région cible et l'ARN de Cas9. Cette micro-injection a été administrée à des œufs fécondés de souris C57BL/6N femelles super ovulées sexuellement immatures (âgées de 4 à 5 semaines). Les embryons injectés ont été implantés dans les oviductes de femelles pseudo-enceintes (Birling M.-C. *et al.*, 2017) La mutation du gène a été identifiée par PCR en utilisant les amorces Ef (5'- GTCCTCGACAGTCAGAAGAGAGTGC -3') et Xr (5'- CCATCCACCACAGTG CTGC -3'). Le produit de la PCR donne une bande de délétion spécifique de 294 bp et une bande wt de 713 pb respectivement. Le programme de PCR utilisé a été: 98°C / 30 sec, 30 X (98°C / 8 sec; 60°C / 10 sec; 72°C / 30 sec), 72°C / 5 min.

Ensuite, pour la caractérisation du modèle d'inactivation du gène *Sez6l2* on a travaillé avec deux allèles différents (Figure 2). En première lieu, on a analysé l'allèle tm1a. Cet allèle est initialement une forme non-expressive développée par insertion d'une cassette de piégeage de gènes. La cassette de piégeage est placée entre les exons 6 et 7 du gène et doit empêcher la transcription du gène *Sez6l2*. Dans le cas particulier de cet allèle les exons ciblés sont présent dans le génome des souris. Pour cette raison, afin de valider ce modèle KO on a vérifié l'expression de l'ARN messager du gène. Ultérieurement, on a analysé l'allèle tm1b. Cet allèle est un allèle Knock-In conditionnel, dont construction conduit à la perte d'un exon critique après l'action de la recombinaise Cre (Skarnes *et al.*, 2011). L'avantage que présente cet allèle est que les exons ciblés n'est pas présent dans le génome des souris. Un impact sur

la viabilité a été observé pour l'inactivation du gène à partir de cette construction dans le croisement hétérozygote sur le fond génétique B6N (Table 1).

Dans le deux cas, l'inactivation de *Sez6l2* a été identifiée par PCR en utilisant les amorces Ef (5'-TGCAAAAAGGAATGGCTACACAGTTG- 3') et Kr (5'-CTCCTACATAGTTGGCAGTGTGGG- 3'). Le produit de la PCR a été une bande de délétion spécifique de 333 pb. Le programme de PCR a été: 95°C / 2 min, 35 X (95°C / 30 sec; 62°C / 30 sec; 72°C / 1 min), 72°C / 7 min.

Les procédures expérimentales concernant l'utilisation d'animaux à des fins scientifiques ont été approuvées par le Ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation avec l'accord du comité d'éthique local Com'Eth (n°017) sous le numéro d'accréditation APAFIS#9290-2017031617456047 v4 et dont la responsabilité de la mise en œuvre générale du projet et de sa conformité à l'autorisation est assurée par Monsieur Yann HERAULT (accréditation 67-369).

Détection et quantification de l'ARN du gène *Sez6l2* pour l'allèle *tm1a* par qRT-PCR

Comme nous l'avons mentionné précédemment, le premier modèle auquel nous avons accès pour le gène candidat *Sez6l2* était l'allèle *tm1a*. Cet allèle a été conçu à l'origine pour être un knock-out à partir de l'épissage de l'ADNc à une cassette LacZ. La cassette a ensuite été insérée en amont d'un exon critique pour créer un allèle nul du gène. Cependant, pour de nombreux gènes, le saut de la cassette LacZ a permis de restaurer l'expression du gène dans une certaine mesure. Pour cette raison, on a décidé d'analyser la détection et quantification de l'ADNc du gène, obtenu par retrotranscription de l'ARN, à partir de la technique de qRT-PCR.

La synthèse de l'ADNc a été réalisée à l'aide du kit de synthèse d'ADNc SuperScript® VILO™ (Invitrogen, Carlsbad, CA). La PCR a été réalisée avec TaqMan® Universal Master Mix II et des tests d'expression génique TaqMan® pré-optimisés (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, États-Unis), consistant en une paire d'amorces PCR non marquées et une sonde TaqMan® avec un test Applied Biosystems™ FAM™ étiquette de colorant sur l'extrémité 5' et le minor groove binder (MGB) et nonfluorescent quencher (NFQ) sur l'extrémité 3'. Les efficacités des tests de Taqman ont été vérifiées en utilisant une série de dilutions d'ADNc à partir d'extraits d'échantillon d'hippocampe. La normalisation a été effectuée en parallèle avec l'amplification de 3 gènes de ménage (*Gnas*, *Pgk1* et *Actb*) et en utilisant la procédure GeNorm afin de corriger les variations de la quantité d'ARN source dans le matériel de départ (Vandesompele *et al.*, 2002). Tous les échantillons testés ont été réalisés en triple.

Symbole du gène	Nombre du gène	ID	Limite d'exon	Emplacement du test RefSeq	Longueur d'amplicon
Actb	Actin, beta	Mm00607939_s1	6-6	1233	115
Gnas	GNAS (guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating) complex locus	Mm01242435_m1	4-5	2609	57
Pgk1	Phosphoglycerate kinase 1	Mm00435617_m1	5-6	675	137
Sez6l2	Seizure related 6 homolog like 2	Mm00523504_m1	12-13	2601	86

L'élevage et la conception de l'analyse

Afin de chercher des gènes candidats responsables des phénotypes associés à la délétion 16p11.2 on a suivi un protocole de caractérisation comportemental. La sélection de la batterie de test a été basée sur les capacités cognitives affectées chez le mâle 16p11.2 *Del/+*.

Nous avons uniquement sélectionné les individus mâles pour cette étude. Les animaux utilisés ont été regroupés de plusieurs portées, en ensembles de 2 à 4 souris après le sevrage, dans des cages de 39 x 20 x 16 cm (Green Line, Techniplast, Italy) où elles ont eu l'accès libre à l'eau et à la nourriture (D04 chow diet, Safe, Augy, France). Les chambres où les sujets ont été gardés ont été maintenues à une température constante de 21 ± 2 °C, avec un cycle de lumière contrôlé comme 12 h de lumière et 12 h de sombre (les lumières ont été allumés à 7h).

Les souris furent transférées de l'animalerie d'élevage à la zone de comportement avec 11 semaines d'âge. Au cours de cette semaine, les souris se sont habituées à ce nouvel environnement et elles ont été manipulées quotidiennement par l'expérimentateur.

Afin de valider l'implication des gènes candidats aux phénotypes associés à la délétion 16p11.2, on a développé un protocole d'analyse de caractérisation comportemental basé sur les capacités cognitives affectées chez le mâle. Les souris ont subi les tests de comportement dans l'ordre suivant: le test de champ ouvert, la tâche de reconnaissance du nouvel objet et l'activité circadienne à 12 semaines et le test du comportement répétitif à 13 semaines.

Les jours où les tests ont été effectués, les animaux ont été placés dans l'antichambre de la salle expérimentale 30 min avant le début de l'expérience. Tous les tests ont été menés par le chercheur à l'aveugle par rapport à l'information du génotype des souris, comme il est recommandé par les directives ARRIVE (Karp et al., 2015; Kilkenny et al., 2010).

Le test de champ ouvert a été utilisé pour évaluer le comportement exploratoire du rongeur dans un nouvel environnement. Le test a été réalisé dans une enceinte ronde de PVC blanc avec des murs et fond opaques de 30 cm de haut et 50 cm de diamètre (Figure 3 A). L'arène a été éclairée pour avoir 60 Lux au centre et elle est placée sous une caméra permettant un suivi de l'animal. Le test se compose d'une session unique de 30 min, pendant laquelle on peut mesurer la distance parcourue, le temps passé sur chaque zone de l'arène (le centre, la zone intermédiaire, la périphérie et les murs) ainsi qu'évaluer l'habituation de l'animal au cours du temps, en fractionnant les données en intervalles de 10 minutes.

La tâche de reconnaissance du nouvel objet est basée sur la préférence innée des rongeurs pour la nouveauté et permet d'analyser la mémoire de reconnaissance entre un objet observé précédemment et un nouvel objet. Cette évaluation se déroule dans la même espace que le champ ouvert. Le premier jour, les souris ont été habituées à l'arène pendant 30 minutes à 60 Lux. Le deuxième jour, les animaux ont été soumis au premier essai d'acquisition de 10 minutes au cours duquel ils ont été individuellement mis en présence de deux objets A (marbre ou dés) placés à 28 cm entre eux. Le temps d'exploration de l'objet A

(lorsque le museau de l'animal était dirigé vers l'objet à une distance ≤ 1 cm) a été enregistré. Après une période de rétention de 3 heures à l'intérieur des cages d'hébergement, un deuxième essai de discrimination d'objet a été effectué. L'objet familier A et un nouvel objet (objet B) ont été placés à la même distance et position et le temps d'exploration de ces deux objets a été enregistré (Figure 3 A).

Un index de reconnaissance a été défini comme $((t_B / (t_A + t_B)) \times 100)$. Toutes les souris n'ayant pas exploré les objets présentés plus de 3 secondes au cours de l'essai d'acquisition ou de rétention ont été exclues de l'analyse.

Le test de l'activité circadienne nous a permis d'évaluer l'activité endogène au cours du cycle de lumière et sombre. L'essai a eu lieu dans des cages individuelles (11 x 21 x 18 cm) équipées de capteurs infrarouges connectés à une interface électronique (Imetronic, France) qui fournissent des mesures automatisées de la position et de l'activité locomotrice de la souris testée (Figure 3 B). Les animaux ont été placés dans les cages à 19 h le premier jour et le test a fini le troisième jour à 7h (60 h). Le cycle de lumière a été contrôlé comme 12 h de lumière et 12 h de sombre.

Le test de comportement répétitif nous a permis d'évaluer la présence de comportement stéréotypé sur notre modèle animal. Les souris femelles sont placées individuellement dans des cages d'hébergement propres faiblement éclairées à 60 lux sans le couvercle (Figure 3 C). L'occurrence des comportements du redressement, du saut, de l'escalade, du creusage, et du toilettage est notée pendant 10 min. Les tâches sélectionnées ont été le test de champ ouvert, le test de reconnaissance du nouvel objet, l'activité circadienne et le test de comportement répétitif.

Analyses statistiques

Les résultats obtenus à partir de ce travail de recherche ont été analysés statistiquement en utilisant le logiciel Sigma Plot (Sigma). Toutes les valeurs aberrantes ont été identifiées à l'aide du test de Grubbs en utilisant le calculateur GraphPad et exclues de notre analyse. Les données obtenues à partir de la caractérisation phénotypique des modèles ont été analysées par le test de Student pour autant que les données aient suivi une distribution normale et présentent une variance égale. Dans le cas contraire, le test non-paramétrique U de Mann-Whitney a été utilisé. De plus, le test « One Sample T test » a été utilisé pour comparer les valeurs de l'index de reconnaissance au niveau de chance de 50%. Les données provenant de l'évaluation de la transmission d'allèles mutants ont été analysées par le test du χ^2 de Pearson. Les données ont été représentées comme la moyenne \pm l'écart-type et le seuil significatif a été $p < 0,05$.

Résultats

Caractérisation cognitive du modèle d'inactivation du gène *Mvp*

Le premier modèle murin auquel nous avons eu accès était le modèle d'inactivation du gène *Mvp* à l'état hétérozygote, généré par l'insertion d'une cassette de piégeage de gènes dans le génome de cellules souches embryonnaires. Le vecteur a été placé entre l'exon 2 et 3 du gène et devait empêcher la transcription du gène. Étonnamment, l'étude phénotypique à laquelle ces souris ont été soumises n'a pas révélé de déficits cognitifs importants, à l'exception de certaines altérations par rapport au temps passé dans les différentes zones du test de champ ouvert (Figure 4). En particulier, les souris *Mvp*^{+/-} restent significativement plus de temps dans la zone centrale et intermédiaire et moins de temps dans la zone périphérique de l'arène (Centre: Test de Student, $T = 170,000$; $p = 0,021$; Zone intermédiaire: Test U de Mann-Whitney, $t_{(21)} = -2,227$; $p = 0,037$; Périphérie: Test de Student, $t_{(21)} = 2,411$; $p = 0,025$).

Cependant, l'inactivation de certains gènes par l'insertion d'une cassette de piégeage n'est pas toujours valide. Dans certains cas, la cassette de piégeage laisse passer la machinerie de transcription et permis ainsi la lecture du gène d'intérêt dans une certaine mesure.

Par la suite, notre laboratoire a développé un nouveau modèle d'inactivation de *Mvp* par l'excision des exons 4 et 5 grâce à la technologie de modification de l'ADN CRISPR / Cas9. La caractérisation de ces souris a commencé par le test de champ ouvert (Figure 5). Les individus mutants ne présentent aucune anomalie dans l'activité d'exploration du nouvel environnement comme dans le cas précédent, bien qu'ils aient été moins actifs que le modèle antérieur. Cependant, ces souris ne présentent pas de changements dans le temps d'exploration de chaque zone du test. Ensuite, les animaux ont passé le test NOR, où ils devaient être capables de différencier entre un nouvel objet et un objet précédemment exploré. Les deux génotypes ont développé un indice de reconnaissance du nouvel objet significativement supérieur au niveau de chance de 50% (One sample t test: wt ($t_{(14)} = 3,1375$; $p = 0.0073$), *Mvp*^{+/-} ($t_{(14)} = 2,9036$; $p = 0,0116$)). Plus tard, notre laboratoire a évalué l'influence de la perte d'une copie du gène dans le test d'activité circadienne. Nous avons constaté que les souris mutantes ne développent pas de phénotypes ni dans l'activité locomotrice mesurée comme le nombre de va et viens dans la cage du test, ni l'activité verticale mesurée comme le nombre de redressements, au cours des cycles de lumière et sombre. Enfin, nous nous demandions si ce modèle présentait des comportements stéréotypés, un phénotype trouvé chez des souris déficientes 16p11.2 (Arbogast *et al.*, 2016). Afin de répondre à cette question, nous avons évalué la présence de comportements répétitifs pour des événements différents trouvés chez la souris. Nous n'avons pas observé de modifications significatives par rapport aux souris témoins.

Caractérisation cognitive du modèle d'inactivation du gène *Sez6l2*

Après la caractérisation de *Mvp^{+/-}*, nous avons effectué le phénotypage comportemental du modèle *Sez6l2^{+/-}*. Pour la caractérisation de cette modèle, on a travaillé avec deux allèles différents. En première lieu, on a analysé l'allèle *tm1a*. Cet allèle est initialement une forme non-expressive développée par insertion d'une cassette de piégeage de gènes. Cette construction s'est placée entre l'exon 6 et 7 du gène et doit empêcher la transcription du gène. Ensuite, nous avons décidé de répéter la même batterie de tests que pour le modèle précédemment évalué sur la base des phénotypes associés à la perte d'une copie de 16p11.2 (Figure 6). L'analyse comportementale de ce modèle murin *Sez6l2^{tm1a/+}* chez le male montre une déficience dans la mémoire de reconnaissance d'objet. En fait, les souris mutantes ont présenté un index de reconnaissance du nouvel objet non significativement supérieur au niveau de chance de 50%, contrairement aux souris témoins (One sample t test: wt ($t_{(10)} = 3,0486$; $p = 0,0123$), *Sez6l2^{tm1a/+}* ($t_{(8)} = 2,2324$; $p = 0.0561$)). De plus, nous avons observé la présence de comportements répétitifs d'escalade significativement supérieurs aux individus wt (Test U de Mann-Whitney : $T = 409,500$; $p = 0,040$).

Le principal avantage de cette construction est sa polyvalence. Pourtant l'inconvénient fondamentalement est que, bien que la cassette de piégeage évite la lecture du transcrit du gène, cette cassette pourrait éventuellement laisser passer la machinerie de transcription de l'ADN et permettre l'expression du gène car les exons ciblés sont toujours présents dans le génome. Donc, afin de valider ce modèle KO hétérozygote on a réalisé des analyses d'expression de RNAm du gène et les résultats nous indiquent une diminution significative de l'expression du gène chez les individus hétérozygotes *Sez6l2^{tm1a/+}* (Test de Student, $t_{(8)} = 2,438$; $p = 0,041$) (Figure 7).

Ensuite, on a analysé l'allèle *tm1b* (Figure 8). Cet allèle est un allèle Knock-In conditionnel généré à partir de la délétion inducible par la recombinaison Cre. L'avantage qui présente cet allèle est que les exons ciblés ne sont pas présentes dans le génome des souris. On pourrait aussi considérer cela comme un allèle plus propre, en raison de l'absence du gène marqueur néomycine qui pourrait avoir une implication dans les phénotypes retrouvés. Lors de l'amplification de la ligne nous avons observé une réduction de la transmission de l'allèle mutant par rapport à la transmission mendélienne. Ces résultats montrent un effet de l'haplo-insuffisance du gène dans la viabilité des souris. L'analyse cognitive et comportementale nous a montré que les souris *Sez6l2^{tmb1/+}* développent des déficits profonds dans la capacité de reconnaissance d'objet. Leur indice de reconnaissance du nouvel objet a été inférieur au niveau de chance de 50% (One sample t test: wt ($t_{(32)} = 3,2605$; $p = 0,0026$), *Sez6l2^{tmb1/+}* ($t_{(18)} = 1.9792$; $p = 0.0633$)). En outre, comme l'allèle *tm1a*, nous avons observé la présence de comportements stéréotypés significativement supérieurs aux individus wt, mais dans ce cas-là il s'agit de l'événement de creuser (Test U de Mann-Whitney : $T = 556,000$; $p = 0,029$).

Discussion et conclusion

La micro-délétion de la région 16p11.2 *SULT1A1-SPN* augmente la sensibilité à divers troubles neuropsychologiques. Comme nous l'avons indiqué précédemment, les désordres le plus fréquemment diagnostiqués sont la déficience intellectuelle et les TSA. Cette CNV est également associée à d'autres symptômes anatomiques liés à la taille de la tête et au poids corporel. Dans cette étude, nous avons décidé de trouver des candidats dans l'intervalle génétique en créant des modèles murins d'inactivation de 2 gènes qui pourraient copier le phénotype étroitement au modèle de délétion de la région 16p11.2.

***Mvp* n'a pas d'implication directe dans les phénotypes cognitifs et d'apprentissage associés à la délétion 16p11.2**

Le premier modèle de souris caractérisé a été le modèle pour l'inactivation du gène *Mvp*. Pour obtenir cette modélisation, nous avons eu accès à une première construction génétique qui devrait empêcher la lecture du transcrit du gène grâce à une cassette de piégeage. Ces souris présentent des anomalies dans le temps passé sur la zone centrale, intermédiaire et périphérique du nouvel environnement créé dans le test en champ ouvert. Cependant, cette construction n'est pas toujours fiable à cause de la possibilité de lecture du gène. Pour cette raison, nous avons décidé de l'exclure.

La deuxième stratégie de mutation utilisée était CRISPR / Cas9, une technique bien connue pour ses applications en biologie moléculaire pour l'édition de l'ADN, à partir de laquelle deux exons du gène endogène ont été excisés. Dans ce cas, aucune anomalie n'est observée pour le phénotype de l'activité d'exploration, de l'activité circadienne, de la mémoire de reconnaissance ou de la présence de comportements répétitifs. Ces résultats indiquent que le phénotype observé sur le premier allèle pourrait être dû à des effets causés par la cassette de piégeage incluant le gène rapporteur et le gène de sélection (β -galactosidase / néomycine phospho-transférase), car ce phénotype n'a pas été observé sur le second allèle.

Ce gène est impliqué dans certains processus importants du développement neural. Il est fortement exprimé dans les neurones cérébrocorticaux en développement et il se présente comme une molécule clé influençant le composant homéostatique de la plasticité synaptique dépendante de l'activité, *via* la régulation de STAT1 et la signalisation ERK (Ip *et al.*, 2018). Pourtant il est important de mentionner que jusqu'à présent, *Mvp* n'a pas été associé directement à des phénotypes liés à la délétion 16p11.2, bien qu'il a été démontré que ce gène augmentait significativement l'expressivité du phénotype du volume cérébral associé à la délétion de *Kctd13* (Golzio *et al.*, 2012; Arbogast *et al.*, 2019). Ces études ont précisé également que les patients porteurs d'altérations du niveau d'expression de *MVP* pourraient avoir un phénotype plus grave que les individus qui présentent une perte unique de fonction hétérozygote du KCTD13.

L'inactivation de *Sez6l2* provoque des déficits dans la mémoire de reconnaissance et des comportements répétitifs

Nous avons sélectionné à *Sez6l2*, en raison de sa forte expression dans les régions de l'hippocampe et du cortex cérébral; deux structures essentielles pour la formation de la mémoire. Afin d'obtenir notre modèle nous avons utilisé une construction initiale tm1a de l'IMPC (www.mousephenotype.org), qui a été conçue à l'origine pour être une invalidation génétique en épissant l'ARNm au niveau d'une cassette LacZ de piégeage de gène. Notre analyse montre un phénotype altéré de la mémoire de reconnaissance d'objet ainsi que la présence de stéréotypie pour le comportement d'escalade. Bien que cette construction soit très polyvalente, dans certains cas, un possible saut par-dessus la cassette LacZ pourrait restaurer l'expression génique dans une certaine mesure. Pour cette raison, la transformation de l'allèle tm1a en allèle tm1b grâce à la recombinaison Cre est nécessaire. Nous avons donc obtenu l'allèle tm1b. L'analyse phénotypique de ce nouveau modèle révèle également des déficits dans la détection de nouveauté dans le test de mémoire de reconnaissance et la présence des comportements stéréotypés de creusage.

Les souris porteuses des deux constructions présentent des phénotypes similaires, à l'exception du type de comportement répétitif. La différence du type de stéréotypie entre les deux allèles pourrait s'expliquer par la diversité des types de comportement restreint, répétitif et stéréotypé montrée par les patients atteints des ASD (Cunningham *et al.*, 2008).

En outre, ces résultats similaires sont en accord avec l'analyse de l'expression de l'ARNm pour l'allèle tm1a qui montre une diminution significative de l'expression du gène chez les souris hétérozygotes. En plus, notre travail souligne l'implication de la dérégulation des niveaux d'expression de *Sez6l2* dans les phénotypes de mémoire de reconnaissance et les comportements répétitifs liés à la perte d'une copie de la région 16p11.2. Cependant, nos données n'excluent pas la possibilité que d'autres loci apportent également une contribution aux phénotypes cognitifs associés à la délétion 16p11.2 et ne permettent pas de déterminer directement si la totalité de la pathologie observée chez les patients porteurs de la délétion 16p11.2 est dictée par les modifications dans le dosage de *Sez6l2*. En outre, notre étude a montré un effet de l'haplo-insuffisance du gène sur la viabilité des animaux. Cette observation a été également montrée dans la caractérisation des souris porteuses des réarrangements 16p11.2 *Sult1a1-Spn*. Notre travail souligne également l'implication de la dérégulation des niveaux d'expression de *Sez6l2* dans l'altération de la viabilité et les troubles du développement associés aux CNVs 16p11.2.

Conclusion de l'étude

Nos modèles murins d'inactivation indépendante de 2 gènes de la micro-délétion atypique associée au développement des TSA chez l'homme, représentent de nouveaux outils génétiques permettant la compréhension des mécanismes moléculaires liés aux syndromes 16p11.2. Plus précisément, nos recherches indiquent que *Sez6l2* est un gène majeur pour l'apparition des comportements stéréotypés. De plus, le dosage de *Sez6l2*, comme celui de *Kctd13* (Chapitre: Etude de l'inhibition pharmacologique de la voie de signalisation

RHOA/ROCK dépendante de l'interaction entre KCTD13 et CULLIN sur les modèles 16p11.2 *Del/+* et *Kctd13 +/-*) est déterminant pour le développement de la mémoire de reconnaissance d'objets. Pour conclure, nous estimons nécessaire d'analyser dans des futures recherches les niveaux des protéines SEZ6L2 et KCTD13 chez les deux modèles afin de comprendre si l'altération du niveau d'expression de l'un des gènes aurait un effet épistatique sur l'autre gène. Nous pourrions évaluer également le comportement du modèle double hétérozygote (*Sez6l2^{tm1b},+)/(+; Kctd13^{Yah1}*), dans le but de vérifier si la double inactivation augmente l'expressivité du phénotype. En plus, bien que la perte d'une copie de *Mvp* ne soit pas suffisante pour induire des altérations cognitives, des futures évaluations comportementales et de l'apprentissage sur le modèle double hétérozygote (*Mvp^{+/-},+)/(+; Kctd13^{Yah1}*), ainsi que sur le modèle pour la micro-délétion *Mvp-Kctd13* doivent être mises en œuvre.

Comme nous l'avons mentionné précédemment dans l'introduction de ce manuscrit, la région 16p11.2 contient de nombreux gènes essentiels pour le développement du système nerveux. Parmi eux nous avons décrit par exemple, le gène *QPRT* impliqué indirectement dans le développement du cortex préfrontal dorsolatéral, de l'hippocampe et de l'amygdale, précédemment associé aux ASD (Haslinger *et al.*, 2018) ; le gène *PRRT2* associé aux phénotypes épileptiques (Michetti *et al.* 2017; Vlaskamp *et al.*, 2019) ; le gène *ALDOA* dont les mutations ont été identifiées dans des cas de retard mental (Beutler *et al.*, 1973), de microcéphalie, de retard de langage (Kreuder *et al.*, 1996), de schizophrénie et de dépression (Beasley *et al.*, 2006) ou le gène *MAPK3* présent dans la voie de signalisation Ras / MAPK associée fréquemment aux ASD (Mitra *et al.*, 2017). Nos résultats ainsi que ces études corroborent la complexité des interactions génétiques associées à l'expression phénotypique liée aux syndromes des CNVs 16p11.2.

Légendes des figures

Figure 1. (A) La stratégie de mutation pour la modélisation de la perte d'une copie du gène *Mvp*. Cette technique est basée sur l'introduction d'une cassette de piégeage dans le génome (entre l'exon 2 et 3 du gène) des cellules souches embryonnaires (ES). Cette construction contient à l'intérieur un site accepteur d'épissage, qui permet la lecture du vecteur lorsqu'il est reconnu comme le début d'un exon du gène par la machinerie de transcription de l'ADN et d'engendrer ainsi le transcrit de la cassette. En suit, l'expression de la séquence du rapporteur/sélection β -galactosidase/néomycine phosphotransférase confère une résistance aux médicaments et permet de sélectionner positivement toutes les cellules ayant intégré la construction introduite. Finalement la «construction-piège» interrompe le gène *Mvp* endogène avec la présence à la fin d'une queue poly(A) et donc elle agit comme un agent mutagène. Le principal inconvénient de cette construction est que le mécanisme de transcription de l'ADN peut sauter la cassette et coder le gène endogène. Les produits spécifiques de la PCR pour l'allèle wild-type (542 pb) et de la mutation (308 pb). (B) Stratégie de mutation basée sur la technologie CRISPR / Cas9 pour l'inactivation du gène *Mvp*. Il s'agit d'un outil de modification du génome. Il est constitué par deux paires d'ARN guide simple brin qui ciblent la séquence d'ADN en amont et en aval des exons 4 et 5 d'une des copies du gène et l'enzyme Cas9 qui coupe la séquence ciblée. De cette manière, les exons critiques sont éliminés et l'inactivation est obtenue. Les produits spécifiques de la PCR pour les allèles wild-type (713 pb) et de la mutation (294 pb).

Figure 2. La modélisation de l'inactivation du gène *Sez6l2* à l'état hétérozygote a été menée à partir de deux constructions différentes. (A) En première lieu, l'allèle tm1a est une forme non-expressive «knockout-first» qui contient une cassette de piégeage LacZ (gène rapporteur) et une cassette pilotée par un promoteur floxé qui contient néomycine. Ces séquences permettent le marquage et la sélection des cellules génétiquement modifiées. La cassette de piégeage inclue également l'accepteur d'épissage et les séquences de polyadénylation, deux signaux très efficaces pour créer des allèles nuls chez la souris. Ces vecteurs ont été insérés en amont des exons 6 et 7 de *Sez6l2*, perturbant ainsi la fonction du gène. L'allèle tm1a peut être facilement modifié à partir de croisements entre des souris porteuses de l'allèle tm1a et des souris transgéniques exprimant la recombinaise Cre pour obtenir l'allèle Knock-In conditionnel (tm1b). (B) Le modèle obtenue à partir de l'allèle tm1b créé pour l'inactivation du gène *Sez6l2*. L'allèle tm1b est produit par la délétion des exons critiques et de la cassette de néomycine en utilisant une recombinaise Cre qui reconnaît les sites loxP. Cet allèle est considéré comme une véritable invalidation génique, car l'absence des exons 6 et 7 empêche que le saut de la cassette LacZ pour la machinerie de transcription restaure l'expression du gène. Le produit spécifique de la PCR pour les allèles tm1a et tm1b (333 pb).

Figure 3. Dépistage du phénotype cognitif et comportemental. (A) De gauche à droite, on montre le schéma de l'arène où le test de champ ouvert ainsi que la première phase d'habituation du test de reconnaissance du nouvel objet ont eu lieu. L'image centrale

présente la phase d'acquisition de 10 min au cours de laquelle les souris sont présentées à deux objets identiques (par exemple deux billes opaques verts). La dernière image montre la phase de rétention où un des deux objets est changé par un nouvel objet (par exemple un dé). (B) Test d'activité circadienne. (C) Test de comportement répétitif. Afin d'analyser la présence des comportements stéréotypés, les souris sont mises individuellement dans une cage d'hébergement.

Figure 4. Caractérisation comportementale du modèle de souris *Mvp^{+/-}* à partir d'une cassette de piégeage. (A) L'analyse du comportement exploratoire des mâles (wt (n = 12) et *Mvp^{+/-}* (n = 12)) dans le test de champ ouvert. Les souris ont été placées dans l'enceinte pendant une session de 30 min et elles ont été permises d'explorer le nouvel environnement librement. En première lieu, le graphique montre l'activité d'exploration à partir de la distance (m) totale parcourue au cours du test. Ensuite, nous évaluons l'adaptation des souris à l'environnement en divisant la session du test en périodes de temps. Le graphique central montre la moyenne de la distance parcourue chaque 10 min pour les deux génotypes. Finalement, nous analysons le temps (s) resté par chaque souris sur les zones établies de l'arène (la zone centrale, la zone intermédiaire, la zone périphérique et les murs). Les souris mutantes *Mvp^{+/-}* restent significativement plus de temps dans la zone centrale et intermédiaire et moins de temps dans la zone périphérique de l'arène (Centre : Test de Student, $T = 170,000$; $p = 0,021$; Zone intermédiaire : Test U de Mann-Whitney, $t(21) = -2,227$; $p = 0,037$; Périphérie : Test de Student, $t(21) = 2,411$; $p = 0,025$). (B) Tâche de mémoire de reconnaissance de nouvel objet. Les mâles de deux génotypes (wt (n = 15) et *Mvp^{+/-}* (n = 15)) ont été évalués pour la mémoire de reconnaissance des objets avec un délai de 3 heures. Le premier graphique montre le temps (s) d'exploration de chacun des deux objets pendant la phase d'acquisition, placés à la droite (D) et à la gauche (G) de l'arène. Ensuite, le graphique représente l'index de reconnaissance, comme la capacité de distinguer entre le nouvel objet et l'objet familier. Tous les génotypes présentent un index de reconnaissance significativement supérieur au niveau de chance de 50 % (One sample t test: wt ($t_{(14)} = 3,1375$; $p = 0,0073$), *Mvp^{+/-}* ($t_{(14)} = 2,9036$; $p = 0,0116$)). (C) Le test d'activité circadienne. En haut: Le graphique supérieur montre l'activité locomotrice mesurée par le nombre de va et viens dans la cage du test, au cours des intervalles du cycle de 12 h de lumière et 12 h de sombre (les lumières s'allument à 7h). Ensuite, l'activité locomotrice totale de chaque génotype au cours du test, ainsi que l'activité locomotrice pendant les périodes de lumière et de sombre. En bas: le graphique inférieur montre l'activité verticale de notre modèle à partir du nombre de redressements montré par les souris. Ces données sont représentées avec le même schéma que pour l'activité locomotrice. Le modèle *Mvp^{+/-}* (wt (n = 10) et *Mvp^{+/-}* (n = 10)) ne développe pas d'altérations de l'activité locomotrice ni de l'activité verticale. (D) Le test d'évaluation de la présence de comportement répétitif (wt (n = 9) et *Mvp^{+/-}* (n = 10)). Des occurrences des redressements, des sautes, des escalades, des creusages et des toilettages pendant 10 min dans une nouvelle cage d'hébergement. Les individus mutants ne présentent pas d'augmentation significative du comportement répétitif par rapport aux souris wt. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Figure 5. Caractérisation du modèle *Mvp^{+/-}* à partir de la technologie CRISPR / Cas9. (A) Le comportement exploratoire des souris mâles (wt (n = 6) et *Mvp^{+/-}* (n = 9)) dans le test de champ ouvert. (B) Tâche de mémoire de reconnaissance de nouvel objet. Tous les génotypes (wt (n = 5) et *Mvp^{+/-}* (n = 8)) montrent un index de reconnaissance significativement supérieur au niveau de chance de 50 % (One sample t test: wt ($t_{(4)} = 5,9230$; $p = 0,0041$), *Mvp^{+/-}* ($t_{(4)} = 4,7864$; $p = 0,0020$)). (C) Le test d'activité circadienne (wt (n = 6) et *Mvp^{+/-}* (n = 8)). (D) Le test d'évaluation de la présence de comportement répétitif (wt (n = 6) et *Mvp^{+/-}* (n = 9)). (** $p < 0.01$).

Figure 6. L'analyse cognitive du modèle de souris *Sez6l2^{+/-}* créé à partir de la forme non expressive du gène (*Sez6l2^{tm1a/+}*). (A) Le test de champ ouvert pour l'analyse du comportement d'exploration de notre modèle (wt (n = 23) et *Sez6l2^{tm1a/+}* (n = 24)). Pour ce test nous avons mesuré la distance (m) totale parcourue, la moyenne de la distance parcourue en des intervalles de 10 min et le temps (s) resté par nos souris sur les zones de l'arène. L'analyse de l'activité d'exploration de notre modèle dans le test de champ ouvert montre un phénotype normal par rapport aux individus wt. (B) Test d'évaluation de la mémoire de reconnaissance de nouvel objet. Les souris mâles de deux génotypes (wt (n = 11) et *Sez6l2^{tm1a/+}* (n = 9)) ont été évaluées pour la capacité de distinction entre un objet précédemment observé et un nouvel objet avec un délai de 3 heures. Alors que les individus wt présentent un index de reconnaissance significativement supérieure au niveau de chance de 50 %, les souris *Sez6l2^{tm1a/+}* montrent des déficits de reconnaissance d'objet (One sample t test: wt ($t_{(10)} = 3,0486$; $p = 0,0123$), *Sez6l2^{tm1a/+}* ($t_{(8)} = 2,2324$; $p = 0,0561$)). (C) Le test d'activité circadienne. L'analyse de l'effet de la perte d'une copie du gène *Sez6l2* sur l'activité circadienne (wt (n = 23) et *Sez6l2^{tm1a/+}* (n = 24)) nous montre que cette mutation ne cause pas d'altérations de l'activité locomotrice (nombre va et viens) ni l'activité vertical (nombre de redressements). (D) Le test de comportement répétitif (wt (n = 23) et *Sez6l2^{tm1a/+}* (n = 22)). Les individus mutants présentent une augmentation significative de comportements répétitifs par rapport à l'évènement d'escalade (Test U de Mann-Whitney : $T = 409,500$; $p = 0,040$) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Figure 7. La technique de qRT-PCR pour la quantification de l'ADNc obtenu à partir de transcription inverse de l'ARNm provenant de l'extraction d'échantillons d'hippocampe du modèle *Sez6l2^{tm1a/+}* (wt (n = 4) et *Sez6l2^{tm1a/+}* (n = 5)) ; Test de Student, $t_{(8)} = 2,438$; $p = 0,041$). (* $p < 0.05$).

Figure 8. L'évaluation du phénotype comportemental du modèle *Sez6l2^{+/-}* créé à partir du Knock-in conditionnel (*Sez6l2^{tm1b/+}*). (A) L'analyse du comportement exploratoire des mâles (wt (n = 38) et *Sez6l2^{tm1b/+}* (n = 31)) dans le test de champ ouvert. L'allèle *tm1b* pour la délétion du gène *Sez6l2* ne provoque pas d'altérations de l'activité d'exploration. (B) Tâche de mémoire de reconnaissance de nouvel objet. Les souris *Sez6l2^{tm1b/+}* (wt (n = 33) et *Sez6l2^{tm1b/+}* (n = 19)) montrent un index de reconnaissance en dessous du niveau de chance de 50 % (One sample t test: wt ($t_{(32)} = 3,2605$; $p = 0,0026$), *Sez6l2^{tm1b/+}* ($t_{(18)} = 1.9792$; $p = 0.0633$)). (C) Le test d'activité circadienne (wt (n = 24) et *Sez6l2^{tm1b/+}* (n = 18)). Les individus

mutants ne montrent pas des variations dans l'activité locomotrice spontanée ou le nombre de redressement au cours des phases de lumière et sombre. **(D)** Le test d'évaluation de la présence de stéréotypie (wt (n = 25) et *Sez6/2^{tmb1/+}* (n = 20)). Dans ce cas, les individus *Sez6/2^{tmb1/+}* présentent une augmentation significative de comportements répétitifs par rapport à l'évènement de creusage. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Figures

Figure 1. La stratégie de mutation pour l'obtention de l'inactivation du gène *Mvp* par l'insertion de la cassette de piégeage de gènes ou la technologie CRISPR / Cas9 et la validation moléculaire

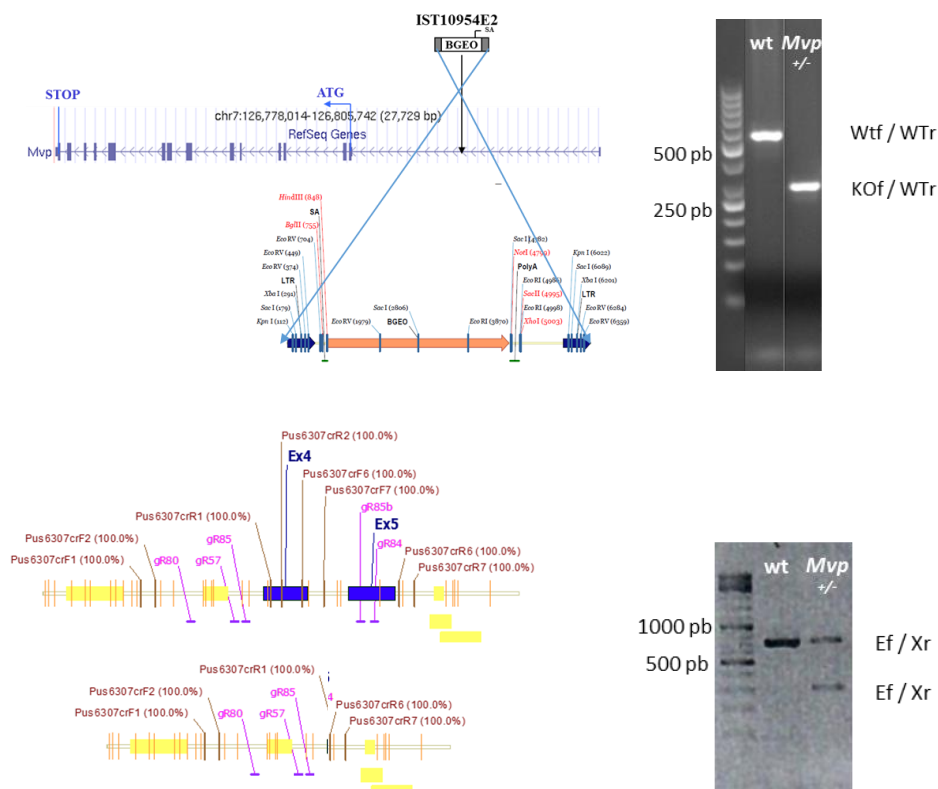


Figure 2. La stratégie de mutation pour l'obtention de l'inactivation du gène *Sez6l2* à partir de l'allèle tm1a et tm1b et sa validation moléculaire

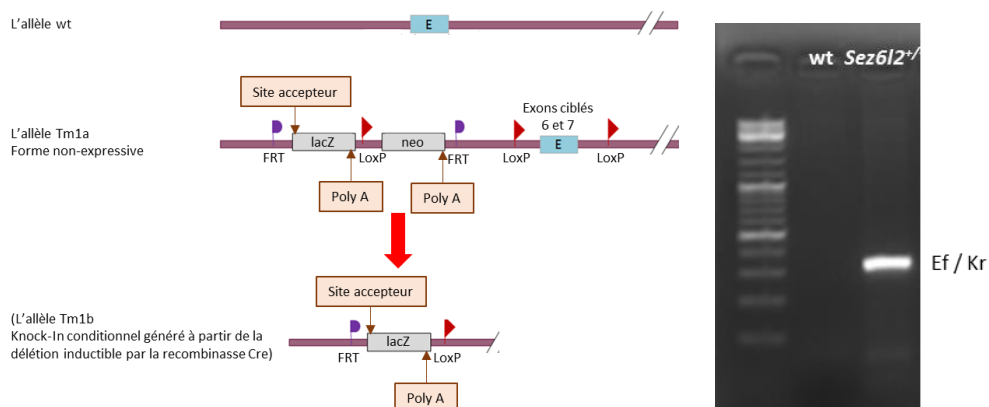


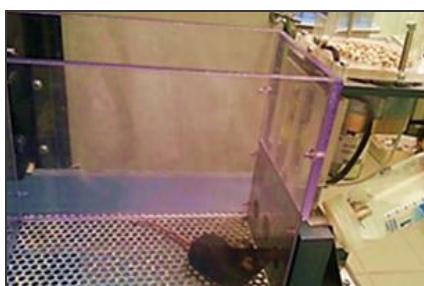
Figure 3. Dépistage du phénotype cognitif et comportemental**A****B****C**

Figure 4. Caractérisation comportementale du modèle de souris $Mvp^{+/-}$ à partir d'une cassette de piégeage

