

Université de Montréal

Tbc1d7 joue un rôle dans la mémoire à long terme et la croissance cervicale chez la souris

Par

Eve Racette

Département de neurosciences, Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de maîtrise en Neurosciences

Avril 2022

© Racette, 2022

Université de Montréal

Unité académique : Département de Neurosciences, Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé

Tbc1d7 joue un rôle dans la mémoire à long terme et la croissance cervicale chez la souris

Présenté par

Eve Racette

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Philippe Roux

Président-rapporteur

Jacques L Michaud

Directeur de recherche

Jannic Boehm

Membre du jury

Résumé

La déficience intellectuelle (DI) est un désordre neurodéveloppemental commun affectant 2-3% de la population. Dans les cas de DI, il y a une prévalence de mutations affectant des voies de signalisation neurodéveloppementales, comme celle du complexe 1 de la cible de la rapamycine chez les mammifères (mTORC1). Elle est hyperactive dans certains cas de DI, causant une augmentation de la croissance cellulaire. Des mutations des sous-unités 1 et 2 du complexe de la sclérose tubéreuse (*TSC1* et *TSC2*), des régulateurs de mTORC1, causent la sclérose tubéreuse de Bourneville (TSC), qui présente des signes cliniques comme la DI, l'autisme et l'épilepsie. Des mutations tronquantes bialléliques du membre 7 de la famille à domaine TBC1 (*TBC1D7*), un stabilisateur du complexe TSC1-TSC2, ont été rapportées chez des patients présentant une DI accompagnée de mégalencéphalie. Notre hypothèse est que la perte de *TBC1D7* cause une hyperactivité de mTORC1 à la base des signes cliniques observés. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons généré, à l'aide de CRISPR-Cas9, un modèle murin de perte de fonction de *Tbc1d7*. L'absence de *Tbc1d7* a été confirmée à l'aide de Western Blot. Comme les patients, les souris *Tbc1d7* *-/-* sont viables et se développent normalement. Elles présentent également des déficits cognitifs au Test de l'enfouissement de billes et à la mémoire de peur à long terme, ainsi qu'une augmentation de la masse cervicale. Ces résultats suggèrent que *Tbc1d7* joue un rôle essentiel dans la cognition et dans la croissance d'organes.

Mots-clés : Déficience intellectuelle, mégalencéphalie, mTORC1, sclérose tubéreuse de Bourneville, maladie autosomale récessive

Abstract

Intellectual disability (DI) is a common disorder affecting 2-3% of the population. Although in most cases the aetiology of DI is unknown, mutations in important developmental pathways are a common cause of DI. One of them is the mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) pathway; it is abnormally upregulated in some cases of DI, causing aberrant cell growth. Mutations in TSC complex subunit 1 and 2 (*TSC1* and *TSC2*), the two main negative regulators of mTORC1 activity, cause Tuberous Sclerosis Complex (TSC), in which DI, autism and epilepsy are common features. As a stabilizer of TSC1-TSC2 interaction, TBC1 domain family member 7 (TBC1D7) plays an important role in the negative regulation of mTORC1 activity. Patients with biallelic truncating mutations in *TBC1D7* present clinical features such as DI, behavioural abnormalities and megalencephaly. Our hypothesis is that the loss of TBC1D7 causes an increase in mTORC1 signalling in the brain and secondarily DI and megalencephaly. To verify these hypotheses, we have generated a *Tbc1d7* loss of function mouse model using CRISPR-Cas9 technology. The absence of *Tbc1d7* in these mice was confirmed by Western Blot. Consistent with the patients, *Tbc1d7* *-/-* mice are viable and develop normally. Behaviourally, *Tbc1d7* *-/-* mice display hypoactivity in the marble burying paradigm and impairments in contextual long term fear memory. *Tbc1d7* *-/-* mice also display significantly heavier brains. These results suggest that *Tbc1d7* is necessary for higher order brain functions like cognition, as well as for the regulation of organ, but not somatic, growth.

Keywords : Intellectual disability, megalencephaly, mTORC1, tuberous sclerosis complex, autosomal recessive disorder

Table des matières

Résumé.....	5
Abstract	7
Table des matières	9
Liste des tableaux.....	13
Liste des figures.....	15
Liste des sigles et abréviations.....	17
Remerciements	21
Introduction.....	23
Voie de signalisation du complexe 1 de la cible de la rapamycine chez les mammifères (mTORC1)	23
mTORC1 est un régulateur du métabolisme cellulaire	23
mTORC1 stimule la synthèse de protéines par rétrocontrôle positif	25
mTORC1 est régulé de façon indépendante par les facteurs de croissance et les acides aminés	25
Influence des facteurs de croissance sur l'activité de mTORC1	26
Influence des acides aminés sur l'activité de mTORC1	26
mTORC1 influence le développement du système nerveux	27
mTORC1 joue un rôle dans la réorganisation de réseaux neuronaux	28
mTORC1 est associé à diverses maladies	29
Régulation de mTOR par voie pharmacologique.....	30
Régulation pharmacologique de mTORC1 en oncologie	30
Régulation pharmacologique de mTORC1 comme traitement neurologique	31