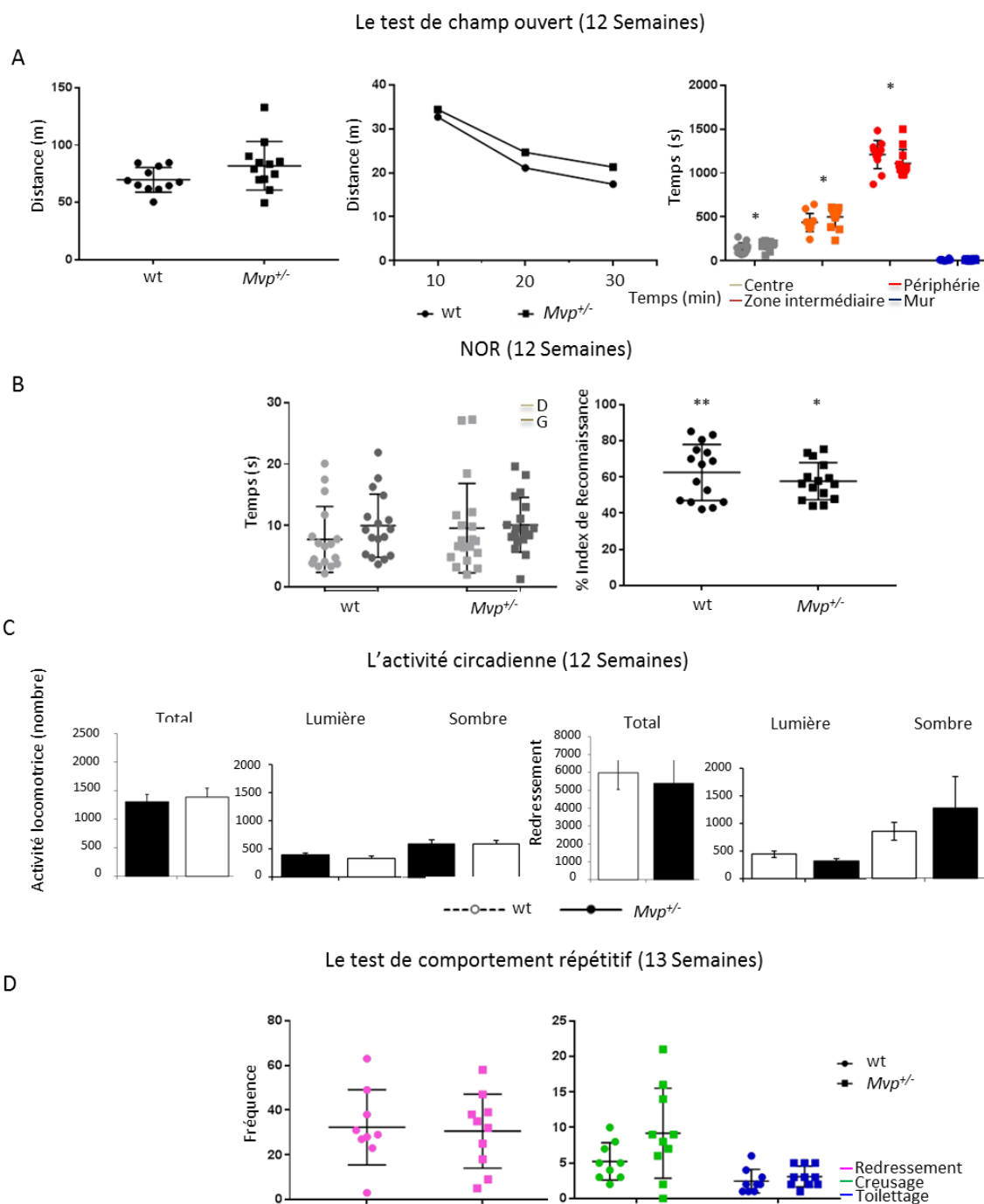


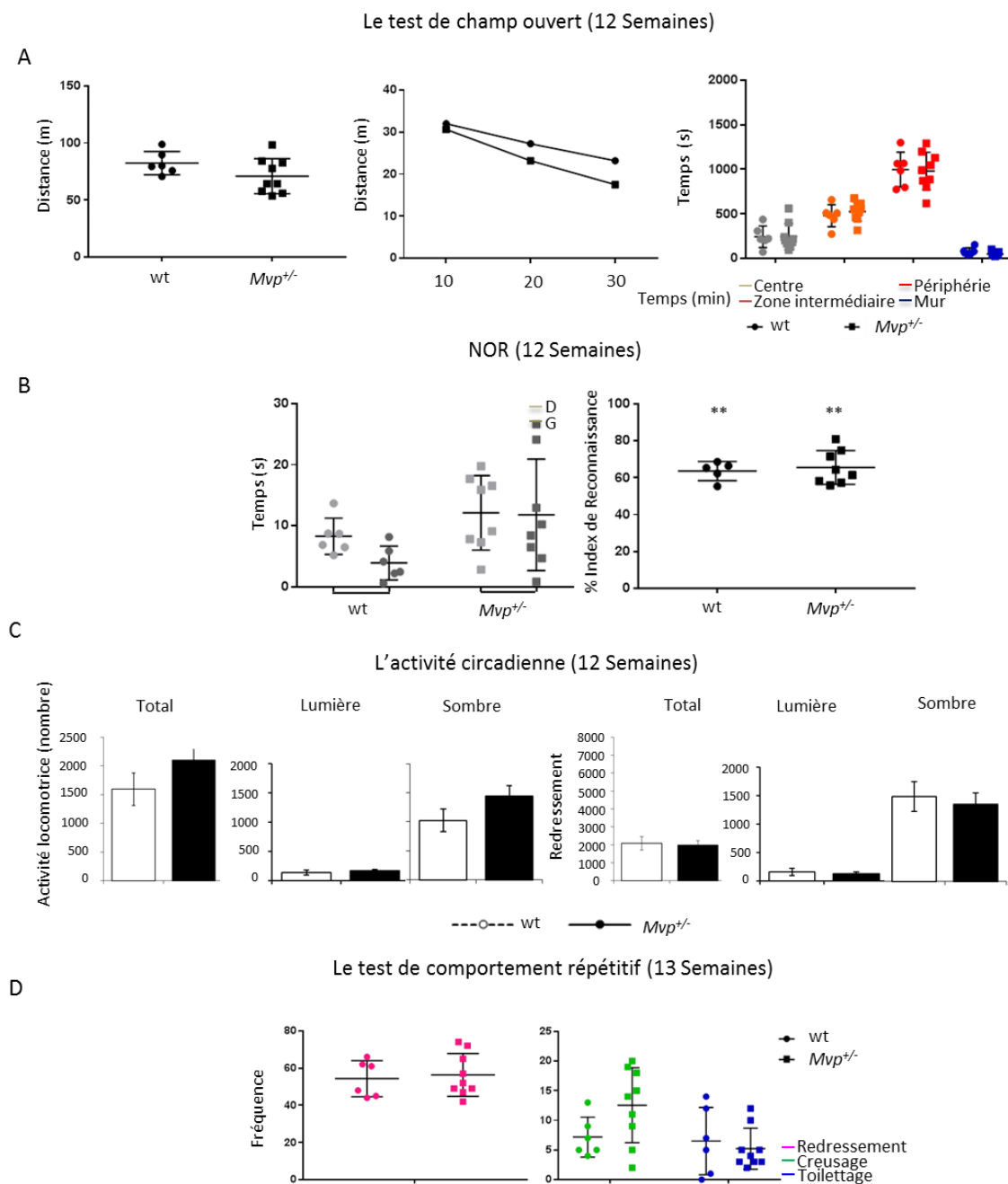
Figure 5. Caractérisation du modèle *Mvp^{+/-}* à partir de la technologie CRISPR / Cas9

Figure 6. L'analyse cognitive du modèle de souris *Sez6l2*^{tm1a/+} créé à partir de la forme non expressive du gène (*Sez6l2*^{tm1a/+})

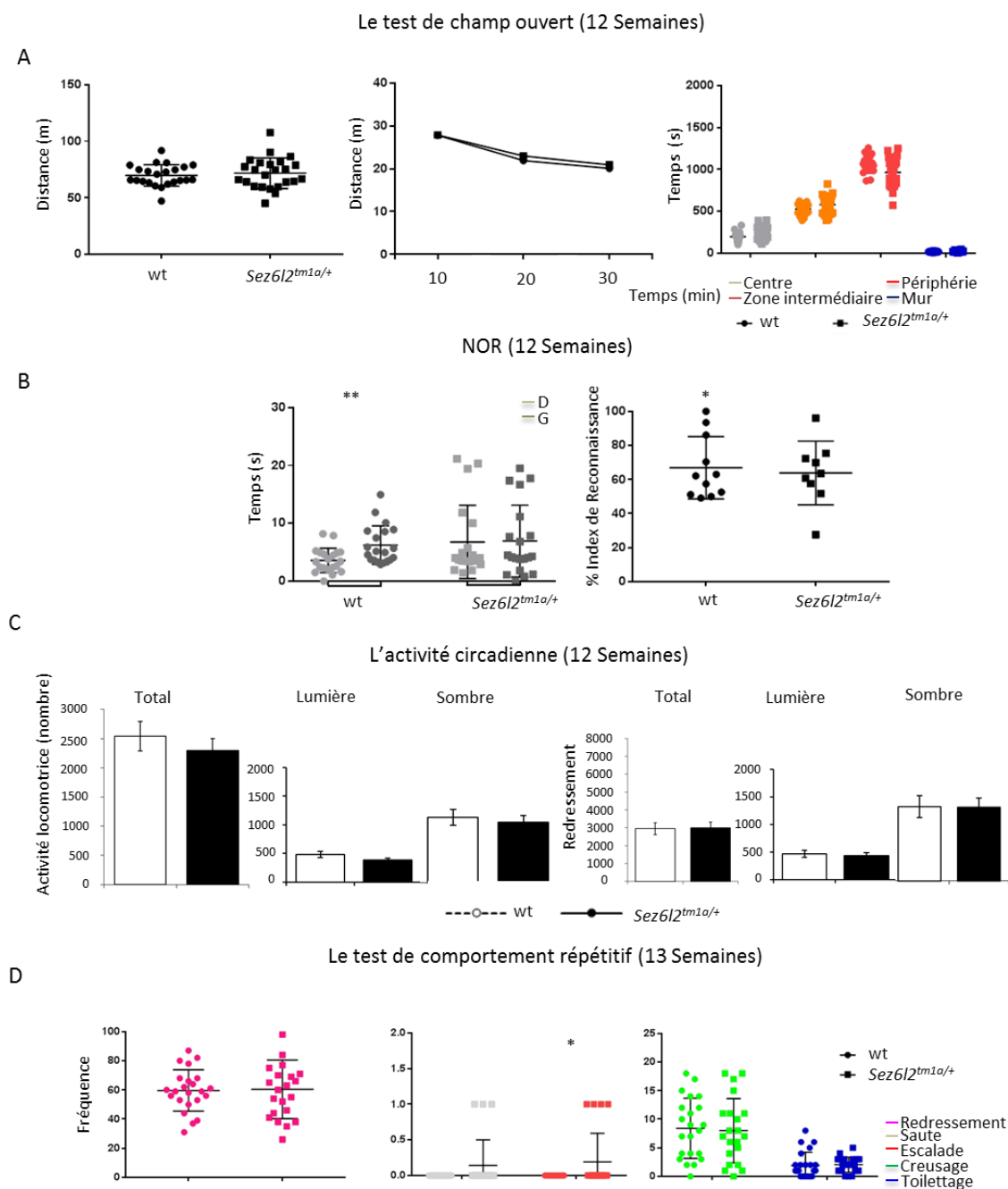


Figure 7. La technique de qRT-PCR pour la quantification de l'ADNc obtenu à partir de transcription inverse de l'ARNm provenant de l'extraction d'échantillons d'hippocampe du modèle *Sez6l2^{tm1a/+}*

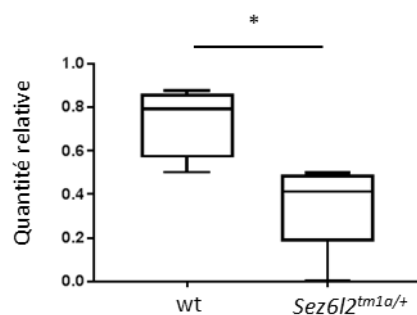
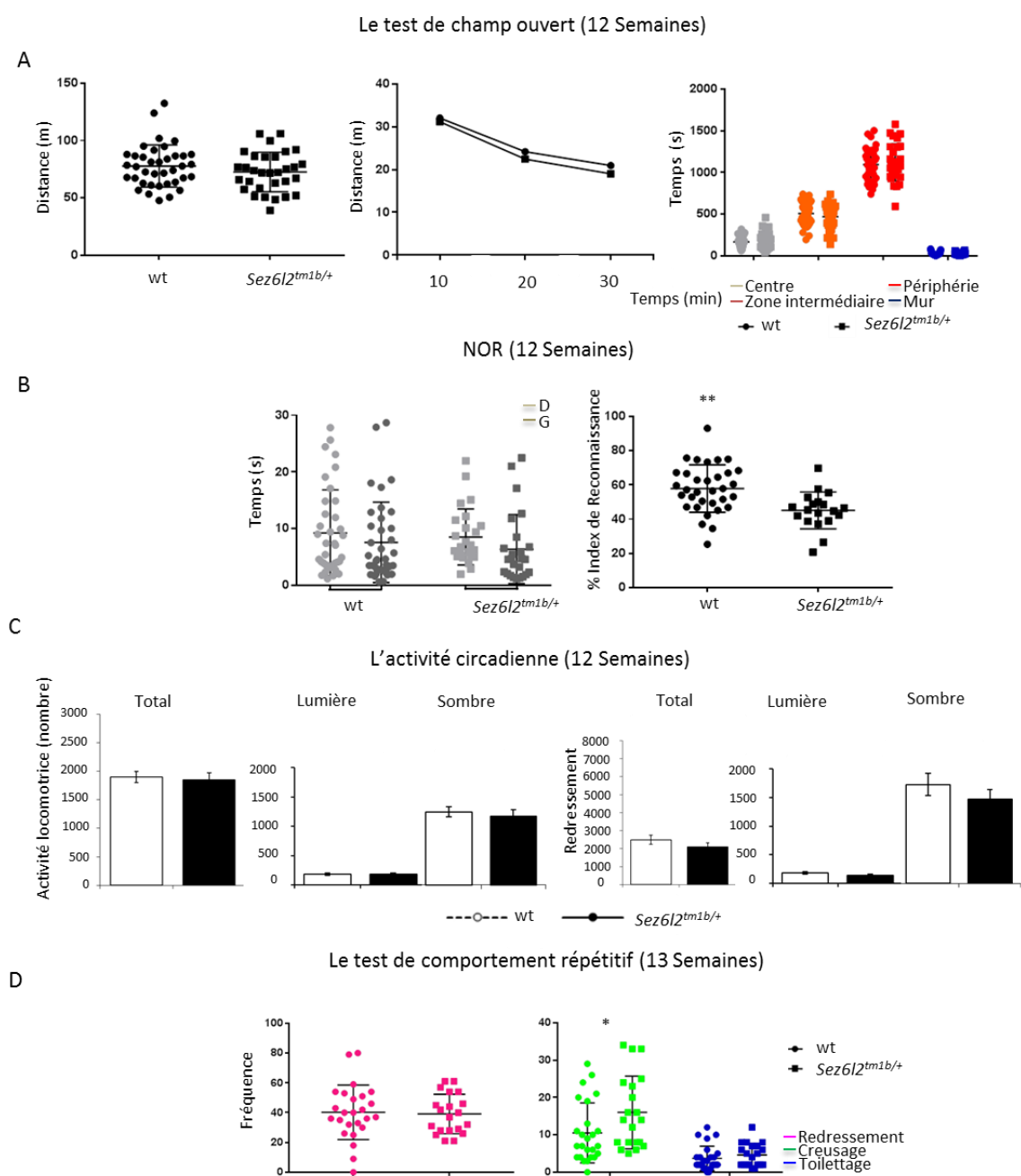


Figure 8. L'évaluation du phénotype comportemental du modèle *Sez6l2*^{+/-} créé à partir du Knock-in conditionnel (*Sez6l2*^{tm1b/+})



Tableaux

Ligne génétique	Fond génétique	Accouplement	Génotype	Individus	Ratio	χ^2	<i>p</i>
<i>Mvp</i> ^{+/-}	B6N	<i>Mvp</i> ^{+/-} x wt	wt	71	45,2%	1.4	0.23
			<i>Mvp</i> ^{+/-}	86	54,8%		
<i>Sez6l2</i> ^{tm1b/+}	B6N	<i>Sez6l2</i> ^{tm1b/+} x wt	wt	234	64,8%	31.7	< 0.0001
			<i>Sez6l2</i> ^{tm1b/+}	127	35,2%		

Tableau 1. Taux de transmission des allèles *Mvp*^{+/-} (vert) et *Sez6l2*^{+/-} (bleu) à l'état hétérozygote à partir des accouplements +/- x wt sur le fond génétique B6N. L'haplo-insuffisance du gène *Sez6l2* +/- a été associée à la létalité à conséquence de l'observation d'une diminution de la transmission de 14,8% par rapport à la transmission mendélienne.

Test	Paramètre	wt	<i>Mvp</i> ^{+/-} (cassette)	wt	<i>Mvp</i> ^{+/-} (CRISPR/Cas9)
Champ ouvert	Distance totale (m)	70 ± 3	81 ± 6	82 ± 4	70 ± 7
	Distance t 0-10 (m)	33 ± 2	34 ± 3	32 ± 1	31 ± 3
	Distance t 10-20 (m)	21 ± 1	25 ± 2	27 ± 2	23 ± 2
	Distance t 20-30 (m)	17 ± 1	21 ± 1	23 ± 2	18 ± 2
	Temps Centre (s)	142 ± 19	190 ± 10*	243 ± 50	230 ± 69
	Temps Zone intermédiaire (s)	437 ± 30	525 ± 25*	479 ± 51	490 ± 44
	Temps Périphérie(s)	1211 ± 46	1074 ± 41*	997 ± 80	1025 ± 100
	Temps Mur (s)	10 ± 2	10 ± 2	80 ± 16	54 ± 11
Reconnaissance d'objets 3 heures délai	S1 exploration d'objet A (s)	18 ± 2	20 ± 2	12 ± 2	24 ± 5
	S2 exploration d'objet A (s)	4 ± 1	4 ± 1	2 ± 0,17	2 ± 0,38
	S2 exploration d'objet B (s)	6 ± 1	6 ± 1	4 ± 0,34	5 ± 1
	Index de reconnaissance (%)	59 ± 3 ^{§§}	59 ± 3 [§]	64 ± 2 ^{§§}	66 ± 3 ^{§§}
Activité circadienne	Activité locomotrice totale (count)	1306 ± 130	1389 ± 156	1596 ± 283	2104 ± 215
	Activité locomotrice lumière (count)	388 ± 30	330 ± 34	133 ± 39	162 ± 26
	Activité locomotrice sombre (count)	590 ± 73	587 ± 64	1024 ± 197	1441 ± 179
	Activité verticale totale (count)	5972 ± 936	5391 ± 1464	2086 ± 367	1978 ± 266
	Activité verticale lumière (count)	442 ± 58	314 ± 49	156 ± 58	126 ± 26
	Activité verticale sombre (count)	831 ± 154	1240 ± 564	1507 ± 268	1371 ± 201
Comportement répétitif	Redressement	32,3 ± 5,6	30,6 ± 5,2	54,3 ± 3,9	56,3 ± 3,8
	Saute	0	0	0	0
	Escalade	0,1 ± 0,1	1,1 ± 1,1	0	0,6 ± 0,6
	Creusage	5,2 ± 0,9	9,2 ± 2	7,2 ± 1,4	12,6 ± 2,1
	Toilettage	2,4 ± 0,6	3,1 ± 0,5	6,5 ± 2,3	8,2 ± 1,8

Tableau 2. Caractérisation comportementale du modèle murin pour l'inactivation du gène *Mvp* à l'état hétérozygote chez le mâle sur un fond génétique pur. Cette modélisation a été menée à partir de deux stratégies de mutation, la cassette de piégeage de gènes et la technologie CRISPR / Cas9. Dans le cas des deux stratégies de mutation, l'inactivation de ce gène n'a pas entraîné de modification de l'activité des souris dans le test de champ ouvert. Bien que le modèle créé à partir de l'insertion de la cassette de piégeage montre des altérations du temps resté par les souris sur la zone central, la zone intermédiaire (significativement supérieur) et la zone périphérique (significativement inférieur). De plus, les souris mutantes dans les deux cas ont présenté un index de reconnaissance d'objet significativement supérieur au niveau de chance de 50%. Finalement, nos animaux n'ont montré aucune altération dans l'activité circadienne ni la présence de comportements répétitifs. Les données sont les moyennes ± l'écart-type. Test de Student, * $p < 0,05$. One Sample T. Test, [§] $p < 0,05$, ^{§§} $p < 0,01$ par rapport au niveau de chance (50%).

Test	Paramètre	wt	Sez6l2 ^{tm1a/+}	wt	Sez6l2 ^{tm1b/+}
Champ ouvert	Distance totale (m)	70 ± 2	72 ± 3	79 ± 3	72 ± 3
	Distance t 0-10 (m)	28 ± 1	28 ± 1	32 ± 1	31 ± 1
	Distance t 10-20 (m)	22 ± 1	23 ± 1	24 ± 1	22 ± 1
	Distance t 20-30 (m)	20 ± 1	21 ± 1	21 ± 1	19 ± 1
	Temps Centre (s)	197 ± 11	238 ± 16	169 ± 11	184 ± 17
	Temps Zone intermédiaire (s)	528 ± 14	578 ± 22	509 ± 24	468 ± 27
	Temps Périphérie(s)	1057 ± 21	965 ± 35	1093 ± 32	1120 ± 41
	Temps Mur (s)	17 ± 2	19 ± 2	28 ± 3	27 ± 3
Reconnaissance d'objets 3 heures délai	S1 exploration d'objet A (s)	10 ± 1	14 ± 3	17 ± 2	15 ± 2
	S2 exploration d'objet A (s)	2 ± 0,38	2 ± 0,21	5 ± 1	6 ± 1
	S2 exploration d'objet B (s)	5 ± 1	5 ± 2	7 ± 1	5 ± 1
	Index de reconnaissance (%)	67 ± 6 [§]	64 ± 6	58 ± 2 ^{§§}	45 ± 2***
Activité circadienne	Activité locomotrice totale (count)	2540 ± 252	2296 ± 207	1898 ± 100	1853 ± 123
	Activité locomotrice lumière (count)	483 ± 54	385 ± 38	183 ± 17	181 ± 16
	Activité locomotrice sombre (count)	1134 ± 136	1050 ± 123	1237 ± 83	1166 ± 112
	Activité verticale totale (count)	2951 ± 336	3000 ± 321	2494 ± 255	2102 ± 216
	Activité verticale lumière (count)	463 ± 62	430 ± 55	180 ± 23	142 ± 21
	Activité verticale sombre (count)	1359 ± 197	1344 ± 174	1744 ± 196	1485 ± 175
Comportement répétitif	Redressement	59,6 ± 2,9	60,5 ± 4,3	40,3 ± 3,7	39,1 ± 3
	Saute	0	0,2 ± 0,1	0	0
	Escalade	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,1*	0	0,1 ± 0,1
	Creusage	10,3 ± 2,1	9,3 ± 1,7	10,5 ± 1,6	16 ± 2,2*
	Toiletage	1,9 ± 0,5	2,3 ± 0,4	3,7 ± 0,7	4,6 ± 0,7

Tableau 3. Caractérisation comportementale du modèle murin pour l'inactivation du gène *Sez6l2* à l'état hétérozygote chez le mâle sur un fond génétique pur. Cette modélisation a été obtenue à partir de deux constructions différentes, l'allèle *tm1a* et l'allèle *tm1b*. La différence fondamentale entre les deux constructions est l'absence des exons ciblés du gène et le gène marqueur sur le génome de l'allèle *tm1b*. Le test du champ ouvert n'a pas révélé de phénotype chez les souris mutantes. La mémoire de reconnaissance a été évaluée à partir du test de reconnaissance d'objets. Au cours de la session S1 du test, aucune différence d'exploration des objets A n'a été remarquée. Après un délai de rétention de 3 heures, aucune des modèles ont présenté un index de reconnaissance d'objets significativement supérieur au niveau de chance de 50%. De plus, dans le cas de l'allèle *tm1b*, les souris mutantes montrent un déficit significatif dans l'index de reconnaissance par rapport aux souris témoins. Enfin, nous avons observé également la présence de comportements répétitifs. Les souris porteuses de l'allèle *tm1a* ont montré une augmentation du comportement d'escalade alors que les souris porteuses de l'allèle *tm1b* ont montré une augmentation du comportement de creusage. Les données sont les moyennes ± l'écart-type. Test de Student, *** $p < 0,001$. One Sample T. Test, [§] $p < 0,05$, ^{§§} $p < 0,01$ par rapport au niveau de chance (50%).

Partie 3

Modélisation des syndromes de
variation du nombre de copies de la
région 16p11.2 chez le rat

—

Données préliminaires

Introduction

L'étude des syndromes de délétion et duplication de la région 16p11.2 BP4-BP5 présente un intérêt majeur pour la compréhension des troubles neuropsychiatriques, tels que la déficience intellectuelle et les ASD, les anomalies de croissance de la boîte crânienne et la variabilité du BMI. L'élucidation des mécanismes génétiques par lesquels les CNVs influent sur le développement nécessite une analyse rigoureuse des données quantitatives sur le phénotype humain et la mise en place de systèmes modèles dans lesquels les mécanismes génétiques sont conservés. La caractérisation des premiers modèles animal des réarrangements 16p11.2 a montré des effets sur le développement de la tête et les fonctions cognitives chez le poisson zèbre (Golzio *et al.*, 2012) et la souris (Arbogast *et al.* 2016).

Afin de générer un modèle des réarrangements 16p11.2 plus relevant pour l'autisme, nous avons développé des modèles pour la délétion ou la duplication de la région homologue à l'intervalle génétique humain 16p11.2 chez le rat. Comme chez la souris, les gènes de la région 16p11.2 BP4-BP5 sont hautement conservés sur le chromosome 1 du rat. En tant que modèle de maladie humaine, cette espèce présente plusieurs avantages par rapport à la souris. Les rats montrent des meilleures performances dans les tests d'apprentissage et de mémoire. En plus, ces animaux sont associés avec un fort composant dans le domaine social, ce qui les rend un modèle approprié pour l'étude des maladies associées à une interaction sociale déficiente.

Ces modèles de rats ont été créés grâce à la technologie CRISPR / Cas9 (Birling *et al.*, 2017) sur la lignée hybride Sprague-Dawley (SD) non consanguin, afin de comprendre mieux la variabilité (pénétrance et expressivité) des phénotypes associés à ces syndromes chez les patients.

Pour déchiffrer plus en détail les fonctions cognitives spécifiques affectées ainsi que les traits autistiques sur les modèles de rat pour la délétion et la duplication de l'intervalle 16p11.2, nous avons travaillé avec le sexe masculin et féminin en évaluant des phénotypes comportementaux et sociaux. Cette caractérisation a été menée avec un protocole basé sur des tests où les modèles de souris montraient des phénotypes robustes: des altérations de l'activité dans le test de champ ouvert, des anomalies dans la mémoire de localisation et de reconnaissance d'objet et l'interaction sociale.

Le modèle 16p11.2 chez le rat présente principalement des défauts de comportement social et seulement quelques défauts cognitifs.

En parallèle nous avons contribué avec nos modèles de rat à une analyse phénotypique multi-espèces des malformations craniofaciales induites par les CNVs de la région 16p11.2. L'objectif principal de cet étude est basé sur la description d'une tendance caractéristique de traits dysmorphiques liés à ces réarrangements.

Le nombre de copies de la région 16p11.2 a des effets pertinents sur la structure cranio-faciale qui est bien conservée entre les espèces étudiées.

Sexual dimorphism in rat models of 16p11.2 deletion and duplication syndromes

Authors

Sandra MARTIN LORENZO¹, Valérie NALESSO¹, Séverine MENORET³, Jean-Paul CONCORDET⁴, Ignacio ANEGO³, Yann HERAULT^{1,2}.

Affiliations

¹IGBMC - CNRS UMR 7104 - Inserm U 964

²PHENOMIN-ICS

³CHU de Nantes-INSERM UMR 1064-ITUN

⁴MNHN - CNRS UMR 7196 / INSERM U1154

Corresponding author: Yann HERAULT, herault@igbmc.fr

Keywords: Copy number variation, neurodevelopment, intellectual disability, autism spectrum disorders, rat model, social behavior, recognition memory.

Running title: 16p11.2 *Sult1a1-Spn* CNVs in rat model.

ABSTRACT

Recurrent copy number variations (CNVs) of human 16p11.2 locus have been associated with several developmental/neurocognitive syndromes. Particularly, deletion and duplication of this genetic interval are found in patients with autism and intellectual disability. The high gene density in that region and the strong phenotypic variability of incomplete penetrance, make the study of the 16p11.2 syndromes extremely complex. To systematically studying the effect of 16p11.2 CNVs and identifying candidate genes and molecular mechanisms involved in the pathophysiology, mouse models were generated previously. This animals developed some learning and memory deficits. In order to generate a 16p11.2 CNVs model more relevant to autism, we engineered deletion and duplication of the homologous region to the human 16p11.2 genetic interval in rat (SD). The rat 16p11.2 model displayed mainly defects in social behavior and only a few cognitive defects. These findings make our model a new genetic tool for the study of syndromes related to deficits in social behavior.

INTRODUCTION

The 16p11.2 locus is a pericentromeric region of the chromosome 16. Interestingly, it is one of the most gene-rich chromosomes in our genome and 10% of its sequence consists of segmental duplications¹. These elements give strong instability and induce the appearance of copy number variations (CNV) as a consequence of the recurrent non-allelic homologous recombination mechanism². The most prevalent rearrangement, deletion and duplication are generated between two low copy repeats (LCR), named BP4 and BP5, and encompasses 600 kb. 16p11.2 CNVs are an important risk factor for neurodevelopmental disorders³, including intellectual disability (ID)⁴ and autism spectrum disorder (ASD)^{5,6,7,8,9}. In addition, deletion and duplication have been linked to epilepsy^{10,11,12} and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD)¹³, whereas only the duplication has been related to schizophrenia, bipolar disorder and depression^{14,15,16,17}.

Besides, these chromosomal rearrangements have been linked to mirrored physical phenotypic effects. The 16p11.2 deletion has been associated with the risk of diabetes-independent morbid obesity and large head circumference, while the 16p11.2 duplication has been associated with low body mass index (BMI) and small head circumference^{18,19,20,21}. Taking into account this reciprocal impact on BMI and head size, it has been suggested that changes in gene transcripts levels could be responsible for the symptoms associated with these CNVs.

So, in order to verify this hypothesis, animal models had been developed and characterized. The investigation of the interplay between genes and proteins, brain activity and behavior through animal experimentation is crucial for the understanding of neurocognitive processes affected for these symptoms in humans.

In particular, genes of the 16p11.2 region have been found to be highly conserved on mouse chromosome 7. Three Mouse models for deletion or duplication of the region homologous to the 16p11.2 have been generated in different groups.

Among them, our laboratory engineered novel 16p11.2 CNV mouse models in pure genetic background named *Del(7Sult1a1-Spn)6Yah* (Del/+) and *Dp(7Sult1a1-Spn)6Yah* (Dup/+) and investigated them focusing on behavior and metabolism²². *Sult1a1-Spn* CNVs affect growth, weight, adiposity, activity and short-term memory in opposite ways. Whereas mice carrying the deletion (*Del/+*) show weight and adipogenesis deficits, endogenous and exploratory hyperactivity with increased stereotyped behavior and short-term memory impairments, mice carrying the duplication (*Dup/+*) show weight and adipogenesis increase, endogenous and exploratory hypo activity and short-term memory improvements. We also have found that the genetic background can affect the social interaction deficits in both *Del/+* and *Dup/+* mice. However, these last models in a mixed genetic background did not share all the phenotypes found in the pure genetic background. Altogether this observation suggests that this deficit could be the consequence of an effect of the genetic context.

Transcriptomic analysis revealed that most genes located on the *Sult1a1-Spn* were dosage-sensitive genes and a whole genome effect was induced altering many pathways in the hippocampus and the striatum certainly as a consequence of many genes from the genetic interval sensitive to gene dosage.

In order to generate a model presenting more suitable autistic traits, we engineered deletion or duplication of the homologous region to the human 16p11.2 genetic interval in the rat. As a model of human disease, the rat is a more sociable animal than the mouse with a large spectrum of similar and complementary behavioral assessments.

The main contribution of our research is the establishment of a new validated 16p11.2 animal model that can be helpful to develop later pharmacological therapies and help with them to improve the lives of patients.

MATERIAL AND METHODS

Rat lines and genotyping

The 16p11.2 rearrangement, deletion and duplication, were studied in a rat model engineered through CRISPR / Cas9 technology²³. Like in mouse, genes of the 16p11.2 *Sult1a1-Spn* region are highly conserved on rat chromosome 1 (Figure 1).

This model was bred on the Sprague-Dawley (SD) outbred line with the aim of helping us to understand the variability (penetrance and expressivity) of the phenotypes associated to these syndromes in patients. No impact on viability was observed so far in the 16p11.2 deletion and duplication in heterozygous cross of the SD rat models (Table 1).

Deletion of the *Sult1a1-Spn* region, referred as *Del/+*, was confirmed by PCR (Figure 1) using Primer Del rHamont99For: (5'-GGGCTGGCAGACTTGAA-3') and Primer Del rHavalB284 Rev: (5'-GTGCCACGATCAGCAGT-3').

Duplication of the same region, referred as *Dup/+*, was identified using Primer Dup rHamont99Rev: (5'-CGCTTTGATGCCCACTAT-3') and Primer Dup rHavalB84For: (5'-AGCTGTGATCCTCTGGTT-3').

The wild-type allele was identified using Primer rAnks3-205For: (5'-CCCCAGCCTCCC ACTTGTC-3') and Primer rAnks3-205Rev: (5'-AGGATGACTGAAATTGGTGGAC3').

The PCR reactions gave deletion, duplication and wt products of 290 bp, 500 bp and 205 bp, respectively

All rats were genotyped by PCR using the following program: 95 °C / 5 min; 35× (72 °C / 30 s, 95 °C / 10 s, 60 °C / 10 s), 72 °C / 3 min.

Behavioral analysis

To decipher more in detail specific cognitive functions and autistic traits in 16p11.2 deletion and duplication rat models, we evaluated several phenotypes with a validated in house rat phenotyping for the classical unique behavioral pipeline as defined in figure 2. We defined the protocol with tasks in which mouse models showed robust phenotypes: increased activity in the open field, defect in object location and recognition memory, and social interaction. Four genotypes with littermate animals from different crosses were used: wt, *Del/+*, *Dup/+* and pseudo-disomic *Del/Dup*.

Behavioral studies were conducted in 14-16 week old rats of both sexes separately, from 8 cohorts. Animals were housed 2 invidious per cage (Innocage Rat cages; 909 cm² of floor space; Innovive, San Diego, USA), where they had free access to water and autoclaved food (D03, Safe Diets, France). Temperature was maintained at 23±1°C and the light cycle was controlled as 12 hours light and 12 hours dark (light on at 7 am).

In the testing days, animals were transferred to experimental room antechambers 30 min before the start of the experiments. Body weights of animals were recorded at 13 weeks old when they arrived to our phenotype zone.

All assessments were scored blind to genotype as recommended by the ARRIVE guidelines^{24,25}.

Open Field: This test was used to study exploration activity. Rats were tested in an automated open field (90 x 90 x 39.5 cm) made of PVC with black walls and floor (Imetronic,

Pessac - France). The structure was equipped with infrared sensors for accurate location of the animal and the rearing. An interface provided the formatting of signals from infrared sensors and allows communication with the computer, where the software POLY OPENFIELD v5.3.2 managed experimental data. The open field arena was divided into central and peripheral regions and was homogeneously illuminated at 15 Lux. Each animal was placed in the periphery of the open field and allowed to explore freely for 30 min. The distance travelled in total arena and in each regions of the arena, as well as, the numbers of rears were recorder over the test session.

Social interaction task: This analyze focused on the evaluation of rat social behavior by manually scoring of a battery social interactions²⁶ among two animals of the same sex and genotype, housed in different cages. The test was carried in a previously described standardized open field arena during 10 min of video recording.

Novel object location recognition memory task: This test was based on the innate preference to the novelty showed by the rodents. On the first day, rats were habituated to the previously described open field arena for 15 min at 15 Lux. On the following day, animals were submitted to the first 3-min acquisition trial during which they were individually placed in the presence of two identical objects A (syringe or flask) located at 15 cm away from one of the corners, on the north side of the box. After a retention period of 5 minutes, a novel location discrimination test was conducted. One of the familiar objects was randomly displaced to a novel location B. The exploration time of the two objects (when the animal's snout was directed towards the object at a distance ≤ 1 cm) was recorded during both trials. All rats that did not explore the first object for more than 3 seconds during the acquisition trial and retention trial were excluded from the analysis. A recognition index (RI) was defined as $((t_B / (t_A + t_B)) \times 100)$. A RI of 50% corresponds to chance level and a significantly higher RI reflects good recognition memory. All rats which did not explore the first object more than 3 seconds during the acquisition and retention trial were excluded from the analysis.

Novel object recognition memory task: This test let to evaluate the ability to recognize previously encountered objects in murine models.

Firstly, we carried out the NOR test through a protocol based on the characterization of the mouse model. In the first 3 min acquisition trial, rats were presented to two identical objects A (syringe, block, bottle or flask). A 3 min retention trial was conducted 3 hour later. One of the two familiar objects was randomly changed for another new object B.

The surprising good performance of the mutant individuals made us question about the simplicity of this test for an intelligent animal like the rat. For this reason, we were motivated to develop a new NOR protocol.

In this case, animals from new cohorts were presented to three different objects located at the northwest, northeast and southwest corner of the arena during 3 min acquisition trial. A 3 min retention trial was conducted 3 hour later. One of the three familiar objects was randomly changed for another new object. Test was analyzed as for the Novel location recognition task.

Statistical analysis

The statistical analysis of our results was carried out using standard statistical procedure operated by Sigma Plot software. All outliers were identified using Grubbs' test from calculator GraphPad. Acquired data from behavioral characterization of 16p11.2 rat models were analyzed using one-way ANOVA followed by Student's t-test and Tukey's post-hoc test whenever data presented normal distribution and equal variance. Otherwise, we used the non-parametric Kruskal-Wallis one-way analysis of variance and Mann-Whitney U test. One sample t-test were used also to compare recognition index values to the set chance level (50%). Data from evaluation of mutant allele transmission were analyzed by a Person's chi-squared test. Data are represented as the mean \pm SEM and the significant threshold was $p < 0.05$.

RESULTS

Behavioral characterization of the 16p11.2 rat models.

To carry the behavioral analysis of the 16p11.2 rat models we decided to combine the deletion (*Del/+*) and the duplication (*Dup/+*) for the generation of 4 groups of genotypes: wt control, *Del/Dup* pseudo-disomic for the 16p11.2 conserved region, *Del/+* and *Dup/+* littermates.

As a first analysis for consequences of 16p11.2 CNVs in neuronal function, we measured spontaneous locomotion activity and exploratory behavior in the open field test. The horizontal activity was measured through total travelled distance, whereas the vertical distance has been analyzed by the number of rears. As shown in figure 3, increased variability was observed in the distance travelled and the rearing activity. Only significant differences were found between extreme genotype male *Del/+* versus *Dup/+* and between female *Del/Dup* versus *Dup/+* for both the distance travelled and the rearing activity in the open field.

Then we carried out the novel object location recognition test and the novel object recognition test, common assays for assessing impaired memory in rodents.

For the novel object location recognition, animals were challenged to discriminate a moved object from an unmoved object. We first evaluated the performances of males and females separately. As no significant sex differences were noted, we collapsed these data across both sexes. As shown in figure 4, no difference was observed between genotypes in the retention session (Kruskal-Wallis one-way analysis of variance: $H_{(3)} = 5.61$; $p = 0.132$). We also compared the recognition index of animals, like percentage of exploration time of the new object location, with the level of chance (50%). The new object position was always explored more than the object not moved for all the genotypes.

Following these observations, we next evaluated novel object recognition from a first paradigm, based to the protocol used for the CNVs 16p11.2 *Sult1a1-Spn* mouse model. The animals should be able to differentiate an object observed previously during the acquisition phase of a novel object, during the retention phase (Figure 5). All four genotypes engaged in similar levels of novelty discrimination (One way ANOVA : $F_{(3,88)} = 0.038$; $p = 0.99$). We also compared the recognition index with the level of chance (50%). A general preference was observed for the new object compared to the familiar object.

The rat 16p11.2 models displayed correct recognition memory, as well as increased time of the objects exploration spent by rats compared to mouse (Arbogast *et al.*, 2016). Thus we used a more complex object recognition paradigm with 3 different objects (Figure 6). In this case, the *Del/+* male carriers showed an impairment in the discrimination of the novel object compared to all the other genotypes. Nevertheless, no alteration was observed in the females, with all the genotype able to discriminate the novel versus the two familiar objects.

Finally, the last task focused on rat social interactions by analyzing different social behaviour²⁶ (Figure 7). The *Del/+* male displayed significant increased time in solitary compared to all genotypes. In addition, 16p11.2 *Del/+* was associated to the presence of

more pinning, a behavior to exert dominance. Interestingly the pinning behavior was found also in the *Del/Dup* male animals. Furthermore, *Dup/+* male showed increased agnostic behavior compared to all genotypes. Surprisingly we did not see any social phenotypes in *Del/+* or *Dup/+* females.

Effect of *Sult1a1-Spn* rearrangements on weight body

When we analyzed the effect of 16p11.2 CNVs on the weight of the 13 weeks old rats, we observed that male rats carrying 16p11.2 deletion showed a decrease in body weight, while males carrying 16p11.2 duplication did not show alterations compared to wt littermates. The 16p11.2 rearrangements had no effect on the body weight of female rats.

DISCUSSION

In the present study, we determined the behavioral and cognitive phenotypes of rat 16p11.2 deletion and duplication models. Only a few cognitive defects were found in our rat model. Above all, 16p11.2 *Del/+* male presented deficiencies in the novel object recognition memory test with 3 objects, a trial adapted for the phenotypic study of the rat model. Nevertheless, the rat 16p11.2 models displayed defects in social behavior. 16p11.2 *Del/+* male showed an isolation behavior, a typical autistic trait, significantly superior to the rest of genotypes. The deletion of the *Sult1a1-Spn* region could also be associated with the appearance of pinning, a behavior associated with the expression of dominance. In addition, this type of behavior could also be seen among pseudo-disomic *Del/Dup* carriers, suggesting a genetic construct effect not related to the dosage of gene from the region. This phenomenon may result from the new deletion allele that could alter the expression of neighboring genes. In the other hand, 16p11.2 duplication in male was linked to an increase in aggressiveness.

Surprisingly, social and cognitive phenotypes were not reproduced by the mutant females. This observation supports the theory of Empathy-Systematization, according to which sexual psychological differences reflect a reinforcement of systematization in the male and a reinforcement of the empathy in the female. In the context of TSA, this theory has an extension, called "extreme male brain" according to which individuals are characterized by deficiencies in empathy with an intact or increased systematization^{27,28}.

In addition, a previous study showed a male : female ratio of 1.3 : 1 for the 16p11.2 deletion in autistic individuals and 1.6: 1 for the 16p11.2 deletion in patients with intellectual disability / developmental delay²⁹.

Further studies are needed for a better understanding of the mechanisms underlying risk and resilience to disease between the sexes.

Another possible explication is that this bias is only due to the specific genetic background of our rat model.

Besides we decided to evaluate the effect of CNVs 16p11.2 on the body weight of our rat models. Our study demonstrates that the deletion of the genetic interval causes only a significant reduction in body weight of males carrying 16p11.2 deletion. These results are in agreement with the characterization of 16p11.2 mouse models²², however in our model the male rats carrying 16p11.2 duplication do not show an important phenotype. In addition, 16p11.2 rearrangements do not affect body weight in female rats evidencing a resilient effect of female sex.

It is important to emphasize that higher variability in the behavior outcome of phenotypic analysis hinder our research. We have used 8 cohorts of rat to increase the number of animals (about 20-25 animals per experiment) to be able to gather a larger part of the population. This should be a direct consequence of the SD outbred genetic background in which the 16p11.2 rat models were generated.

The dysregulated genes and pathways by a comparative transcriptome analysis as well as, dysregulated proteins by a comparative proteomic analysis of different brain regions and liver from our rat 16p11.2 deletion and duplication models should be explored for further research.

REFERENCES

1. Redaelli, S. *et al.* Refining the Phenotype of Recurrent Rearrangements of Chromosome 16. *Int J Mol Sci.* 20(5). pii: E1095 (2019).
2. Hastings, P.J., Lupski, J.R., Rosenberg, S.M., Ira G. Mechanisms of change in gene copy number. *Nat Rev Genet.* 10(8):551-64 (2009).
3. Torres, F., Barbosa, M., Maciel, P. Recurrent copy number variations as risk factors for neurodevelopmental disorders: critical overview and analysis of clinical implications. *J Med Genet.* 53(2):73-90 (2016).
4. Cooper, G.M. *et al.* A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nature Genetics* 43, 838 - U844 (2011).
5. Fernandez, B.A. *et al.* Phenotypic spectrum associated with de novo and inherited deletions and duplications at 16p11.2 in individuals ascertained for diagnosis of autism spectrum disorder. *Journal of Medical Genetics* 47, 195 - 203 (2010).
6. Marshall, C.R. *et al.* Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *American Journal of Human Genetics* 82, 477 - 488 (2008).
7. Sanders, S. J. *et al.* Multiple Recurrent De Novo CNVs, Including Duplications of the 7q11.23 Williams Syndrome Region, Are Strongly Associated with Autism. *Neuron* 70, 863 - 885 (2011).
8. Steinman K.J. *et al.* 16p11.2 deletion and duplication: Characterizing neurologic phenotypes in a large clinically ascertained cohort. *Am J Med Genet A.* 170(11):2943-2955 (2016);
9. Weiss, L.A. *et al.* Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. *New England Journal of Medicine* 358, 667 - 675 (2008).
10. Reinthaler, E.M. *et al.* 16p11.2 600 kb Duplications confer risk for typical and atypical Rolandic epilepsy. *Hum Mol Genet.* 23(22):6069-80 (2014).
11. Shinawi, M. *et al.* Recurrent reciprocal 16p11.2 rearrangements associated with global developmental delay, behavioral problems, dimorphism, epilepsy, and abnormal head size. *Journal of Medical Genetics* 47, 332-341 (2010).
12. Zufferey, F. *et al.* A 600 kb deletion syndrome at 16p11.2 leads to energy imbalance and neuropsychiatric disorders. *J. Med. Genet* 2012;49:660–668 (2012).
13. Angelakos, C.C. *et al.* Hyperactivity and Male-Specific Sleep Deficits in the 16p11.2 Deletion Mouse Model of Autism. *Autism Res* 10(4): 572–584 (2017).
14. Drakesmith, M. *et al.* Genetic risk for schizophrenia and developmental delay is associated with shape and microstructure of midline white-matter structures. *Transl Psychiatry* 9(1):102 (2019).
15. McCarthy, S.E. *et al.* Microduplications of 16p11.2 are associated with schizophrenia. *Nature Genetics* 41(11):1223-7 (2009).
16. Rees, E. *et al.* Analysis of copy number variations at 15 schizophrenia-associated loci. *Br J Psychiatry.* 204(2):108-14 (2014).
17. Steinberg, S. *et al.* Common variant at 16p11.2 conferring risk of psychosis. *Mol Psychiatry* 19(1):108-14 (2014).
18. D'Angelo, D. *et al.* Defining the Effect of the 16p11.2 Duplication on Cognition, Behavior, and Medical Comorbidities. *JAMA Psychiatry.* 73(1):20-30 (2016).
19. Jacquemont, S. *et al.* Mirror extreme BMI phenotypes associated with gene dosage at the chromosome 16p11.2 locus. *Nature* 478(7367): 97–102 (2011).