Développement de nouveaux agents de régulation pharmacologique de mTORC1.....	32
Complexe TSC1-TSC2-TBC1D7	33
Le complexe TSC1-TSC2-TBC1D7 interagit avec RHEB au lysosome	33
Le complexe TSC1-TSC2-TBC1D7 inhibe mTORC1 en conditions énergétiquement appauvries.....	33
La dissociation du complexe TSC1-TSC2-TBC1D7 du lysosome permet l'activité de mTORC1 en conditions énergétiquement propices	34
La stabilité du complexe TSC1-TSC2-TBC1D7 dépend de la présence de chacune de ses sous-unités	35
TBC1D7 est conservé évolutivement.....	37
Modélisation de déficits associés à la voie mTORC1	38
Les modèles <i>in vitro</i> de suppression des composantes du complexe TSC1-TSC2-TBC1D7 ont des altérations morphologiques	38
Les modèles <i>in vivo</i> de suppression des composantes du complexe TSC1-TSC2-TBC1D7 ont des altérations morphologiques et comportementales.....	38
Les modèles <i>in vivo</i> de dérégulation de la voie mTORC1 ont des altérations morphologiques et comportementales.....	39
Certains modèles murins de maladies n'étant pas classifiées comme mTOR-opathies présentent une altération de la voie mTORC1	40
Les patients atteints de TSC et du syndrome TBC1D7 sont affectés différemment.....	41
Les patients atteints de TSC présentent un large éventail de déficits communs.....	41
Les mutations de <i>TBC1D7</i> causent un syndrome.....	42
Diverses mutations de <i>TBC1D7</i> sont retrouvées chez les patients.....	42
Le syndrome TBC1D7 possède un éventail de signes cliniques incertain.....	43
L'étude biochimique des lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCL) dérivées des patients révèle une hyperactivation de la voie mTORC1	43

Des mutations de TBC1D7 sont aussi associées à d'autres maladies	44
But et hypothèses	45
Matériel et méthodes	46
Stratégie de production du modèle murin	46
Souris utilisées.....	50
Design expérimental- tests comportementaux	50
Test d'enfouissement de billes	52
Test du labyrinthe en T.....	54
Test en champ ouvert	54
Test de reconnaissance de nouveaux objets	55
Test du conditionnement contextuel à la peur.....	57
Confirmation de la délétion de <i>Tbc1d7</i> chez la souris <i>Tbc1d7</i> <i>-/-</i>	59
Préparation d'échantillons de protéines	59
Test de Bradford.....	59
WB	60
Mesure de la masse du cerveau	61
Analyses statistiques	61
Résultats	63
Caractérisation génétique du modèle murin <i>Tbc1d7</i> <i>-/-</i>	63
Le modèle murin <i>Tbc1d7</i> <i>-/-</i> possède une délétion des exons 3 et 4.....	63
Les souris <i>Tbc1d7</i> <i>-/-</i> n'expriment pas <i>Tbc1d7</i>	65
Caractérisation comportementale des souris <i>Tbc1d7</i> <i>-/-</i>	66
Les souris <i>Tbc1d7</i> <i>-/-</i> sont hypoactives au test d'enfouissement de billes.....	66

Les souris <i>Tbc1d7</i> <i>-/-</i> n'ont pas de déficits de mémoire de travail au test du labyrinthe en T	68
Les souris <i>Tbc1d7</i> <i>-/-</i> n'ont pas de déficits comportementaux en champ ouvert.....	70
Les souris <i>Tbc1d7</i> <i>-/-</i> n'ont pas de déficits mnésiques au test de reconnaissance de nouveaux objets	71
Les souris <i>Tbc1d7</i> <i>-/-</i> ont un déficit de mémoire de peur à long terme au test de conditionnement contextuel à la peur.....	73
Caractérisation de la mégalencéphalie chez les souris <i>Tbc1d7</i> <i>-/-</i>	77
Les souris <i>Tbc1d7</i> <i>-/-</i> de sexe masculin présentent une augmentation de la masse du cerveau	77
Discussion	80
Comportements répétitifs	80
Locomotion et comportements exploratoires	80
Anxiété	81
Apprentissage	81
Mémoire	82
Masse du cerveau	84
Perspectives.....	86
Conclusions.....	88
Références bibliographiques.....	89