20. Walters, R.G. *et al.* A new highly penetrant form of obesity due to deletions on chromosome 16p11.2. *Nature* 463(7281):671-5 (2010)
21. Zufferey, F. *et al.* A 600 kb deletion syndrome at 16p11.2 leads to energy imbalance and neuropsychiatric disorders. *J. Med. Genet* 2012;49:660–668 (2012).
22. Arbogast, T. *et al.* Reciprocal Effects on Neurocognitive and Metabolic Phenotypes in Mouse Models of 16p11.2 Deletion and Duplication Syndromes. *PLoS Genet* 12, e1005709 (2016).
23. Birling M.-C., Schaeffer L., André P., Lindner L., Maréchal D., Ayadi A., Sorg T., Pavlovic G. and Héroult Y. Efficient and rapid generation of large genomic variants in rats and mice using CRISMERE. *Sci. Rep.* 7, 43331 10.1038/srep43331 (2017).
24. Karp, N.A. *et al.* Applying the ARRIVE guidelines to an in vivo database. *PLoS Biol.* , 13, e1002151 (2015)
25. Kilkenny, C., Browne, W.J., Cuthill, I.C., Emerson, M. and Altman, D.G. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*, 8, e1000412 (2010).
26. Lorbach, M. *et al.* Learning to recognize rat social behavior: Novel dataset and cross-dataset application. *J Neurosci Methods* 300, 166-172 (2018).
27. Baron-Cohen, S., Knickmeyer, R. C. & Belmonte, M. K. Sex differences in the brain: implications for explaining autism. *Science* 310, 819-823 (2005).
28. Baron-Cohen, S. *et al.* Why are autism spectrum conditions more prevalent in males? *PLoS Biol* 9, e1001081 (2011).
29. Polyak, A., Rosenfeld, J. A. & Girirajan, S. An assessment of sex bias in neurodevelopmental disorders. *Genome Med* 7, 94 (2015).

ACKNOWLEDGEMENTS

"This work was supported by a grant from the Simons Foundation (SFARI 548888 toYH)"

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. (A) The homologous region 16p11.2 BP4-BP5 placed in the rat chromosome 1. All genomic position are given according to UCSC human genome browser. (B) Top. Mutation strategy using CRISPR / Cas9 technology from the *in vitro* genome editing inside of a fertilized embryo and subsequent injection into a pseudo- pregnant female. We obtained individuals carrying the deletion and duplication of the *Sult1a1-Spn* region. Bottom. PCR products specific for the wt (205 bp), *Del/+* (290 bp) and *Dup/+* (500 bp) alleles. (C) Breeding strategy for obtaining wt, *Del/+*, *Dup/+* and *Del/Dup* littermates.

Figure 2. Detailed representation of the rat behavioral pipeline used for investigating 16p11.2 deletion and duplication rat models. The pipeline is derived from the analysis of the *Del(7Sult1a1-Spn)6Yah* and *Dp(7Sult1a1-Spn)6Yah* mouse models (Arbogast *et al.*, 2016).

Figure 3. Exploratory behavior of the rat 16p11.2 models in the open field test. Male (wt (n=28), *Del/Dup* (n=26), *Del/+* (n=21) and *Dup/+* (n=27)) and female (wt (n=25), *Del/Dup* (n=22), *Del/+* (n=26) and *Dup/+* (n=22)) rats were placed in the open field for 30 min to explore the new environment. Horizontal activity was measured by the total distance traveled and vertical activity was recorded with the number of rears. Animals showed large variability and limited changes between genotype except *Del/+* versus *Dup/+* male (One way ANOVA between groups, Total distance : $F_{(3,98)} = 4.33$; $p = 0.007$; Tukey's post hoc tests : *Del/+* vs. *Dup/+* : $p = 0.004$; Rears : $F_{(3,117)} = 3.55$; $p = 0.017$; Tukey's post hoc tests: *Del/+* vs. *Dup/+*: $p = 0.016$) and *Del/Dup* versus *Dup/+* female (Kruskal-Wallis one-way analysis of variance, Total distance : $H_{(3)} = 14.18$; $p = 0.003$, Mann-Whitney Test : *Del/Dup* vs. *Dup/+* : $p = 0.002$); (One way ANOVA between groups, Rears : $F_{(3,116)} = 4.83$; $p = 0.003$; Tukey's post hoc tests: *Del/Dup* vs. *Dup/+*: $p = 0.002$). (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Figure 4. Novel object location recognition memory task of the 16p11.2 rat models after 5 min of retention. Male and female rats from different genotypes (wt (n=21), *Del/Dup* (n=25), *Del/+* (n=18) and *Dup/+* (n=25)) developed similar novel object location recognition index. All the genotypes showed increased time in exploring an object with a new relative location (NO) compared to the time spent exploring an unmoved object (FO) in the retention session of 3 min. We compared the recognition index, like percentage of exploration time of the new object location, to the level of chance (50%). No object location recognition deficit was observed among genotypes. (One sample t test: wt ($t_{(20)} = 9.3$; $p < 0.0001$), *Del/Dup* ($t_{(24)} = 2.41$; $p = 0.02$), *Del/+* ($t_{(17)} = 4.69$; $p = 0.0002$) and *Dup/+* ($t_{(24)} = 4.05$; $p = 0.0005$). (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$).

Figure 5. Novel object recognition memory task of the 16p11.2 rat models after 3 hours of retention with 2 objects. (A) Scheme of the phenotyping paradigm used for the analysis of object recognition memory in rodents. (B) There are no differences between the recognition index shown by male and female rats from different genotypes (wt (n=22), *Del/Dup* (n=25), *Del/+* (n=18) and *Dup/+* (n=27)). In the four groups we observed a preference for a novel object (NO) compared to a familiar object (FO). We compared the recognition index, like percentage of exploration time of the new object, to the level of chance (50 %). (One sample

t test: wt ($t_{(21)} = 3.87$; $p = 0.0009$), *Del/Dup* ($t_{(24)} = 4.12$; $p = 0.0004$), *Del/+* ($t_{(17)} = 2.96$; $p = 0.009$) and *Dup/+* ($t_{(26)} = 3.5$; $p = 0.0017$). (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Figure 6. Novel object recognition memory task of the rat 16p11.2 models after 3 hours of retention with 3 objects. (A) Scheme of the phenotyping paradigm adapted for the analysis of object recognition memory in our rat model. (B) Male rats from different genotypes (wt ($n=26$), *Del/Dup* ($n=16$), *Del/+* ($n=14$) and *Dup/+* ($n=16$)) and female rats (wt ($n=18$), *Del/Dup* ($n=16$), *Del/+* ($n=26$), and *Dup/+* ($n=17$)) were tested for the novelty recognition. The graphs show the percentage of time spent by the animals exploring a novel object compared to the time spent exploring two familiar objects. We compared the recognition index, like percentage of exploration time of the new object, to the level of chance (33.3 %). Only the *Del/+* males showed an impairment in the recognition index (One sample t test: wt ($t_{(25)} = 4.6$; $p = 0.0001$), *Del/Dup* ($t_{(15)} = 2.82$; $p = 0.01$), *Del/+* ($t_{(13)} = 0.34$; $p = 0.74$) and *Dup/+* ($t_{(14)} = 3.58$; $p = 0.0030$) compared to all the other genotypes in males and in females. Surprisingly, no change was observed in the *Del/+* females (One sample t test: wt ($t_{(17)} = 3.67$; $p = 0.002$), *Del/Dup* ($t_{(16)} = 3.08$; $p = 0.01$), *Del/+* ($t_{(25)} = 3.83$; $p = 0.0008$) and *Dup/+* ($t_{(16)} = 2.3$; $p = 0.035$). (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Figure 7. Social interaction of the 16p11.2 rat models. (A) Example frames of each behavior event analyzed during social interaction test. (B) Male (wt ($n=15$), *Del/Dup* ($n=14$), 16p11.2 *Del/+* ($n=10$) and *Dup/+* ($n=14$)) and female (wt ($n=14$), 16p11.2 *Del/+* ($n=15$), 16p11.2 *Dup/+* ($n=12$) and *Del/Dup* ($n=15$)) rats were tested for impairment of social interaction in pairs of individuals from different home cages with the same genotype. The *Del/+* male rat showed increase solitary time (One way ANOVA between groups, Solitary behavior : $F_{(3,49)} = 9.85$; $p < 0.001$; Tukey's post hoc tests : *Del/+* vs. wt : $p < 0.001$, *Del/+* vs. *Del/Dup* : $p < 0.001$ and *Del/+* vs. *Dup/+* : $p = 0.005$). and pinning behaviour with *Del/Dup* (Kruskal-Wallis one-way analysis of variance : $H_{(3)} = 8.66$; $p = 0.03$; Mann-Witney test: *Del/+* vs. wt: $p = 0.04$; *Del/Dup* vs. wt: $p = 0.01$) while *Dup/+* males are more agnostic (Kruskal-Wallis one-way analysis of variance : $H_{(3)} = 13.63$; $p = 0.003$; Mann-Witney test: *Dup/+* vs. wt: $p = 0.01$; *Dup/+* vs. *Del/+*: $p = 0.02$). No altered social behaviour has been detected in females (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Figure 8. Effects of *Sult1a1-Spn* rearrangements on body weight. Body Weight (g) of the 13 weeks old males (wt ($n=15$), *Del/Dup* ($n=8$), *Del/+* ($n=12$) and *Dup/+* ($n=16$)) and female rats (wt ($n=15$), *Del/Dup* ($n=12$), *Del/+* ($n=13$), and *Dup/+* ($n=13$)) from *Del-Dup* littermates. Only the deletion of 16p11.2 region caused body weight alteration associated with the male sex. Our observations showed a decreased weight body in *Del/+* males compared to wt littermates (One way ANOVA between groups, $F_{(3,44)} = 6.24$; $p = 0.001$; Student t-test, *Del/+* vs. wt : $t_{(25)} = 3.39$ $p = 0.002$). (** $p < 0.01$).

FIGURES

Figure 1. Rat models for 16p11.2 deletion and duplication

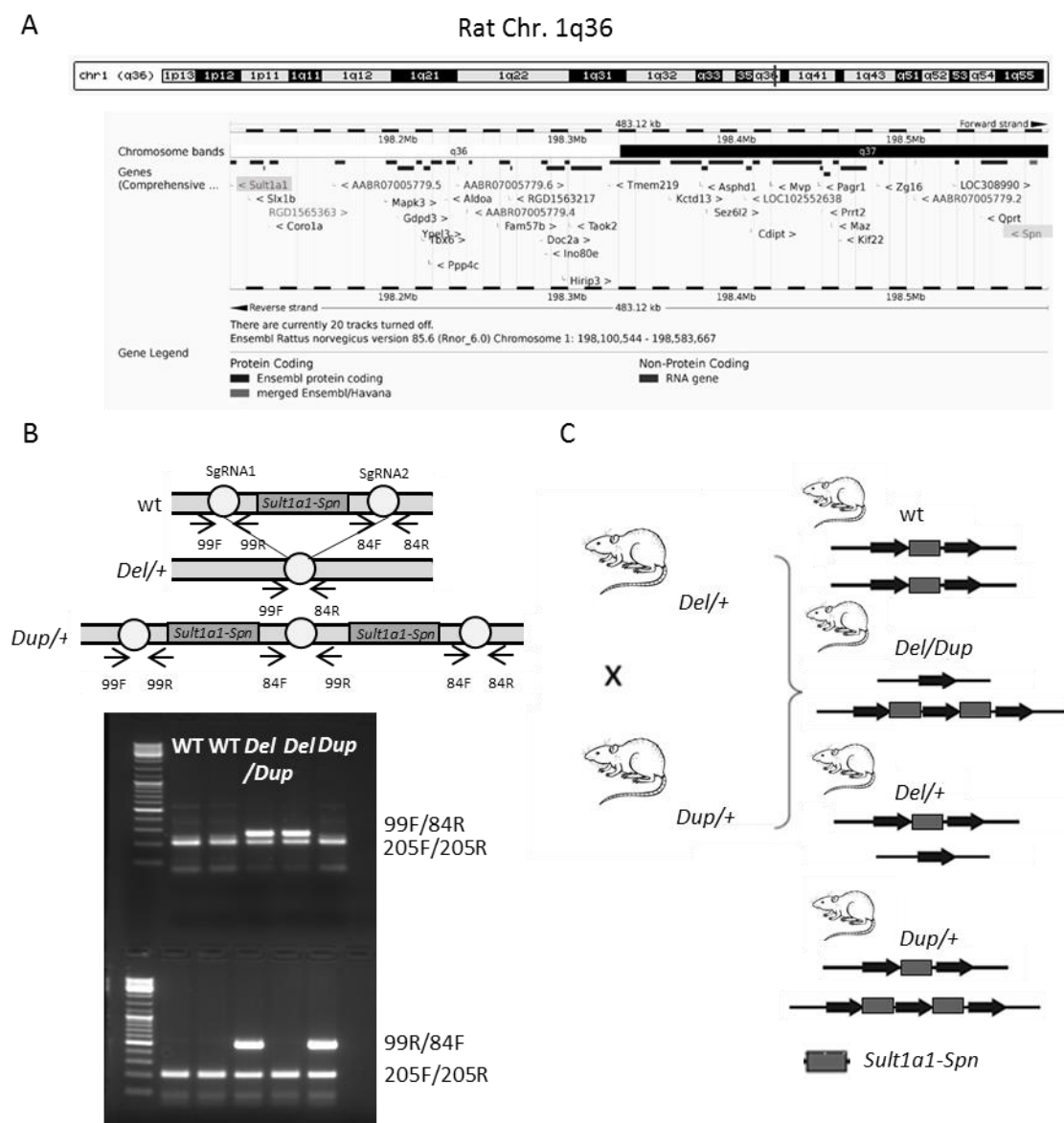


Figure 2. Detailed representation of the rat behavioral pipeline used for investigating 16p11.2 deletion and duplication rat models

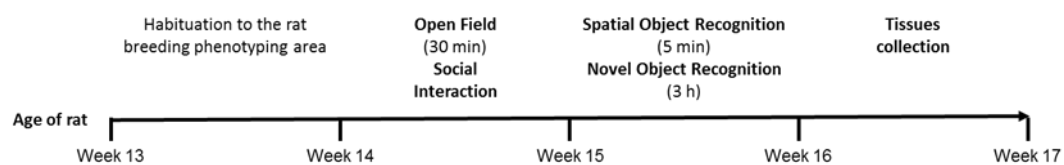


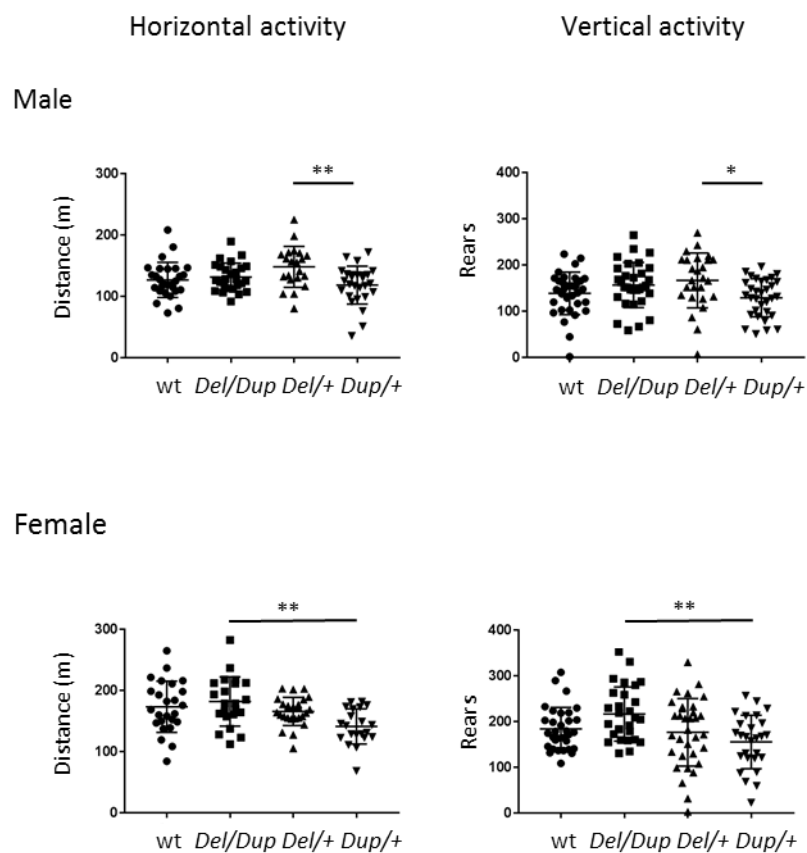
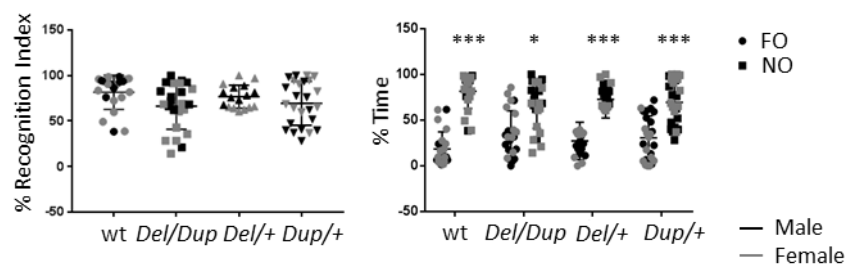
Figure 3. Exploratory behavior of the rat 16p11.2 models in the open field test**Figure 4. Novel object location recognition memory task of the 16p11.2 rat models after 5 min of retention.**

Figure 5. Novel object recognition memory task of the 16p11.2 rat models after 3 hours of retention with 2 objects

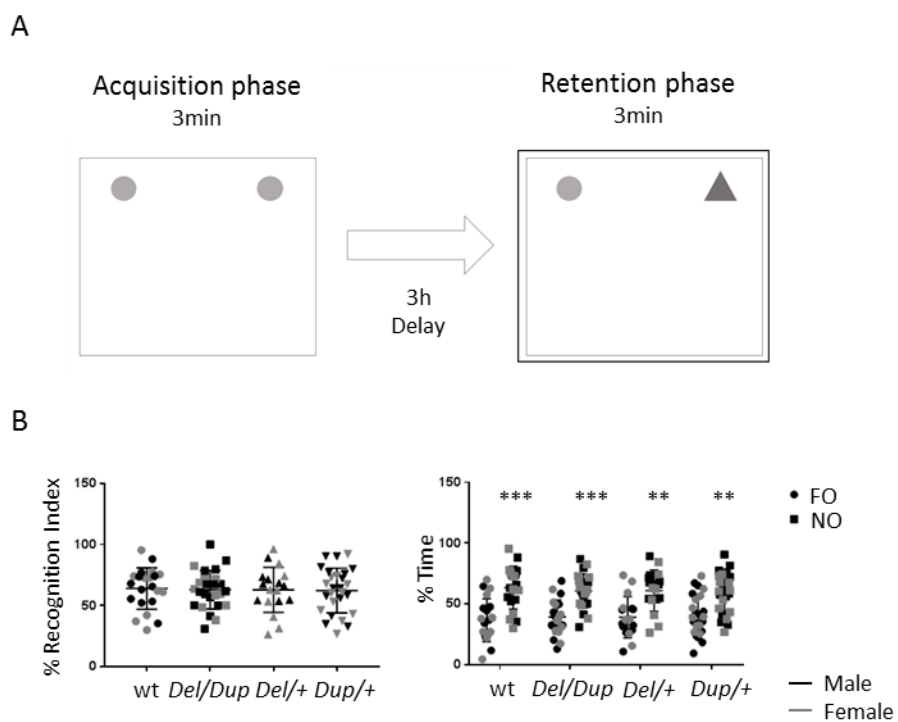


Figure 6. Novel object recognition memory task of the rat 16p11.2 models after 3 hours of retention with 3 objects

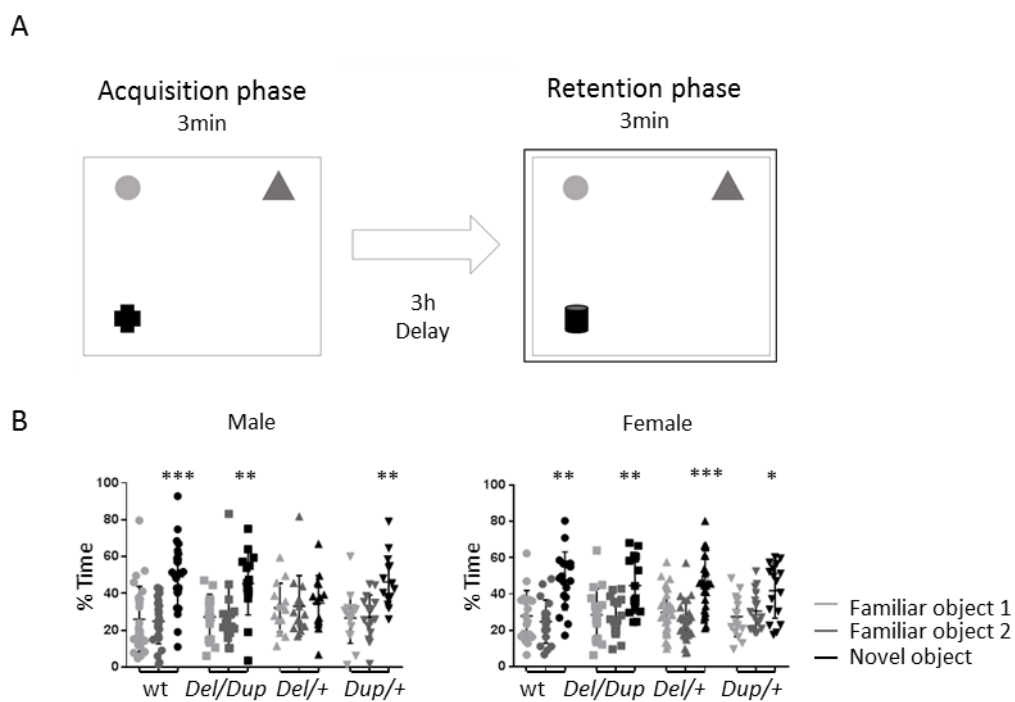


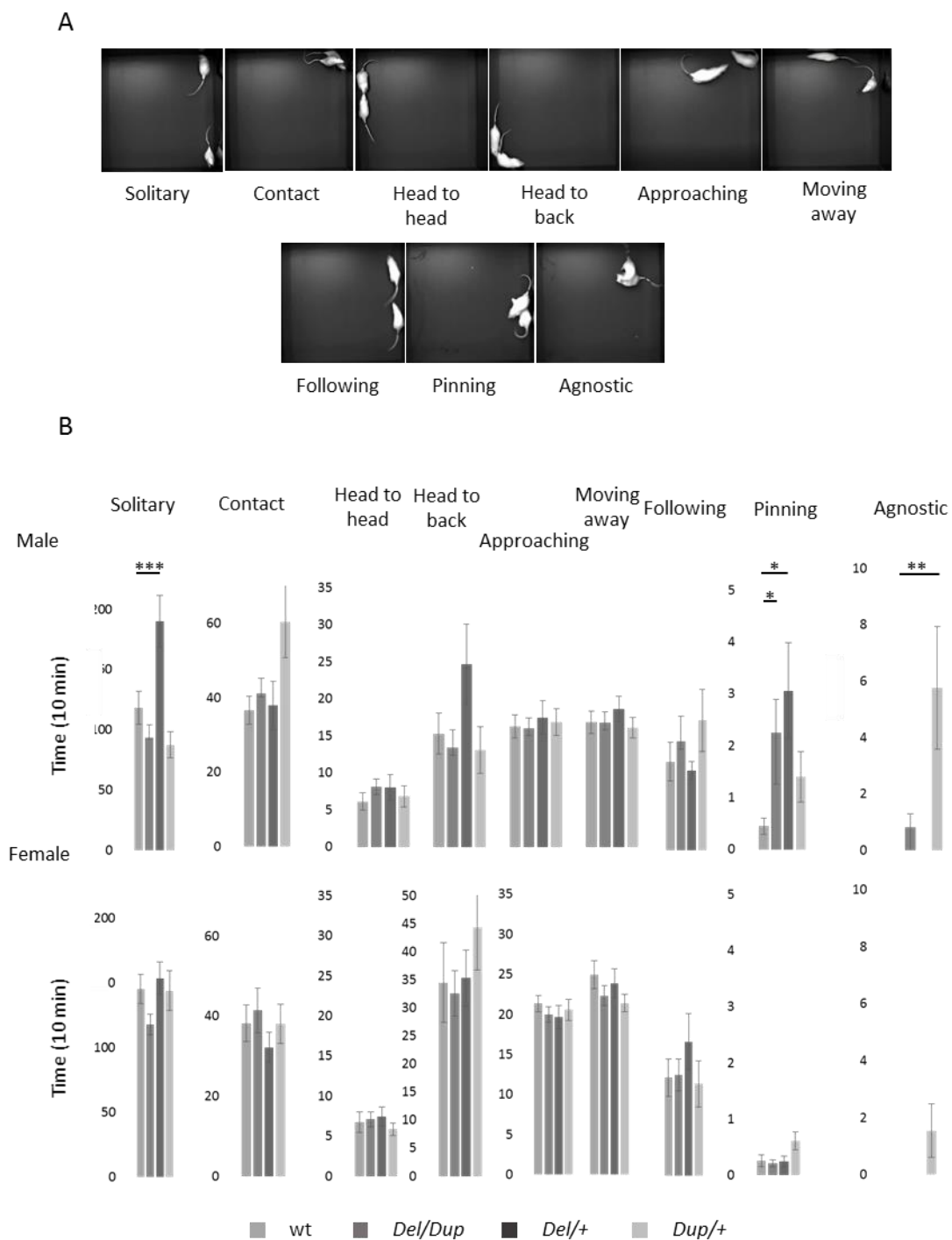
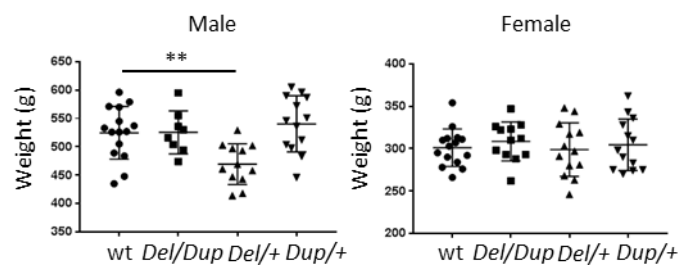
Figure 7. Social interaction of the 16p11.2 rat models

Figure 8. Effects of *Sult1a1-Spn* rearrangements on body weight

TABLES

Genetic background	Crossings	Sex	Genotype	Individuals	Ratio	χ^2	<i>p</i>
SD	<i>Del/+</i> x <i>Dup/+</i>	Total	wt	170	29,2%	5.8	0.12
			<i>Del/Dup</i>	132	22,6%		
			<i>Del/+</i>	138	23,7%		
			<i>Dup/+</i>	143	24,6%		
SD	<i>Del/+</i> x <i>Dup/+</i>	Male	wt	79	27,7%	1.7	0.64
			<i>Del/Dup</i>	64	22,5%		
			<i>Del/+</i>	69	24,2%		
			<i>Dup/+</i>	73	25,6%		
SD	<i>Del/+</i> x <i>Dup/+</i>	Female	wt	91	30,5%	4.9	0.18
			<i>Del/Dup</i>	68	22,8%		
			<i>Del/+</i>	69	23,2%		
			<i>Dup/+</i>	70	23,5%		

Table 1. Summary table of the transmission rates of the *Sult1a1-Spn* deletion (*Del/+*) and duplication (*Dup/+*) alleles from the *Del/+* x *Dup/+* crossing in total individuals, males or females observed at weaning.

Sex	Test	Parameter	wt	Del/Dup	Del/+	Dup/+
Male	Open Field	Horizontal activity (m)	127 ± 5	132 ± 4	149 ± 7	119 ± 6
		Vertical activity (count)	139 ± 8	157 ± 9	167 ± 12	130 ± 7
Female		Horizontal activity (m)	174 ± 8	182 ± 9	166 ± 4	141 ± 6
		Vertical activity (count)	184 ± 8	217 ± 11	177 ± 13	156 ± 11
Total	New Object Location Recognition 5 min delay	S1 object exploration (s)	38 ± 3	40 ± 3	48 ± 2	38 ± 3
		S2 non-displaced object exploration (s)	4 ± 1	4 ± 1	5 ± 1	6 ± 1
		S2 displaced object (s)	15 ± 1	8 ± 1***	13 ± 1	11 ± 1*
		Recognition Index (%)	82 ± 4 ^{§§§}	66 ± 5 ^{§§}	73 ± 5 ^{§§§}	70 ± 5 ^{§§§}
Total	Novel Object Recognition 2 objects 3 hours delay	S1 object A exploration (s)	39 ± 3	33 ± 2	45 ± 3	38 ± 2
		S2 object A exploration (s)	12 ± 2	8 ± 1	10 ± 1	11 ± 1
		S2 object B exploration (s)	18 ± 3	13 ± 1	21 ± 4	19 ± 2
		Recognition Index (%)	64 ± 4 ^{§§§}	63 ± 3 ^{§§§}	62 ± 4 ^{§§}	63 ± 4 ^{§§}
Male	Novel Object Recognition 3 objects 3 hours delay	S1 object exploration (s)	50 ± 3	41 ± 4	44 ± 3	40 ± 3
		S2 familiar 1 object exploration (s)	8 ± 1	7 ± 1	13 ± 2*	7 ± 1
		S2 familiar 2 object exploration (s)	7 ± 1	6 ± 1	16 ± 4**	7 ± 1
		S2 new object exploration (s)	15 ± 2	12 ± 2	14 ± 2	13 ± 2
		Recognition Index (%)	49 ± 3 ^{§§§}	45 ± 4 ^{§§}	34 ± 4	46 ± 4 ^{§§}
	Female	S1 object exploration (s)	50 ± 4	43 ± 5	53 ± 3	42 ± 4
		S2 familiar 1 object exploration (s)	10 ± 1	10 ± 1	12 ± 1	10 ± 1
		S2 familiar 2 object exploration (s)	9 ± 1	10 ± 1	9 ± 1	10 ± 1
		S2 new object exploration (s)	18 ± 3	16 ± 2	17 ± 2	14 ± 2
		Recognition Index (%)	47 ± 4 ^{§§§}	44 ± 4 ^{§§}	45 ± 3 ^{§§§}	42 ± 4 [§]
Male	Social Interaction	Solitary	118 ± 14	93 ± 11	190 ± 22***	87 ± 11
		Contact	37 ± 4	41 ± 4	38 ± 7	60 ± 10
		Head to head	6 ± 1	8 ± 1	8 ± 2	7 ± 1
		Head to back	15 ± 3	13 ± 2	25 ± 5	13 ± 3
		Approaching	16 ± 2	16 ± 1	17 ± 2	17 ± 2
		Moving away	17 ± 2	17 ± 1	19 ± 2	16 ± 1
		Following	12 ± 3	15 ± 3	11 ± 1	17 ± 4
		Pinning	0	2 ± 1*	3 ± 1*	1
		Agnostic	0	1	0	6 ± 2**
	Female	Solitary	145 ± 11	118 ± 8	154 ± 12	144 ± 15
		Contact	38 ± 5	41 ± 6	32 ± 4	38 ± 5
		Head to head	7 ± 1	7 ± 1	7 ± 1	6 ± 1
		Head to back	35 ± 7	33 ± 4	35 ± 5	44 ± 8
		Approaching	21 ± 1	20 ± 1	20 ± 1	21 ± 1
		Moving away	25 ± 2	22 ± 1	24 ± 2	21 ± 1
		Following	12 ± 2	12 ± 2	17 ± 3	11 ± 3
		Pinning	0	0	0	1
		Agnostic	0	0	0	2 ± 1

Table 2. Behavioral and cognitive study of the 16p11.2 *Sult1a1-Spn Del/Dup* genetic line in the rat model for both sex. In the open field test, we didn't observe any significant alteration for horizontal and vertical activity in our mutant rats compared to wt animals for any sex. The absence of phenotype could be explained by the high variability shown by the individuals in each group. Recognition memory was analyzed through the novel object location and object recognition test. We first evaluated the performances of males and females separately. As no significant sex differences were noted, we collapsed these data across both sexes. In the first session (S1) no difference in object A exploration was noticed.

Although the *Del/Dup* and *Dup/+* individuals showed a decreased exploration time of displaced object, any genotype showed impaired object location recognition. In the novel object recognition task with 2 objects, no change of memory was observed. In the first session (S1) of the novel object recognition test with 3 objects, no difference in object A exploration was noticed. The *Del/+* males showed a deficit for novel object recognition index. *Del/+* males were the only animals whose recognition index was not significantly higher than the level of chance for 3 objects (33.3%). Finally, social interaction test indicated that *Del/+* males present an increased solitary behavior whereas *Dup/+* males develop agnostic behavior. In addition, *Del/+* as well as *Del/Dup* males showed an increased pinning behavior. Data are mean \pm SEM. Mann-Witney *U* test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. One Sample T. Test, $^{\S}p < 0.05$, $^{\S\S}p < 0.01$, $^{\S\S\S}p < 0.001$.

Sex	Parameter	wt	<i>Del/Dup</i>	<i>Del/+</i>	<i>Dup/+</i>
Male	Body weight (g)	525 ± 11	526 ± 13	469 ± 10**	540 ± 13
Female	Body weight (g)	301 ± 6	309 ± 6	299 ± 8	305 ± 8

Table 3. Body weight analyse of 16p11.2 Sult1a1-Spn *Del/Dup* rat model. *Del/+* male carriers showed decreased body weight compared to wt littermates. Data are mean ± SEM. Student t-test ** $p < 0.01$.

Oligogenic effects of 16p11.2 copy number variation on craniofacial development

Authors

Yuqi Qiu^{1*}, Thomas Arbogast^{2*}, Sandra Martin Lorenzo^{3,4,5}, Honying Li¹, Shih C. Tang⁶, Ellen Richardson², Oanh Hong⁶, Shawn Cho⁶, Omar Shanta^{6,7}, Timothy Pang⁶, Christina Corsello^{6,8}, Curtis K. Deutsch⁹, Claire Chevalier^{3,4,5}, Erica E. Davis², Lilia M. Iakoucheva⁶, Yann Herault^{3,4,5}, §, Nicholas Katsanis^{2,§}, Karen Messer^{1,§}, Jonathan Sebat^{6,10,11,12,13,§,†}

Affiliations

1 Division of Biostatistics and Bioinformatics, Department of Family Medicine and Public Health, University of California San Diego, La Jolla, CA 92093

2 Center for Human Disease Modeling, Duke University, Durham, NC 27701

3 Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Strasbourg, Illkirch, France

4 Centre National de la Recherche Scientifique, UMR7104, Illkirch, France

5 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U964, Illkirch, France

6 Department of Psychiatry, University of California San Diego, La Jolla, CA 92093

7 Department of Electrical Engineering, University of California San Diego, La Jolla, CA 92093

8 Rady Children's Hospital, San Diego, CA 92123

9 Eunice Kennedy Shriver Center UMMS, Charlestown and Worcester MA

10 Beyster Center for Genomics of Psychiatric Diseases, University of California, San Diego, La Jolla, CA 92093, USA

11 Institute for Genomic Medicine, University of California, San Diego, La Jolla, CA 92093

12 Department of Cellular and Molecular Medicine, University of California, San Diego, La Jolla, CA 92093

13 Department of Pediatrics, University of California, San Diego, La Jolla, CA 92093

* These authors contributed equally

§ co-senior authors

† correspondence: jsebat@ucsd.edu

ABSTRACT

A copy number variant (CNV) of 16p11.2, which encompasses 30 genes, is associated with developmental and psychiatric disorders, head size and body mass. The genetic mechanisms that underlie these associations are not understood. To elucidate the effects of genes on development, we exploited the quantitative effects of CNV on craniofacial structure in humans and model organisms. We show that reciprocal deletion and duplication of 16p11.2 have characteristic “mirror” effects on craniofacial features that are conserved in human, rat and mouse. By testing gene dosage effects on the shape of the mandible in zebrafish, we show that the distribution of effects for all individual genes is consistent with that of the CNV, and some combinations have non-additive effects. Our results suggest that, at minimum, one third of genes within the 16p11.2 region influence craniofacial development, and the facial gestalt of each CNV represents a product of 30 dosage effects.

HIGHLIGHTS

- Reciprocal CNVs of 16p11.2 have mirror effects on craniofacial structure. Copy number is associated with a positive effect on nasal and mandibular regions and a negative effect on frontal regions of the face.
- Effects of CNV on craniofacial development in human are well conserved in rat and mouse models of 16p11.2 deletion and duplication.
- 7/30 genes each independently have significant effects on the shape of the mandible in zebrafish; these include *SPN*, *C16orf54*, *SEZ6L2*, *ASPHD1*, *TAOK2*, *INO80E* and *FAM57B*. Others (*MAPK3*, *MVP*, *KCTD13*) have detectable effects only in combination.
- Overexpression of 30 genes individually showed a distribution of effects that was skewed in the same direction as that of the full duplication, suggesting that specific facial features represent the net of all individual effects combined.

INTRODUCTION

Recent technological advances in genomics have facilitated the discovery of scores of new genetic disorders that have a complex and variable clinical presentation (Malhotra and Sebat, 2012). Unlike Down syndrome (Roizen and Patterson) and Williams's syndrome (Ewart *et al.*), which have a distinguishable constellation of clinical features and facial gestalts, these new genetic disorders are notable for not having a clear pattern of congenital anomalies or dysmorphic features (Nevado *et al.*). A major exemplar are the reciprocal CNVs of 16p11.2 (BP4-BP5, OMIM: 611913 and 614671). Deletion (Miller *et al.*) and duplication (D'Angelo *et al.*) of 30 genes are associated with variable degrees of cognitive impairment, epilepsy and psychiatric traits including autism spectrum disorder, psychiatric disorders. We and others have shown that the dosage of 16p11.2 has quantitative effects on development in particular morphometric traits, such as head circumference (McCarthy *et al.*; Shinawi *et al.*) and body mass index (BMI) (D'Angelo *et al.*). Deletions are associated with greater head size and BMI while duplications are associated with smaller head size and BMI. In addition, a variety of craniofacial anomalies have been reported in a subset of cases (Bijlsma *et al.*; Rosenfeld *et al.*; Shinawi *et al.*), but a characteristic pattern of dysmorphic features has not been described.

Thus, the influence of CNV on psychiatric and morphometric traits alike is complex, and the underlying genetic mechanisms are not understood.

Elucidating the genetic mechanisms through which CNVs influence development requires rigorous analysis of quantitative phenotype data in humans and the establishment of model systems in which the genetic mechanisms are conserved. Craniofacial development, in particular, is controlled by genetic mechanisms that are conserved across species (Schilling). The effect of genes on the human face is of interest, therefore, because craniofacial structure represents developmental phenotypes that are experimentally tractable in model organisms, and which could provide insights into disease mechanisms. Effects of 16p11.2 CNV on development of the brain and head have been reported in both mouse (Arbogast *et al.*; Horev *et al.*) and zebrafish (Golzio *et al.*), and multiple genes have been demonstrated to influence brain development including KCTD13, MAPK3 and MVP (Arbogast *et al.*; Escamilla *et al.*; Golzio *et al.*). We hypothesize that a precise morphometric characterization of patients could help to further illuminate how 16p11.2 genes influence embryonic development.

The application of 3D imaging provides detailed quantitative analysis of surface features, enabling more precise measurements of the shape of the head and face. Application of this approach has facilitated the finer characterization of genetic syndromes with characteristic craniofacial features (Hammond; Hammond *et al.*). Application of this technology in non-syndromic and complex genetic disorders has the potential to elucidate the effect of genes on craniofacial development. By three-dimensional image analysis of surface features in human, rat and mouse and the dissection of single gene effects in zebrafish, we show that the copy number variation of 16p11.2 has a strong effects on craniofacial structure that are

conserved across species, and the facial features associated with each disorder are attributable to the oligogenic effects of multiple genes.

RESULTS

Reciprocal deletion and duplication of 16p11.2 have mirror effects on craniofacial structure

3D morphometric facial imaging was performed on subjects with 16p11.2 duplications or deletions and controls recruited to the Simons VIP study (Simons VIP Consortium, see supplementary methods). The final dataset (N = 228, Table S1) included 45 with deletions, 44 with duplications and 139 familial non- carrier controls. A total of 24 landmarks were placed on each image and a “features”, defined as pairwise distances between landmarks, were normalized to the mean. Differences in deletion and duplication groups relative to controls were detected by linear regression controlling for fixed effects of age, head circumference, body mass index (BMI), sex, and ancestry principal components obtained from genetic data, with a random intercept allowed to account for within-family correlation. Eighteen features differed significantly between groups at a family-wise error rate of 5% (Fig 1B, Table S2), and forty-five were significant at a Benjamini-Hochberg FDR correction of 5%. For 13 of the 18 significant features, deletion and duplication had effects that were opposite in direction ($p = 0.048$, one- sided binomial test). Consistent with the deletion and duplication having reciprocal effects, the deletion vs duplication effect sizes were negatively correlated for the 18 significant measures ($p = <0.001$, Pearson’s correlation = -0.77 , Fig 1A).

Genetic effects were clustered in regions corresponding to major processes of craniofacial development (Frontonasal, Medial Nasal, Maxilla and Mandible, Fig 1A). Deletion of 16p11.2 was associated with significantly larger frontal (4-1, 4-2, 4-3, 12-9, 12-10, 12-11) and maxillary (7-8, 15-16, 5-16 and 13-8) dimensions and a shorter (18-19) and narrower nose (4-12, 4-15, 6-15, 7-12 and 7-14). By contrast the duplication was associated with opposite effects, including smaller frontal dimensions (4-2) and significantly wider nose and longer nasal bridge (18-19). Duplications were associated with a narrower LMA consistent with a more protrusive chin. A wider LMA was observed in deletion carriers, but the effect did not reach statistical significance in this comparison. Least absolute shrinkage and selection operator (LASSO) logistic regression was performed to select a parsimonious subset of 14 features which could best discriminate each genotype (Fig. 1B, Table S2).

Facial gestalts associated with the 16p11.2 deletion and duplication were visualized using computer- generated faces in which the features of a model face were adjusted according to the 14 differences described above, including the frontonasal and maxillary distances and the LMA (Fig. 1C, Table S2). Dimensions were adjusted based on the percentage difference between CNV and control groups (defined as the effect size divided by the mean). Differences ranged from 1% to 12%.

To further visualize the facial gestalts of controls, deletion carriers and duplication carriers respectively, a 3D-model of each was generated by averaging of the surface topography of

faces from multiple subjects (3dMDvultus version 2.5.0.1). The sample was limited to subjects ages 14-49 to avoid variability in facial features across development at young ages, and the sample was restricted to males for which there were sufficient numbers of age-matched subjects (>5) for all three genotypes (Table S3). A facial gestalt similar to that of the simulated faces was distinguishable in the average faces of adult male deletion and duplication carriers and control subjects, with the effects on the nose and chin being the most recognizable feature (Fig. 1D). Similar features were observed in the average faces of younger (age 8-11) and older (ages 18-50) subjects of both sexes (Fig. S1).

Craniofacial characteristics distinguish 16p11.2 deletion and duplication carriers from controls

Based on Linear Discriminate Analysis (LDA) of craniofacial features, genotypes could be separated into clusters, with better separation for younger subjects (Fig. 2). The LDA model achieved a total correct classification rate of 0.78 on the full sample; reflecting the considerable overlap between the genotypes (Fig. 2A). Genotype was classified more accurately by LDA when restricted to younger (age 3-20) subjects, with total correct classification 0.84. The predictive accuracy of the LDA model was confirmed by leave-one-out cross validation of the full sample which gave specificities of 0.88 and 0.93 and sensitivities of 0.48 and 0.42 for deletion and duplication respectively. When restricted to younger subjects, specificities were 0.88 and 0.87 and sensitivities were 0.72 and 0.52 for deletion and duplication respectively.

These results demonstrate that deletion and duplication carriers have combinations of facial features that are distinctive for each group. However, the substantial overlap between the faces of CNV carriers and controls is consistent with many subjects having a non-syndromic appearance that is not characterized by gross anomalies. Examination of group differences on each of the individual distances confirms that deletion and duplication groups do not represent outliers on any single measure. (Fig. S2).

Differential effects CNV on craniofacial structure are recapitulated in rat and mouse models of 16p11.2

Rodent models of 16p11.2 deletion and duplication exhibit a variety of behavioral traits (Arbogast et al.; Horev et al.; Yang et al.). However, the direct relevance of these phenotypes to the human condition is uncertain. Similarly, the analysis of anthropometric traits in model organisms has been confounded by growth retardation that is observed in some mouse models (Arbogast et al.; Horev et al.; Yang et al.).

We theorized that the cranial skeleton might represent an aspect of vertebrate development that is sufficiently conserved to serve as surrogate traits for genetic dissection of 16p11.2 CNV. To that end, we pursued quantitative analyses of the cranial skeleton from rat and mouse models of the 16p11.2 deletion and duplication (Arbogast et al., 2016).

Rat deletion and duplication models were generated by CRISPR/Cas9 genome editing of the syntenic region, and computed tomography (CT) scans were obtained from a cohort of 75

rats. In addition, CT scans of mouse lines from Arbogast et al. were obtained from a cohort of 26 mice (see supplementary methods). For each subject, a set of 19 landmarks were placed delineating the major craniofacial processes, and features were compared between the CNV models and matched controls using linear regression. Results of all univariate tests are described in Table S4.

CNV had a significant effect on craniofacial structure in rat with strong mirror effects across all features between the deletion and duplication models ($r = -0.56$, $P < 0.001$, Fig. S3). A total of 52 features were significantly associated with genotype ($FDR < 0.05$, Fig. 3A). By labeling features according to their respective craniofacial regions, we observe that the deletion was associated with larger frontal regions (e.g. 9-2, 9-3, 9-6 and 9-7, Fig. 3B) and smaller nasal (3-7, 3-8, 7-7 and 4-8) and mandibular (MW) regions, while the opposite effects were associated with the duplication. These results are consistent with the patterns that were observed in human.

Overall the effects of the deletion in mouse were similar to those in rat with effect sizes across the face being significantly correlated between species ($r = 0.50$, $p < 0.0001$, Fig. S10). The effects of the duplication in mouse did not correlate with those in rat and did not exhibit a strong mirror effect relative to the deletion across all features ($p = 0.59$), consistent with the duplication having a comparatively modest effect in this mouse line. Mouse craniofacial features that differed between deletion and duplication lines, however, did show mirror patterns similar to those in rat and human (Fig. 3C). For the most informative features that were selected by LASSO regression, deletion mice had larger frontal (9-2, 9-6 and 2-6) and maxillary (19-14 and 15-18) distances and smaller nasal (7-1, 8-1, 8-3 and 10-1) and mandibular (ML) distances, which were similar to the effects observed in human (sign test $P = 0.004$), whereas the duplication mouse model had reciprocal effects on the same features (sign test $P = 0.004$).

Craniofacial features associated with 16p11.2 CNVs are attributable to multiple genes

To assess with more granularity the influence of the 16p11.2 BP4-BP5 genes on facial structure, we tested their effects on specific craniofacial features that could be measured by in vivo imaging of zebrafish larvae. Protrusion of the lower jaw was measured using the ceratohyal arch angle (CHA), where a smaller angle corresponds to a more protrusive jaw and a wider angle corresponds to a receding jaw (Fig. 4A). Dimensions of the frontonasal region were measured using the Frontonasal area (FNA) and interocular distance (IOD) (Fig. S4A), however we are unable to capture separate frontal and nasal measurements in zebrafish analogous to those in rodent and in human.

We first tested the overexpression of all 30 genes in the 16p11.2 region, focusing on the lower jaw phenotype which is more directly analogous to the phenotypes in human and rodent. We found that several genes had significant effects on CHA, including *SPN*, *C16orf54*, *SEZ6L2*, *ASPHD1*, *TAOK2*, *INO80E* and *FAM57B* (Fig. 4B). The genes inducing the most significant phenotypes included *SEZ6L2* (4° decrease in CHA versus controls; $p < 0.0001$) and *TAOK2* (3° decrease in CHA versus controls; $p < 0.0001$; Fig. 4A,B). Effects for all seven transcripts were associated with a narrower CHA compared to controls, consistent with the

protruding lower jaw that is associated with the duplication in human and rodent. The distribution of effects for all 30 genes (95% CI = 98.1-99.1) was significantly lower than the distribution in controls (95% CI = 99.5-100.5), consistent with the effect of the duplication. We evaluated the effects of ablating endogenous zebrafish *sez6l2*, *taok2a*, and *taok2b* using CRISPR/Cas9 genome editing, and confirmed that the reciprocal loss of these genes results in a reciprocal increase of the CHA in comparison to controls (*sez6l2* gRNA+Cas9 versus controls, 5° increase in CHA, $p < 0.0001$; *taok2a* gRNA+Cas9 versus controls, 8° increase in CHA, $p < 0.0001$; *taok2b* gRNA+Cas9 versus controls, 5° increase in CHA, $p < 0.0001$; Fig. 4A,C), consistent with the effect of the deletion.

We showed previously using zebrafish models that overexpression of *KCTD13* individually and in combination with *MAPK3* and *MVP* led to a decrease in head width (Golzio et al., 2012), and knockdown of *kctd13* exhibited mirror effects, a pattern consistent with the human phenotype of the 16p11.2 CNV. We tested overexpression and CRISPR/Cas9 F0 mutants of *KCTD13*, *MAPK3*, and *MVP* individually and in combinations of two or three genes. Overexpression of the three mRNAs individually did not have a significant effect on CHA, but injection of all three transcripts combined resulted in a significant 6° decrease in CHA relative to controls (Tukey's $p < 0.01$; Fig. 4A, D). Mutants with reciprocal loss of *mapk3* displayed an increased CHA (Fig. 4E) and the three gene combination resulted in a 16° CHA increase (Tukey's $p < 0.0001$). Thus mirror effects of these genes parallel those that are observed in human. We evaluated the body length of larvae injected with a combination of the three gRNAs and Cas9 and found no growth retardation compared to controls, supporting further the specificity of the cartilage phenotypes (Fig. S5). For Frontonasal area (FNA) and Interocular distance (IOD), significant effects were also observed with combinations of two or three genes (Fig. S4). Genome editing was associated with reduction in FNA (Fig. S4A-C), and gene overexpression was associated with increase in IOD (Fig. S4D, E), results that parallel the effect of the deletion and duplication on nasal regions in human. Evidence for a synergistic effect of *MAPK3* in combination with *MVP* or *KCTD13* was observed for dimensions of the frontonasal region but not the mandible (Table S5). Other combinations were consistent with additive effects ($p = 0.99$ for additive ANOVA model compared to fully parameterized model). Together, our in vivo experiments performed in zebrafish suggest that facial features that are associated with CNV are under the influence of a substantial proportion of 16p11.2 genes, including some that have non-additive effects.

DISCUSSION

Here we show that reciprocal CNVs of the 16p11.2 BP4-BP5 region have mirror effects on craniofacial development. Deletion and duplication of 16p11.2 are each associated with facial features that are distinctive but both groups overlap with the variability observed in the general population. Dosage of 16p11.2 was associated with a positive effect on nasal and mandibular regions and a negative effect on the frontal regions.

The principal value of the 16p11.2 CNV facial phenotypes are, not as a clinical diagnostic markers, but as a model for studying the genetic mechanisms through which CNVs influence complex traits. Here we show that mirror effects of CNV on facial features are well conserved in rat and mouse models of 16p11.2, and the effects of gene dosage on a specific feature (shape of the mandible) can be further modeled in zebrafish. The craniofacial phenotype of 16p11.2 thus represents the first set of traits for which a genetic mechanisms is conserved across model systems.

By dissection of individual gene effects in zebrafish we show that mirror facial phenotypes of CNV are attributable to multiple genes within the region. Significant effects were observed for seven genes when overexpressed individually and for additional genes (*MAPK3*, *MVP* and *KCTD13*) when overexpressed in combination, thus at least one third of genes may influence the shape of the mandible. The distribution of effects for all 30 gene overexpression tests was negative, consistent with the effect for the full duplication. Our results suggest that the net effect of the large CNV on specific developmental features consists of a combination of 30 individual gene effects. We find some evidence for synergistic effects when multiple genes are expressed in combination; however, we are not able to assess whether the overall effect is explained predominantly by additive effects or epistasis without a model of the full CNV in zebrafish.

The genes that have the greatest effects on shape of the mandible were *SPN*, *C16orf54*, *SEZ6L2*, *ASPHD1*, *TAOK2*, *INO80E* and *FAM57B*. These genes were not clearly distinguishable from the other 23 based on their levels of expression in the developing face (Table S6). However, some of these genes have been shown previously to be associated with alterations in head and brain size, such as *TAOK2* (Richter *et al.*) and *FAM57B* (McCammon *et al.*). These and other genes within the region function as regulators of cell proliferation and embryonic development (Khosravi-Far *et al.*). Notably, *TAOK2* is a regulator of MAP Kinase (MAPK) signaling (Chen *et al.*), which is a commonality among multiple 16p11.2 genes, including *MAPK3* which encodes the Extracellular Receptor Kinase 1 (ERK1) (Meloche and Pouyssegur) and *MVP* (Scheffer *et al.*), which complexes with ERK2 (Kolli *et al.*) and regulates ERK signaling (Kim *et al.*). This pathway-level convergence highlights MAPK signaling as a potential driver of craniofacial effects that are observed in this study.

The craniofacial features that are associated with the deletion of 16p11.2, including macrocephaly, broad forehead, and underdeveloped nose and chin (micrognathia), bare some similarity to features of monogenic disorders that are caused by mutations in components of RAS/MAPK signaling, such as Noonan (Bhambhani and Muenke) and Cardiofaciocutaneous (CFC) syndromes (Rauen). Similar craniofacial anomalies are also observed in mouse embryos with conditional disruption of MAPK signaling in neural crest

cells (Parada *et al.*). Common facial features between 16p11.2 deletions and a subset of these other syndromes is intriguing and suggests that dysregulation of RAS/MAPK signaling might affect embryonic patterning in similar ways in 16p11.2 microdeletion syndrome and in the family disorders known as the “rasopathies” (Araki *et al.*).

An oligogenic mechanism is unlikely to be unique to the 16p11.2 locus. Rather an oligogenic model may apply in general to the effect of large CNVs on complex traits. For example, the polygenic contribution to height appears to be distributed across a large proportion of the genome (Boyle *et al.*; Liu *et al.*). The same is likely to be true for other anthropometric and cognitive traits such as facial features, body mass and IQ. In principle, haploinsufficiency of 30 adjacent genes may exert a distribution of effects across a variety of traits, and the features that are most prominent for a particular disorder could be those traits for which the sum of gene dosage effects across the CNV deviates significantly from the genome-wide genetic load.

Previous studies have found evidence that multiple genes within the 16p11.2 region impact various aspects of development in zebrafish (McCammon *et al.*) and drosophila (Iyer *et al.*). However, a major limitation has been a lack of validation of these phenotypes as models of the human disorder. The reciprocal craniofacial phenotypes that we observe are, to our knowledge, the only human 16p11.2- associated traits that are reproducible across multiple model organisms, both in magnitude and direction of effect. Knowledge of the influence of 16p11.2 deletion and duplication on craniofacial development could serve as a guide for how these genetic disorders influence embryonic patterning more broadly, including regional patterning of the brain (Chang *et al.*; Owen *et al.*; Owen *et al.*; Qureshi *et al.*). Further studies of the oligogenic effects described here could provide insights into mechanisms underlying cognitive impairments of these genetic disorders.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

3D Morphometric Analysis of Simons VIP subjects

Images of Simons VIP subjects were acquired using the 3dMDtrio system (<http://www.3dmd.com/3dmd-systems/#trio>) and were landmarked according to Farkas standards (Farkas) blind to genotype. Additional landmarks were placed to capture frontal dimensions including landmarks 2 (lateral brow) and 4 (medial brow). A total of 24 landmarks were placed. Quantitative pairwise distances between landmarks were calculated using the 3DMD software (3dMDvultus version 2.5.0.1). Symmetric distances were averaged and normalized to the overall size of the face, yielding 156 facial measurements and two angular measurements, the nasomental (NMA) and labiomental (LMA) angles respectively. We used a series of linear mixed-effects models to test for the effect of the deletion and the duplication separately on each facial measure. Linear regression was controlled for fixed effects of age, head circumference, body mass index (BMI), sex, and ancestry principal components obtained from genetic data, with a random intercept allowed to account for within-family correlation.

To investigate further the extent to which the 16p11.2 genotype can be distinguished based on craniofacial features, we performed Linear Discriminate Analysis (LDA) using the 45 distances significant at FDR <0.05 (Fig. 2), for the total sample and a subset restricted to younger subjects (age 3-20).

Statistical analysis controlled for age, head circumference, body mass index (BMI), sex, and ancestry principal components. Leave-one-out cross validation was performed twice to calculate misspecification rates for both full sample and younger sample.

Computed tomography analysis of 16p11.2 deletion and duplication rodent models

Quantitative analysis of skull morphometry in rodent models of the 16p11.2 deletion and duplication was performed using a dataset of CT scans collected by Arbogast et al (Arbogast et al.) and completed here with a CT dataset for the rat models (see supplementary materials). The cohort of 75 rats consisted of 23 Del/+ (9 male and 14 female), 26 Dup/+ (13 male and 13 female) and 26 +/- littermates (13 male and 13 female). The mouse cohort consisted of female deletion or duplication lines (aged 13 weeks) paired with the same number of wild-type female littermates, including 10 deletion and 8 duplication pairs obtained from more than 5 independent breeder pairs to minimize inbreedism.

Following CT scans of all rodents, nineteen landmarks were placed to capture the dimensions of the frontal, nasal and maxillary regions. Centroids of multiple landmarks were determined to mark three positions on the mandible (Fig. S6). For each skull, pairwise distances were normalized to the overall geometric mean distance, and the most significant differences between mutant and control groups were identified by linear regression at an unadjusted significance of 5%.

Testing the effects of genes on craniofacial features in a Zebrafish model

To model the 16p11.2 BP4-BP5 duplication, we overexpressed all 30 genes of the CNV individually and evaluated the shape of the mandible in a transgenic zebrafish model (-1.4col1a1:egfp) in which GFP marks the developing cartilage (Kague et al. 2012). In addition, we investigated pairwise and three-way gene interactions for MAPK3, MVP, and KCTD13 that have been reported previously to impact head size (Golzio et al 2011). To model the reciprocal deletion, we performed CRISPR/Cas9 genome editing of *sez6l2*, *taok2a*, and *taok2b* individually; we generated F0 mutants for *mapk3*, *mvp*, and *kctd13* individually and in pairwise and three-way combinations. We used CHOPCHOP (Labun et al., 2016) to identify guide (g)RNAs targeting coding sequence and PCR primers used to determine efficiency of CRISPR/Cas9 genome editing (Fig. S7-12, Table S7). Measurements of the dorsal zebrafish head were performed by determining the interocular distance (IOD) and the frontonasal area (FNA).

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by grants to J.S. from the Simons Foundation (SFARI #178088) and the NIMH (*new grant number pending); a grant to E.E.D. from the NIMH (MH106826); a NIMH Silvio O. Conte Center grant to N.K. (P50MH094268); a grant to Y.H. from the French Foundation for Rare Diseases; and grants to L.M.I. from the Simons Foundation (SFARI #345469) and NIMH (MH104766). We are grateful to all of the families at the participating Simons Variation in Individuals Project (Simons VIP) sites, as well as the Simons VIP Consortium. We appreciate obtaining access to 3D human imaging and genetic data from SFARI. Approved researchers can obtain the Simons VIP datasets described in this study (<https://www.sfari.org/resource/simons-vip/>) by applying at <https://base.sfari.org>. We are grateful to the CELPHEDIA/TEFOR French National infrastructure and especially to Severine Menoret, for helping us to obtain the 16p11.2 rat models that are described here.

REFERENCES

1. Araki, T., Mohi, M.G., Ismat, F.A., Bronson, R.T., Williams, I.R., Kutok, J.L., Yang, W., Pao, L.I., Gilliland, D.G., Epstein, J.A., *et al.* (2004). Mouse model of Noonan syndrome reveals cell type- and gene dosage- dependent effects of Ptpn11 mutation. *Nat Med* 10, 849-857.
2. Arbogast, T., Ouagazzal, A.M., Chevalier, C., Kopanitsa, M., Afinowi, N., Migliavacca, E., Cowling, B.S., Birling, M.C., Champy, M.F., Reymond, A., *et al.* (2016). Reciprocal Effects on Neurocognitive and Metabolic Phenotypes in Mouse Models of 16p11.2 Deletion and Duplication Syndromes. *PLoS Genet* 12, e1005709.
3. Arbogast, T., Razaz, P., Ellegood, J., McKinstry, S., Erdin, S., Currall, B., Aneichyk, T., Lerch, J.P., Qiu, L.R., Rodriguiz, R.M., *et al.* (2018). Kctd13-deficient mice display short-term memory impairment and sex- dependent genetic interactions. *Hum Mol Genet.*
4. Bhambhani, V., and Muenke, M. (2014). Noonan syndrome. *Am Fam Physician* 89, 37-43.
5. Bijlsma, E.K., Gijssbers, A.C., Schuurs-Hoeijmakers, J.H., van Haeringen, A., Fransen van de Putte, D.E., Anderlid, B.M., Lundin, J., Lapunzina, P., Jurado, L.A., Delle Chiaie, B., *et al.* (2009). Extending the phenotype of recurrent rearrangements of 16p11.2: deletions in mentally retarded patients without autism and in normal individuals. *Eur J Med Genet.*
6. Boyle, E.A., Li, Y.I., and Pritchard, J.K. (2017). An Expanded View of Complex Traits: From Polygenic to Omnigenic. *Cell* 169, 1177-1186.
7. Chang, Y.S., Owen, J.P., Pojman, N.J., Thieu, T., Bukshpun, P., Wakahiro, M.L., Marco, E.J., Berman, J.I., Spiro, J.E., Chung, W.K., *et al.* (2016). Reciprocal white matter alterations due to 16p11.2 chromosomal deletions versus duplications. *Hum Brain Mapp* 37, 2833-2848.
8. Chen, Z., Hutchison, M., and Cobb, M.H. (1999). Isolation of the protein kinase TAO2 and identification of its mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase binding domain. *J Biol Chem* 274, 28803-28807.
9. Simons VIP Consortium (2012). Simons Variation in Individuals Project (Simons VIP): a genetics-first approach to studying autism spectrum and related neurodevelopmental disorders. *Neuron* 73, 1063- 1067.
10. D'Angelo, D., Lebon, S., Chen, Q., Martin-Brevet, S., Snyder, L.G., Hippolyte, L., Hanson, E., Maillard, A.M., Faucett, W.A., Mace, A., *et al.* (2016). Defining the Effect of the 16p11.2 Duplication on Cognition, Behavior, and Medical Comorbidities. *JAMA Psychiatry* 73, 20-30.
11. Escamilla, C.O., Filonova, I., Walker, A.K., Xuan, Z.X., Holehonnur, R., Espinosa, F., Liu, S., Thyme, S.B., Lopez-Garcia, I.A., Mendoza, D.B., *et al.* (2017). Kctd13 deletion reduces synaptic transmission via increased RhoA. *Nature* 551, 227-231.
12. Ewart, A.K., Morris, C.A., Atkinson, D., Jin, W., Sternes, K., Spallone, P., Stock, A.D., Leppert, M., and Keating, M.T. (1993). Hemizyosity at the elastin locus in a developmental disorder, Williams syndrome. *Nat Genet* 5, 11-16.
13. Farkas, L.G. (1994). *Anthropometry of the head and face* (New York: Raven).
14. Golzio, C., Willer, J., Talkowski, M.E., Oh, E.C., Taniguchi, Y., Jacquemont, S., Reymond, A., Sun, M., Sawa, A., Gusella, J.F., *et al.* (2012). KCTD13 is a major driver of mirrored neuroanatomical phenotypes of the 16p11.2 copy number variant. *Nature* 485, 363-367.
15. Hammond, P. (2007). The use of 3D face shape modelling in dysmorphology. *Arch Dis Child* 92, 1120- 1126.

16. Hammond, P., McKee, S., Suttie, M., Allanson, J., Cobben, J.M., Maas, S.M., Quarrell, O., Smith, A.C., Lewis, S., Tassabehji, M., *et al.* (2014). Opposite effects on facial morphology due to gene dosage sensitivity. *Hum Genet* 133, 1117-1125.
17. Horev, G., Ellegood, J., Lerch, J.P., Son, Y.E., Muthuswamy, L., Vogel, H., Krieger, A.M., Buja, A., Henkelman, R.M., Wigler, M., *et al.* (2011). Dosage-dependent phenotypes in models of 16p11.2 lesions found in autism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 17076-17081.
18. Iyer, J., Singh, M.D., Jensen, M., Patel, P., Pizzo, L., Huber, E., Koerselman, H., Weiner, A.T., Lepanto, P., Vadodaria, K., *et al.* (2018). Pervasive genetic interactions modulate neurodevelopmental defects of the autism-associated 16p11.2 deletion in *Drosophila melanogaster*. *Nat Commun* 9, 2548.
19. Khosravi-Far, R., Solski, P.A., Clark, G.J., Kinch, M.S., and Der, C.J. (1995). Activation of Rac1, RhoA, and mitogen-activated protein kinases is required for Ras transformation. *Molecular and cellular biology* 15, 6443-6453.
20. Kim, E., Lee, S., Mian, M.F., Yun, S.U., Song, M., Yi, K.S., Ryu, S.H., and Suh, P.G. (2006). Crosstalk between Src and major vault protein in epidermal growth factor-dependent cell signalling. *FEBS J* 273, 793-804.
21. Kolli, S., Zito, C.I., Mossink, M.H., Wiemer, E.A., and Bennett, A.M. (2004). The major vault protein is a novel substrate for the tyrosine phosphatase SHP-2 and scaffold protein in epidermal growth factor signaling. *J Biol Chem* 279, 29374-29385.
22. Liu, X., Li, Y.I., and Pritchard, J.K. (2018). Trans effects on gene expression can drive omnigenic inheritance. *bioRxiv*.
23. Malhotra, D., and Sebat, J. (2012). CNVs: harbingers of a rare variant revolution in psychiatric genetics. *Cell* 148, 1223-1241.
24. McCammon, J.M., Blaker-Lee, A., Chen, X., and Sive, H. (2017). The 16p11.2 homologs *fam57ba* and *doc2a* generate certain brain and body phenotypes. *Hum Mol Genet* 26, 3699-3712.
26. McCarthy, S.E., Makarov, V., Kirov, G., Addington, A.M., McClellan, J., Yoon, S., Perkins, D.O., Dickel, D.E., Kusenda, M., Krastoshevsky, O., *et al.* (2009). Microduplications of 16p11.2 are associated with schizophrenia. *Nat Genet* 41, 1223-1227.
27. Meloche, S., and Pouyssegur, J. (2007). The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* 26, 3227-3239.
28. Miller, D.T., Chung, W., Nasir, R., Shen, Y., Steinman, K.J., Wu, B.L., and Hanson, E. (1993). 16p11.2 Recurrent Microdeletion. In *GeneReviews*((R)), M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J.H. Bean, H.C. Mefford, K. Stephens, A. Amemiya, and N. Ledbetter, eds. (Seattle (WA)).
29. Nevado, J., Mergener, R., Palomares-Bralo, M., Souza, K.R., Vallespin, E., Mena, R., Martinez-Glez, V., Mori, M.A., Santos, F., Garcia-Minaur, S., *et al.* (2014). New microdeletion and microduplication syndromes: A comprehensive review. *Genet Mol Biol* 37, 210-219.
30. Owen, J.P., Bukshpun, P., Pojman, N., Thieu, T., Chen, Q., Lee, J., D'Angelo, D., Glenn, O.A., Hunter, J.V., Berman, J.I., *et al.* (2017). Brain MR Imaging Findings and Associated Outcomes in Carriers of the Reciprocal Copy Number Variation at 16p11.2. *Radiology*, 162934.

31. Owen, J.P., Chang, Y.S., Pojman, N.J., Bukshpun, P., Wakahiro, M.L., Marco, E.J., Berman, J.I., Spiro, J.E., Chung, W.K., Buckner, R.L., *et al.* (2014). Aberrant white matter microstructure in children with 16p11.2 deletions. *J Neurosci* 34, 6214-6223.
32. Parada, C., Han, D., Grimaldi, A., Sarrion, P., Park, S.S., Pelikan, R., Sanchez-Lara, P.A., and Chai, Y. (2015). Disruption of the ERK/MAPK pathway in neural crest cells as a potential cause of Pierre Robin sequence. *Development* 142, 3734-3745.
33. Qureshi, A.Y., Mueller, S., Snyder, A.Z., Mukherjee, P., Berman, J.I., Roberts, T.P., Nagarajan, S.S., Spiro, J.E., Chung, W.K., Sherr, E.H., *et al.* (2014). Opposing brain differences in 16p11.2 deletion and duplication carriers. *J Neurosci* 34, 11199-11211.
34. Rauen, K.A. (1993). Cardiofaciocutaneous Syndrome. In *GeneReviews*((R)), M.P. Adam, H.H. Ardinger,
35. R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J.H. Bean, H.C. Mefford, K. Stephens, A. Amemiya, and N. Ledbetter, eds. (Seattle (WA)).
36. Richter, M., Murtaza, N., Scharrenberg, R., White, S.H., Johanns, O., Walker, S., Yuen, R.K.C., Schwanke, B., Bedurftig, B., Henis, M., *et al.* (2018). Altered TAOX2 activity causes autism-related neurodevelopmental and cognitive abnormalities through RhoA signaling. *Mol Psychiatry*.
37. Roizen, N.J., and Patterson, D. (2003). Down's syndrome. *Lancet* 361, 1281-1289.
38. Rosenfeld, J.A., Coppinger, J., Bejjani, B.A., Girirajan, S., Eichler, E.E., Shaffer, L.G., and Ballif, B.C. (2010). Speech delays and behavioral problems are the predominant features in individuals with developmental delays and 16p11.2 microdeletions and microduplications. *J Neurodev Disord* 2, 26-38.
39. Scheffer, G.L., Wijngaard, P.L., Flens, M.J., Izquierdo, M.A., Slovak, M.L., Pinedo, H.M., Meijer, C.J., Clevers, H.C., and Scheper, R.J. (1995). The drug resistance-related protein LRP is the human major vault protein. *Nat Med* 1, 578-582.
40. Schilling, T.F. (1997). Genetic analysis of craniofacial development in the vertebrate embryo. *Bioessays* 19, 459-468.
41. Shinawi, M., Liu, P., Kang, S.H., Shen, J., Belmont, J.W., Scott, D.A., Probst, F.J., Craigen, W.J., Graham, B.H., Pursley, A., *et al.* (2010). Recurrent reciprocal 16p11.2 rearrangements associated with global developmental delay, behavioural problems, dysmorphism, epilepsy, and abnormal head size. *J Med Genet* 47, 332-341.
42. Yang, M., Mahrt, E.J., Lewis, F., Foley, G., Portmann, T., Dolmetsch, R.E., Portfors, C.V., and Crawley, J.N. (2015). 16p11.2 Deletion Syndrome Mice Display Sensory and Ultrasonic Vocalization Deficits During Social Interactions. *Autism Res* 8, 507-521.

Figure 1. Differential effects of 16p11.2 copy number on dimensions of the frontal, nasal, maxillary and mandibular regions. (A) On each 3D facial image, 24 landmarks were placed and two angular measurements were calculated. After averaging symmetric distances, 156 distance measures were compared between the CNV and control groups. (B) 18 measures were significant after correction for a FWER < 5%. Regression coefficients for duplication vs control (y-axis) and deletion vs control (x-axis) show that reciprocal CNVs have reciprocal effects on growth of the major craniofacial processes. The category “Other” represents features that span multiple processes. The 14 most informative facial features based on LASSO selection are drawn in panel A and colored by facial region according to the legend. For clarity some nasal distances are excluded. (C) Facial features associated with deletion and duplication were visualized by adjusting the computer-generated model face according to the observed effect sizes (from Panel B and Table S2). (D) The average surface topography was generated from multiple (>5) age-matched subjects with each genotype. Note that subtle differences in BMI are also apparent, however these effects are controlled for in the statistical analysis, and do not influence the feature selection.

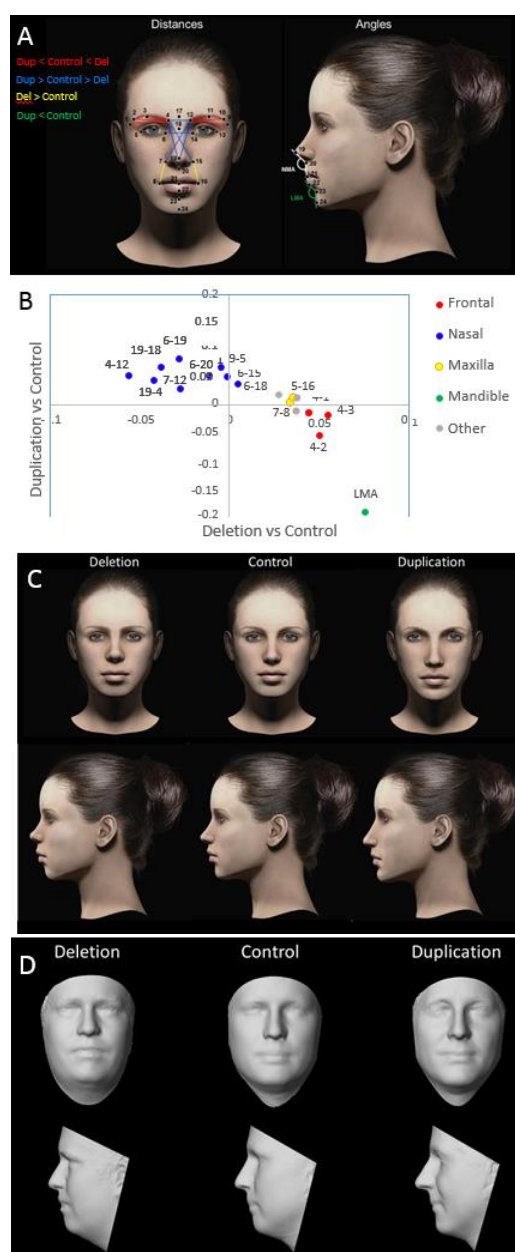


Figure 2. Classification of 16p11.2 genotype based on facial features. Discriminate coefficients based on features that were significant at $FDR < 0.05$ can distinguish the subjects based on genotype, with better discrimination for younger subjects (age ≤ 20 years). The linear model was controlled for age, head circumference, body mass index (BMI), sex, and ancestry principal components. LDA was applied to subjects for which the above demographic information was complete (N= 220 for the full sample and 107 for the younger group).

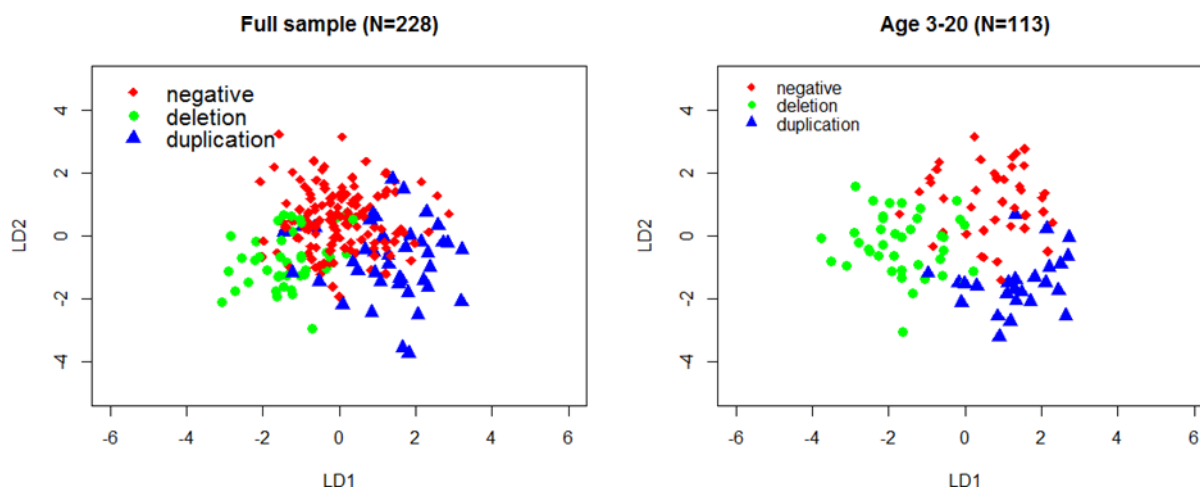


Figure 3. Validation of mirror craniofacial effects in rat and mouse models of 16p11.2 deletion and duplication. All pairwise distances were analyzed for nineteen landmarks on the dorsal skull and three on the mandible as shown here and in Table S4. Distances are colored according to craniofacial region using the same scheme as in figure 1. Distances that span multiple craniofacial processes are denoted as “other”. ML = Mandibular length, MW = Mandibular Width. (A) In the rat models, 52 individual features differed significantly by genotype. Regression coefficients for the duplication deletion show significant mirror effects. (B) Informative features were identified by LASSO selection, and features that correspond to a specific facial process in rat are shown. (C) In the mouse models, twelve craniofacial measures that discriminated mutant and control groups were selected by LASSO. Regression coefficients of these features show mirror effects of deletion and duplication similar to those in human and rat. (D) Features that correspond to specific facial processes in mouse.

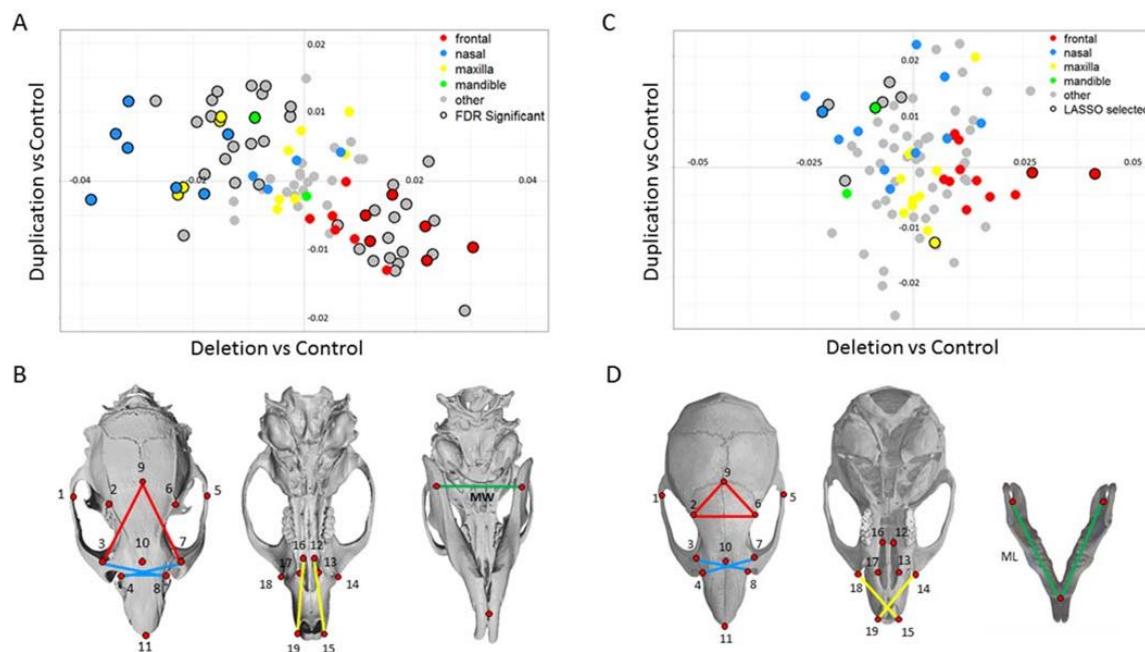
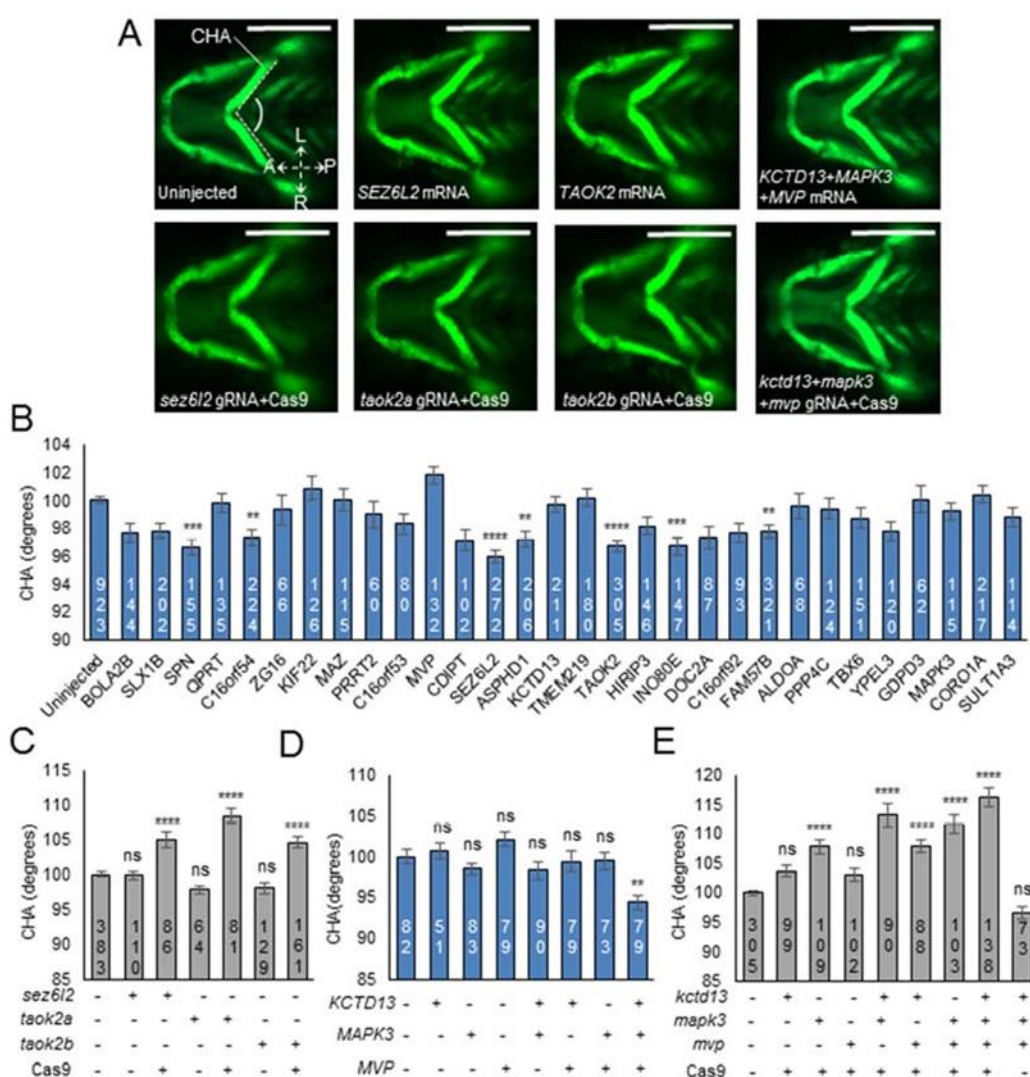


Figure 4. In vivo modeling of the 16p11.2 CNV implicates single gene drivers and epistatic effects influencing cartilage structures in the zebrafish pharyngeal skeleton. (A) Representative ventral images of -1.4col1a1:egfp zebrafish larvae at 3 days post-fertilization (dpf). Orientation arrows indicate anterior (A), posterior (P), left (L) and right (R). Scale bar, 300 μ m. (B) Quantitative assessment of the CHA of larvae injected with single human mRNAs for the 30 genes located in the 16p11.2 BP4-BP5 region.

Images were measured as shown in (A) (angle between dashed lines). Seven transcripts induced a significant reduction in CHA. Dosage: 12.5 pg for *KIF22* and *PPP4C*; 50 pg for all other genes. (C) Quantitative assessment of the CHA of F0 mutant batches injected with single combinations of each of *sez6l2*, *taok2a*, and *taok2b* gRNAs with or without Cas9. Dosage: 50 pg gRNA and 200 pg Cas9 protein.

(D) Quantitative assessment of the CHA of larvae injected with single or equimolar combinations of human *KCTD13*, *MAPK3*, and *MVP* mRNAs. Dosage: 50 pg. (E) Quantitative assessment of the CHA of F0 mutant batches injected with single or equimolar combinations of *kctd13*, *mapk3*, and *mvp* gRNAs with or without Cas9. Dosage: 50 pg gRNA and 200 pg Cas9 protein. Number of larvae measured for each condition are indicated at the base of each bar in the graphs. The data are represented as the mean \pm standard error of the mean (s.e.m.); ns=not significant; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ and **** $P < 0.0001$ vs uninjected controls. Tukey's test was applied following a significant one-way ANOVA.



SUPPLEMENTARY METHODS

Study Sample

Subjects were recruited in conjunction with the Simons VIP study (Consortium). 3D morphometric facial imaging was performed on a subset (N = 359) of subjects with 16p11.2 duplications or deletions from the Simons VIP cohort at 3 sites (UW, Harvard, Baylor) using the 3DMD 3-pod camera system. Data analysis was restricted to subjects of European ancestry older than 3 years of age. Additional subjects were excluded due to facial hair, image quality or landmark visibility (i.e. obscured by clothing, hair or makeup). The final dataset (N = 228) included 45 deletions, 44 duplications and 139 familial non-carrier controls (Table S1).

3DMD morphometric imaging

Images were acquired using the 3dMDtrio system (<http://www.3dmd.com/3dmd-systems/#trio>). Images were landmarked according to Farkas standards (Farkas) blind to genotype. In addition to standard Farkas landmarks, additional landmarks were placed to capture frontal dimensions including landmarks 2 (lateral brow) and 4 (medial brow). A total of 24 landmarks were placed (Fig. 1A). All Landmarking was performed by a single analyst (S.T.) blind to genotype. To confirm a high reliability of our manual landmarking, an independent set of landmarks was generated by a second analyst (T.P) and reproducibility was determined by the intraclass correlation of the two sets of distances measures (127 distances per set), assuming random effects for both subjects and analysts. The median ICC across all distances was 0.89; 87% (110/127) of distances had ICC > 0.7; and 98% (125 out of 127) show no significant difference between two analysts ($p < 0.05$).

Analysis: Quantitative measurement of all pairwise distances between 24 landmarks were calculated using the 3dMDvultus – Analysis software, version 2.5.0.1 (3dMD.com). Symmetric distances were averaged, yielding 156 facial distance measurements. Each distance was normalized to the overall size of the individual's face, by dividing by the geometric mean of the 156 distances for that individual.

Angular measurements of the nose and chin, the nasomental (NMA) and labiomental (LMA) angles respectively, were calculated by triangulating the relevant landmarks. A series of linear mixed-effects models, using package lme4 in R (version 3.4.1), was used to separately test for the effect of deletion and of duplication on each angle or normalized facial distance. Each model controlled for fixed effects of age, head circumference, body mass index (BMI), sex, and ancestry principal components, with a random intercept allowed to account for within-family correlation. Interaction between genotype and sex was included if significant at 5% level. Significant differences according to genotype were determined by a likelihood-ratio test at a family-wise error rate of 5% using Holm's correction (Holm).

Controlling for variation in ancestry

All subjects were of European ancestry, however regional genetic differences could still explain variation in facial traits. We controlled for ancestry using principal components derived from genetic data subjects. Ancestry principal components were obtained on 213 subjects from Illumina SNP genotype data (Illumina HumanOmniExpress v.1 and v.2) available from the Simons VIP study (<https://www.sfari.org/resource/simons-vip/>). Missing data on 38 subjects was imputed by using PCs from a sibling nearest in age or a randomly selected parent. After imputation, 15 subjects from two different families were still missing data, 9 of which were familial controls and 6 were duplications.

Analyses were performed with and without including the ancestry principal components as a sensitivity analysis, and the results were very similar. Significant correlation was observed between one of the first two principal components and 7 of the 160 craniofacial distances.

Generating 3D models by averaging faces of deletion, duplication and control subjects

To visualize the respective facial gestalts of controls, deletion carriers and duplication carriers, a 3D- model of each was generated by averaging of the surface topography of faces from multiple subjects using the 3dMDvultus – Analysis software, version 2.5.0.1 (3dMD.com). To maximize the number of unrelated subjects that were closely matched in age within each group, selection criteria for averaging of faces differed slightly from that of the overall dataset. Only unrelated individuals were included, additional subjects were removed due to image quality (gaps in the surface topography), and the requirement for landmark visibility was relaxed, allowing for frontotemporal landmarks (landmarks 1 and 9, see Fig. 1) to be covered in some cases by hair or headwear. We first restricted our 3D models to young adults (age 14) and older to avoid variability in facial features across development at young ages, and the sample was restricted to males (the largest group). Subjects consisted of 5 Deletion carriers (average age 25.5 years), 5 duplication carriers (36.5 years) and 10 controls (36.6 yrs). Four Landmarks (the Exocanthion, Glabella and Subnasale, Fig 1. Landmarks 5, 13, 17, 20) were placed manually, and the software's average-face function was used to generate the average face. The surface property of the 3D image was then converted from a photographic image into a textured-model (Fig. 1D). Subsequently, to determine if similar facial gestalts are apparent for other demographics, additional 3D models were generated for children and females (Fig. S1). Subjects that were included in average face models are listed in Table S3.

Linear Discriminate Analysis.

Linear discriminate analysis (LDA) was performed on linear model residuals after adjusting for age, head circumference, body mass index (BMI), sex, and ancestry principal components, for both total subjects and subjects aged < 20 years. The 45 distances with FDR q value less than 0.05 were used. We used the function “lda” from the “MASS” package in R

(version 3.4.1). Specificity and sensitivity were calculated based on LDA prediction with default values.