Liste des tableaux

Tableau 1. –	Détails concernant le protocole de production du modèle murin	49
Tableau 2. –	Tableau comparatif des phénotypes observés chez les patients et les souris	79

Liste des figures

Figure 1. Schéma non-exhaustif des voies de signalisation mTORC1 et mTORC2.....	24
Figure 2. Représentation schématique à l'échelle de la stratégie de production du modèle murin.	47
Figure 3. Schéma représentatif de la configuration des billes lors du test d'enfouissement de billes.....	53
Figure 4. Représentation schématique du paradigme de test de reconnaissance de nouveaux objets.....	56
Figure 5. Représentation schématique du protocole utilisé pour le test de conditionnement contextuel à la peur.	58
Figure 6. Ratio de génotypes découlant d'un croisement <i>Tbc1d7</i> ^{-/+} x <i>Tbc1d7</i> ^{-/+}	64
Figure 7. Confirmation de la perte d'expression de <i>Tbc1d7</i> chez les souris <i>Tbc1d7</i> ^{-/-}	65
Figure 8. Activité des souris <i>Tbc1d7</i> ^{-/-} au test d'enfouissement de billes.....	67
Figure 9. Alternation des souris <i>Tbc1d7</i> ^{-/-} au test du labyrinthe en T.....	69
Figure 10. Activité des souris <i>Tbc1d7</i> ^{-/-} au Test en champ ouvert.	70
Figure 11. Exploration des objets par les souris <i>Tbc1d7</i> ^{-/-} au test de reconnaissance de nouveaux objets.	72
Figure 12. Apprentissage de la peur chez les souris <i>Tbc1d7</i> ^{-/-} au test du conditionnement contextuel à la peur.	74
Figure 13. Mémoire et discrimination du contexte des souris <i>Tbc1d7</i> ^{-/-} au test de conditionnement contextuel à la peur.....	76
Figure 14. Phénotype physique retrouvé chez les souris <i>Tbc1d7</i> ^{-/-}	78

Liste des sigles et abréviations

DI : Déficience intellectuelle

mTORC1 : Complexe 1 de la cible de la rapamycine chez les mammifères

TSC1 : Sous-unité 1 du complexe de la sclérose tubéreuse

TSC2 : Sous-unité 2 du complexe de la sclérose tubéreuse

TSC : Sclérose tubéreuse de Bourneville

TBC1D7 : Membre 7 de la famille à domaine TBC1

RHEB : Ras enrichi dans le cerveau

S6K : Kinase de la protéine ribosomale S6

4EBP1 : Partenaire de liaison du facteur d'initiation 4E de la traduction eucaryotique

ATG : Protéine liée à l'autophagie

EIF4 : facteur d'initiation de la traduction eucaryote 4E

CAD : Carbamyl-phosphate synthétase II, Aspartate carbamoyltransférase, Dihydroorotase

PI3K : Kinase phosphatidylinositol-3

AKT : Protéine kinase B

χ KO : Suppression fonctionnelle de la protéine χ

LTP : Potentialisation à long terme

LTD : Dépression à long terme

TSA : Troubles du spectre de l'autisme

vATPases : ATPases à protons vacuolaires

LAMP : Protéine membranaire associée au lysosome

HEK293FT / HEK293T: Cellules 293 embryonnaires de rein humain

MEF : Fibroblastes d'embryons de souris

SDS : Dodécylsulfate de sodium

HeLa : Lignée cellulaire cancéreuse « Henrietta Lacks »

ARN : Acide ribonucléique

siARN : Petit ARN interférent

PTEN : Homologue de la phosphatase et tensine

IRM : Imagerie par résonance magnétique

LCL : Lignée cellulaire lymphoblastoïde

WB : Immunobavardage

NMD : Voie de dégradation des ARN non-sens

TS : Syndrome de Gilles de la Tourette

TDAH : Trouble de déficit d'attention avec hyperactivité

MICAM: McGill Integrated Core for Animal Modeling

ADN: Acide désoxyribonucléique

NHEJ: Mécanisme de réparation non-homologue

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

HRM : Fusion des courbes à haute résolution

PFA : Paraformaldéhyde

OCT : Composé de température de coupe optimal

PVDF : Polyfluorure de vinylidène

BSA : Sérum d'albumine de bovin

HRP : Peroxidase de raifort

ANOVA : Analyse de la variance

Douter de moi est la plus grande faveur que vous m'ayez faite

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, Dr Jacques L Michaud, qui a eu suffisamment confiance en moi pour me confier un nouveau projet aussi important et qui a accordé une valeur substantielle à mon opinion scientifique dès nos premiers échanges. J'espère sincèrement que nos chemins se croiseront dans le futur et que nous aurons de nouveau l'occasion de travailler ensemble.

Je tiens aussi à remercier tous les membres du laboratoire et des laboratoires adjacents, autant ceux qui s'y trouvent toujours que ceux qui ont suivi un autre chemin. Ils ont su rendre mon parcours tellement plus agréable par le biais d'activités, d'échanges enrichissant autant sur le plan scientifique que personnel, de blagues douteuses, de citations hors contexte et de multiples bruits de bouche. Je suis éternellement reconnaissante d'avoir passé ces dernières années aux côtés de personnes aussi exquises que vous.

Je tiens également à remercier mes « cheerleaders » personnels, sans qui je ne serais pas où je suis aujourd'hui. Je tiens à remercier mon copain, mes amis et ma famille, qui, pour la plupart, sont dans des domaines très éloignés du mien mais démontrent un réel intérêt pour mes expériences scientifiques et mes anecdotes d'études comportementales.

Pour finir, je tiens à remercier mes souris, auxquelles je suis devenue bien attachée et avec lesquelles j'ai pris plaisir à travailler. Elles m'ont fourni un nombre incalculable d'anecdotes farfelues et m'ont ouvert les yeux sur leur ressemblance à l'humain, avec leurs personnalités variées et leurs comportements affectueux.

À tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ma réussite, merci.

Introduction

Voie de signalisation du complexe 1 de la cible de la rapamycine chez les mammifères (mTORC1)

mTORC1 est un régulateur du métabolisme cellulaire

mTORC1 est un complexe protéique agissant comme régulateur du métabolisme cellulaire, qui permet de maintenir l'homéostasie entre le catabolisme et l'anabolisme, afin de générer diverses composantes cellulaires, permettant ainsi à la cellule de survivre. mTOR existe sous deux formes : la forme mTORC1, activée par un homologue de Ras, petite protéine possédant une activité GTPase, enrichi dans le cerveau (RHEB), est sensible à la rapamycine alors que la forme mTORC2 n'est ni activée par RHEB, ni sensible à la rapamycine de façon directe, bien qu'elle le soit chroniquement à cause de l'interaction des voies mTORC1 et mTORC2 (Li et al., 2014; Dibble and Cantley, 2015). Le complexe mTORC1 gère, entre autres, la synthèse protéique, la synthèse lipidique, l'autophagie, etc. Dans la cellule, l'activation de mTORC1 stimule la synthèse de protéines, de lipides, d'acides nucléiques, etc. Ceci se fait entre autres via la phosphorylation par mTORC1 de la kinase de la protéine ribosomale S6 (S6K) et la phosphorylation du partenaire de liaison du facteur d'initiation 4E de la traduction eucaryotique (4EBP1), des effecteurs en aval de mTORC1. De même, mTORC1 inhibe la lipolyse, l'autophagie et la β -oxydation. Ceci se fait entre autres par le biais de l'inhibition d'autres effecteurs comme la famille des protéines liées à l'autophagie (ATG) (Betz and Hall, 2013; Normen and Suter, 2013; Demetriades et al., 2014; Dibble and Cantley, 2015) (Figure 1).