Least absolute shrinkage and selection operator (LASSO) logistic regression

Generalized linear model with lasso was performed for both human subjects and mice. Distances with FDR q value less than 0.05 were used for human subjects, while distances with a statistically significant likelihood ratio test at $p < .05$ were used for mouse skulls. We used 10-fold cross validation for lasso with minimum deviance for human subjects, and lasso with minimum Akaike Information Criteria (AIC) for mouse skulls (Akaike). Specificity and sensitivity were calculated based on lasso selected models.

Packages “glmnet” and “glmnet” from R (version 3.4.1) were used.

Description of rat and mouse cohorts

Craniofacial structure was analyzed for rodent models of 16p11.2 Deletion and Duplication in rat and mouse. Rat deletion and duplication models were generated by CRISPR/Cas9 genome editing of Sprague Dawley line (Charles River Laboratory, Oncins, France). Briefly a deletion of 483,122 bp located at positions chr1:198,100,544-198,583,667 (RatRnor_6.0) and a duplication of the interval from chr1:198,100,545-198,583,458 (RatRnor_6.0), corresponding to the 16p11.2 homologous region of the rat genome, were obtained. For the genotyping, primer pairs were designed for the Del, Dup and an internal control alleles (Primers Del: rHamont99For: GGGCTGGCAGACTTGAA rHavalB284Rev: GTGCCACGATCAGCAG; Primers Dup: rHamont99Rev: CGCTTTGATGCCCACTA; rHavalB84For: AGCTGTGATCCTCTGGTT; Primers for internal control: rAnks3-205For: CCCCAGCCTCCCACTTGTC, rAnks3-205Rev: AGGATGACTGAAATTGGTGGAC) to amplify specific PCR fragments (Del: 290bp, Dup: 500bp, internal control 205bp) using standard conditions (Roche, 60°C for primer hybridation). A cohort of 75 rats was bred for craniofacial analysis, which included 23 Del/+ (9 male and 14 female), 26 Dup/+ (13 male and 13 female) and 26 +/+ siblings (13 male and 13 female). The mouse models of 16p11.2 used in this study consisted of deletion (Del/+) or duplication (Dup/+) of the Sult1a1-Spn genetic interval (Arbogast et al.) Lines were maintained on a pure C57BL/6N C3B genetic background. A mouse cohort was bred including 36 females at 13 weeks of age, including 10 Del/+ and 10 +/+ littermates, and 8 Dup/+ and 8 +/+ littermates.

Rodent skull Imaging, Landmarking, Data Processing

For both rat and mouse cohorts, images of the dorsal skulls were captured using a microCT imaging system (Quantum GX, Perkin Elmer, France). For rats, an image was acquired for the complete skull. For mice, images of the dorsal skull and lower jaw of each animal were acquired separately as part of a previous study (Arbogast et al.). Nineteen landmarks were placed representing the frontal, nasal and maxillary regions, and all pairwise distances

between landmarks were normalized to the geometric mean. In addition the mandibular length (ML) and width (MW) were determined by first determining the centroid of multiple landmarks at the lower incisors and the left and right ramus (Fig. S6), and then determining distances between the three centroids. Symmetric distances of the skull and mandible were averaged.

Differences in facial features between deletion and control lines and differences between duplication and control lines were tested with univariate linear models. We tested all 91 distances on the dorsal skull and two distances on the mandible. Effects that were significant at an FDR of 5% were identified. In addition, as we did previously in human, we identified a set of features that distinguish CNV models from controls by performing least absolute shrinkage and selection operator (LASSO) based on all univariate significant distances by generalized linear model, with AIC as the criteria rule.

mRNA overexpression and CRISPR/Cas9 genome editing in zebrafish embryos

Zebrafish embryos were obtained from natural matings of heterozygous -1.4col1a1:egfp transgenic adults maintained on an AB background (Kague et al., 2012). To model the 16p11.2 BP4-BP5 duplication, we overexpressed individually each gene of the region (see Fig. 4D). We linearized pCS2+ constructs (Golzio et al., 2012) and transcribed human mRNA using the mMessage mMachine SP6 Transcription Kit (Ambion). All RNAs were injected into the yolk of the embryo at the 1- to 4-cell stage at 50, 25, or 12.5 pg doses (1 nl/injection). To investigate specific gene interactions that have been reported previously (Golzio et al.), KCTD13, MAPK3, and MVP mRNAs were tested in combinations of two or three. Two way and three way gene interaction models were fitted to test the synergy effect from double-hit or triple- hit groups. Packages “multcomp” from R (version 3.4.1) was used.

CRISPR/Cas9 genome editing was performed as a model of the reciprocal deletion. We used CHOPCHOP(Labun et al., 2016) to identify guide (g)RNAs targeting coding sequence within *kctd13*, *mapk3*, *mvp*, *sez6l2*, *taok2a*, and *taok2b* (Table S7). gRNAs were transcribed in vitro using the GeneArt precision gRNA synthesis kit (ThermoFisher) according to the manufacturer's instructions; 1 nl of injection cocktail containing 50 pg/nl gRNA and 200 pg/nl Cas9 protein (PNA Bio) was injected into the cell of embryos at the 1-cell stage. To determine targeting efficiency in founder (F0) mutants, we extracted genomic DNA from 2 day post-fertilization (dpf) embryos and PCR amplified the region flanking the gRNA target site. PCR products were denatured, reannealed slowly and separated on a 20% TBE 1.0-mm precast polyacrylamide gel (ThermoFisher), which was then incubated in ethidium bromide and imaged on a ChemiDoc system (Bio-Rad) to visualize hetero- and homoduplexes. To estimate the percentage of mosaicism of F0 mutants (n = 5/condition), PCR products were gel purified (Qiagen), and cloned into a pCR8/GW/TOPO-TA vector (Thermo Fisher). Plasmid was prepped from individual colonies (n = 9–12 colonies/embryo) and Sanger sequenced according to standard procedures.

Automated zebrafish imaging

Larvae were maintained under standard conditions at 28.5°C until 3 dpf and were positioned and imaged live as described (Isrie et al., 2015). Automated imaging was conducted with an AxioScope.A1 microscope and AxioCam 503 monochromatic camera facilitated by Zen Pro software (Zeiss), to capture dorsal images of GFP signal. Larval batches were positioned and imaged live using the Vertebrate Automated Screening Technology (VAST; software version 1.2.5.4; Union Biometrica) BioImager. Larvae from each experimental condition were anesthetized with 0.2 mg/mL Tricaine prior to being loaded into the sample reservoir. Dorsal and lateral image templates of uninjected controls and experimental larvae were created and we acquired images at a >70% minimum similarity for the pattern-recognition algorithms. Larvae were rotated to 180° to acquire ventral images via a 10x objective and fluorescent excitation at 470nm to detect GFP to capture fluorescent images of the pharyngeal skeleton. ImageJ software (NIH) was used to measure the angle of the ceratohyal cartilage. All experimental conditions were normalized to uninjected controls and set to 100 degrees. Statistical comparisons were performed using one-way ANOVA with Tukey's test (GraphPad Prism).

Examining levels of gene expression during murine craniofacial development

We examined whether the significant effects of seven genes (SPN, C16orf54, SEZ6L2, ASPHD1, TAOK2, INO80E and FAM57B) on shape of the mandible could be attributable to the differential regulation of these genes. A published dataset was obtained consisting of Affymetrix gene expression analysis of the major craniofacial processes of the developing mouse embryo (E10.5-E12.5) (Hooper et al.) (accession # FB-STU-201-0001, Facebase.org). Samples included mesenchymal and ectodermal cells of the frontonasal and mandibular processes of embryos at E10.5, E11.5 and E12.5 in triplicate, and samples of the maxillary process at E11.5 and E12.5. The basal expression levels of the seven genes was compared to the levels of other in each structure was determined by averaging the expression values across replicates and embryonic stages. Results show the expression levels of all three genes to be consistent across cell types and structures of the face (Fig S9).

SUPPLEMENTARY MATERIAL REFERENCES

1. Akaike, H. (1974). A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions* 19, 716–723.
2. Arbogast, T., Ouagazzal, A.M., Chevalier, C., Kopanitsa, M., Afinowi, N., Migliavacca, E., Cowling, B.S., Birling, M.C., Champy, M.F., Reymond, A., et al. (2016). Reciprocal Effects on Neurocognitive and Metabolic Phenotypes in Mouse Models of 16p11.2 Deletion and Duplication Syndromes. *PLoS Genet* 12, e1005709.
3. Consortium, S.V. (2012). Simons Variation in Individuals Project (Simons VIP): a genetics-first approach to studying autism spectrum and related neurodevelopmental disorders. *Neuron* 73, 1063-1067.
4. Farkas, L.G. (1994). *Anthropometry of the head and face* (New York: Raven).
5. Golzio, C., Willer, J., Talkowski, M.E., Oh, E.C., Taniguchi, Y., Jacquemont, S., Reymond, A., Sun, M., Sawa, A., Gusella, J.F., et al. (2012). KCTD13 is a major driver of mirrored neuroanatomical phenotypes of the 16p11.2 copy number variant. *Nature* 485, 363-367.
5. Holm, S. (1979). A Simple Sequentially Rejective Multiple Test Procedure. *Scand J Stat* 6, 65-70. Hooper, J.E., Feng, W., Li, H., Leach, S.M., Phang, T., Siska, C., Jones, K.L., Spritz, R.A., Hunter, L.E., and
6. Williams, T. (2017). Systems biology of facial development: contributions of ectoderm and mesenchyme. *Dev Biol* 426, 97-114.
7. Isrie, M., Breuss, M., Tian, G.L., Hansen, A.H., Cristofoli, F., Morandell, J., Kupchinsky, Z.A., Sifrim, A., Rodriguez-Rodriguez, C.M., Dapena, E.P., et al. (2015). Mutations in Either TUBB or MAPRE2 Cause Circumferential Skin Creases Kunze Type. *American Journal of Human Genetics* 97, 790-800.
8. Kague, E., Gallagher, M., Burke, S., Parsons, M., Franz-Odenaal, T., and Fisher, S. (2012). Skeletogenic fate of zebrafish cranial and trunk neural crest. *PLoS One* 7, e47394.
9. Labun, K., Montague, T.G., Gagnon, J.A., Thyme, S.B., and Valen, E. (2016). CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering. *Nucleic Acids Research* 44, W272-W276.

SUPPLEMENTARY FIGURES

Figure S1. 3D models of deletion, control and duplication groups generated by averaging of the surface topography of faces from multiple subjects. Separate models were constructed for adults and children of each sex. The number and mean age of subjects in each group is listed below.

(A) Female children subjects: Deletion $n=7$; mean age= 9.15 years ; Control $n=8$, mean age= 9.92 years; and Duplication $n=5$, mean age= 12.73 year

(B) Female adult subjects: Deletion $n=4$; mean age= 20.13 years ; Control $n=8$, mean age= 23.71 years; and Duplication $n=5$, mean age= 23.25 years

(C) Male children subjects: Deletion $n=7$; mean age= 8.90 years ; Control $n=9$, mean age= 9.27 years; and Duplication $n=9$, mean age= 9.20 years

(D) Male adult subjects: Deletion $n=5$; mean age= 25.53 years ; Control $n=10$, mean age= 36.59 year; and Duplication $n=5$, mean age= 36.48 years

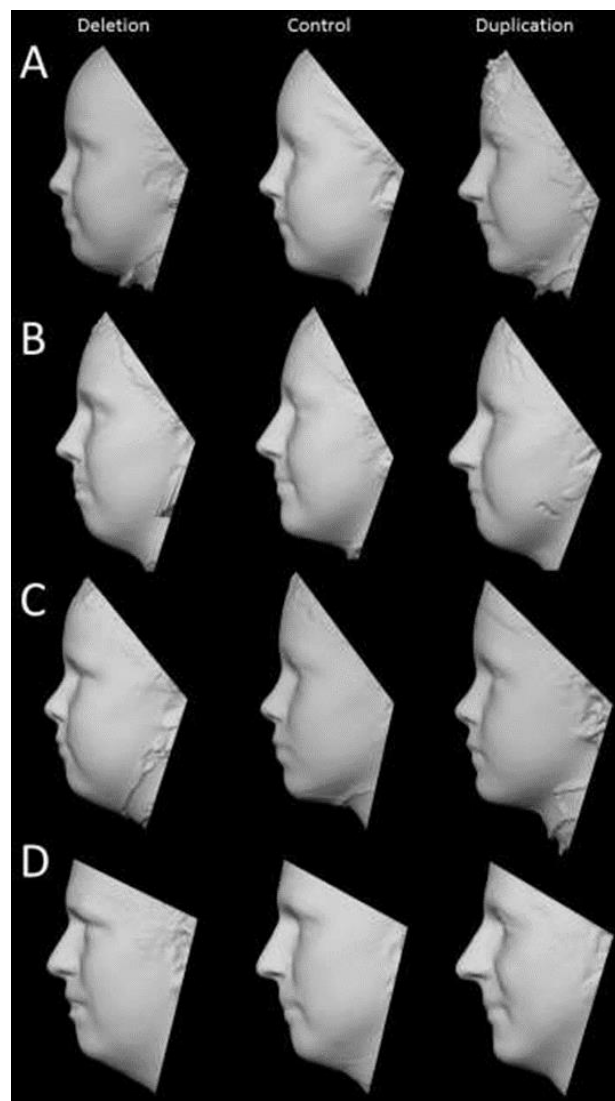


Figure S2. Craniofacial features that distinguish deletion, duplication and control groups. Eighteen craniofacial measures were differed significantly between CNV carriers and controls. Box plots illustrate the mean and standard error (whiskers) across the full dataset.

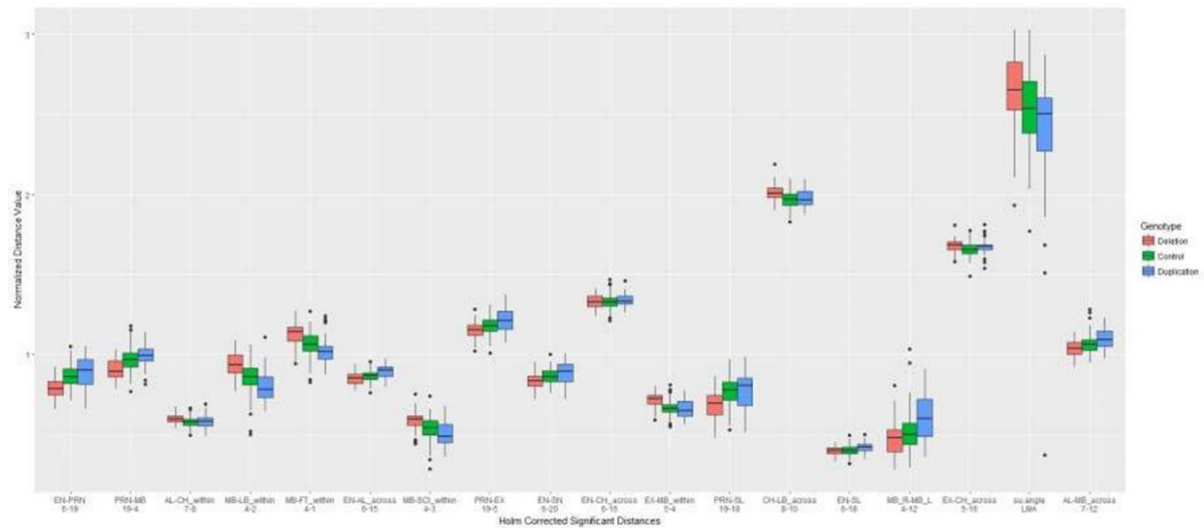


Figure S3. Comparison of the craniofacial effects of CNV in rat and mouse. Significant mirror effects of the deletion and duplication across all facial are observed in rat across all facial features. A significant correlation of effects was also observed between the rat and mouse models of the deletion. The effects of the duplication in mouse did not show a significant correlation with the other rodent models.

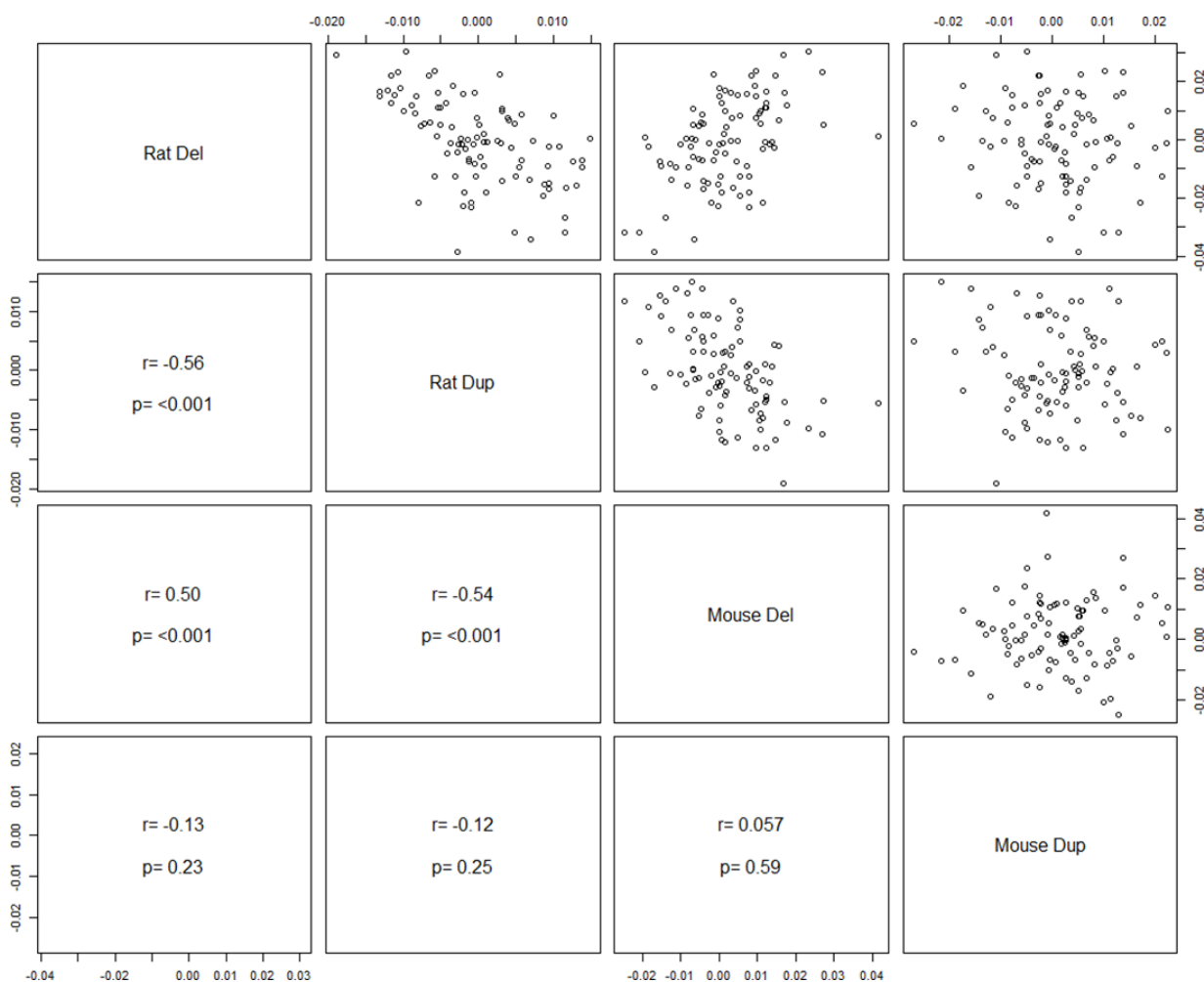


Figure S4. *KCTD13*, *MAPK3*, and *MVP* dose combinatorial suppression result in a decreased frontonasal area whereas similar overexpression results in an increased interocular distance. (A) Representative ventral images of *-1.4col1a1:egfp* zebrafish larvae at 3 days post-fertilization (dpf). Orientation arrows indicate anterior (A), posterior (P), left (L) and right (R). Area between the eyes: dashed white line. Interocular distance: red line. Scale bar, 200 μ m. (B, D) Quantitative assessment of the frontonasal area. (C, E) Quantitative assessment of the interocular distance. The data are represented as the mean \pm s.e.m.; ns=not significant; * P <0.05, ** P <0.01 and **** P <0.0001 vs uninjected controls. Tukey's test was applied following a significant one-way ANOVA.

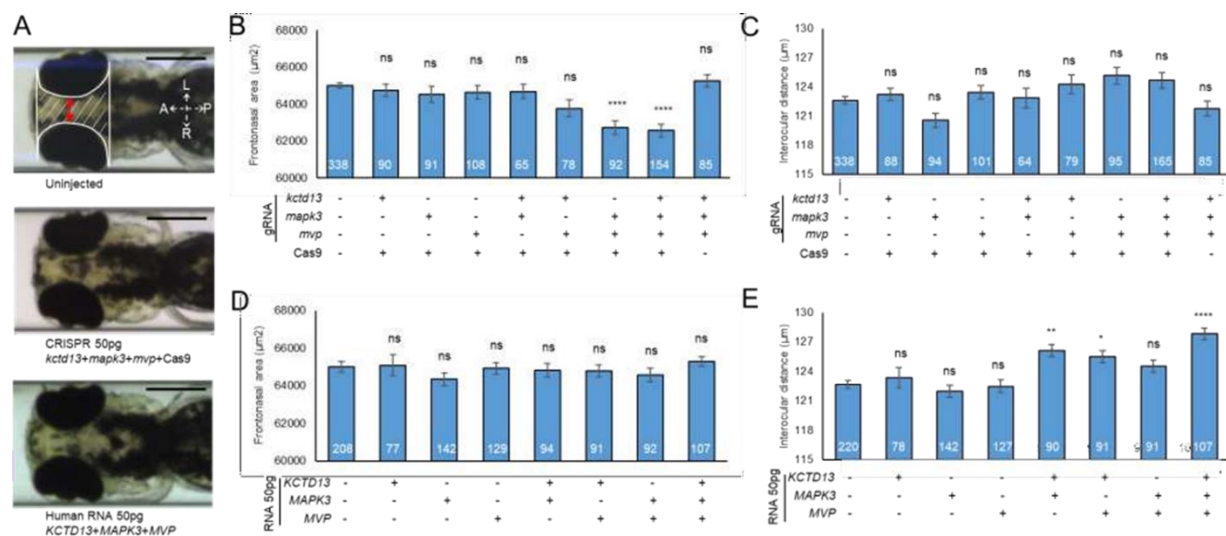


Figure S5. *kctd13*, *mapk3*, and *mvp* dose combinatorial suppression do not induce growth delay. (A) Representative lateral images of -1.4*col1a1*:*egfp* zebrafish larvae at 3 dpf. Measurement of the body length is shown with a white dashed line. Orientation arrows indicate anterior (A), posterior (P), dorsal (D) and ventral (V). Scale bar, 600 μm . (B) Scatterplot of all larvae; x-axis, area between the eyes; y-axis, body length. Each dot corresponds to one larva. F0 mutant larvae injected with equivalent amounts of *kctd13*, *mapk3*, and *mvp* guide do not show a reduction of the body length.

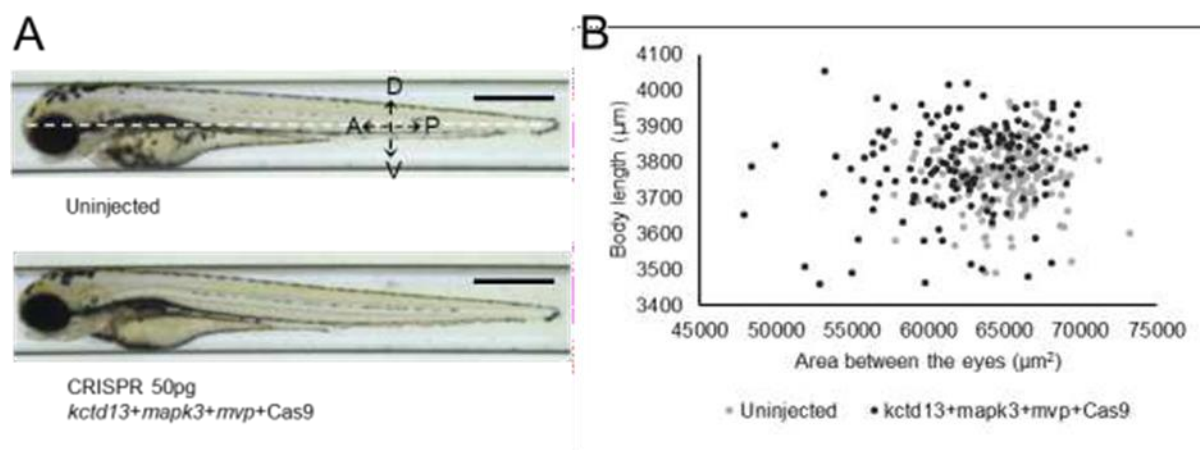


Figure S6. Landmarks that were used to determine the length and width of the mouse mandible. (A) On each jaw bone, two posterior landmarks were placed above and below the incisors (yellow) and four anterior landmarks were placed along the ramus (blue = left, red = right). (B) Landmarks were grouped by color and the centroid of each group was calculated from X,Y,Z coordinates. The distances between the three centroids was then used to determine the mandibular width (MW) and the length of the left (ML-L) and right (ML-R) mandible.

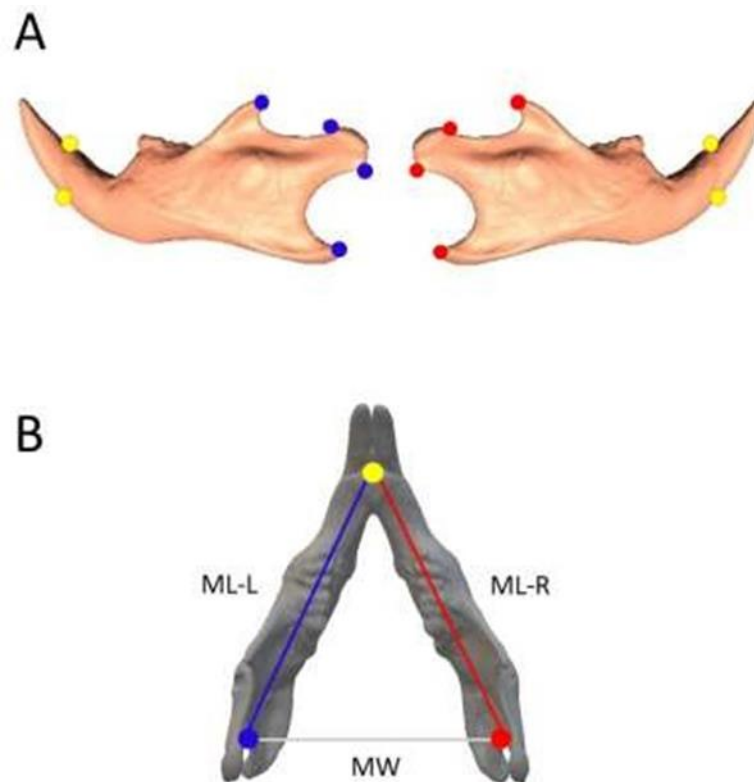


Figure S7. Genome editing of *kctd13* using CRISPR/Cas9 to generate F0 zebrafish mutants. (A) Schematic of the *kctd13* ortholog in zebrafish. The locus is shown with exons (black boxes); untranslated regions (white boxes); introns (dashed lines); guide (g)RNA target site and primers used to generate PCR products shown in panel B (red box and triangles, respectively). (B) Assessment of genome-editing efficiency using polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Genomic DNA was extracted from single embryos at 2 dpf, and PRC amplified. PCR products were denatured, reannealed slowly and migrated on a 20% polyacrylamide gel. All twelve F0 embryos displayed heteroduplexes not present in two uninjected controls. Asterisks (*) indicate embryos assessed for percent mosaicism with PCR8/GW/TOPO-TA cloning and Sanger sequencing of individual clones. (C) Representative sequence alignments showing the most common targeting events for each embryo. To estimate percent mosaicism, one control and five F0 embryos were assessed (n=9-12 clones/embryo); all FO clones harbored deletions (green) and some clones harbored insertions (blue), suggesting ~100% efficiency. gRNA sequence (gray) and protospacer adjacent motif (PAM, red) are shown.

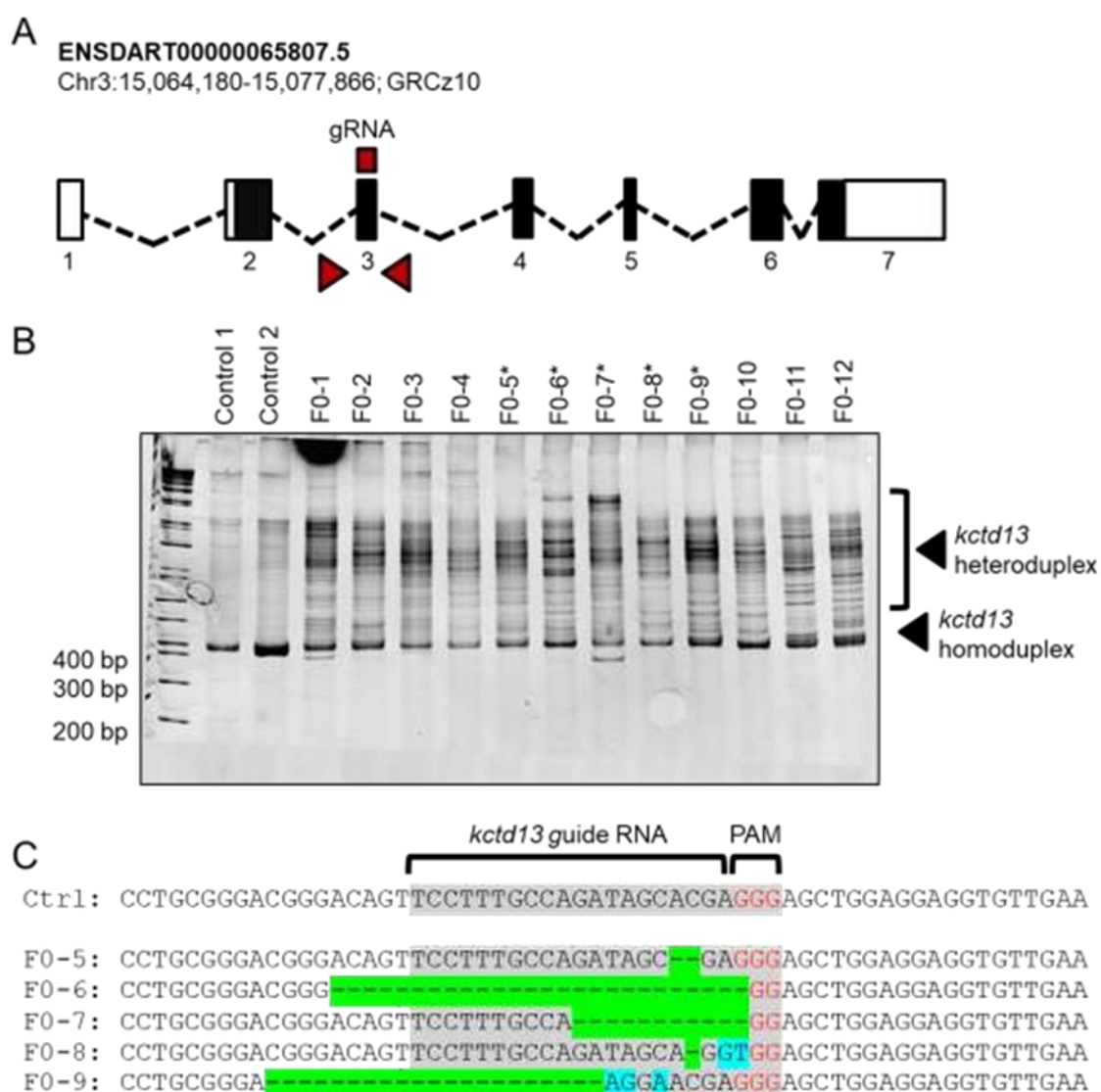


Figure S8. Genome editing of *mapk3* using CRISPR/Cas9 to generate F0 zebrafish mutants. (A, B): see Figure S2. (C) A majority of F0 clones harbored deletions (green) and some clones harbored insertions (blue), suggesting ~97% mosaicism.

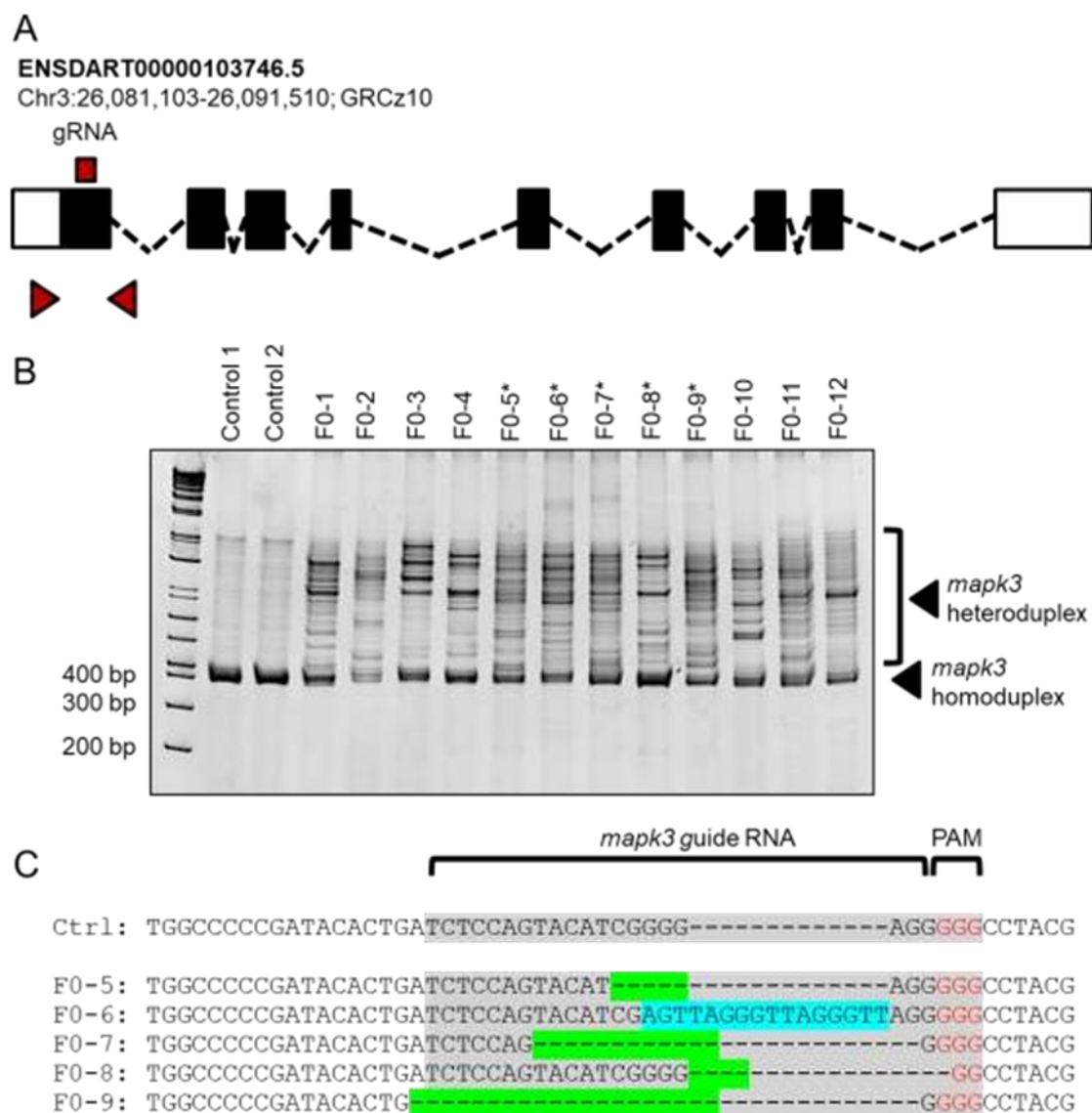


Figure S9. Genome editing of *mvp* using CRISPR/Cas9 to generate F0 zebrafish mutants. (A, B): see Figure S2. (C) A majority of F0 clones harbored deletions (green) and some clones harbored insertions (blue), suggesting ~96% mosaicism.

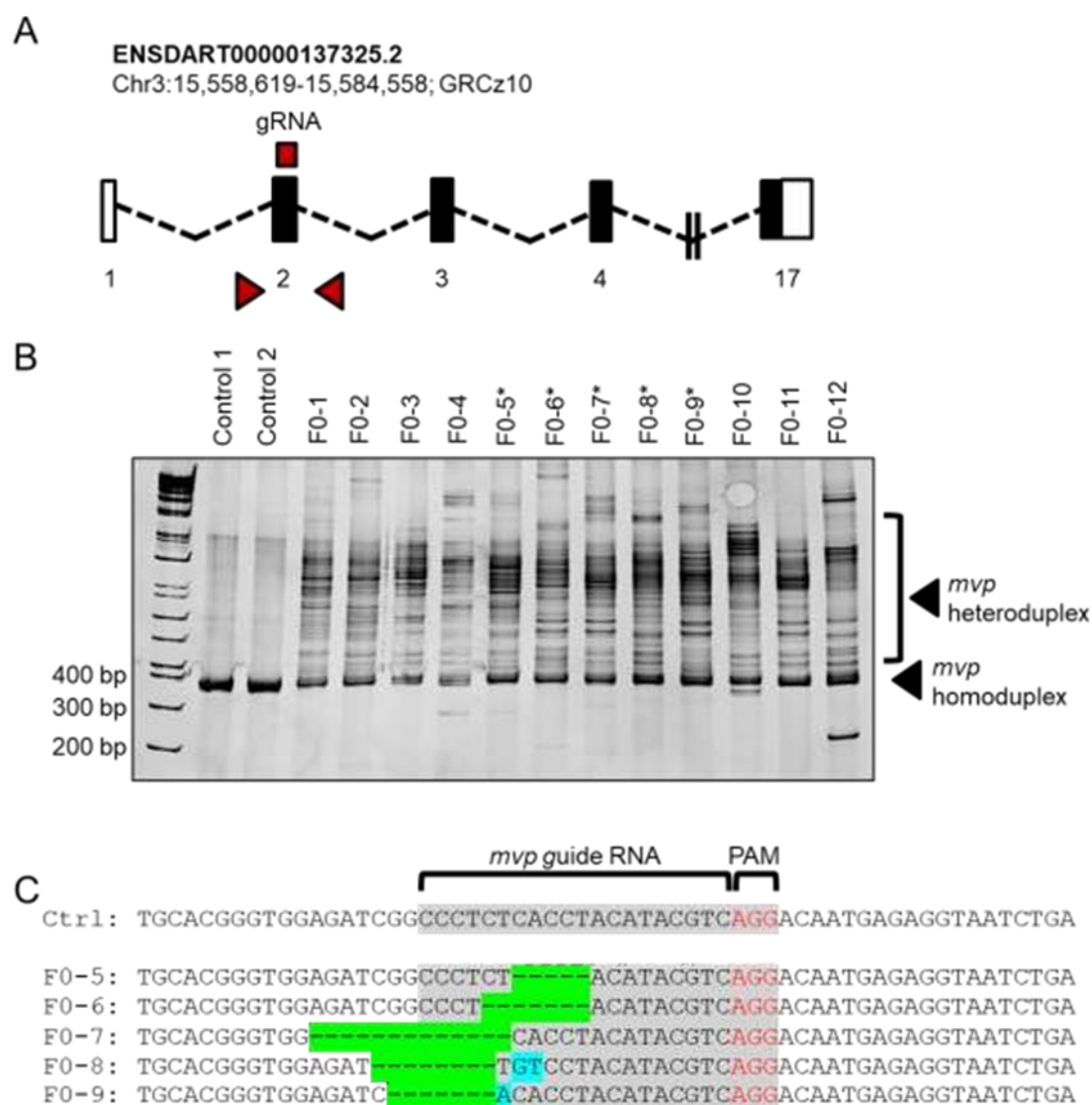


Figure S10. Genome editing of *sez6l2* using CRISPR/Cas9 to generate F0 zebrafish mutants. (A, B): see Figure S2. (C) A majority of F0 clones harbored deletions (green), suggesting ~96% mosaicism.

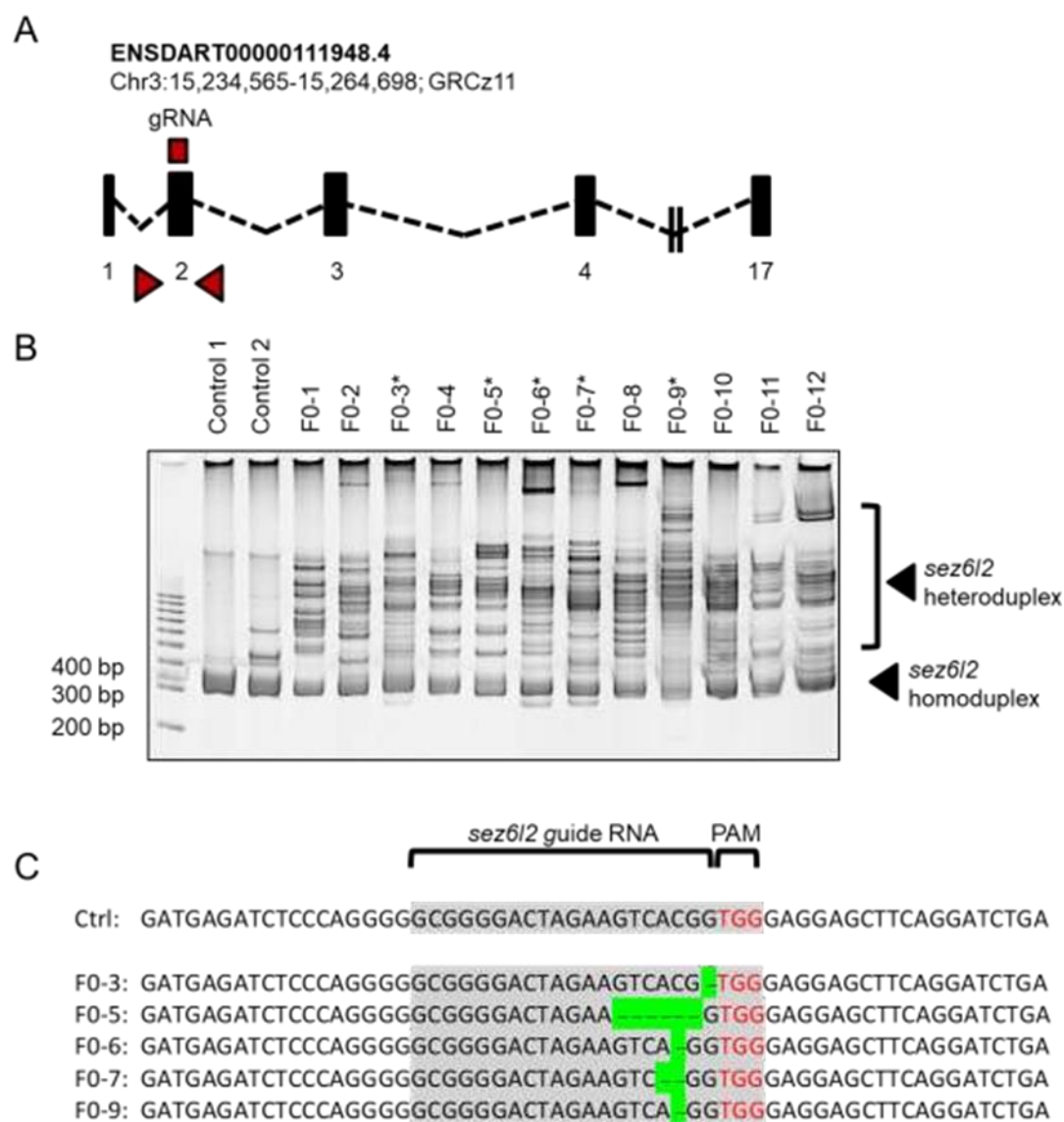


Figure S11. Genome editing of *taok2a* using CRISPR/Cas9 to generate F0 zebrafish mutants. (A, B): see Figure S2. (C) Some F0 clones harbored deletions (green) and some clones harbored insertions (blue), suggesting ~94% mosaicism.

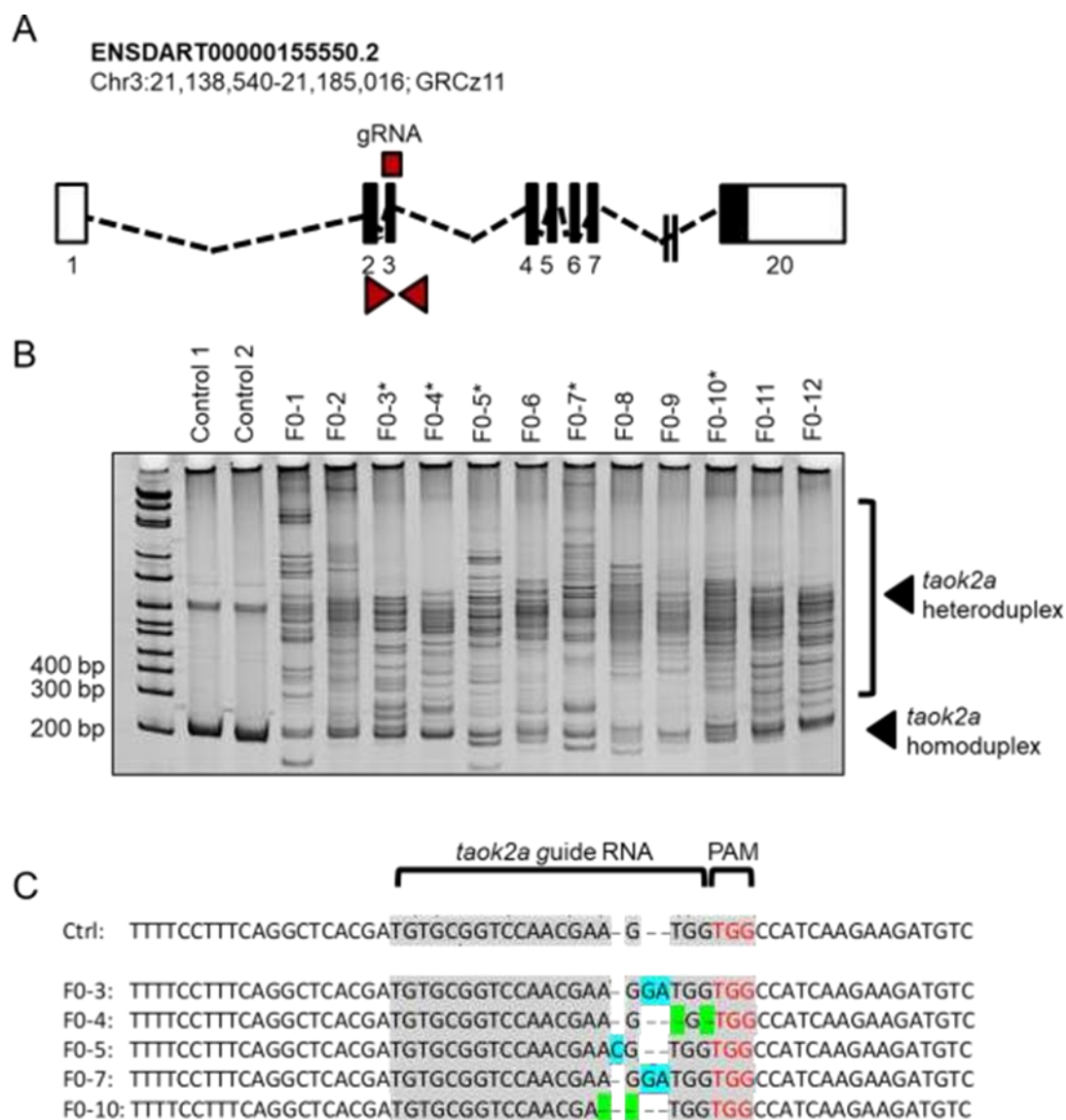
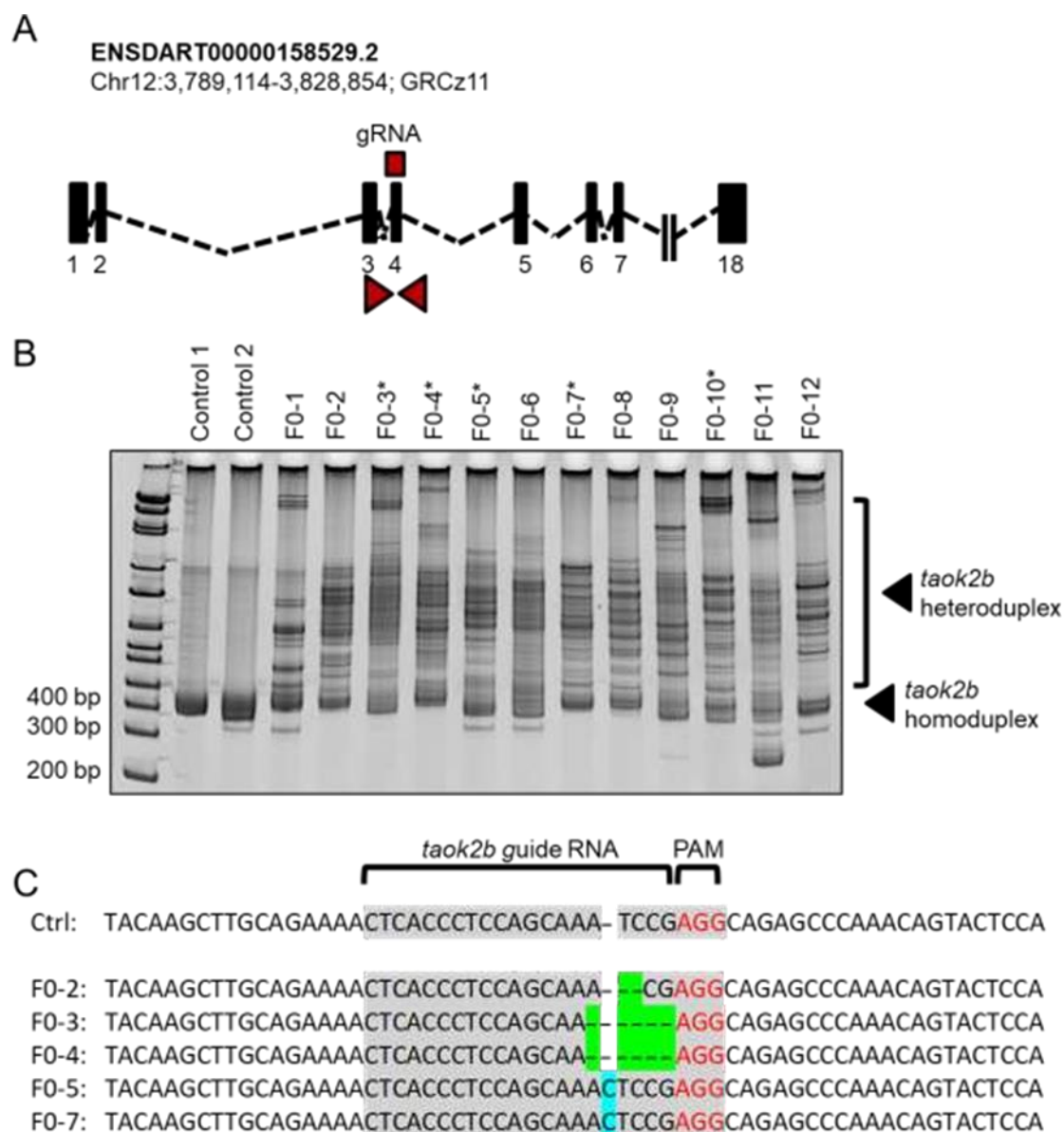


Figure S12. Genome editing of *taok2b* using CRISPR/Cas9 to generate F0 zebrafish mutants. (A, B): see Figure X. (C) Some F0 clones harbored deletions (green) and some clones harbored insertions (blue), suggesting ~89% mosaicism.



Discussion et conclusion

Caractérisation des phénotypes comportementaux chez les modèles *Del/+* et *Dup/+* chez le rat

Lors de l'amplification de la ligne, aucun impact sur la viabilité n'a été observé pour la délétion et la duplication de 16p11.2 dans le croisement hétérozygote des modèles de rats SD.

Nous avons utilisé 8 cohortes de rats pour augmenter le nombre d'animaux afin de pouvoir rassembler une grande partie de la population. Pourtant, la variabilité élevée dans les résultats comportementaux de cette analyse phénotypique rendre difficile nos recherches. Cette circonstance est probablement une conséquence directe du fond génétique hybride SD dans lequel les modèles 16p11.2 ont été générés.

Globalement, les résultats de la caractérisation phénotypique obtenus chez les mâles ont montré une implication du dosage de la région 16p11.2 dans la mémoire de reconnaissance, un phénotype déjà observé chez la souris. Pour l'analyse de ce trait cognitif, nous avons dû adapter le protocole du test utilisé chez la souris à l'intelligence du rat. Nous avons donc rendu ce test plus complexe, en utilisant 3 objets différents à reconnaître.

De manière attendue les modèles de rat montrent des variations du comportement social. Les rats *Del/+* présentent moins d'interaction sociale, un trait communément associé aux patients avec TSA. Ce génotype est aussi lié à la présence du comportement de blocage, un événement qui survient lorsqu'un partenaire manœuvre pour bloquer à l'autre partenaire et il est considéré comme un moyen d'exprimer la domination. En plus, ce type de comportement a été également observé chez les porteurs pseudo-disomiques de *Del / Dup*, suggérant un effet de construction génétique non lié au dosage génétique de la région. Ce phénomène pourrait résulter du nouvel allèle de délétion qui pourrait modifier l'expression des gènes voisins. Alors que les rats *Dup/+* développent un comportement plus agressif. Mais, étonnamment, aucun phénotype n'a été rapporté chez la femelle à différence des phénotypes trouvés chez le modèle de souris dans ce travail.

Ces observations viennent renforcer la théorie d'Empathie-Systématisation, selon laquelle les différences psychologiques sexuelles reflètent un renforcement de la systématisation chez le mâle et un renforcement de l'empathie chez la femelle. Dans le cadre de TSA, cette théorie a une extension, appelée « cerveau mâle extrême » selon laquelle les individus sont caractérisés par des déficiences dans l'empathie avec une systématisation intacte ou augmentée (Baron-Cohen *et al.*, 2005; Baron-Cohen *et al.*, 2011). De manière complémentaire, une étude précédente a montré un rapport hommes : femmes de 1,3 : 1 pour la délétion 16p11.2 chez des personnes autistes et de 1,6 : 1 pour la délétion 16p11.2 chez les patients présentant une déficience intellectuelle / un retard de développement (Polyak *et al.*, 2015).

Une autre explication possible est que ce biais est uniquement dû au fond génétique spécifique de notre modèle de rat. Afin d'étudier cette possibilité plus en profondeur, de futures analyses comportementales ont été prévues dans des modèles de rats avec un autre fond génétique pour des recherches ultérieures.

Analyse phénotypique des malformations cranio-faciales induites par les CNVs de la région 16p11.2 chez le rat

Les CNVs de la région 16p11.2 BP4-BP5 ont des effets inverses sur le développement cranio-facial chez l'homme.

Afin de vérifier si ces traits physiques sont bien conservés entre des espèces différentes, nous avons participé dans une étude de caractérisation cranio-facial inter espèce en poursuivant des analyses quantitatives du squelette crânien à partir de nos modèles de rat pour la délétion et de la duplication 16p11.2. Chez le rat, la délétion a été associée à des régions frontales du crâne plus grandes et à des régions nasales et mandibulaires plus petites, tandis que les effets opposés ont été associés à la duplication. Ces résultats suggèrent que le dosage de la région 16p11.2 a une conséquence quantitative dans le développement. L'effet miroir puissant absente sur le modèle de souris, correspondent aux tendances observées chez les patients. Avec ce travail, nous présentons le rat comme un modèle pour étudier les mécanismes génétiques par lesquels les CNVs 16p11.2 influencent les caractères complexes liés au développement craniofacial.

Conclusion de l'étude

Dans cette étude, nous proposons les premiers modèles de rat porteurs de la délétion ou duplication de l'intervalle génétique 16p11.2 BP4-BP5 *Sult1a1-Spn* associé à la pathologie humaine. Nos animaux ont été générés sur un fond non consanguin, ce qui nous a permis d'étudier les réarrangements de la région avec une forte variabilité, aussi présente dans les syndromes humains. Les CNVs 16p11.2 ont été associées à quelques déficits cognitifs et fondamentalement aux troubles du comportement social. Ce dernier phénotype avait été trouvé ultérieurement chez la souris mais que sur un fond génétique mixte. A partir de cette étude on a confirmé que ce trait est lié aux réarrangements de la région 16p11.2 BP4-BP5 qui est conservé entre espèces et qu'il ne s'agit pas d'une conséquence du fond génétique. L'analyse des animaux *Del/Dup* indique que la structure d'ADN de la délétion *Sult1a1-Spn* pourrait potentiellement affecter à l'expression génétique aboutissant à l'apparition du comportement social de blocage. Nos modèles représentent de nouveaux outils génétiques permettant la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans les désordres d'interaction sociale associée ainsi que le développement craniofacial. De futures études seront dédiées à la recherche des gènes et les voies dérégulés par une analyse comparative du transcriptome ainsi que les protéines dérégulés par une analyse protéomique comparative de différentes régions du cerveau et du foie.

Partie 4

Caractérisation du modèle de souris
chez la femelle 16p11.2 *Del/+*
BP4-BP5 *Sult1a1-Spn*

Introduction

Comme nous avons mentionné précédemment, les variations du nombre de copies 16p11.2 BP4-BP5 jouent un rôle essentiel dans l'architecture génétique des troubles neurodéveloppementaux (Malhotra *et al.*, 2012), tels que l'autisme et la déficience intellectuelle. Ces désordres neuropsychiatriques ont un biais sexuel en faveur du caractère masculin. Un certain nombre de théories suggèrent que les différences de fonction neuronale entre les sexes contribuent au risque de désordres du développement neurologique (Baron-Cohen *et al.*, 2005; Lai *et al.*, 2015). Les études génétiques humaines indiquent que le biais masculin chez l'autisme trouve son fondement dans la vulnérabilité différentielle aux lésions génétiques, en proposant que le cerveau féminin peut être résilient en réponse à des altérations génétiques fortement associées au diagnostic chez les hommes (Robinson *et al.*, 2013; Jaquemont *et al.*, 2014). Cependant, l'évaluation systématique de ce biais est compliquée par l'hétérogénéité génétique et phénotypique significative de ces syndromes. Dans le cas de la délétion 16p11.2, le risque de diagnostics psychiatriques est plus élevé chez les hommes porteurs de ce réarrangement que chez les femmes (Hanson *et al.*, 2015; Duyzend *et al.*, 2015).

Etant donné que l'architecture génétique de cette région chromosomique est hautement conservée, la perte d'une copie de la région humaine 16p11.2 peut être modélisée chez la souris via une hémi-délétion du chromosome 7qF32. Pourtant, des analyses antérieures sur des modèles de souris n'ont pas permis d'examiner si l'impact de la délétion 16p11.2 sur les phénotypes trouvés sur ces modèles est différent entre les mâles et les femelles (Horev *et al.*, 2011; Portmann *et al.*, 2014; Arbogast *et al.*, 2016).

Dans le travail de recherche actuel, nous avons voulu vérifier si la délétion de la région 16p11.2 BP4-BP5, associé à la pathologie humaine, entraîne les mêmes conséquences comportementales pour les 2 sexes sur le modèle préclinique *Sult1a1-Spn* créé par notre laboratoire (Arbogast *et al.*, 2016).

Nous avons donc développé un protocole de caractérisation comportementale et d'apprentissage pour la femelle, basé sur les altérations phénotypiques trouvées sur le modèle de délétion 16p11.2 *Sult1a1-Spn* mâle, afin de vérifier la robustesse des phénotypes du modèle de la délétion 16p11.2 dans les 2 sexes.

Matériels et méthodes

A partir de ce projet de recherche, nous avons évalué le phénotype comportemental et l'interaction sociale du modèle murin dont génome porte la délétion d'une copie de l'intervalle *Sult1a1-Spn* correspondant à la région de synténie 16p11.2 BP4-BP5, chez la femelle.

Ligne de souris, génotypage et autorisation éthique

Le modèle de souris Del(7*Sult1a1-Spn*)6Yah (Del/+), décrit précédemment (Arbogast *et al.* 2016), a été maintenu sur un fond génétique pur C57BL/6N (B6N) consanguin, ce qui nous permet d'étudier le réarrangement de la région 16p11.2 dans un contexte génétique défini. L'allèle Del6Yah a été identifié à travers de la technique de PCR en utilisant les amorces Fwd1 (5'-CCTGTGTGTTCTCAGCCTCAGGATG- 3') et Rev2 (5'-GGACACACAGGAG AGCTATCCAGGTC- 3') par la détection de une bande spécifique de 500 pb alors que l'allèle wt a été identifié à partir des amorces Fwd1 et Rev1 (5' –GGACACACAG GAGAGCTATCCAGGTC- 3') avec la présence du produit de PCR de 330 pb (Figure1). Toutes les souris ont été génotypées en utilisant le programme suivant: 95 °C /5 min; 35x (95 °C/30 s, 65 °C/30 s, 70 °C/1 min) ; 70 °C/5 min.

Les procédures expérimentales concernant l'utilisation d'animaux à des fins scientifiques ont été approuvées par le Ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation avec l'accord du comité d'éthique local Com'Eth (n°017) sous le numéro d'accréditation APAFIS#9290-2017031617456047 v4 et dont la responsabilité de la mise en œuvre générale du projet et de sa conformité à l'autorisation est assurée par Monsieur Yann HERAULT (accréditation 67-369).

L'élevage et la conception de l'analyse

Nous avons uniquement sélectionné les femelles pour cette étude. Les animaux utilisés ont été regroupés de plusieurs portées, en ensembles de 2 à 5 souris après le sevrage, dans des cages de 39 x 20 x 16 cm (Green Line, Techniplast, Italy) où elles ont eu l'accès libre à l'eau et à la nourriture (D04 chow diet, Safe, Augy, France). Les chambres où les sujets ont été gardés ont été maintenues à une température constante de 21±2 °C, avec un cycle de lumière contrôlé comme 12 h de lumière et 12 h de sombre (les lumières ont été allumés à 7h).

Les souris furent transférées de l'animalerie d'élevage à la zone de comportement avec 11 semaines d'âge. Au cours de cette semaine, les souris se sont habituées à ce nouvel environnement et elles ont été manipulées quotidiennement par l'expérimentateur.

Afin de valider la robustesse des phénotypes associés à la délétion 16p11.2, on a développé un protocole d'analyse de caractérisation comportemental basé sur les capacités cognitives affectées chez le mâle. Les souris ont subi les tests de comportement dans l'ordre suivant: le test de champ ouvert, la tâche de reconnaissance du nouvel objet et l'activité circadienne à 12 semaines, le test de paradigme social de trois chambres et le test du comportement répétitif à 13 semaines (Figure 2).

Les jours où les tests ont été effectués, les animaux ont été placés dans l'antichambre de la salle expérimentale 30 min avant le début de l'expérience.

Tous les tests ont été menés par le chercheur à l'aveugle par rapport à l'information du génotype des souris, comme il est recommandé par les directives ARRIVE (Karp *et al.*, 2015; Kilkenny *et al.*, 2010).

Le test de champ ouvert a été utilisé pour évaluer le comportement exploratoire du rongeur dans un nouvel environnement. Le test a été réalisé dans une enceinte ronde de PVC blanc avec des murs et fond opaques de 30 cm de haut et 50 cm de diamètre (Figure 3 A). L'arène a été éclairée pour avoir 60 Lux au centre et elle est placée sous une caméra permettant un suivi de l'animal. Le test se compose d'une session unique de 30 min, pendant laquelle on peut mesurer la distance parcourue, le temps passé sur chaque zone de l'arène (le centre, la zone intermédiaire, la périphérie et les murs) ainsi qu'évaluer l'habituation de l'animal au cours du temps, en fractionnant les données en intervalles de 10 minutes.

La tâche de reconnaissance du nouvel objet est basée sur la préférence innée des rongeurs pour la nouveauté et permet d'analyser la mémoire de reconnaissance entre un objet observé précédemment et un nouvel objet. Cette évaluation se déroule dans la même espace que le champ ouvert. Le premier jour, les souris ont été habituées à l'arène pendant 30 minutes à 60 Lux. Le deuxième jour, les animaux ont été soumis au premier essai d'acquisition de 10 minutes au cours duquel ils ont été individuellement mis en présence de deux objets A (marbre ou dés) placés à 28 cm entre eux. Le temps d'exploration de l'objet A (lorsque le museau de l'animal était dirigé vers l'objet à une distance ≤ 1 cm) a été enregistré. Après une période de rétention de 3 heures à l'intérieur des cages d'hébergement, un deuxième essai de discrimination d'objet a été effectué. L'objet familier A et un nouvel objet (objet B) ont été placés à la même distance et position et le temps d'exploration de ces deux objets a été enregistré (Figure 3 A).

Un index de reconnaissance et un index de discrimination ont été définis comme $((t_B / (t_A + t_B)) \times 100)$ et $((t_B - t_A) / (t_A + t_B)) \times 100$ respectivement. Toutes les souris n'ayant pas exploré les objets présentés plus de 3 secondes au cours de l'essai d'acquisition ou de rétention ont été exclues de l'analyse.

Le test de l'activité circadienne nous a permis d'évaluer l'activité endogène au cours du cycle de lumière et sombre. L'essai a eu lieu dans des cages individuelles (11 x 21 x 18 cm) équipées de capteurs infrarouges connectés à une interface électronique (Imetronic, France) qui fournissent des mesures automatisées de la position et de l'activité locomotrice de la souris testée (Figure 3 B). Les animaux ont été placés dans les cages à 19 h le premier jour et le test a fini le troisième jour à 7h (60 h). Le cycle de lumière a été contrôlé comme 12 h de lumière et 12 h de sombre.

Le test de comportement répétitif nous a permis d'évaluer la présence de comportement stéréotypé sur notre modèle animal. Les souris femelles sont placées individuellement dans des cages d'hébergement propres faiblement éclairées à 60 lux sans le couvercle (Figure 3 C). L'occurrence des comportements du redressement, du saut, de l'escalade, du creusage, et du toilettage est notée pendant 10 min.

Le test de reconnaissance sociale évalue les fonctions cognitives sous la forme de la sociabilité générale et de l'intérêt pour la nouveauté sociale sur des modèles de CNVs chez la souris. Les rongeurs montrent généralement une préférence pour l'interaction avec un autre rongeur (sociabilité) et enquêtent davantage sur un nouvel intrus que sur un intrus familier (nouveauté sociale). Sur la base de ces inclinaisons, le test à trois chambres permet l'identification des animaux présentant un déficit de sociabilité et / ou de nouveauté sociale. Le test a eu lieu dans une boîte à trois chambres successives et identiques (20 x 40 x 22 cm) avec des ouvertures (5 x 8 cm) entre les chambres (Stoelting, Dublin). Le protocole, précédemment décrit (Moy *et al.*, 2004) a été développé en trois sessions de 10 min. La première phase est focalisée à l'habituation. Une souris est permise à explorer librement l'enceinte. Au cours de la deuxième phase, le sujet est placé dans la chambre centrale et un des deux cages, localisées dans les autres chambres est occupée par un intrus de manière aléatoire et équilibrée. Les portes qui bloquent les chambres sont ouvertes et la souris peut explorer toutes les chambres librement. Le temps d'exploration de la cage vide et de la cage occupée est enregistré. Dans la dernière phase, le sujet évalué rencontre le premier intrus ainsi qu'un deuxième nouvel intrus. Le temps d'exploration des deux cages est enregistré (Figure 3 D). L'index de préférence ou nouveauté social a été défini comme : $((t_2 / (t_1 + t_2)) \times 100)$.

Les souris étrangères ont été des femelles B6N, habituées à la cage et à l'arène du test pendant 15-30 min les jours précédents.

Analyses statistiques

Les résultats de notre travail ont été analysés statistiquement en utilisant le logiciel Sigma Plot (Sigma). Toutes les valeurs aberrantes ont été identifiées à l'aide du test de Grubbs en utilisant le calculateur GraphPad et exclues de notre analyse. Les données obtenues à partir de la caractérisation phénotypique de notre modèle ont été analysées par le test de Student pour autant que les données aient suivi une distribution normale. Dans le cas contraire, le test non-paramétrique U de Mann-Whitney a été utilisé. De plus, l'« One Sample T test » a été utilisé pour comparer les valeurs de l'index de reconnaissance ou préférence au niveau de chance de 50%. Les données ont été représentées comme la moyenne \pm l'écart-type et le seuil significatif a été $p < 0,05$.

Résultats

La modélisation de la délétion de la région chromosomique 16p11.2 humaine à partir de la souris, aide à la compréhension de la relation entre la perte d'une copie de cet intervalle génétique et les symptômes associés. Cette mutation est considérée un facteur de risque important pour le développement des troubles neuropsychiatriques. De plus, la délétion 16p11.2 a un impact supérieur chez les garçons que chez les filles (Polyak *et al.*, 2015). Jusqu'à présent, plusieurs modèles de souris ont été créés et caractérisés uniquement chez des souris mâles. Ces modèles montrent des altérations au niveau de l'activité, la mémoire de reconnaissance et l'apparition du comportement répétitif.

Dans ce projet de recherche, on a décidé d'évaluer le modèle de souris pour la délétion 16p11.2 *Sult1a1-Spn* chez la femelle afin de vérifier la robustesse des phénotypes associés dans les deux sexes.

En premier lieu, les résultats obtenus dans le test du champ ouvert ont montré une augmentation de la distance totale parcourue pour les souris *Del/+* par rapport aux souris témoins ($T = 678,000$; $p = 0,008$, test U de Mann-Whitney). L'apparition de ce phénotype a été observée précédemment chez les mâles. Ceci signale une association de la délétion 16p11.2 à l'hyperactivité exploratrice qui affecte aux deux sexes. Quand nous avons analysé l'habituation des souris au nouvel environnement en divisant la session de 30 minutes en périodes de 10 minutes, nous avons observé une diminution de l'activité au cours du test. Cette observation nous indique que les souris *Del/+* sont capables de s'habituer à l'arène comme les individus wt bien qu'ils maintiennent l'hyperactivité au cours du test ($T_{0-10} : t_{(46)} = -2,753$; $p = 0,008$; $T_{10-20} : t_{(46)} = -2,142$; $p = 0,038$; $T_{20-30} : t_{(46)} = -1,968$; $p = 0,055$, test de Student). Finalement, on a évalué des possibles comportements d'anxiété en mesurant le temps que les souris ont passé sur chaque région de l'arène. Aucune préférence pour quelque zone du test n'a été observée (Figure 4).

Ensuite on a évalué la mémoire de reconnaissance du nouvel objet de notre modèle (Figure 5), un phénotype qui a été observé chez les mâles 16p11.2 *Del/+*.

Pendant la phase d'acquisition on a mesuré le temps d'exploration des deux objets identiques, ce qui pourrait nous informer des possibles troubles d'exploration. Aucune différence entre le temps d'explorations des deux objets n'a été observée. Après 3 heures, on a mesuré le temps d'exploration de l'objet familier et du nouvel objet pendant la phase de rétention. Étonnement, les individus témoins n'ont montré aucune préférence par le nouvel objet. Ces résultats inattendus nous empêchent d'analyser le phénotype de mémoire de reconnaissance d'objet du modèle 16p11.2 *Del/+* chez la femelle. Pour cette raison, un nouveau protocole adapté doit être développé dans une recherche supplémentaire.

Subséquentement, nous avons décidé de vérifier si les femelles partageaient le phénotype d'hyperactivité circadienne présenté par les mâles 16p11.2 *Del/+*. A cette fin, nous avons mesuré l'activité de nos souris pendant 60 heures en cycles de lumière et de sombre (Figure 6). Cette analyse a été représentée comme l'activité locomotrice et l'activité verticale. Nous avons mesuré l'activité locomotrice à partir du nombre de va et viens présentés par les souris dans la cage du test et l'activité verticale à partir du nombre de redressement.

Contrairement aux mâles, les femelles *Del/+* n'ont pas présenté d'anomalies significatives de l'activité locomotrice. En ce qui concerne le nombre de redressements au cours du test, les souris *Del/+* ont montré une grande variabilité. Cependant, notre modèle a présenté une augmentation significative du nombre de redressements total ($T = 341,000$; $p = 0,043$, test U de Mann-Whitney). Ce phénotype a été retrouvé également dans le sexe masculin précédemment.

Après, on a évalué la présence des comportements répétitifs en mesurant la fréquence des répétitions des comportements courants chez la souris (Figure 7). Les femelles porteuses de la délétion de la région 16p11.2 ont montré une augmentation significative des escalades pendant une session de 10 minutes d'observation (Escalade : $T = 579,500$; $p = 0,002$, test U de Mann-Whitney).

Afin d'évaluer des possibles déficits de sociabilité et / ou nouveauté social, nos souris ont été soumises au test de sociabilité à trois chambres (Figure 8). La variation de structure chromosomique à cause de la délétion 16p11.2 n'affecté pas à ce phénotype chez la souris femelle.

Tout d'abord, on a permis aux individus testés d'explorer librement l'arène à trois chambres et on a mesuré le temps d'explorations de deux cages à grilles vides. L'absence de préférence pour l'une des cages indique que notre modèle ne présente pas d'altérations d'exploration. Ensuite, la phase de sociabilité a eu lieu. Au cours de cette session, une autre femelle a été introduite dans l'une des cages et le temps de l'exploration des deux cages a été mesuré. Les souris *Del/+* montrent une préférence pour la cage occupée pour l'étranger 1 significativement supérieur au niveau de chance de 50% (One sample t test: wt ($t_{(20)} = 5,4512$; $p < 0,0001$), *Del/+* ($t_{(18)} = 3,8469$; $p = 0,0012$)). Finalement, dans la phase de nouveauté sociale, une autre femelle a été introduite dans l'autre cage. Les souris déficientes pour la région 16p11.2 passent plus de temps à explorer l'étranger 2. L'index de préférence est significativement supérieure au niveau de chance de 50% (One sample t test: wt ($t_{(19)} = 3,3419$; $p = 0,034$), *Del/+* ($t_{(18)} = 6,9711$; $p < 0,0001$)). Ce comportement nous indique que notre modèle présente une sociabilité et une préférence sociale normales.

Discussion et conclusion

Caractérisation phénotypique du modèle murin 16p11.2 *Del*/+ BP4-BP5 chez la femelle

Pour obtenir une résolution phénotypique complète des syndromes associés à la délétion 16p11.2 BP4-BP5, nous avons caractérisé le modèle murin *Del*/+ *Sult1a1-Spn* chez la femelle. Bien que les CNVs les plus fréquemment identifiés chez l'homme soient la délétion et la duplication, nous avons décidé de caractériser uniquement le modèle pour la perte d'une copie de 16p11.2, car ce modèle présente des symptômes plus graves chez la souris.

L'évaluation des phénotypes comportementaux chez la femelle *Del*/+ est basée sur une série de paramètres murins affectés chez le mâle *Del*/+. Ces symptômes sont associés aux nombreux troubles neuropsychiatriques chez les patients porteurs de la délétion.

Les femelles 16p11.2 BP4-BP5 *Del*/+ présentent une hyperactivité d'exploration dans le test du champ ouvert. De plus, on a détecté la présence des stéréotypies d'escalade. Ces deux altérations ont été trouvées de manière similaire dans le sexe masculin pour ce modèle. Ces observations mettent en évidence l'implication de la perte d'une copie de la région 16p11.2 dans le développement de ces affections cognitives pour les deux sexes.

Contrairement aux mâles, les femelles *Del*/+ ne présentent pas d'anomalies de l'activité locomotrice dans le test d'activité circadienne. Cette différence pourrait être due au fait que les femelles témoins ont montré une augmentation de l'activité circadienne par rapport aux souris mâles (Arbogast *et al.*, 2016), ce qui pourrait empêcher l'observation de telles différences chez les femelles. En ce qui concerne l'activité verticale, les souris *Del*/+ montrent une augmentation du nombre de redressements. Cependant, si on prend en compte les résultats du test des comportements répétitifs, où on n'a pas détecté de stéréotypies de redressement, cette augmentation de l'activité verticale pourrait être expliquée par la présence des stéréotypies d'escalade. Un comportement détecté par les capteurs infrarouges du test comme des redressements.

Un autre paramètre analysé a été la mémoire de reconnaissance d'objets. Cette capacité cognitive est insuffisante chez les mâles 16p11.2 *Del*/+. Quand nous testons les souris femelles, une déficience de reconnaissance est également observée chez les porteurs de la délétion. Pourtant, de façon inattendue, les individus témoins ne montrent aucune différence entre le temps d'exploration de l'objet familier et du nouvel objet. Cette faible discrimination pourrait être due à l'activité d'exploration de l'arène surélevée montrée par ces individus lors de la phase d'acquisition. Ceci pourrait affecter la capacité de reconnaissance des animaux pendant la phase de rétention. Ces résultats nous empêchent d'utiliser ce protocole pour l'analyse de ce paramètre chez notre modèle et soulignent le besoin de développer des nouveaux protocoles qui permettront d'augmenter l'intérêt des souris aux objets.

Dans le but d'améliorer la capacité discriminante des individus témoins dans ce test, nous proposons pour des recherches ultérieures de modifier la phase d'habituation à l'arène du test. Dans ce cas, cette phase serait constituée de deux sessions de 15 minutes tenues sur deux jours différents. Une autre proposition est de répéter la caractérisation comportementale en utilisant des souris d'origine génétique hybride B6NC3B. Ce fond génétique présente une activité spontanée plus faible en comparaison à la souche B6N (Mandillo *et al.*, 2008), ce qui pourrait nous permettre d'évaluer l'effet de cette atténuation sur l'habilité de discrimination des objets.

Dans le protocole de caractérisation des femelles, nous incluons finalement le test de sociabilité à trois chambres. Ce paramètre n'a pas été affecté chez les mâles *Del/+ Sult1a1-Spn*, mais nous avons décidé de l'inclure, car il s'agit d'un trait caractéristique des patients autistes. Nos observations dans le test à trois chambres indiquent que la perte d'une copie de la région chromosomique 16p11.2 ne provoque pas de déficit du comportement social chez le modèle de souris pour les deux sexes.

Conclusion de l'étude

La comparaison des effets observés chez les femelles avec les mâles nous permet de vérifier que 2 des phénotypes les plus robustes sont présents dans les deux sexes (Table 1). Pourtant, l'étude de la susceptibilité différentielle liée au sexe, impactant la sévérité des symptômes de cette maladie, ainsi que l'interaction complexe entre des facteurs génétiques et les hormones sexuelles, se présente comme une perspective future à analyser. Notre recherche suggère l'importance des études ciblées pour établir les effets des hormones neuroactives, tel que l'estradiol dans les modèles génétiques d'autisme, déjà soulignés dans d'autres études et par le biais plus important des troubles autistiques chez les garçons (Olivetti *et al.*, 2014).

Légendes des figures

Figure 1. Modèle murin pour la délétion de la région chromosomique 16p11.2 chez la femelle. Validation moléculaire de la modélisation de la perte d'une copie de l'intervalle génétique *Sult1a1-Spn* créée à partir de la recombinaison Cre-LoxP *in vivo* (Arbogast *et al.*, 2016). Les produits spécifiques de la PCR pour les allèles wild-type (330 pb) et de la délétion (500 pb).

Figure 2. Schéma détaillé du protocole de l'étude comportementale de la souris femelle porteuse de la délétion 16p11.2. La consécution des test est dérivée de l'analyse du modèle *Del* (7*Sult1a1-Spn*) 6Yah (Arbogast *et al.*, 2016).

Figure 3. Dépistage du phénotype cognitif et comportemental. (A) De gauche à droite, on montre le schéma de l'arène où le test de champ ouvert ainsi que la première phase d'habituation du test de reconnaissance du nouvel objet ont eu lieu. L'image centrale présente la phase d'acquisition de 10 min au cours de laquelle les souris sont présentées à deux objets identiques (par exemple deux billes opaques verts). La dernière image montre la phase de rétention où un des deux objets est change par un nouvel objet (par exemple un dé). (B) Test d'activité circadienne. (C) Test de comportement répétitif. Afin d'analyser la présence des comportements stéréotypés, les souris sont mises individuellement dans une cage d'hébergement. (D) Test de reconnaissance sociale. Pendant la première phase, la souris explore l'arène à trois chambres du test comme forme d'adaptation au nouvel environnement. Dans la deuxième étape, une autre souris étrangère est placée dans une des deux cages à grille vide. Au cours de la dernière phase, une autre souris étrangère occupe la deuxième cage vide. Les salles où les tests ont été menés étaient illuminées faiblement à 60 Lux.

Figure 4. Le comportement exploratoire des femelles 16p11.2 *Del/+* dans le test de champ ouvert. Les souris (wt (n=25) et *Del/+* (n=23)) ont été mises à l'intérieur d'une enceinte pendant une session de 30 min et elles ont été permises à explorer le nouvel environnement librement. En première lieu, nous avons analysé l'activité d'exploration à partir de la distance totale parcourue (m) au cours du test. Les souris *Del/+* montrent une augmentation significative de l'activité d'exploration ($T = 678,000$; $p = 0,008$, test U de Mann-Whitney). Ensuite, nous avons évalué l'adaptation des souris à l'environnement en divisant la durée totale du test en périodes de temps. Le graphique central montre la moyenne de la distance parcourue chaque 10 min pour les deux génotypes. Les animaux porteurs de la délétion de la région 16p11.2 maintiennent une activité d'exploration supérieure à exception de la dernière période ($T_{0-10} : t_{(46)} = -2,753$; $p = 0,008$; $T_{10-20} : t_{(46)} = -2,142$; $p = 0,038$; $T_{20-30} : t_{(46)} = -1,968$; $p = 0,055$, test de Student). Ces résultats se traduisent en une habituation à l'environnement. Finalement, nous avons analysé le temps (s) passé par chaque souris dans les zones établies de l'arène (la zone central, la zone intermédiaire, la périphérie et les murs). Aucune préférence pour les différentes zones n'a été observée (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Figure 5. Tâche de mémoire de reconnaissance de nouvel objet. Les souris femelles des deux génotypes (wt (n=17) et *Del/+* (n=21)) ont été évaluées pour la mémoire de reconnaissance

des objets avec un délai de 3 heures. Le premier graphique montre le temps (s) d'exploration de chaque objet pendant la phase d'acquisition, placés à la droite (D) et à la gauche (G) de l'arène. Aucun génotype ne montre de préférences d'objet. Le graphique central montre l'index de reconnaissance du nouvel objet présenté aux souris pendant la phase de rétention. La ligne pointillée matérialise un niveau de chance de 50%. Étonnement, les souris témoin montrent une performance déficiente inattendue pendant ce test (One sample t test: wt ($t_{(16)} = 0,2535$; $p = 0,8031$), *Del/+* ($t_{(20)} = 1,1291$; $p = 0,2722$)). Finalement, l'index de discrimination entre les deux objets des souris wt et *Del/+* est montré sur le graphique à la droite. Aucune différence significative n'a été observée entre les deux génotypes.

Figure 6. Le test d'activité circadienne. (A) Haute: Le graphique supérieur montre l'activité locomotrice. Ce paramètre a été mesuré à partir du nombre de va et viens dans la cage au cours des intervalles du cycle de 12 h de lumière et 12 h de sombre (les lumières s'allument à 7h). Bas: De gauche à droite, nous montrons l'activité locomotrice total de chaque génotype pendant 60 heures, ainsi que l'activité locomotrice pendant les périodes de lumière et de sombre, par séparé. (B) L'activité verticale de notre modèle a été évaluée à partir du nombre de redressements. Les données sont présentées avec le même format que pour l'activité locomotrice. L'analyse du modèle 16p11.2 *Del/+* (wt (n=21) et *Del/+* (n=15)) montre que les souris mutantes ne développent pas d'altérations de l'activité locomotrice. Par contre, nous observons des différences significatives par rapport au nombre de redressements total entre le génotype wt et *Del/+* ($T = 341,000$; $p = 0,043$, test U de Mann-Whitney). (* $p < 0,05$).

Figure 7. Le test d'évaluation de la présence de comportement répétitif chez le modèle 16p11.2 *Del/+* femelle (wt (n=24) et *Del/+* (n=21)). Des occurrences des redressements, des sautes, des escalades, des creusages et des toilettes pendant 10 min dans une cage d'hébergement. Les individus *Del/+* présentent une augmentation significative du comportement répétitif d'escalade par rapport aux souris wt (Escalade : $T = 579,500$; $p = 0,002$, test U de Mann-Whitney). (** $p < 0,01$).