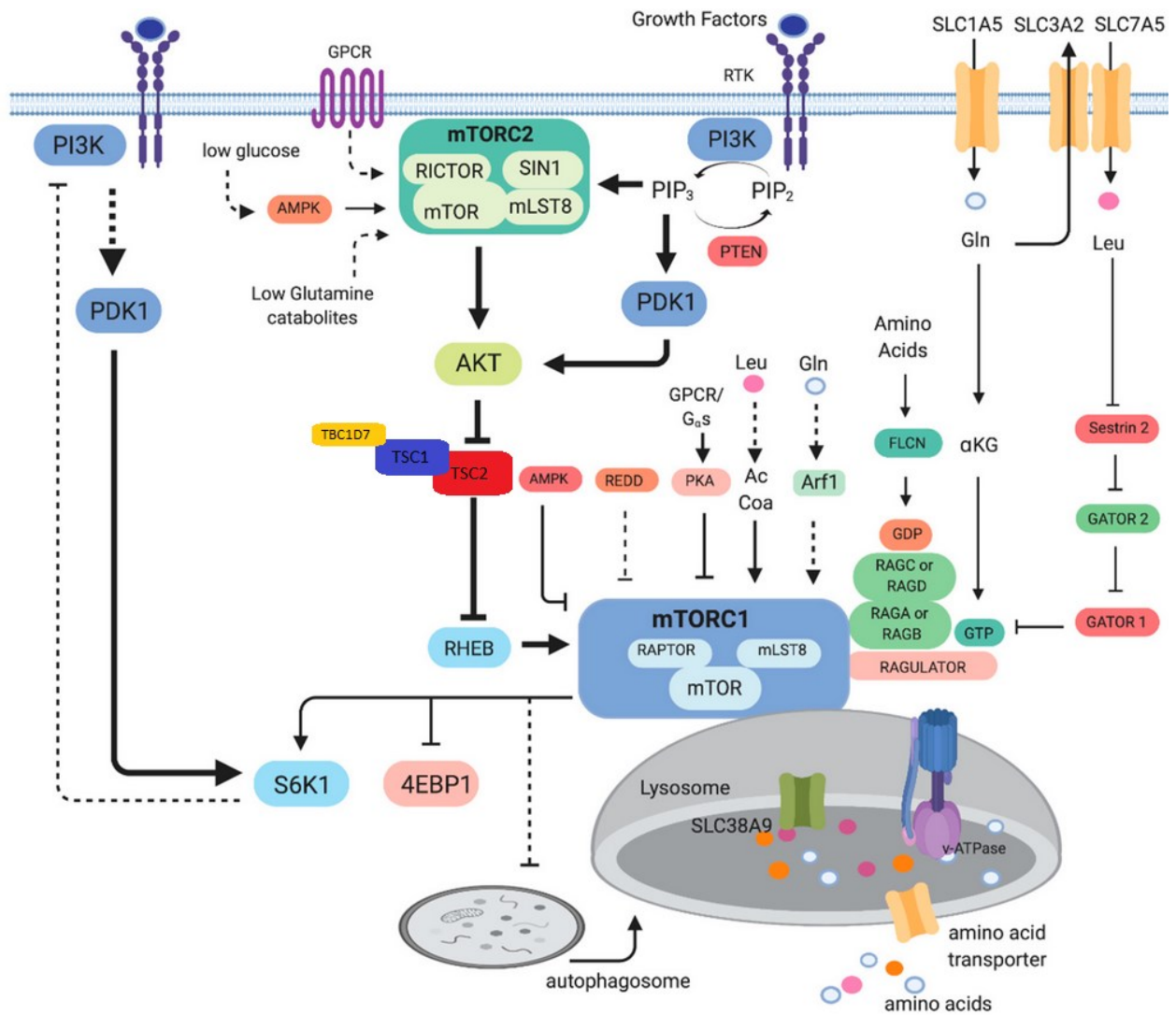


Figure 1. Schéma non-exhaustif des voies de signalisation mTORC1 et mTORC2.

La voie de signalisation mTORC1 est régulée par une variété d'acteurs, comme les facteurs de croissance et les acides aminés. Sa régulation permet de maintenir le métabolisme cellulaire en état d'homéostasie en fonction de l'état nutritif de la cellule, en agissant sur la synthèse et la dégradation de multiples composantes cellulaires. Ce schéma est une adaptation de Magaway, Cedric et al. (Magaway et al., 2019).

mTORC1 stimule la synthèse de protéines par rétrocontrôle positif

mTORC1 stimule la synthèse protéique de bien des façons. Lorsqu'activés, les effecteurs de mTORC1 jouent un rôle pro-translationnel. Par exemple, la phosphorylation de S6K permet l'activation de facteurs d'initiation de traduction comme le facteur d'initiation de la traduction eucaryote 4E (EIF4) B ainsi que la dégradation d'autres protéines comme PDCD4, un inhibiteur de EIF4. MTORC1 phosphoryle aussi 4EBP1. Lorsque retrouvée sous sa forme non-phosphorylée, 4EBP1 séquestre EIF4E afin de limiter l'assemblage du complexe d'initiation de la traduction. La phosphorylation de 4EBP1 par mTORC1 permet alors la libération de EIF4E et l'assemblage subséquent du complexe d'initiation, causant une augmentation de la traduction (Saxton and Sabatini, 2017). Bien que mTORC1 augmente la synthèse protéique de façon globale, la traduction de certains types d'ARNm est enrichie par rapport aux autres. Certains exemples, comme les protéines ribosomales et d'autres acteurs de la synthèse protéique, mettent en évidence un mécanisme de rétroaction positive en ce qui a trait à la synthèse des protéines lors de l'activation de mTORC1 (Belelovsky et al., 2009; Morita et al., 2015; Saxton and Sabatini, 2017).