Figure 8. Le test de reconnaissance social à trois chambres pour le modèle 16p11.2 *Del/+* (wt (n=21) et *Del/+* (n=19)). Pendant la phase d'habituation, nous avons mesuré le temps d'exploration de deux cages (D et G) vides placées dans les chambres extérieures de l'arène. Aucune préférence d'exploration des cages n'a été observée. Le graphique de la phase de sociabilité montre l'index de préférence de notre modèle par l'étrangère 1 par rapport à une cage vide. Les souris *Del/+* montrent un index de préférence significativement supérieur au niveau de chance de 50%. (One sample t test: wt ($t_{(20)} = 5,4512$; $p < 0,0001$), *Del/+* ($t_{(18)} = 3,8469$; $p = 0,0012$)). Le graphique de la phase de nouveauté sociale montre l'index de préférence par l'étrangère 2 (nouveau) par rapport à l'étrangère 1 (familier). Les souris mutantes présentent un index de préférence significativement supérieur au niveau de chance de 50%. (One sample t test: wt ($t_{(19)} = 3,3419$; $p = 0,034$), *Del/+* ($t_{(18)} = 6,9711$; $p < 0,0001$)). La ligne pointillée matérialise un niveau de chance de 50%. (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Figures

Figure 1. Validation moléculaire de la modélisation de la délétion de la région chromosomique 16p11.2 chez la souris femelle

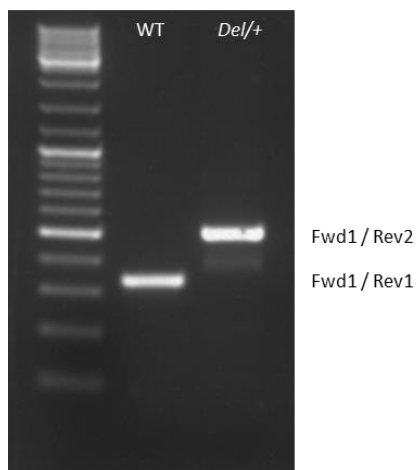


Figure 2. Schéma détaillé du protocole comportemental du modèle 16p11.2 *Del/+*

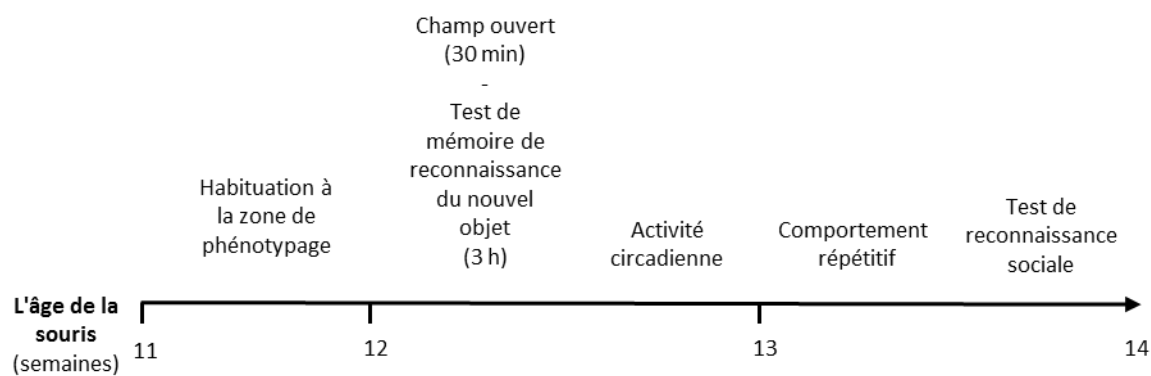


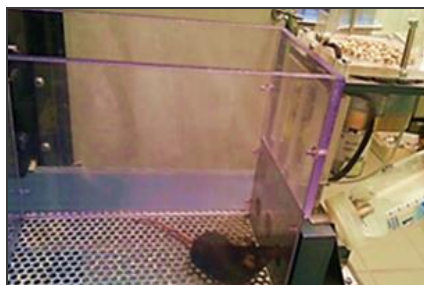
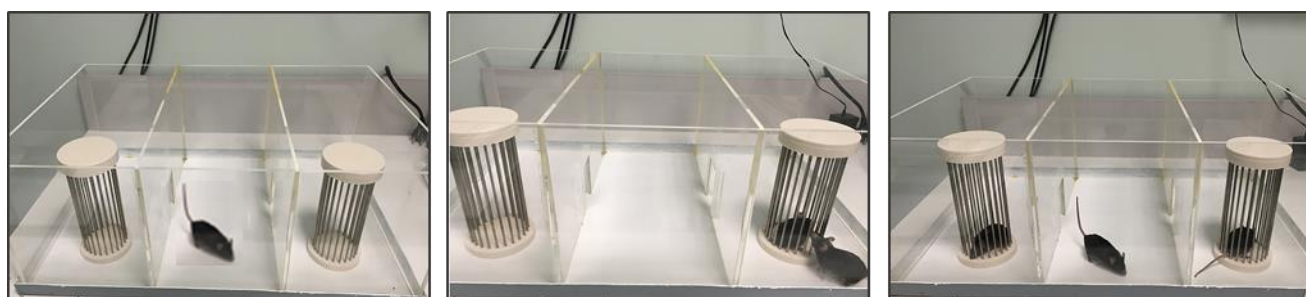
Figure 3. Dépistage du phénotype cognitif et comportemental**A****B****C****D**

Figure 4. Le comportement exploratoire des femelles 16p11.2 *Del/+* dans le test de champ ouvert

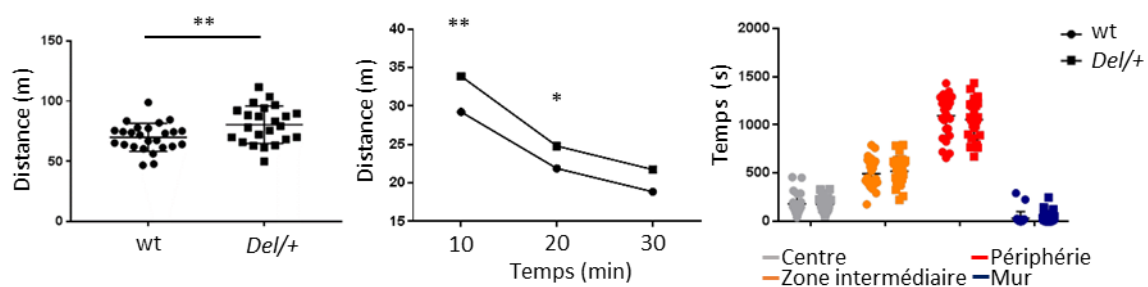


Figure 5. Tâche de mémoire de reconnaissance de nouvel objet

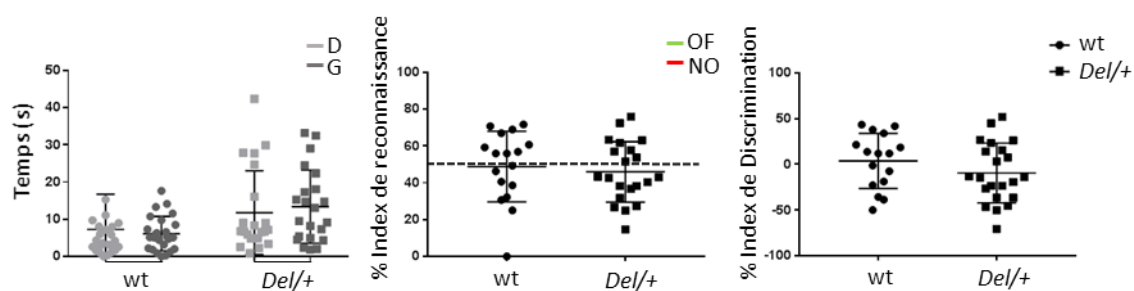


Figure 6. Le test d'activité circadienne

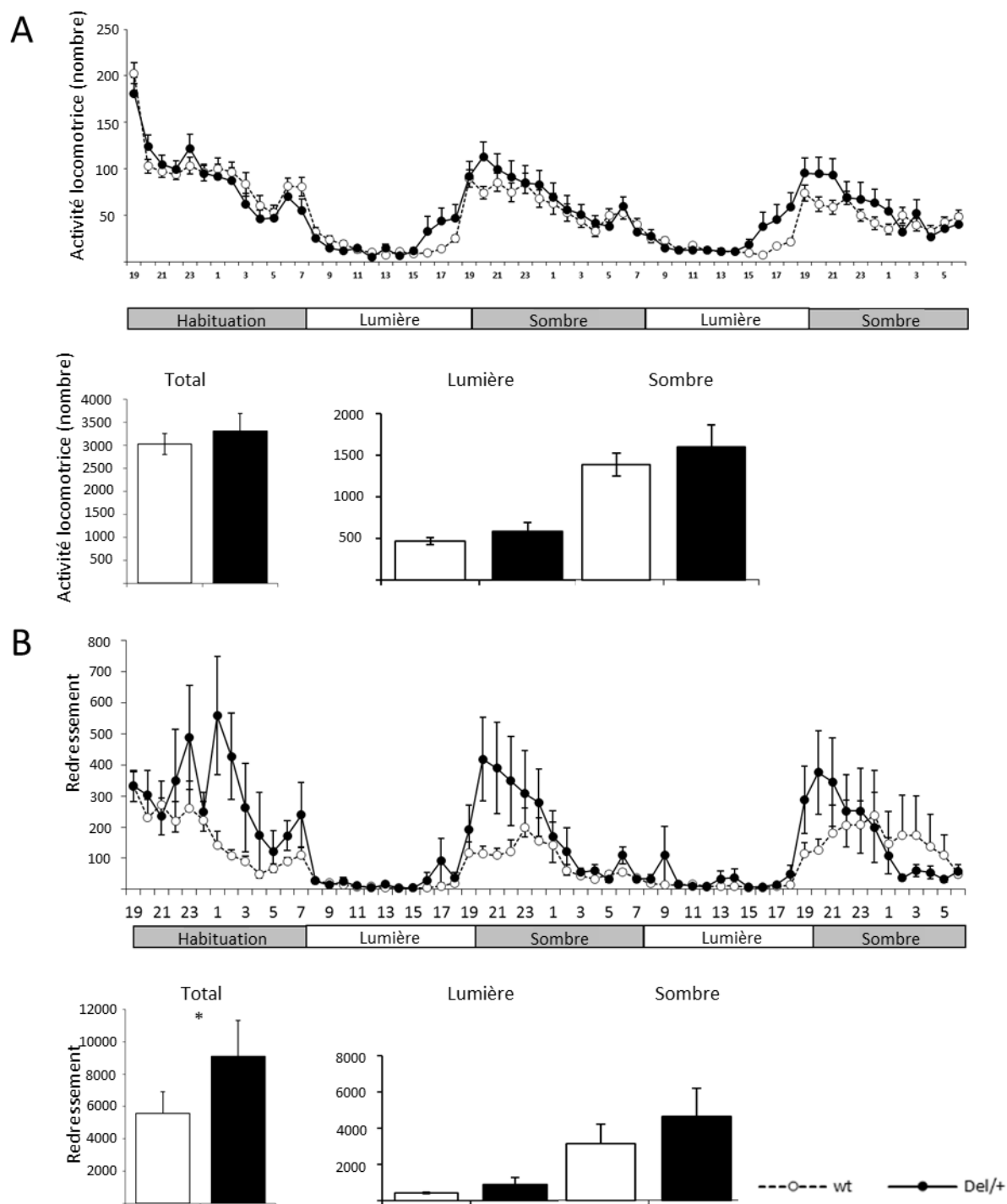


Figure 7. Le test d'évaluation de la présence de comportement répétitif

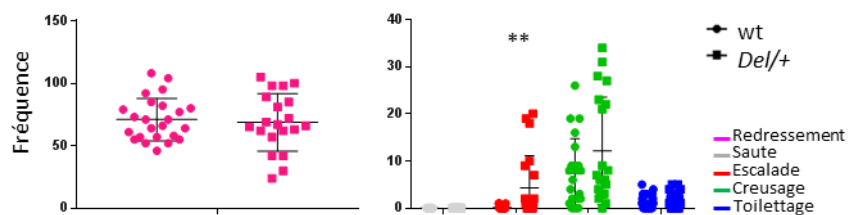
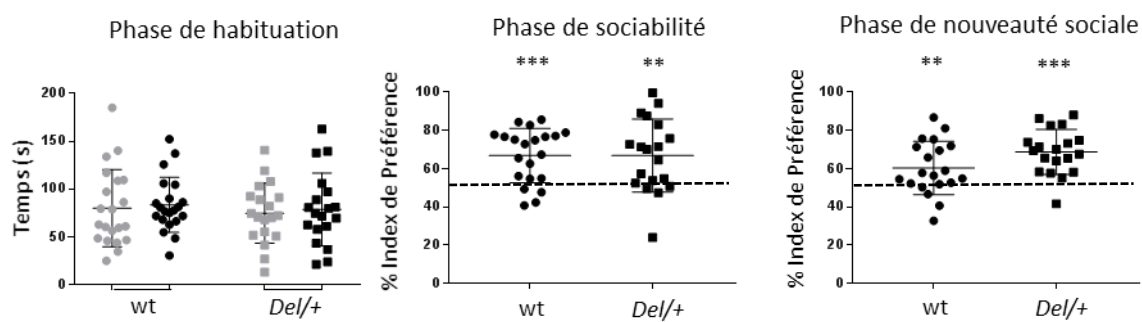


Figure 8. Le test de reconnaissance social à trois chambres



Tableaux

Ligne génétique	Fond génétique	Accouplement	Génotype	Individus	Ratio
16p11.2 <i>Del/+</i>	B6N	<i>Del/+</i> x wt	wt	412	67,2%
			<i>Del/+</i>	201	32,8%

Tableau 1. Taux de transmission de l'allèle porteur de la délétion 16p11.2 *Sult1a1-Spn* pour le sexe féminin à partir des accouplements *Del/+* x wt sur le fond génétique B6N. Comme on a retrouvé dans le cas du sexe masculin, l'allèle *Del/+* montre une réduction de la transmission de 17,2% par rapport à la transmission mendélienne.

Génotype	<i>Del/+</i>	
Sexe	♂	♀
Activité circadienne		
Activité d'exploration		
Comportement répétitif		
Mémoire de reconnaissance		
Sociabilité		

	Significativement supérieur chez les animaux mutants que chez les animaux wt		Pas de différence entre les animaux mutants et les animaux wt
	Significativement inférieur chez les animaux mutants que chez les animaux wt		Résultats non définitifs

Tableau 2. Carte comportementale des phénotypes observés chez les modèles de souris mâle et femelle portant la délétion de l'intervalle génétique *Slx1b-Sept1* sur le fond génétique B6N.

Test	Paramètre	wt	Del/+
Champ ouvert	Distance totale (m)	70 ± 2	80 ± 3**
	Distance t 0-10 (m)	29 ± 1	33 ± 1**
	Distance t 10-20 (m)	22 ± 1	25 ± 1*
	Distance t 20-30 (m)	19 ± 1	22 ± 1
	Temps Centre (s)	182 ± 22	175 ± 15
	Temps Zone intermédiaire (s)	493 ± 30	520 ± 32
	Temps Périphérie(s)	1095 ± 44	1054 ± 43
	Temps Mur (s)	31 ± 14	51 ± 12
Reconnaissance d'objets 3 heures délai	S1 exploration d'objet A (s)	10 ± 1	25 ± 4**
	S2 exploration d'objet A (s)	5 ± 1	9 ± 2
	S2 exploration d'objet B (s)	6 ± 2	7 ± 1
	Index de reconnaissance (%)	49 ± 5	46 ± 4
Activité circadienne	Activité locomotrice totale (count)	3027 ± 225	3312 ± 378
	Activité locomotrice lumière (count)	473 ± 42	586 ± 103
	Activité locomotrice sombre (count)	1380 ± 134	1592 ± 261
	Activité verticale totale (count)	5576 ± 1330	9097 ± 2229*
	Activité verticale lumière (count)	401 ± 47	861 ± 405
	Activité verticale sombre (count)	3064 ± 1062	4548 ± 1528
Comportement répétitif	Redressement	71 ± 3,4	68,9 ± 5,1
	Saute	0	0
	Escalade	0,1 ± 0,1	4,3 ± 1,5**
	Creusage	7,4 ± 1,5	12,2 ± 2,5
	Toilettage	1,4 ± 0,3	2 ± 0,4

Tableau 3. Analyses comportemental du modèle murin pour la délétion de la région 16p11.2 *Sult1a1-Spn* chez la femelle sur un fond génétique pur. L'évaluation de l'activité d'exploration d'un nouveau contexte a été menée à partir du test de champ ouvert. Nos résultats montrent une augmentation de l'activité totale, mesurée comme la distance totale parcourue par nos animaux. La division de la session du test de 30 minutes en intervalles de 10 minutes nous a permis d'observer que nos animaux présentent une hyperactivité qui continue jusqu'à le dernier intervalle. Ceci pourrait indiquer une habitude correcte au contexte. Le test de mémoire de reconnaissance d'objets a été constitué pour deux sessions, la session d'acquisition (S1) et la session de rétention (S2). Au cours de la première session, nous avons observé une augmentation significative de l'exploration des objets A chez les individus *Del/+*, qui pourrait être expliquée pour l'hyperactivité d'exploration montrée par nos souris au cours du test de champ ouvert. De manière inattendue, nos souris témoins n'ont pas développé une capacité de reconnaissance d'objet correcte, probablement en raison du manque d'intérêt manifesté par les objets A au cours de la première session du test. Ces résultats invalident notre test et nous obligent à développer un nouveau protocole adapté. L'activité de notre modèle a été également évaluée en cycles circadiens dans le test d'activité circadienne. Nos observations montrent que la perte d'une copie de la région 16p11.2 génère uniquement des altérations dans l'activité verticale totale. L'observation de comportements répétitifs dans des cages pendant 10 minutes montre une augmentation du comportement d'escalade. Ce résultat pourrait expliquer l'augmentation de l'activité verticale totale dans le test d'activité circadienne. Les données sont les moyennes ± l'écart-type. Test de Student, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Conclusion et perspectives

Etude de l'inhibition pharmacologique de la voie de signalisation RHOA / ROCK dépendante de l'interaction entre KCTD13 et CULLIN sur les modèles *Kctd13*^{+/-} et 16p11.2 *Del/+*

Certains troubles du comportement et des déficits du développement diagnostiqués chez les patients porteurs des CNVs de la région 16p11.2 ont été liés à divers mécanismes cellulaires. En particulier, un des gènes présents sur la région, *KCTD13*, fut initialement impliqué dans l'apparition d'altérations de la taille du crâne chez l'homme (Kusenda *et al.*, 2015) et des modèles animaux (Golzio *et al.*, 2012). Récemment, il a été également impliqué dans le contrôle des niveaux cellulaires de la protéine RHOA (Lin *et al.*, 2015). Cependant, la manière dont l'haplo-insuffisance de ce gène cause des modifications de l'activation de la voie RHOA / ROCK, entraînant des altérations significatives de la transmission synaptique (Escamilla *et al.*, 2017) et des troubles cognitifs chez la souris (Arbogast *et al.*, 2019), ainsi que le rôle mécaniste exact de RHOA dans les syndromes 16p11.2 reste toutefois à découvrir.

La famille des Rho GTPases joue un rôle essentiel dans la régulation du cytosquelette d'actine, ce qui contrôle la croissance, la dynamique et la fonction des épines dendritiques et la plasticité synaptique (Penzes et Rafalovich, 2012). Considérant que le dysfonctionnement du cytosquelette d'actine a été associé à l'autisme (Yan *et al.*, 2016) et que la normalisation des régulateurs d'actine dans la voie RHOA, comme Pak et cofilin, a permis de restaurer des phénotypes autistiques dans les modèles génétiques *Nf1*, *Shank3* et *Fmr1* (Martin-Vilchez *et al.*, 2017), nous avons considéré très intéressant d'étudier l'effet de l'inactivation pharmacologique de la voie de signalisation RHOA / ROCK sur les phénotypes associés à la modélisation de la délétion 16p11.2 chez la souris.

La caractérisation comportementale du modèle de souris pour l'inactivation du gène *Kctd13* ainsi que le modèle pour la délétion de la région complète 16p11.2 avant et après le traitement chronique avec un inhibiteur de la voie RHOA (fasudil), a concerné au premier projet de cette recherche. Cette étude a révélé que le gène *Kctd13* est impliqué dans le déficit de mémoire de reconnaissance d'objets associé à la délétion de la région 16p11.2 et que la suractivation de la voie RHOA / ROCK est la cause principale, grâce à l'observation d'un effet normalisant du traitement sur ce phénotype chez les deux modèles. Ces résultats sont cohérents avec les informations de l'« Allen Brain Atlas » qui localisent l'expression du gène dans l'hippocampe des souris adultes, une région cérébrale impliquée dans l'acquisition de la mémoire. En outre, les souris déficientes pour *Kctd13* ne présentent pas de troubles dans l'activité d'exploration associés à la délétion 16p11.2. De plus, l'administration de fasudil ne provoque pas d'effet sur ces deux modèles. Ces résultats nous indiquent que *Kctd13* n'est pas responsable de ce phénotype et que pour cette raison la normalisation de l'activation de la voie RHOA ne permet pas de rétablir ce phénotype. Une autre observation intéressante concerne la disparition à l'âge de 18 semaines du phénotype des déficits dans la mémoire de localisation d'objets présenté par le modèle *Kctd13*^{+/-} à 12 semaines. Ces résultats pourraient signaler un trouble du développement qui empêche nos souris de manifester cette capacité à 12 semaines. Ceci sera vérifié prochainement à partir de la caractérisation des souris *Kctd13*^{+/-} naïves de 18 semaines. En outre, fasudil ne

provoque pas d'effets significatifs dans le déficit de reconnaissance de localisation d'objets observé chez le modèle 16p11.2 *Del/+*. Ces résultats sont cohérents avec la faible robustesse du phénotype dans le modèle d'inactivation de *Kctd13*.

Finalement, les résultats de l'étude biochimique de la voie RHOA ont montré une augmentation de la phosphorylation de MLC dans l'hippocampe des deux modèles signalant le gène *Kctd13* comme responsable de la sur activation de la voie RHOA / ROCK chez les individus porteurs de la délétion 16p11.2. De plus, nous avons démontré l'effet inhibiteur de fasudil dans la voie de signalisation grâce à la normalisation significative de la phosphorylation de MLC chez les individus mutants traités *Kctd13^{+/-}* et 16p11.2 *Del/+*. Cependant, nous n'avons pas observé d'altérations des niveaux de la protéine RHOA sur ces deux modèles. Ces résultats sont cohérents avec l'étude récente menée par Arbogast *et al.*, en 2019, où il n'a pas été montré de changements des niveaux de la protéine RHOA, malgré l'observation d'altérations de la maturation des épines dendritiques de l'hippocampe de souris déficientes pour *Kctd13* avec un déficit de la mémoire de reconnaissance. Cependant, notre analyse ne récapitule pas l'altération des niveaux de la protéine RHOA ni l'absence de phénotypes de la mémoire de reconnaissance observées sur le modèle *Kctd13* de Escamilla *et al.* Ces différences pourraient être la conséquence des stratégies de mutation utilisées pour l'obtention de chaque modèle.

Nous estimons que des études biochimiques supplémentaires de la voie RHOA / ROCK et du complexe KCTD13-CULLIN3 sont nécessaires afin de comprendre le rôle mécaniste de la voie dans les syndromes associés aux réarrangements 16p11.2. En outre, nos résultats n'excluent pas le fait que d'autres gènes de la région puissent agir à d'autres niveaux de la voie RHOA ou à des moments différents du développement. Un de ces gènes est *Taok2* dont produit a été impliqué dans la régulation de l'activation de la voie de signalisation à travers un complexe fonctionnel avec RHOA, dans le cortex de souris présentant des phénotypes du comportement, de la connectivité du cerveau entier, de la stratification corticale, de la morphologie neuronale et de la fonction synaptique dans les neurones excitateurs corticaux (Richter *et al.*, 2019). Il est probable que plusieurs gènes jouent un rôle similaire ou que l'expression d'un gène puisse réguler l'expression d'un autre gène de la région, considérant la grande densité génétique de l'intervalle 16p11.2 et la variabilité des phénotypes neurologiques associés (Girirajan *et al.*, 2012).

Recherche des gènes candidats de la région MVP-KCTD13

Les études transcriptomiques menées précédemment sur le modèle 16p11.2 *Sult1a1-Spn* ont démontré que la plupart des gènes de la région 16p11.2 sont sensibles au dosage génétique et qu'en particulier la délétion a un effet plus prononcé sur l'expression des gènes que la duplication avec un impact très faible de régulation génomique (Arbogast *et al.*, 2016). Ces résultats impliquent directement les gènes de l'intervalle dans les phénotypes associés.

Considérant que l'inactivation de *Kctd13* n'est pas la cause de tous les phénotypes associés à la délétion 16p11.2, nous avons décidé ici de continuer la recherche des gènes candidats.

Nous avons développé deux modèles d'inactivation des gènes *Mvp* et *Sez6l2* à l'état hétérozygote car chez l'humain, les CNVs de la région 16p11.2 les plus fréquemment identifiés incluent une unique copie du locus.

Ensuite, nous avons procédé à la caractérisation comportementale basée sur les phénotypes trouvés sur le modèle murin 16p11.2. Nos résultats montrent que la perte d'une copie du gène *Mvp* généré à partir de la technique de la cassette de piégeage de gènes ou à partir de la technologie CRISPR / Cas9 ne provoque pas de phénotypes cognitives. Pourtant, des études précédentes ont impliqué ce gène dans l'augmentation de l'expressivité des phénotypes de la taille crânienne et cérébrale associés à *Kctd13* (Arbogast *et al.*, 2019; Golzio *et al.*, 2012). Pour cette raison, nous n'excluons pas la possibilité que *Mvp* puisse aggraver les phénotypes associés à un autre gène de la région dans un modèle double hétérozygote.

La génération du modèle pour l'inactivation du gène *Sez6l2* à l'état hétérozygote a été menée à partir de l'allèle tm1a et tm1b. La principale différence entre ces deux constructions est la présence ou pas des exons critiques et du gène marqueur respectivement. Alors que l'allèle tm1a est plus polyvalent, l'allèle tm1b est plus approprié pour l'étude de l'apparition de phénotypes associés à l'inactivation du gène, car il ne contient pas les exons ciblés dans le génome. L'allèle *Sez6l2*^{tm1b/+} présente une transmission similaire à la délétion de la région 16p11.2 à partir du croisement wt x *Sez6l2*^{tm1b/+} d'environ 35%. Ce résultat pourrait nous indiquer que l'inactivation du gène *Sez6l2* a un effet délétère et est impliquée dans une certaine mesure dans la létalité observée chez les souris 16p11.2 *Del/+*.

Par rapport à l'analyse comportementale des souris *Sez6l2*^{+/-}, nos résultats ont montré un déficit dans la mémoire de reconnaissance et une stéréotypie du comportement d'escalade pour l'allèle tm1a et de creusage pour l'allèle tm1b. La différence du type de comportement répétitif entre les deux allèles pourrait s'expliquer par le fait que les patients atteints d'ASD peuvent développer différents types de comportement répétitif (Cunningham *et al.*, 2008).

Deux gènes, *Sez6l2* et *Kctd13* sont impliqués dans le phénotype de mémoire de reconnaissance d'objets associé à la délétion 16p11.2 *Sult1a1-Spn*. Nos résultats soulignent la possibilité que ces deux gènes agissent dans le même domaine fonctionnel et qu'il serait possible de cibler un mécanisme cellulaire contrôlé par l'un de ces deux locus avec une seule drogue, comme fasudil et d'obtenir des effets de réversion du phénotype observé. Cependant, nous estimons nécessaire de vérifier dans des futures recherches si l'inactivation d'un de ces gènes pourrait avoir des effets épistatiques sur l'expression de l'autre. Pour cette raison, l'analyse du niveau d'expression du produit des deux gènes adjacents sur ces deux modèles est prévue par notre laboratoire.

Des futures analyses à partir de la combinaison des deux mutations génétiques chez un modèle double hétérozygote ainsi que la modélisation de la micro-délétion de la région *MVP*-

KCTD13 identifiée dans une famille de trois générations avec autisme (Crepel *et al.*, 2011) nous permettront de vérifier si les phénotypes sont accentués et si ces modèles reproduisent les phénotypes associés à la délétion 16p11.2.

Modélisation des syndromes de variation du nombre de copies de la région 16p11.2 chez le rat

La modélisation des réarrangements de la région de synténie 16p11.2 *Sult1a1-Spn* chez la souris sur un fond génétique pur ou mixte a permis de mimer les phénotypes cognitifs et d'apprentissage associés à la déficience intellectuelle et aux troubles d'activité diagnostiqués chez l'homme, ainsi que la stéréotypie couramment observée sur les patients atteints d'ASD (Cunningham *et al.*, 2008). Cependant, le phénotype d'altération du comportement social, un trait typiquement autiste, a été observé uniquement chez les souris sur le fond génétique mixte. Pourtant ces souris ne partageaient pas les mêmes caractéristiques comportementales avec les souris sur le fond pur. Ces observations pourraient indiquer une association des polymorphismes liés au fond génétique au phénotype social.

Dans ce contexte nous avons décidé de créer des modèles animaux porteurs des réarrangements 16p11.2 plus relevant pour l'autisme. A cette fin, nous avons développé des modèles pour la délétion et pour la duplication de la région 16p11.2 chez le rat, une espèce connue pour son intelligence et son instinct social. Lors de l'amplification de la ligne génétique à partir des accouplements *Del/+* X *Dup/+*, nous n'avons pas observé de différences de transmission des mutations.

La caractérisation de ces modèles sur un fond génétique non consanguin nous a permis d'observer initialement une grande variabilité phénotypique compatible avec la grande variabilité symptomatique et la faible pénétrance des troubles neuropsychiatriques associés aux CNVs 16p11.2 chez l'humain. En outre, nos résultats ont montré que les individus porteurs de la délétion développent une suractivité locomotrice par rapport aux rats porteurs de la duplication pour le sexe masculin. Dans le cas des femelles, les animaux porteurs de deux régions *Sult1a1-Spn* sur un seul chromosome (*Del/Dup*) sont significativement plus actives que les individus porteurs de trois copies de la région (*Dup/+*) suggérant que la structure de l'ADN pourrait impacter l'expression génétique par des effets de position du matériel génétique en provoquant une altération de l'activité. De plus, la délétion a été associée à un déficit dans la mémoire de reconnaissance d'objets chez les mâles dans un test conditionné à l'intelligence des rats. Ce phénotype a été également identifié chez la souris et pourrait être associé à la déficience intellectuelle chez les humaines. En outre, nous avons observé à partir de ce modèle animal que la délétion est liée à une augmentation significative de l'isolement social alors que la duplication est liée à une augmentation des comportements sociaux agressifs. Ces phénotypes pourraient être associés aux traits autistiques et aux symptômes psychotiques identifiés chez les patients affectés par les réarrangements 16p11.2 (Niarchou *et al.*, 2019).

Par rapport aux phénotypes anatomiques, les rats *Del/+* ont présenté une diminution du poids corporel uniquement pour le sexe masculin.

Nos résultats signalent une diminution de l'expressivité phénotypique liée au sexe féminin qui est compatible avec la théorie du « cerveau masculin extrême » développée par Baron-Cohen *et al.*, en 2011 selon laquelle l'autisme est considéré comme un extrême du cerveau typiquement masculin, présentant une diminution de l'empathie avec une systématisation normale ou accrue. Nos données sont également cohérentes avec la proportion d'identification des réarrangements 16p11.2 favorable pour les garçons par rapport aux filles (Polyak *et al.*, 2015). Une autre possibilité à prendre en compte est que ce biais était uniquement dû au fond génétique. La disponibilité des nouveaux modèles de rats 16p11.2 aidera à vérifier la seconde hypothèse.

Nos modèles de rats ont été également utilisés pour l'analyse d'altérations cranio-faciales dans une étude multi-espèce. Les résultats actuellement publiés, montrent que nos animaux présentent des phénotypes opposés entre la délétion et la duplication par rapport aux mesures des régions frontales du crâne et des régions nasales et mandibulaires. Ces résultats indiquent que le dosage des gènes de la région 16p11.2 a une conséquence quantitative dans le développement. Finalement, l'analyse transcriptomique et de l'expression des protéines à partir des tissus des différentes régions du cerveau est en cours dans notre équipe afin de vérifier cette dernière hypothèse.

Caractérisation du modèle de souris chez la femelle Del/+ 16p11.2 BP4-BP5 *Sult1a1-Spn*

Nous avons observé des différences comportementales associées au sexe chez le rat compatibles avec le biais sexuel des cas porteurs des réarrangements 16p11.2 avec l'ASD et la déficience intellectuelle chez l'humain. Par contre, les fondements de ceci sont inconnus. Pour cette raison, nous avons décidé d'étudier l'implication du sexe dans les troubles comportementaux du modèle de souris pour la délétion 16p11.2 *Sult1a1-Spn* et ainsi compléter la résolution phénotypique associée à ce syndrome. La raison pour laquelle nous avons sélectionné la délétion entre les deux réarrangements, a été la plus grande sévérité des phénotypes trouvés chez l'homme (Cooper *et al.*, 2011) et le modèle murin (Arbogast *et al.*, 2016) par rapport à la duplication. Pour ce projet on a travaillé avec des souris femelles sur un fond consanguin à l'état hétérozygote.

Comme dans le cas de la modélisation de la délétion 16p11.2 *Sult1a1-Spn* pour le sexe masculin, la première observation à considérer a été un effet sur la viabilité des souris porteuses de cette mutation. En effet, nous avons trouvé une létalité significative associée à l'haplo-insuffisance des gènes de la région. Ces résultats indiquent que cet effet ne dépend pas du sexe des animaux et ils sont cohérents avec la principale proportion de délétions *de novo* identifiées chez l'homme. L'effet délétère de la délétion implique que la mutation ne soit pas transmise principalement de génération en génération et qu'elle ne soit pas présente dans le patrimoine génétique familial.

En ce qui concerne l'analyse des capacités cognitives associées à la perte d'une copie de la région pour le sexe féminin, nous avons observé une augmentation de l'activité locomotrice d'exploration et une stéréotypie dans le comportement d'escalade. Ces deux

phénotypes sont partagés avec le sexe masculin. Cependant, il n'a pas été possible de déterminer la présence de désordres dans la mémoire de reconnaissance d'objets sur notre modèle car nos animaux témoins n'ont pas montré de préférence entre les objets. Pour cette raison, l'obtention de deux nouvelles cohortes de souris est prévue afin de répéter le test à partir d'un nouveau protocole dans lequel la phase d'habituation se déroulera en deux sessions de 15 minutes sur deux jours différents. Ce changement pourrait diminuer l'intérêt des souris pour l'arène et augmenter leur intérêt pour les objets présentés. En outre, contrairement aux souris mâles, nos mutantes ne montrent aucune altération de l'activité locomotrice circadienne. Cette différence de phénotypes observée entre les deux sexes pourrait s'expliquer par l'augmentation générale de l'activité des deux génotypes par rapport aux mâles. Cette observation pourrait influencer sur la possibilité de trouver des différences significatives entre les femelles témoins et les femelles mutantes.

Néanmoins, les résultats de l'analyse de ce modèle ont montré également une diminution de l'expressivité phénotypique. Cette différence pourrait être associée à une résilience spécifique du sexe féminin en ce qui concerne l'effet de l'haplo-insuffisance des gènes de la région dans le neuro-développement. Nos résultats sont cohérents avec les études menées par Grissom *et al.*, en 2018. Leurs analyses montrent des profondes différences entre les sexes par rapport à l'impact de la délétion 16p11.2 liée à des troubles du développement neurologique, comprenant des mécanismes de vulnérabilité spécifiques aux souris mâles et de la résilience spécifique à la femelle avec un impact sur la signalisation intracellulaire dans le cerveau. Nous soulignons le besoin de futures recherches afin de comprendre l'effet de vulnérabilité associé au sexe masculin et l'effet protecteur associé au sexe féminin, comme conséquence de gènes présents dans les chromosomes sexuels ou d'hormones sexuelles agissant dans le système nerveux, ce qui nous permettrait de développer de futurs traitements à partir de ces molécules.

Conclusion finale

Notre travail se centre sur la compréhension et l'atténuation des conséquences des réarrangements de la région chromosomique 16p11.2 chez l'humain. Ces mutations sont considérées comme l'une des étiologies les plus pertinentes des troubles neuro développementaux et neurocognitives, tels que la déficience intellectuelle et l'autisme. Notre recherche a été menée à partir de l'utilisation des modèles animaux de la souris et du rat, considérant les recherches scientifiques apportées au cours des dernières années sur ces CNVs.

Nous avons récapitulé les informations données sur *Kctd13*, un gène impliqué dans la régulation de la voie de signalisation cellulaire RHOA / ROCK, pour le développement d'une approche thérapeutique sur les modèles de souris déficientes pour *Kctd13* ou porteuses de la délétion 16p11.2. Nos résultats démontrent que *Kctd13* est impliqué dans le phénotype de mémoire de reconnaissance d'objets associé à la délétion de la région 16p11.2 et que la suractivation de la voie RHOA est la cause principale. Considérant que *Kctd13* n'est pas l'unique gène responsable des phénotypes associés à la délétion 16p11.2, nous avons

continué la recherche des autres gènes candidats. Ainsi, nous avons découvert l'implication du gène *Sez6/2* dans l'apparition de comportements répétitifs et le déficit de mémoire de reconnaissance d'objets. Nos résultats indiquent donc que plus d'un gène de la région 16p11.2 est impliqué dans le développement de cette capacité cognitive. Bien que nous ayons réussi à récapituler certains phénotypes associés aux syndromes 16p11.2 humains à partir du modèle de souris, nous nous sommes intéressés à l'obtention d'un modèle animal manifestant des troubles sociaux. Pour cette raison, nous avons développé des modèles de rat pour les réarrangements de la région 16p11.2. Nos modèles ont développé fondamentalement des troubles du comportement social, un trait associé communément à l'autisme chez l'homme. Ces observations présentent nos modèles comme un outil génétique pour la recherche de mécanismes moléculaires impliqués dans ce phénotype et de molécules thérapeutiques avec des effets de normalisation sur les désordres sociaux pouvant aboutir à l'amélioration de la vie des patients. D'autre part, considérant la complexité du cerveau humain, nous n'excluons pas que d'autres gènes de la région puissent avoir des effets épistatiques et même des fonctions similaires dans des régions du cerveau identiques ou différentes. De plus, nous considérons que l'étude d'autres gènes en dehors de notre région d'intérêt dont les mutations ont été associées à la déficience intellectuelle ou à l'autisme est vraiment importante pour la compréhension globale de ces troubles. En particulier, *DYRK1A* un gène essentiel pour le développement correct du système nerveux dont les mutations ont été liées à l'ASD (O'Roak *et al.*, 2012). Nous voudrions également inclure d'autres gènes tels que *SHANK2* dont les mutations rares ont été identifiées chez des patients atteints d'autisme et de déficience intellectuelle (Leblond *et al.*, 2012; Sanders *et al.*, 2012) et elles ont eu des effets variables sur la localisation des protéines, le volume des épines dendritiques et la ramification dans des cultures neuronales et même la transmission synaptique et le comportement cognitif chez la souris (Berkel *et al.*, 2012). De plus, des mutations sur *SHANK3* (Sarasua *et al.*, 2011; Peça *et al.*, 2011) et *NLGN3* (chromosome X) (Jamain *et al.*, 2003) ont été aussi associées à l'autisme. Finalement, nos résultats mettent en évidence l'effet de résilience associé au sexe féminin chez nos modèles de rat. Cette différence d'expressivité phénotypique associée au sexe a été également observée sur le modèle de souris. La similitude retrouvée entre les espèces dans nos études nous permet de proposer des futures analyses pharmacologiques à partir d'hormones sexuelles qui agissent dans le système nerveux et pourraient avoir des effets normalisant chez nos modèles animaux.

Références bibliographiques

- Albertson, D.G., and Pinkel, D. Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Hum Mol Genet* 12 Spec No 2, R145-152 (2003).
- Arbogast, T., Ouagazzal, A.M, Chevalier, C., Kopanitsa, M., Afinowi, N., Migliavacca, E., Cowling, B.S., Birling, M.C., Champy, M.F., Reymond, A., *et al.* Reciprocal Effects on Neurocognitive and Metabolic Phenotypes in Mouse Models of 16p11.2 Deletion and Duplication Syndromes. *PLoS Genet.* 12(2): e1005709 (2016).
- Arbogast, T., Razaz, P., Ellegood, J., McKinstry, S.U., Erdin, S., Currall, B., Aneichyk, T., Lerch, J.P., Qiu, L.R., Rodriguiz, R.M., *et al.* Kctd13-deficient mice display short-term memory impairment and sex-dependent genetic interactions. *Hum Mol Genet.* 28(9):1474-1486 (2019).
- Bailey, J.A., Gu, Z., Clark, R.A., Reinert, K., Samonte, R.V., Schwartz, S., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., and Eichler, E.E. Recent segmental duplications in the human genome. *Science* 9;297(5583):1003-7 (2002).
- Baron-Cohen, S., Knickmeyer, R. C., and Belmonte, M. K. Sex differences in the brain: implications for explaining autism. *Science* 310, 819-823 (2005).
- Baron-Cohen, S., Lombardo, M.V., Auyeung, B., Ashwin, E., Chakrabarti, B., and Knickmeyer, R. Why are autism spectrum conditions more prevalent in males? *PLoS Biol* 9, e1001081, doi:10.1371/journal.pbio.1001081 (2011).
- Barret, M.T., Scheffer, A., Ben-Dor, A., Sampas, N., Lipson, D., Kincaid, R., Tsang, P., Curry, B., Baird, K., Meltzer, P.S., *et al.* Comparative genomic hybridization using oligonucleotide microarrays and total genomic DNA. *PNAS* 101 (51) 17765-17770 (2004).
- Beasley, C.L., Pennington, K., Behan, A., Wait, R., Dunn, M.J., and Cotter, D. Proteomic analysis of the anterior cingulate cortex in the major psychiatric disorders: Evidence for disease-associated changes. *Proteomics* 6(11):3414-25 (2006).
- Bedoyan, J.K., Kumar, R.A., Sudi, J., Silverstein, F., Ackley, T., Iyer, R.K., Christian, S.L., and Martin, D.M. Duplication 16p11.2 in a child with infantile seizure disorder. *Am J Med Genet A* 152A(6):1567-74 (2010).
- Berger, W., Steiner, E., Grusch, M., Elbling, L., and Micksche, M. Vaults and the major vault protein: novel roles in signal pathway regulation and immunity. *Cell Mol Life Sci* 66(1):43-61 (2009).
- Berkel, S., Tang, W., Treviño, M., Vogt, M., Obenhaus, H.A., Gass, P., Scherer, S.W., Sprengel, R., Schratt, G., and Rappold, G.A. Inherited and de novo SHANK2 variants associated with autism spectrum disorder impair neuronal morphogenesis and physiology. *Hum Mol Genet* 15;21(2):344-57 (2012).
- Betancur, C., Sakurai, T., and Buxbaum, J.D. The emerging role of synaptic cell-adhesion pathways in the pathogenesis of autism spectrum disorders. *Trends Neurosci* 32(7):402-12 (2009).

- Beutler, E., Scott, S., Bishop, A., Margolis, N., Matsumoto, F., and Kuhl W. Red cell aldolase deficiency and hemolytic anemia: a new syndrome. *Trans Assoc Am Physicians* 86:154-66 (1973).
- Bijlsma, E.K., Gijsbers, A.C., Schuurs-Hoeijmakers, J.H., van Haeringen, A., Fransen van de Putte, D.E., Anderlid, B.M., Lundin, J., Lapunzina, P., Pérez Jurado, L.A., Delle Chiaie, B. *et al.* Extending the phenotype of recurrent rearrangements of 16p11.2: deletions in mentally retarded patients without autism and in normal individuals. *Eur J Med Genet* 52(2-3):77-87 (2009).
- Birling M.-C., Schaeffer L., André P., Lindner L., Maréchal D., Ayadi A., Sorg T., Pavlovic G., and Hérault Y. Efficient and rapid generation of large genomic variants in rats and mice using CRISMER. *Sci. Rep.* 7, 43331 10.1038/srep43331 (2017).
- Blackmon, K., Thesen, T., Green, S., Ben-Avi, E., Wang, X., Fuchs, B., Kuzniecky, R., and Devinsky, O. Focal Cortical Anomalies and Language Impairment in 16p11.2 Deletion and Duplication Syndrome. *Cereb Cortex* 1;28(7):2422-2430 (2018).
- Blaker-Lee, A., Gupta, S., McCammon, J.M., De Rienzo, G., and Sive H. Zebrafish homologs of genes within 16p11.2, a genomic region associated with brain disorders, are active during brain development, and include two deletion dosage sensor genes. *Dis Model Mech* 5(6): 834–851 (2012).
- Blumenthal, I., Ragavendran, A., Erdin, S., Klei, L., Sugathan, A., Guide, J.R., Manavalan, P., Zhou, J.Q., Wheeler, V.C., Levin, J.Z., *et al.* Transcriptional consequences of 16p11.2 deletion and duplication in mouse cortex and multiplex autism families. *Am J Hum Genet.* 5;94(6):870-83 (2014).
- Boonen, M., Staudt, C., Gilis, F., Oorschot, V., Klumperman, J., and Jadot, M. Cathepsin D and its newly identified transport receptor SEZ6L2 can modulate neurite outgrowth *J. Cell Sci.*, 129 pp. 557-568 (2016).
- Brault, V., Pereira, P., Duchon, A., and Hérault, Y. Modeling chromosomes in mouse to explore the function of genes, genomic disorders, and chromosomal organization. *PLoS Genet.* 2, e86 10.1371/journal.pgen.0020086 (2006).
- Brunner, D., Kabitzke, P., He, D., Cox, K., Thiede, L., Hanania, T. Sabath, E., Alexandrov, V., Saxe, M., Peleset E., *et al.* Comprehensive analysis of the 16p11.2 deletion and null *Cntnap2* mouse models of autism spectrum disorder. *PLoS ONE* 10: e0134572 (2015).
- Canete-Soler, R., Reddy, K.S., Tolan, D.R., and Zhai, J. Aldolases a and C are ribonucleolytic components of a neuronal complex that regulates the stability of the light-neurofilament mRNA. *J Neurosci* 25:4353–4364 (2005).
- Chapman, D.L., and Papaioannou V.E. Three neural tubes in mouse embryos with mutations in the T-box gene *Tbx6*. *Nature* 12;391(6668):695-7 (1998).

- Chawner, S.J.R.A., Owen, M.J., Holmans, P., Raymond, F.L., Skuse, D., Hall, J., and van den Bree, M.B.M. Genotype-phenotype associations in children with copy number variants associated with high neuropsychiatric risk in the UK (IMAGINE-ID): a case-control cohort study. *Lancet Psychiatry* 6(6):493-505 (2019).
- Chelly, J., Khelfaoui, M., Francis, F., Chérif, B., and Bienvenu, T. Genetics and pathophysiology of mental retardation. *Eur J Hum Genet* 14(6):701-13 (2006).
- Chen, J., Yu, S., Fu, Y., and Li, X. Synaptic proteins and receptors defects in autism spectrum disorders. *Front Cell Neurosci* 8: 276 (2014).
- Chen, J.I., Hannan, N.J., Mak, Y., Nicholls, P.K., Zhang, J., Rainczuk, A., Stanton, P.G., Robertson, D.M., Salamonsen, L.A., and Stephens, A.N. Proteomic characterization of midproliferative and midsecretory human endometrium. *J Proteome Res* 8(4):2032-44 (2009).
- Chen, W.J., Lin, Y., Xiong, Z.Q., Wei, W., Ni, W., Tan, G.H., Guo, S.L., He, J., Chen, Y.F., Zhang, Q.J., *et al.* Exome sequencing identifies truncating mutations in PRRT2 that cause paroxysmal kinesigenic dyskinesia. *Nat Genet* 20;43(12):1252-5 (2011).
- Conrad, D.F., Andrews, T.D., Carter, N.P., Hurles, M.E., and Pritchard, J.K. A high-resolution survey of deletion polymorphism in the human genome. *Nat Genet* 38(1):75-81 (2006).
- Conrad, D.F., Pinto, D., Redon, R., Feuk, L., Gokcumen, O., Zhang, Y., Aerts, J., Andrews, T.D., Barnes, C., Campbell, P., *et al.* Origins and functional impact of copy number variation in the human genome *Nature* 1; 464(7289): 704–712 (2010).
- Cooper, G.M., Coe, B.P., Girirajan, S., Rosenfeld, J.A., Vu, T.H., Baker, C., Williams, C., Stalker, H., Hamid, R., Hannig, V. *et al.* A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat Genet* 14;43(9):838-46 (2011).
- Consortium, I. H. The International HapMap Project. *Nature* 437, 1299-1320 (2003).
- Consortium, I. H. The haplotype map of the human genome. *Nature* 437, 1299-1320 (2005).
- Courchesne, E., Campbell, K., and Solso, S. Brain growth across the life span in autism: age-specific changes in anatomical pathology. *Brain Res* 22; 1380():138-45 (2011).
- Craddock, N., Hurles, M.E., Cardin, N., Pearson, R.D., Plagnol, V., Robson, S., Vukcevic, D., Barnes, C., Conrad, D.F., Giannoulatou, E., *et al.* Genome-wide association study of CNVs in 16,000 cases of eight common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 1;464(7289):713-20 (2010).