En plus de stimuler la traduction, l'activité de mTORC1 permet la synthèse de nucléotides. Ceci se fait via l'induction de la voie des pentoses phosphates et de la voie Carbamyl-phosphate synthétase II, Aspartate carbamoyltransférase, Dihydroorotase (CAD). Cette augmentation de la synthèse de nucléotides accroît leur biodisponibilité, permettant de générer rapidement des ARNs (Morita et al., 2015; Saxton and Sabatini, 2017). mTORC1 stimule la production d'ARNr et d'ARNt, mettant en exergue son rôle primordial dans chaque étape menant à la synthèse protéique (Morita et al., 2015).

mTORC1 est régulé de façon indépendante par les facteurs de croissance et les acides aminés

Considérant son rôle dans la régulation du métabolisme cellulaire, la localisation subcellulaire de mTORC1 change en fonction des conditions énergétiques, lui permettant une régulation appropriée des voies de signalisation en aval. Dans des conditions riches en acides aminés et/ou en facteurs de croissance, mTORC1 se trouve à la surface du lysosome, d'où son activité principale est médiée (Betz and Hall, 2013; Demetriades et al., 2014). De plus, l'activité optimale de mTORC1 est

atteinte lorsqu'il y a présence d'acides aminés *et* de facteurs de croissance dans le milieu. Cela étant dit, dans les cas d'absence de facteurs de croissance, mTORC1 ne devient pas complètement inactif bien que sa liaison au lysosome soit faible. Cependant, dans les cas d'absence d'acides aminés, même en présence de facteurs de croissance, mTORC1 se détache complètement du lysosome, inactivant les voies de signalisation en aval (Dibble and Cantley, 2015). Il est important de noter que la voie mTORC1 est régulée de façon indépendante par la présence d'acides aminés et de facteurs de croissance dans le milieu (Menon et al., 2014; Dibble and Cantley, 2015) (Figure 1).

Influence des facteurs de croissance sur l'activité de mTORC1

La régulation de mTORC1 par les facteurs de croissance se fait en plusieurs étapes. D'abord, la kinase phosphatidylinositol-3 (PI3K) est activée et phosphoryle la protéine kinase B (AKT), qui est à son tour activée. AKT ira à son tour phosphoryler la sous-unité 2 du complexe de la sclérose tubéreuse (TSC2), un régulateur négatif de RHEB, à 5 sites d'inactivation. La phosphorylation de ces sites cause le détachement de TSC2 de RHEB et l'arrêt de son activité GTPase sur RHEB, désinhibant ce dernier. La désinhibition de RHEB permet alors l'activation de mTORC1 (Huang and Manning, 2008; Graber et al., 2013; Norrmen and Suter, 2013; Dibble and Cantley, 2015). Dans le cas où mTORC1 est activé par cette voie de manière prolongée, un mécanisme de rétrocontrôle inhibe l'activité de PI3K et de AKT pour arrêter l'activité de mTORC1 (Norrmen and Suter, 2013).

Influence des acides aminés sur l'activité de mTORC1

En plus d'être régulé par la présence de facteurs de croissance, la voie mTORC1 est régulée par la présence d'acides aminés. Cette voie de régulation de mTORC1 est distincte de la voie des facteurs de croissance puisque la localisation subcellulaire de mTORC1 est contrôlée ici par le complexe RAGULATOR et le complexe GATOR1, plutôt que par RHEB (Graber et al., 2013). RAGULATOR est un complexe qui recrute mTORC1 à la membrane lysosomale dans des conditions riches en acides aminés pour l'activer (Bar-Peled et al., 2012; Graber et al., 2013). Quant à lui, GATOR1 est un complexe qui inhibe la liaison de mTORC1 au lysosome, et donc son activité,

dans des conditions appauvries en acides aminés (Baldassari et al., 2016). Par ailleurs, la présence d'acides aminés dans la cellule est détectée par différentes protéines se trouvant dans le cytoplasme et dans la lumière des lysosomes (Shimobayashi and Hall, 2016). De même, lorsqu'une privation en acides aminés est détectée, l'activité de GATOR1 inhibe mTORC1 pour permettre la lyse protéique via les lysosomes afin de fournir la cellule en acides aminés recyclés. Dans le cas d'une privation prolongée, mTORC1 est réactivé par des acides aminés provenant de la lyse protéique afin de limiter l'autophagie (Betz and Hall, 2013).