- Crepel, A., Steyaert, J., De la Marche, W., De Wolf, V., Fryns, J.P., Noens, I., Devriendt, K., and Peeters, H. Narrowing the critical deletion region for autism spectrum disorders on 16p11.2. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 156(2):243-5 (2011).
- Cunningham, A.B., and Schreibman, L. Stereotypy in Autism: The Importance of Function. *Res Autism Spectr Disord* 2(3): 469–479 (2008).
- D'Angelo, D., Lebon, S., Chen, Q., Martin-Brevet, S., Snyder, L.G., Hippolyte, L., Hanson, E., Maillard, A.M., Faucett, W.A., Macé, A., *et al.* Defining the Effect of the 16p11.2 Duplication on Cognition, Behavior, and Medical Comorbidities. *JAMA Psychiatry* 73(1):20-30 (2016).
- D'Angelo, C.S., Varela, M.C., de Castro, C.I.E., Otto, P.A., Perez, A.B.A., Lourenço, C.M., Kim, C.A., Bertola, D.R., Kok, F., Garcia-Alonso, L., *et al.* Chromosomal microarray analysis in the genetic evaluation of 279 patients with syndromic obesity. *Mol Cytogenet* 5;11:14 (2018).
- de Anda, F.C., Rosario, A.L., Durak, O., Tran, T., Gräff, J., Meletis, K., Rei, D., Soda, T., Madabhushi, R., Ginty, D.D., Kolodkin, A.L., *et al.* Autism spectrum disorder susceptibility gene TAOK2 affects basal dendrite formation in the neocortex. *Nat Neurosci* 10;15(7):1022-31 (2012).
- Duncan, R.R., Shipston, M.J., and Chow, R.H. Double C2 protein. A review. *Biochimie*. 82(5):421-6 (2000).
- Duyzend, M.H., and Eichler, E.E. Genotype-first analysis of the 16p11.2 deletion defines a new type of 'autism'. *Biol Psychiatry* 77: 769–771 (2015).
- Eichler, E.E. Recent duplication, domain accretion and the dynamic mutation of the human genome. *Trends Genet* 17(11):661-9(2001).
- Ellenbroek, B., and Youn, J. Rodent models in neuroscience research: is it a rat race? *Dis Model Mech* 1;9(10):1079-1087 (2016).
- Escamilla, C., Filonova, I., Walker, A.K., Xuan, Z.X., Holehonnur, R., Espinosa, F., Liu, S., Thyme, S.B., López-García, I.A., Mendoza, D.B., *et al.* Kctd13 deletion reduces synaptic transmission via increased RhoA. *Nature* 551(7679): 227–231 (2017).
- Fatakia, S.N., Mehta, I.S., and Rao, B.J. Systems-level chromosomal parameters represent a suprachromosomal basis for the non-random chromosomal arrangement in human interphase nuclei. *Sci. Rep.* 6:36819 (2016).
- Fedorenko, E., Morgan, A., Murray, E., Cardinaux, A., Mei, C., Tager-Flusberg, H., Fisher, S.E., and Kanwisher, N. A highly penetrant form of childhood apraxia of speech due to deletion of 16p11.2. *Eur J Hum Genet* 24(2):302-6 (2016).

- Feuk, L., Carson, A.R., and Scherer S.W. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet* 7(2):85-97 (2006).
- Friedel, R.H., and Soriano, P. Gene Trap Mutagenesis in the Mouse. *Methods Enzymol* 477: 243–269 (2010).
- Fromer, M., Moran, J.L., Chambert, K., Banks, E., Bergen, S.E., Ruderfer, D.M., Handsaker, R.E., McCarroll, S.A., O'Donovan, M.C., Owen, M.J., *et al.* Discovery and statistical genotyping of copy-number variation from whole-exome sequencing depth. *Am J Hum Genet* 5;91(4):597-607(2012).
- Ghebranious, N., Giampietro, P.F., Wesbrook, F.P., and Rezkalla. S.H. A novel microdeletion at 16p11.2 harbors candidate genes for aortic valve development, seizure disorder, and mild mental retardation *Am. J. Med. Genet* 1;143A(13):1462-71. (2007).
- Gibbs, R.A., Weinstock, G.M., Metzker, M.L., Muzny, D.M., Sodergren, E.J., Scherer, S., Scott, G., Steffen, D., Worley, K.C., Burch, P.E., *et al.* Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* Apr 1;428(6982):493-521 (2004).
- Gillberg, C., Cederlund, M., Lamberg, K., and Zeijlton, L. Brief report: "the autism epidemic". The registered prevalence of autism in a Swedish urban area. *J Autism Dev Disord* 36(3):429-35 (2006).
- Gimeno-Ferrer, F., Albuquerque, D., Guzmán Luján, C., Marcaida Benito, G., Torreira Banzas, C., Repáraz-Andrade, A., Ballesteros Cogollos, V., Aleu Pérez-Gramunt, M., Galán Gómez, E., Quintela, I., *et al.* The effect of copy number variations in chromosome 16p on body weight in patients with intellectual disability. *J Hum Genet* 64(3):221-231 (2019).
- Gilmore, J.H., Lin, W., Prastawa, M.W., Looney, C.B., Vetsa, Y.S., Knickmeyer, R.C., Evans, D.D., Smith, J.K., Hamer, R.M., Lieberman, J.A., *et al.* Regional gray matter growth, sexual dimorphism, and cerebral asymmetry in the neonatal brain. *J Neurosci.* 7; 27(6):1255-60 (2007).
- Girirajan, S., Rosenfeld, J.A., Coe, B.P., Parikh, S., Friedman, N., Goldstein, A., Filipink, R.A., McConnell, J.S., Angle, B., Meschino, W.S., *et al.* Phenotypic heterogeneity of genomic disorders and rare copy-number variants. *N Engl J Med* 367:1321–1331 (2012).
- Gladwyn-Ng, I., Huang, L., Ngo, L., Li, S.S., Qu, Z., Vanyai, H.K., Cullen, H.D., Davis, J.M., and Heng, J.I. Bacurd1/Kctd13 and Bacurd2/Tnfaip1 are interacting partners to Rnd proteins which influence the long-term positioning and dendritic maturation of cerebral cortical neurons. *Neural Dev* 11;11:7 (2016).
- Grayton, H.M., Fernandes, C., Rujescu, D., and Collier, D.A. Copy number variations in neurodevelopmental disorders. *Prog Neurobiol* 99(1):81-91 (2012).

- Golzio, C., Willer, J., Talkowski, M.E., Oh, E.C., Taniguchi, Y., Jacquemont, S., Reymond, A., Sun, M., Sawa, A., Gusella, J.F., *et al.* KCTD13 is a major driver of mirrored neuroanatomical phenotypes of the 16p11.2 copy number variant. *Nature*, 485, 363-367 (2012).
- Grissom, N.M., McKee, S.E., Schoch, H., Bowman, N., Havekes, R., O'Brien, W.T., Mahrt, E., Siegel, S., Commons, K., Portfors, C., *et al.* Male-specific deficits in natural reward learning in a mouse model of neurodevelopmental disorders. *Mol Psychiatry* 23(3):544-555 (2018).
- Groffen, A.J., Friedrich, R., Brian, E.C., Ashery, U., and Verhage, M. DOC2A and DOC2B are sensors for neuronal activity with unique calcium-dependent and kinetic properties. *J Neurochem* 97:818–833 (2006).
- Guillemin, G.J., Cullen, K.M., Lim, C.K., Smythe, G.A., Garner, B., Kapoor, V., Takikawa, O., and Brew, B.J. Characterization of the kynurenine pathway in human neurons. *J Neurosci* 21;27(47):12884-92 (2007).
- Handsaker, R.E., Korn, J.M., Nemesh, J., and McCarroll, S.A. Discovery and genotyping of genome structural polymorphism by sequencing on a population scale. *Nat Genet* 43(3):269-76 (2011).
- Hanson, E., Bernier, R., Porche, K., Jackson, F.I., Goin-Kochel, R.P., Snyder, L.G., Snow, A.V., Wallace, A.S., Campe, K.L., Zhang, Y., *et al.* The cognitive and behavioral phenotype of the 16p11.2 deletion in a clinically ascertained population. *Biol Psychiatry* 1;77(9):785-93 (2015).
- Harony-Nicolas, H., Kay, M., du Hoffmann, J., Klein, M.E., Bozdagi-Gunal, O., Riad, M., Daskalakis, N.P., Sonar, S., Castillo, P.E., and Hof, P.R. Oxytocin improves behavioral and electrophysiological deficits in a novel Shank3-deficient rat. *Elife* 31;6 (2017).
- Haslinger, D., Waltes, R., Yousaf, A., Lindlar, S., Schneider, I., Lim, C.K., Tsai, M., Garvalov, B.K., Acker-Palmer, A., Krezdorn, N., *et al.* Loss of the Chr16p11.2 ASD candidate gene QPRT leads to aberrant neuronal differentiation in the SH-SY5Y neuronal cell model. *Mol Autism*. 9: 56 (2018).
- He, H., Tan, C., Downey, K.M., and So, A.G. A tumor necrosis factor α - and interleukin 6-inducible protein that interacts with the small subunit of DNA polymerase δ and proliferating cell nuclear antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 9; 98(21): 11979–11984 (2001).
- Henderson, C., Wijetunge, L., Kinoshita, M.N., Shumway, M., Hammond, R.S., Postma, F.R., Brynczka, C., Rush, R., Thomas, A., Paylor, R., *et al.* Reversal of disease-related pathologies in the fragile X mouse model by selective activation of GABAB receptors with arbaclofen. *Sci Transl Med* 4(152):152ra128 (2012).
- Hinkley, L.B.N., Dale, C., Luks, T.L., Findlay, A.M., Bukshpun, P., Pojman, N., Thieu, T., Chung, W.K., Berman, J., Roberts, T.P.L., *et al.* Sensorimotor cortical oscillations during movement preparation in 16p11.2 deletion carriers. *J Neurosci* 3. pii: 3001-17 (2019).

- Horev, G., Ellegood, J., Lerch, J.P., Son, Y.E., Muthuswamy, L., Vogel, H., Krieger, A.M., Buja, A., Henkelman, R.M., Wigler, M., *et al.* Dosage-dependent phenotypes in models of 16p11.2 lesions found in autism. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 17076–17081 (2011).
- Huentelman, M.J., Stephan, D.A., Talboom, J., Corneveaux, J.J., Reiman, D.M., Gerber, J.D., Barnes, C.A., Alexander, G.E., Reiman, E.M., and Bimonte-Nelson, H.A. Peripheral Delivery of a ROCK Inhibitor Improves Learning and Working Memory. *Behav Neurosci* 123(1): 218–223 (2009).
- Iafrate, A.J., Feuk, L., Rivera, M.N., Listewnik, M.L., Donahoe, P.K., Qi, Y., Scherer, S.W., and Lee, C. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 36, 949-951 (2004).
- Ip, J.P.K., Nagakura, I., Petravic, J., Li, K., Wiemer, E.A.C. and Sur, M. Major Vault Protein, a Candidate Gene in 16p11.2 Microdeletion Syndrome, Is Required for the Homeostatic Regulation of Visual Cortical Plasticity *J Neurosci.* 38(16): 3890–3900 (2018).
- Iyer, J., Singh, M.D., Jensen, M., Patel, P., Pizzo, L., Huber, E., Koerselman, H., Weiner, A.T., Lepanto, P., Vadodaria, K., *et al.* Pervasive genetic interactions modulate neurodevelopmental defects of the autism-associated 16p11.2 deletion in *Drosophila melanogaster*. *Nat Commun* 29;9(1):2548 (2018).
- Jacquemont, S., Reymond, A., Zufferey, F., Harewood, L., Walters, R.G., Kutalik, Z., Martinet, D., Shen, Y., Valsesia, A., Beckmann, N.D., *et al.* Mirror extreme BMI phenotypes associated with gene dosage at the chromosome 16p11.2 locus. *Nature* 31;478(7367):97-102 (2011).
- Jacquemont, S., Coe, B.P., Hersch, M., Duyzend, M.H., Krumm, N., Bergmann, S., Beckmann, J.S., Rosenfeld, J.A., and Eichler, E.E. A higher mutational burden in females supports a ‘female protective model’ in neurodevelopmental disorders. *Am J Hum Genet* 94: 415–425 (2014).
- Jamain, S., Quach, H., Betancur, C., Råstam, M., Colineaux, C., Gillberg, I.C., Soderstrom, H., Giros, B., Leboyer, M., Gillberg, C., *et al.* Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat Genet* 34(1):27-9 (2003).
- Jarvis, S.E., and Zamponi, G.W. Masters or slaves? Vesicle release machinery and the regulation of presynaptic calcium channels. *Cell Calcium* 37(5):483-8 (2005).
- Jong, K., Marchiori, E., Meijer, G., Vaart, A.V., and Ylstra, B. Breakpoint identification and smoothing of array comparative genomic hybridization data. *Bioinformatics* 20:3636–7 (2004).
- Karp, N.A., Meehan, T.F., Morgan, H., Mason, J.C., Blake, A., Kurbatova, N., Smedley, D., Jacobsen, J., Mott, R.F., Iyer, V., *et al.* Applying the ARRIVE guidelines to an in vivo database. *PLoS Biol* 13, e1002151 (2015).
- Kilkenny, C., Browne, W.J., Cuthill, I.C., Emerson, M., and Altman, D.G. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* 8, e1000412. (2010).

- Kim, J.H., Lee, S., Kim, J.H., Lee, T.G., Hirata, M., Suh, P.G., and Ryu S. H. Phospholipase D2 directly interacts with aldolase via its PH domain. *Biochemistry* 41, 3414–3421 (2002).
- Kirov, G., Pocklington, A.J., Holmans, P., Ivanov, D., Ikeda, M., Ruderfer, D., Moran, J., Chambert, K., Toncheva, D., Georgieva, L., *et al.* De novo CNV analysis implicates specific abnormalities of postsynaptic signalling complexes in the pathogenesis of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 17(2):142-53 (2012).
- Kojima, T., Fukuda, M., Aruga, J., and Mikoshiba, K. Calcium-dependent phospholipid binding to the C2A domain of a ubiquitous form of double C2 protein (Doc2 beta) *J Biochem* 120:671–676 (1996).
- Kolli, S., Zito, C.I., Mossink, M.H., Wiemer, E.A., and Bennett, A.M. The major vault protein is a novel substrate for the tyrosine phosphatase SHP-2 and scaffold protein in epidermal growth factor signaling. *J Biol Chem* 279(28):29374-85 (2004).
- Kreuder, J., Borkhardt, A., Repp, R., Pekrun, A., Götsche, B., Gottschalk, U., Reichmann, H., Schachenmayr, W., Schlegel, K., Lampert, F. Brief report: inherited metabolic myopathy and hemolysis due to a mutation in aldolase A. *N Engl J Med* Apr 25;334(17):1100-4 (1996).
- Kumar, R.A., KaraMohamed, S., Sudi, J., Conrad, D.F., Brune, C., Badner, J.A., Gilliam, T.C., Nowak, N.J., Cook, E.H. Jr, Dobyns, W.B., *et al.* Recurrent 16p11.2 microdeletions in autism. *Hum Mol Genet* 15;17(4):628-38 (2008).
- Kumar, R.A., Marshall, C.R., Badner, J.A., Babatz, T.D., Mukamel, Z., Aldinger, K.A., Sudi, J., Brune, C.W., Goh, G., KaraMohamed, S., *et al.* Association and Mutation Analyses of 16p11.2 Autism Candidate Genes. *PLoS One* 4(2): e4582 (2009).
- Kusakabe, T., Motoki, K., and Hori, K. Mode of interactions of human aldolase isozymes with cytoskeletons. *Arch. Biochem. Biophys.* 344, 184–193 (1997).
- Kusenda, M., Vacic, V., Malhotra, D., Rodgers, L., Pavon, K., Meth, J., Kumar, R.A., Christian? S.L., Peeters, H., Cho, S.S., *et al.* The Influence of Microdeletions and Microduplications of 16p11.2 on Global Transcription Profiles. *J Child Neurol* 30(14): 1947–1953 (2015).
- Laffin, J.J., Raca, G., Jackson, C.A., Strand, E.A., Jakielski, K.J., and Shriberg, L.D. Novel candidate genes and regions for childhood apraxia of speech identified by array comparative genomic hybridization. *Genet Med* 14(11):928-36 (2012).
- Lai, M., Lombardo, M.V., Ruigrok, A.N.V., Chakrabarti, B., Auyeung, B., Szatmari, P., Happé, F., Baron-Cohen, S. and MRC AIMS Consortium. Quantifying and exploring camouflaging in men and women with autism. *Autism* 21(6): 690–702 (2017).

- Lai, M-C., Baron-Cohen, S., and Buxbaum, J.D. Understanding autism in the light of sex/ gender. *Mol Autism* 6: 1–5 (2015).
- Leblond, C.S., Heinrich, J., Delorme, R., Proepper, C., Betancur, C., Huguet, G., Konyukh, M., Chaste, P., Ey, E., Rastam, M. et al. Genetic and functional analyses of SHANK2 mutations suggest a multiple hit model of autism spectrum disorders. *PLoS Genet* 8(2):e1002521 (2012).
- Lin, G.N., Corominas, R., Lemmens, I., Yang, X., Tavernier, J., Hill, D.E., Vidal, M., Sebat, J., and Iakoucheva, L.M. Spatiotemporal 16p11.2 Protein Network Implicates Cortical Late Mid-Fetal Brain Development and KCTD13-Cul3-RhoA Pathway in Psychiatric Diseases. *Neuron* 85(4): 742–754 (2015).
- Liu, J., Zhou, Y., Liu, S., Song, X., Yang, X.Z., Fan, Y., Chen, W., Akdemir, ZC., Yan, Z., Zuo, Y., et al. The coexistence of copy number variations (CNVs) and single nucleotide polymorphisms (SNPs) at a locus can result in distorted calculations of the significance in associating SNPs to disease. *Hum Genet* 137(6-7):553-567 (2018).
- Liu, P., Carvalho, C.M.B., Hastings, P.J., and Lupskia, J.R. Mechanisms for recurrent and complex human genomic rearrangements. *Curr Opin Genet Dev.* 22(3): 211–220 (2012).
- Lee, S.H., Ripke, S., Neale, B.M., Faraone, S.V., Purcell, S.M., Perlis, R.H., Mowry, B.J., Thapar, A., Goddard, M.E., Witte, J.S., et al. Genetic relationship between five psychiatric disorders estimated from genome-wide SNPs. *Nat Genet* 45(9):984-94 (2013).
- Luo, R., Sanders, S.J., Tian, Y., Voineagu, I., Huang, N., Chu, S.H., Klei, L., Cai, C., Ou, J., Lowe, J.K., et al. Genome-wide transcriptome profiling reveals the functional impact of rare de novo and recurrent CNVs in autism spectrum disorders. *Am J Hum Genet* 13;91(1):38-55 (2012).
- MacDonald, J.R., Ziman, R., Yuen, R.K.C., Feuk, L., and Scherer, S.W. The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome. *Nucleic Acids Res.* 1; 42(Database issue): D986–D992 (20014).
- Macé, A., Tuke, M.A., Deelen, P., Kristiansson, K., Mattsson, H., Nöukas, M., Sapkota, Y., Schick, U., Porcu, E., Rüeger, S.M., et al. CNV-association meta-analysis in 191,161 European adults reveals new loci associated with anthropometric traits. *Nat Commun* 29;8(1):744 (2017).
- Maillard, A.M., Ruef, A., Pizzagalli, F., Migliavacca, E., Hippolyte, L., Adaszewski, S., Dukart, J., Ferrari, C., Conus, P., Männik, K., et al. The 16p11.2 locus modulates brain structures common to autism, schizophrenia and obesity. *Mol Psychiatry* 20(1): 140–147 (2015).
- Maillard, A.M., Hippolyte, L., Rodriguez-Herreros, B., Chawner, S.J., Dremmel, D., Agüera, Z., Fagundo, A.B., Pain, A., Martin-Brevet, S., Hilbert, A., et al. 16p11.2 Locus modulates response to satiety before the onset of obesity. *Int J Obes (Lond)* 40(5):870-6 (2016).

- Malhotra, D., and Sebat, J. CNVs: harbingers of a rare variant revolution in psychiatric genetics. *Cell* 148, 1223–1241 (2012).
- Mandillo, S., Tucci, V., Höltér, S. M., Meziane, H., Banchaabouchi, M. A., Kallnik, M., Lad, H. V., Nolan, P. M., Ouagazzal A. M., Coghill E. L., *et al.* Reliability, robustness, and reproducibility in mouse behavioral phenotyping: a cross-laboratory study. *Physiol. Genomics* 34, 243–255 (2008).
- Marshall, C.R., Noor, A., Vincent, J.B., Lionel, A.C., Feuk, L., Skaug, J., Shago, M., Moessner, R., Pinto, D., Ren, Y., *et al.* Structural variation of chromosomes in autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet* 82(2):477-88 (2008).
- Martin, J., Han, C., Gordon, L.A., Terry, A., Prabhakar, S., She, X., Xie, G., Hellsten, U., Chan, Y.M., and Altherr, M. The sequence and analysis of duplication-rich human chromosome 16. *Nature* 432:988–994 (2004).
- Martin-Brevet, S., Rodríguez-Herreros, B., Nielsen, J.A., Moreau, C., Modenato, C., Maillard, A.M., Pain, A., Richetin, S., Jønch, A.E., Qureshi, A.Y., *et al.* Quantifying the Effects of 16p11.2 Copy Number Variants on Brain Structure: A Multisite Genetic-First Study. *Biol Psychiatry*. 15;84(4):253-264 (2018).
- Martin-Vilchez, S., Whitmore, L., Asmussen, H., Zareno, J., Horwitz, R., and Newell-Litwa, K. RhoGTPase Regulators Orchestrate Distinct Stages of Synaptic Development. *PLoS One* 23;12(1):e0170464 (2017).
- McCarroll, S.A., Hadnott, T.N., Perry, G.H., Sabeti, P.C., Zody, M.C., Barrett, J.C., Dallaire, S., Gabriel, S.B., Lee, C., Daly, M.J., *et al.* Common deletion polymorphisms in the human genome. *Nature Genetics* 38(1):86-92. (2006).
- McCarthy, S.E., Makarov, V., Kirov, G., Addington, A.M., McClellan, J., Yoon, S., Perkins, D.O., Dickel, D.E., Kusenda, M., Krastoshevsky, O., *et al.* Microduplications of 16p11.2 are associated with schizophrenia. *Nat Genet* 41(11):1223-7 (2009).
- Mei, C., Fedorenko, E., Amor, D.J., Boys, A., Hoeflin, C., Carew, P., Burgess, T., Fisher, S.E., and Morgan, A.T. Deep phenotyping of speech and language skills in individuals with 16p11.2 deletion. *Eur J Hum Genet* 26(5):676-686 (2018).
- Michetti, C., Corradi, A., and Benfenati, F. PRRT2, a network stability gene. *Oncotarget* 24;8(34):55770-55771 (2017).
- Mills, R.E., Walter, K., Stewart, C., Handsaker, R.E., Chen, K., Alkan, C., Abyzov, A., Yoon, S.C., Ye, K., Cheetham, R.K., *et al.* Mapping copy number variation by population scale genome sequencing. *Nature* 3; 470(7332): 59–65 (2011).
- Mitra, I., Lavillaureix, A., Yeh, E., Traglia, M., Tsang, K., Bearden, C.E., Rauen, K.A., Weiss, L.A. Reverse pathway genetic approach identifies epistasis in autism spectrum disorders. *PLoS Genet*. 13, e1006516 (2017).

- Miyazaki, T., Hashimoto, K., Uda, K., Sakagami, H., Nakamura, Y., Saito, S.Y., Nishi, M., Kume, H., Tohgo, A., Kaneko, I., *et al.* Disturbance of cerebellar synaptic maturation in mutant mice lacking BSRPs, a novel brain-specific receptor-like protein family. *FEBS Lett.*, 580 pp. 4057-4064 (2006).
- Moore, T.M., Garg, R., Johnson, C., Coptcoat, M.J., Ridley, A.J., and Morris, J.D. PSK, a novel STE20-like kinase derived from prostatic carcinoma that activates the c-Jun N-terminal kinase mitogen-activated protein kinase pathway and regulates actin cytoskeletal organization. *J Biol Chem* 275:4311–4322 (2000).
- Moy, S.S., Nadler, J.J., Perez, A., Barbaro, R.P., Johns, J.M., Magnuson, T.R., Piven, J. and Crawley, J.N. Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes Brain Behav.* 3(5):287-302 (2004).
- Nakayama, M., and Hama, C. Modulation of neurotransmitter receptors and synaptic differentiation by proteins containing complement-related domains. *Neurosci. Res.*, 69 pp. 87-92 (2011).
- Németh, H., Toldi, J., and Vécsei, L. Role of kynurenines in the central and peripheral nervous systems. *Curr Neurovasc Res* 2(3):249-60 (2005).
- Niarchou, M., Chawner, S.J.R.A., Doherty, J.L., Maillard, A.M., Jacquemont, S., Chung, W.K., Green-Snyder L., Bernier, R.A., Goin-Kochel, R.P., Hanson, E., *et al.* Psychiatric disorders in children with 16p11.2 deletion and duplication. *Transl Psychiatry* 16;9(1):8 (2019).
- Ohsugi M., Adachi K., Horai R., Kakuta S., Sudo K., Kotaki H., Tokai-Nishizumi N., Sagara H., Iwakura Y., and Yamamoto T. Kid-mediated chromosome compaction ensures proper nuclear envelope formation. *Cell* 132, 771–782 (2008).
- Okamoto, S., Sherman, K., Bai, G., and Lipton, S.A. Effect of the ubiquitous transcription factors, SP1 and MAZ, on NMDA receptor subunit type 1 (NR1) expression during neuronal differentiation. *Brain Res Mol Brain Res* 15;107(2):89-96 (2002).
- Olivetti, P.R., Maheshwari, A. and Noebels, J.L. Neonatal Estradiol Stimulation Prevents Epilepsy in Arx Model of X-Linked Infantile Spasms Syndrome. *Science Translational Medicine* 6 (2014).
- O'Roak, B.J., Vives, L., Fu, W., Egertson, J.D., Stanaway, I.B., Phelps, I.G., Carvill, G., Kumar, A., Lee, C., Ankenman, K., *et al.* Multiplex targeted sequencing identifies recurrently mutated genes in autism spectrum disorders. *Science*. 338 (6114) (2012).
- Papapetrou, C., Putt, W., Fox, M., and Edwards, Y.H. The human TBX6 gene: cloning and assignment to chromosome 16p11. 2. *Genomics* 55(2):238–241 (1999).
- Park, S.M., Park, H.R., and Lee J.H. MAPK3 at the Autism-Linked Human 16p11.2 Locus Influences Precise Synaptic Target Selection at Drosophila Larval Neuromuscular Junctions. *Mol Cells* 28; 40(2): 151–161 (2017).

- Pearson, T.A., and Manolio, T.A. How to interpret a genome-wide association study. *JAMA*. 299 (11): 1335–44 (2008).
- Peça, J., Feliciano, C., Ting, J.T., Wang, W., Wells, M.F., Venkatraman, T.N., Lascola, C.D., Fu, Z., Feng, G. Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature*. 472 (7344): 437–42 (2011).
- Pellerin, L. Food for thought: The importance of glucose and other energy substrates for sustaining brain function under varying levels of activity. *Diabetes Metab* 36(Suppl 3):S59–S63 (2010).
- Penzes, P., and Rafalovich, I. Regulation of the actin cytoskeleton in dendritic spines. *Adv Exp Med Biol* 970:81–95 (2012).
- Polyak, A., Kubina, R.M., and Girirajan, S. Comorbidity of intellectual disability confounds ascertainment of autism: implications for genetic diagnosis. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 168(7):600–8 (2015).
- Portmann, T., Yang, M., Mao, R., Panagiotakos, G., Ellegood, J., Dolen, G., Bader, P.L., Grueter, B.A., Goold, C., Fisheret, E., *et al.* Behavioral abnormalities and circuit defects in the basal ganglia of a mouse model of 16p11.2 deletion syndrome. *Cell Rep* 7: 1077–1092 (2014).
- Pucilowska, J., Vithayathil, J., Tavares, E.J., Kelly, C., Karlo, J.C., and Landreth, G.E. The 16p11.2 deletion mouse model of autism exhibits altered cortical progenitor proliferation and brain cytoarchitecture linked to the ERK MAPK pathway. *J Neurosci* 18;35(7):3190–200 (2015).
- Pucilowska, J., Vithayathil, J., Pagani, M., Kelly, C., Karlo, J.C., Robol, C., Morella, I., Gozzi, A., Brambilla, R., and Landreth, G.E. Pharmacological Inhibition of ERK Signaling Rescues Pathophysiology and Behavioral Phenotype Associated with 16p11.2 Chromosomal Deletion in Mice. *J Neurosci* 25;38(30):6640–6652 (2018).
- Qureshi, A.Y., Mueller, S., Snyder, A.Z., Mukherjee, P., Berman, J.I., Roberts, T.P., Nagarajan, S.S., Spiro, J.E., Chung, W.K., Sherr, E.H., *et al.* Opposing Brain Differences in 16p11.2 Deletion and Duplication Carriers. *J Neurosci* 20; 34(34): 11199–11211 (2014).
- Raca, G., Baas, B.S., Kirmani, S., Laffin, J.J., Jackson, C.A., Strand, E.A., Jakielski, K.J., and Shriberg, L.D. Childhood Apraxia of Speech (CAS) in two patients with 16p11.2 microdeletion syndrome. *Eur J Hum Genet* 21(4): 455–459 (2013).
- Redaelli, S., Maitz, S., Crosti, F., Sala, E., Villa, N., Spaccini, L., Selicorni, A., Rigoldi, M., Conconi, D., Dalprà, L., *et al.* *Int J Mol Sci* 4;20(5). pii: E1095 (2019).
- Redon, R., Ishikawa, S., Fitch, K.R., Feuk, L., Perry, G.H., Andrews, T.D., Fiegler, H., Shapero, M.H., Carson, A.R., Chen, W., *et al.* Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 23;444(7118):444–54 (2006).

- Reinthal, E.M., Lal, D., Lebon, S., Hildebrand, M.S., Dahl, H.H., Regan, B.M., Feucht, M., Steinböck, H., Neophytou, B., Ronen, G.M., *et al.* 6p11.2 600 kb Duplications confer risk for typical and atypical Rolandic epilepsy. *Hum Mol Genet* 15;23(22):6069-80 (2014).
- Richter, M., Murtaza, N., Scharrenberg, R., White, S.H., Johanns, O., Walker, S., Yuen, R.K., Schwanke, B., Bedürftig, B., Henis, M., *et al.* Altered TAOX2 activity causes autism-related neurodevelopmental and cognitive abnormalities through RhoA signaling. *Mol Psychiatry* 24(9):1329-1350 (2019).
- Risch, N., and Merikangas, K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 13;273(5281):1516-7 (1996).
- Robinson, E.B., Lichtenstein, P., Anckarsäter, H., Happé, F., and Ronald, A. Examining and interpreting the female protective effect against autistic behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 5258–5262 (2013).
- Roll, P., Rudolf, G., Pereira, S., Royer, B., Scheffer, I.E., Massacrier, A., Valenti, M.P., Roedel-Trevisiol, N., Jamali, S., Beclin, C., *et al.* SRPX2 mutations in disorders of language cortex and cognition. *Hum Mol Genet* 15:1195–1207 (2016).
- Ropers, H.H. Genetics of intellectual disability. *Curr Opin Genet Dev* 18(3):241-50 (2008).
- Rosenberg, C., Knijnenburg, J., Bakker, E., Vianna-Morgante, A.M., Sloos, W., Otto, P.A., Kriek, M., Hansson, K., Krepisch-Santos, A.C., Fiegler, H., *et al.* Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents. *J Med Genet* 43(2):180-6 (2006).
- Saha, S., Chant, D., Welham, J., and McGrath, J. A systematic review of the prevalence of schizophrenia. *PLoS Med* 2(5):e141 (2005).
- Sakaguchi, G., Manabe, T., Kobayashi, K., Orita, S., Sasaki, T., Naito, A., Maeda, M., Igarashi, H., Katsuura, G., Nishioka, H., *et al.* Doc2alpha is an activity-dependent modulator of excitatory synaptic transmission. *Eur J Neurosci* 11:4262–4268 (1999).
- Sakai, Y., Shaw, C.A., Dawson, B.C., Dugas, D.V., Al-Mohtaseb, Z., Hill D.E., and Zoghbi, H.Y. Protein interactome reveals converging molecular pathways among autism disorders. *Sci Transl Med* 8;3(86):86ra49 (2011).
- Sanders, S.J., Murtha, M.T., Gupta, A.R., Murdoch, J.D., Raubeson, M.J., Willsey, A.J., Ercan-Sencicek, A.G., DiLullo, N.M., Parikshak, N.N., Stein, J.L. *et al.* De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism. *Nature* 4;485(7397):237-41 (2012).
- Santamaria, A., Nagel, S., Sillje, H. H., and Nigg, E. A. The spindle protein CHICA mediates localization of the chromokinesin Kid to the mitotic spindle. *Curr. Biol.* 18, 723–729 (2008).

- Santolini, M., Romay, M.C., Yukhtman, C.L., Rau, C.D., Ren, S., Saucerman, J.J., Wang, J.J., Weiss, J.N., Wang, Y., Lusic, A.J., *et al.* A personalized, multiomics approach identifies genes involved in cardiac hypertrophy and heart failure. *NPJ Systems Biology and Applications*. 4 (1): 12 (2018).
- Sarasua, S.M., Dwivedi, A., Boccuto, L., Rollins, J.D., Chen, C.F., Rogers, R.C., Phelan, K., DuPont, B.R., Collins, J.S. Association between deletion size and important phenotypes expands the genomic region of interest in Phelan-McDermid syndrome (22q13 deletion syndrome). *Journal of Medical Genetics*. 48 (11): 761–6 (2011).
- Scherer S. Guide to the Human Genome. Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, NY, USA: (2010).
- Scott, F.J., Baron-Cohen, S., Bolton, P., and Brayne, C. Brief report: prevalence of autism spectrum conditions in children aged 5–11 years in Cambridgeshire. *UK Autism* 6:231–7 (2002).
- Sebat, J., Lakshmi, B., Troge, J., Alexandre, J., Young, J., Lundin, P., Månér, S., Massa, H., Walker, M., Chi, M., *et al.* Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* 305, 525-528 (2004).
- Sebat, J., Lakshmi, B., Malhotra, D., Troge, J., Lese-Martin, C., Walsh, T., Yamrom, B., Yoon, S., Krasnitz, A., Kendall, J., *et al.* Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science* 20;316(5823):445-9 (2007).
- Sharp, A.J., Locke, D.P., McGrath, S.D., Cheng, Z., Bailey, J.A., Vallente, R.U., Pertz, L.M., Clark, R.A., Schwartz, S., Segraves, R., *et al.* Segmental duplications and copy-number variation in the human genome. *Am J Hum Genet* 77(1):78-88 (2005).
- Shen, Y., Chen, X., Wang, L., Guo, J., Shen, J., An, Y., Zhu, H., Zhu, Y., Xin, R., Bao, Y., *et al.* Intra-family phenotypic heterogeneity of 16p11.2 deletion carriers in a three-generation Chinese family. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 156(2):225-32 (2011).
- Shimajima, K., Inoue, T., Fujii, Y., Ohno, K., and Yamamoto, T. A familial 593-kb microdeletion of 16p11.2 associated with mental retardation and hemivertebrae. *Eur J Med Genet*. 52(6):433-5 (2009).
- Shinawi, M., Liu, P., Kang, S.H., Shen, J., Belmont, J.W., Scott, D.A., Probst, F.J., Craigen, W.J., Graham, B.H., Pursley, A., *et al.* Recurrent reciprocal 16p11.2 rearrangements associated with global developmental delay, behavioural problems, dysmorphism, epilepsy, and abnormal head size. *J Med Genet* 47(5):332-41 (2010).
- Skarnes, W.C. Rosen, B., West, A.P., Koutsourakis, M., Bushell, W., Iyer, V., Mujica, A.O., Thomas, M., Harrow, J., Cox, T., *et al.* A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature* 474, 337–342 (2011).

- Steinman, K.J., Spence, S.J., Ramocki, M.B., Proud, M.B., Kessler, S.K., Marco, E.J., Green Snyder, L., D'Angelo, D., Chen, Q., Chung, W.K., *et al.* 16p11.2 deletion and duplication: Characterizing neurologic phenotypes in a large clinically ascertained cohort. *Am J Med Genet A* 170(11):2943-2955 (2016).
- Sullivan, P.F., Kendler, K.S., and Neale, M.C. Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Arch Gen Psychiatry* 60(12):1187-92 (2003).
- Sweatt, J.D. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol* 14(3):311-7 (2004).
- Swinkels, W.A.M., Kuyk, J., vanDyck, R., and Spinhovenc, Ph. Psychiatric comorbidity in epilepsy. *Epilepsy Behav*, 7 (1) pp. 37-50 (2005).
- Takemoto, T., Uchikawa, M., Yoshida, M., Bell, D.M., Lovell-Badge, R., Papaioannou, V.E., and Kondoh, H. Tbx6-dependent Sox2 regulation determines neural or mesodermal fate in axial stem cells. *Nature* 470(7334):394–398 (2011).
- Tian, D., Stoppel, L.J., Heynen, A.J., Lindemann, L., Jaeschke, G., Mills, A.A., and Bear, M.F. Contribution of mGluR5 to pathophysiology in a mouse model of human chromosome 16p11.2 microdeletion. *Nat Neurosci* 18: 182–184 (2015).
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3(7):RESEARCH0034 (2002).
- Veenstra-VanderWeele, J., Cook, E.H., King, B.H., Zarevics, P., Cherubini, M., Walton-Bowen, K., Bear, M.F., Wang, P.P., and Carpenter, R.L. Arbaclofen in children and adolescents with autism spectrum disorder: a randomized, controlled, phase 2 trial. *Neuropsychopharmacology* 42: 1390–1398 (2017).
- Vissers, L. E., de Vries, B.B.A., Osoegawa, K., Janssen, I.M., Feuth, T., Choy, C.O., Straatman, H., van der Vliet, W., Huys, E.H.L.P.G., van Rijk, A., *et al.* Array-based comparative genomic hybridization for the genome-wide detection of submicroscopic chromosomal abnormalities. *American Journal of Human Genetics* 73, 1261–1270 (2003).
- von Kriegsheim, A. Baiocchi, D., Birtwistle, M., Sumpton, D., Bienvenut, W., Morrice, N., Yamada, K., Lamond, A., Kalna, G., Orton, R., *et al.* Cell fate decisions are specified by the dynamic ERK interactome. *Nat. Cell Biol.* 11, 1458–1464 (2009).
- Vlaskamp, D.R.M., Callenbach, P.M.C., Rump, P., Giannini, L.A.A., Brilstra, E.H., Dijkhuizen, T., Vos, Y.J., van der Kevie-Kersemaekers, A.F., Knijnenburg, J., de Leeuw, N., *et al.* PRRT2-related phenotypes in patients with a 16p11.2 deletion. *Eur J Med Genet* 62(4):265-269 (2019).

- Walsh, T., McClellan, J.M., McCarthy, S.E., Addington, A.M., Pierce, S.B., Cooper, G.M., Nord, A.S., Kusenda, M., Malhotra, D., Bhandari, A., *et al.* Rare Structural Variants Disrupt Multiple Genes in Neurodevelopmental Pathways in Schizophrenia. *Science* 320:539–543 (2008).
- Walters, R.G., Jacquemont, S., Valsesia, A., de Smith, A.J., Martinet, D., Andersson, J., Falchi, M., Chen, F., Andrieux, J., Lobbens, S., *et al.* A new highly penetrant form of obesity due to deletions on chromosome 16p11.2. *Nature* 4;463(7281):671-5 (2010).
- Watabe-Rudolph, M., Schlautmann, N., Papaioannou, V.E., and Gossler, A. The mouse rib-vertebrae mutation is a hypomorphic Tbx6 allele. *Mech Dev* 119(2):251-6 (2002).
- Waterston, R.H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J.F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., *et al.* Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 5;420(6915):520-62 (2002).
- Weiss, L.A., Shen, Y., Korn, J.M., Arking, D.E., Miller, D.T., Fossdal, R., Saemundsen, E., Stefansson, H., Ferreira, M.A., Green, T., *et al.* Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. *N Engl J Med* 14;358(7):667-75 (2008).
- Wirth A. Rho kinase and hypertension. *Biochim. Biophys. Acta* 1802:1276–1284 (2010).
- Yaguchi, H., Yabe, I., Takahashi, H., Watanabe, M., Nomura, T., Kano, T., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Watanabe, M., and Hatakeyama, S. Sez6l2 regulates phosphorylation of ADD and neuritogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 9;494(1-2):234-241 (2017).
- Yan, Z., Kim, E., Datta, D., Lewis, D.A., and Soderling S.H. Synaptic Actin Dysregulation, a Convergent Mechanism of Mental Disorders? *J Neurosci* 9; 36(45): 11411–11417 (2016).
- Yang, M., Mahrt, E.J., Lewis, F., Foley, G., Portmann, T., Dolmetsch, R.E. Portfors, C.V., and Crawley, J.N. 16p11.2 deletion syndrome mice display sensory and ultrasonic vocalization deficits during social interactions. *Autism Res* 8: 507–521 (2015).
- Yasuhiko, Y., Kitajima, S., Takahashi, Y., Oginuma, M., Kagiwada, H., Kanno, J., and Saga Y. Functional importance of evolutionally conserved Tbx6 binding sites in the presomitic mesoderm-specific enhancer of Mesp2. *Development* Nov;135(21):3511-9 (2008).
- Zufferey, F., Sherr, E.H., Beckmann, N.D., Hanson, E., Maillard, A.M., Hippolyte, L., Macé, A., Ferrari, C., Kutalik, Z., Andrieux, J., *et al.* A 600 kb deletion syndrome at 16p11.2 leads to energy imbalance and neuropsychiatric disorders. *J Med Genet* 49(10):660-8 (2012).

Approches génétiques et thérapeutiques visant à comprendre et atténuer les conséquences de la délétion et duplication de la région 16p11.2 dans des modèles précliniques

Résumé

Les variations du nombre de copies (CNVs) des régions chromosomiques sont une source importante de variabilité chez l'humain. Ainsi certaines altérations structurales ont été associées à des maladies syndromiques comme les CNVs de la région 16p11.2. En effet la délétion et la duplication de cette région représentent un facteur de risque important pour le diagnostic de troubles du neurodéveloppement, tels que la déficience intellectuelle et les troubles du spectre autistique (ASD). Pourtant, la grande densité en gènes de la région et la forte variabilité phénotypique, avec la pénétrance incomplète des traits phénotypiques, rendent leur étude complexe. La modélisation chez la souris des réarrangements 16p11.2 a permis d'identifier plusieurs déficits cognitifs similaire aux traits humains afin d'identifier gènes responsables et comprendre les mécanismes moléculaires affectés.

Les projets de recherche présentés dans ce manuscrit consistent en l'identification de gènes candidats à partir de la caractérisation comportementale de modèles d'inactivation génétique et le développement d'approches thérapeutiques afin de restaurer les phénotypes associés à la délétion de la région 16p11.2 chez la souris. En outre, nous avons également engagé la création de modèles porteurs des réarrangements 16p11.2 chez le rat. Grâce à ces nouveaux modèles, nous avons retrouvé des désordres de l'interaction sociale, un phénotype associé à l'autisme, ce qui rend ces modèles très pertinents pour la compréhension de ces désordres. Finalement, la caractérisation comportementale des modèles 16p11.2 à partir de ces deux espèces a mis en évidence un dimorphisme sexuel : les femelles porteuses de la délétion étant moins affectées que les mâles. La similitude retrouvée entre ces modèles animaux dans nos études et le biais sexuel des cas porteurs des réarrangements 16p11.2 avec l'ASD ou la déficience intellectuelle chez l'homme ouvre des perspectives intéressantes pour le développement de traitements futurs. Ce travail s'inscrit dans une perspective plus large qui permette de comprendre le rôle des gènes de la région dans le développement neurologique et leurs effets sur le comportement afin de comprendre et améliorer la pathologie humaine associée aux CNVs 16p11.2.

Variations du nombre de copies, déficience intellectuelle, autisme, modèles murins, gènes candidats et biais sexuel

Résumé en anglais

Variations in copy number (CNVs) of chromosomal regions are an important source of variability in humans. Thus some structural alterations have been associated with syndromic diseases such as the CNVs of the 16p11.2 region. Indeed deletion and duplication of this region represent an important risk factor for the diagnosis of neurodevelopmental disorders, such as intellectual disability and Autism Spectrum Disorder (ASD). However, the high gene density of the region and the high phenotypic variability, with incomplete penetrance of phenotypic traits, make their study complex. Mouse modeling of 16p11.2 rearrangements has allowed to identify several cognitive deficits similar to human traits for the purpose of identify responsible genes and to understand the molecular mechanisms affected.

The work presented in this manuscript consists of the identification of candidate genes from the behavioral characterization of genetic inactivation models and the development of therapeutic approaches to restore the phenotypes associated with the 16p11.2 deletion in the mouse. In addition, we also initiated the creation of models carrying 16p11.2 rearrangements in rats. Thanks to these models, we found disorders of social interaction, a phenotype associated with autism, which makes these models very relevant for the understanding of these disorders. Finally, the behavioral characterization of the 16p11.2 models from these two species revealed a sexual dimorphism: the females carrying the deletion are less affected than the males. The similarity found between these models in our studies and the sexual bias of cases carrying 16p11.2 rearrangements with ASD or intellectual disability in humans open interesting prospects for the development of future treatments. This work is part of a wider perspective that allows to understand the role of genes of the region in neurodevelopment to understand and improve the human pathology associated with CNVs 16p11.2.

Copy number variation, intellectual disability, autism, murine models, candidate genes and sexual bias