mTORC1 influence le développement du système nerveux

Globalement, la voie mTORC1 module une multitude de processus neuronaux comme la prolifération cellulaire, la croissance cellulaire, la migration, le développement des neurites, l'excitabilité membranaire, la transmission synaptique, etc (Potheraveedu et al., 2017; Karalis and Bateup, 2021). Il est connu que l'activité de mTORC1 est nécessaire pour la signalisation Notch. Cette dernière joue un rôle dans l'inhibition latérale afin de contrôler la différenciation de certains neuroblastes en neurones. (Sanes et al., 2012b, a). Multiples expériences menées *in vitro* et *ex vivo* suggèrent que la voie de signalisation Notch et la voie de signalisation mTORC1 agissent de concert pour réguler la croissance cellulaire et la prolifération. Il a d'ailleurs été montré qu'une activité accrue de mTORC1 dans les tumeurs de patients TSC étaient accompagnée d'une hyperactivation de la voie STAT3/p63/Jagged1/Notch/HES1 (Karbowniczek et al., 2010; Ma et al., 2010). Ces observations ont aussi été faites dans des tumeurs de souris *Tsc2*^{-/+}. Des expériences menées dans des MEFs dont *Tsc2* a été partiellement supprimé ont montré une augmentation d'activité de Notch, ainsi qu'une absence de différenciation cellulaire. Ce phénotype est renversé par l'administration de rapamycine. Chez les MEFs de type sauvage la présence de rapamycine inhibe la différenciation, indiquant que la modulation de l'activité de mTORC1 est nécessaire à la différenciation cellulaire induite par Notch (Ma et al., 2010). Il a d'ailleurs été proposé que l'activité accrue de Notch chez les patients TSC est à la base de bien des observations effectuées chez ces patients, comme des cellules mal différenciées et des tumeurs particulièrement résistantes (Karbowniczek et al., 2010).

La dérégulation de la voie mTORC1 pendant le développement est accompagnée d'anomalies retrouvées au sein du système nerveux central. Par exemple, l'hyperactivation de mTORC1 au sein

de neuroblastes *in vitro* cause une division asymétrique prématurée, entraînant une différenciation hâtive des neuroblastes aux dépens de la conservation du phénotype de cellule souche (Potheraveedu et al., 2017). Par ailleurs, chez les souris dont mTORC1 est fonctionnellement supprimé (*mTORC1 KO*), on retrouve une diminution de l'épaisseur des zones ventriculaires et sous-ventriculaire au niveau des éminences ganglionnaires pendant le développement. Le nombre de cellules en prolifération se trouve également à être diminué chez ces souris. Ces dernières présentent aussi une diminution du nombre d'interneurones exprimant la Calbindine. Les déficits neurodéveloppementaux observés chez les souris *mTORC1 KO* sont un exemple flagrant de l'importance de la voie mTORC1 dans une variété de processus cruciaux au développement du système nerveux central (Ka et al., 2017). Il n'est alors pas étonnant que des maladies neurodéveloppementales émergent fréquemment d'une régulation inefficace de cette voie de signalisation, tel qu'exploré dans la section « mTORC1 est associé à diverses maladies ».

mTORC1 joue un rôle dans la réorganisation de réseaux neuronaux

La voie mTORC1 est importante pendant le développement et elle demeure active au cours de la vie entière afin de conserver l'homéostasie cellulaire et de permettre la réorganisation synaptique qui accompagne l'utilisation de réseaux neuronaux spécifiques (Lim and Crino, 2013). En effet, mTORC1 régule la plasticité synaptique via son rôle dans la potentialisation à long terme (LTP) et la dépression à long terme (LTD) au sein des synapses de l'hippocampe et du cortex cérébral (Deli et al., 2012). De plus, il a été montré que l'activité de S6K et de 4EBP1, deux des effecteurs principaux de mTORC1 agissant dans la synthèse protéique, est nécessaire à la plasticité synaptique (Potheraveedu et al., 2017). La synthèse protéique est connue comme jouant un rôle primordial dans la plasticité synaptique puisqu'elle permet de modifier des composantes pré- et post-synaptiques, comme les récepteurs se trouvant à la membrane et les neuropeptides relâchés lors de la signalisation, pour nommer quelques exemples (Rajgor et al., 2021). En outre, l'activité de mTORC1 est primordiale lors de l'apprentissage en général, à cause de son rôle dans la plasticité synaptique. D'ailleurs, les périodes où la plasticité synaptique est accrue en réaction à la stimulation sont considérées comme des périodes critiques. Pendant ces périodes de durée relativement courte, l'apprentissage de fonctions ou de tâches spécifiques est au summum de l'efficacité puisque les synapses les plus importantes pour ces tâches se renforcent alors que celles d'utilité moindre sont

éliminées rapidement. L'existence de ces périodes critiques a été démontrée pour des fonctions comme l'apprentissage des langues, associée au cortex auditif primaire, ainsi que la vision, associée au cortex visuel primaire (Wiesel and Hubel, 1963; Hensch, 2005; Patton et al., 2019). La fermeture de ces périodes critiques est associée à une diminution de la plasticité synaptique au sein des réseaux impliqués, ainsi qu'une difficulté accrue à apprendre de nouvelles tâches liées à ce réseau (Patton et al., 2019). Prenons l'exemple drastique du cas « d'enfants sauvages », qui ont été complètement isolés de toute stimulation linguistique pendant la période critique de l'apprentissage du langage. Malgré leur exposition intensive à des stimulations linguistiques à l'adolescence, ils peinent à apprendre une première langue à cet âge et ce déficit se maintient à l'âge adulte. Cela étant dit, la fermeture d'une période critique n'implique pas l'absence d'apprentissage médié par la plasticité synaptique, tel qu'indiqué par l'apprentissage d'un vocabulaire rudimentaire chez les « enfants sauvages ». (Vyshedskiy et al., 2017) Des altérations de la période critique sont également retrouvées dans des modèles murins de diverses maladies neurodéveloppementales associées à la déficience intellectuelle comme le syndrome du X fragile, la neurofibromatose de type 1, le syndrome de Rett, etc (van Lier et al., 2020). Ces observations mettent en exergue l'importance d'avoir une régulation en continu du remodelage neuronal afin de permettre des apprentissages tout au long de la vie.

mTORC1 est associé à diverses maladies

Considérant son rôle primordial dans la prolifération cellulaire, mTORC1 est reconnu comme un oncogène. Il est d'ailleurs une cible pharmacologique fréquente pour ce qui est du traitement de divers cancers (Hillmann and Fabbro, 2019). La dérégulation de la voie mTORC1 est également associée à des maladies métaboliques comme le diabète et l'obésité (Li et al., 2014). De plus, mTORC1 est impliqué dans bien d'autres maladies associées à des excès de croissance et des dysfonctions du système nerveux central d'ordres variés. En effet, des mutations de multiples acteurs de la voie de signalisation mTORC1, comme PTEN, AKT, TSC1, TSC2, PI3KCD, PIK3CA, etc, sont impliquées dans des syndromes d'hypercroissance (Meffre et al., 2012; Hillmann and Fabbro, 2019). Plusieurs de ces syndromes possèdent des signes cliniques communs comme la macrocéphalie/mégalencéphalie et des déficiences intellectuelles. Dans bien des cas de mégalencéphalie ou d'hémimégalencéphalie, l'organisation générale du cerveau est conservée,

malgré que l'on retrouve dans certains cas des dysplasies, des désorganisations corticales, des tubercules corticaux, etc, comme dans le cas de mutations touchant TSC2 ou la sous-unité 1 du complexe de la sclérose tubéreuse (TSC1) (Butler et al., 2005; Lim and Crino, 2013; Hillmann and Fabbro, 2019). De plus, certaines maladies qui ne sont pas communément considérées comme des mTOR-opathies ont des altérations de cette voie de signalisation, comme le syndrome du X Fragile, le syndrome de Down, les troubles du spectre de l'autisme (TSA) idiopathiques, etc (Karalis and Bateup, 2021).

Régulation de mTOR par voie pharmacologique

L'utilisation aigue de la rapamycine, un inhibiteur allostérique de mTORC1, diminue la signalisation de la voie mTORC1, sans affecter la voie mTORC2. Par contre, le traitement chronique à la rapamycine altère ces deux voies de signalisation à cause de l'interaction entre celles-ci (Li et al., 2014). La rapamycine et les rapalogues, comme everolimus, sirolimus et temsirolimus pour en nommer quelques exemples, sont utilisés comme traitements oncologiques, mais aussi comme traitements d'immunosuppression et de maladies neurologiques (Li et al., 2014; Hillmann and Fabbro, 2019). Leur action est principalement au niveau de l'inhibition de la phosphorylation de S6K en aval de mTORC1, bien qu'à court terme la phosphorylation de 4EBP1 est également inhibée par ceux-ci. Il a également été proposé que la rapamycine permettrait d'augmenter l'autophagie; par contre cet effet est limité chez les mammifères (Choo et al., 2008; Huang and Manning, 2008; Li et al., 2014; Hillmann and Fabbro, 2019; Karalis and Bateup, 2021).

Régulation pharmacologique de mTORC1 en oncologie

Dans le cas des traitements en oncologie, les doses utilisées d'inhibiteurs de mTORC1 ou de AKT doivent permettre de diminuer l'activité de mTORC1 de 90% pour être efficaces. Ceci s'accompagne souvent d'effets secondaires indésirables, comme la suppression du système immunitaire, l'hyperglycémie, la fatigue, la dépression, etc (Li et al., 2014; Hillmann and Fabbro, 2019). Cela étant dit, ces doses sont inappropriées en ce qui a trait au traitement de symptômes purement neurologiques, puisqu'elles posent un risque plus élevé que les bénéfices attendus pour les patients.

Régulation pharmacologique de mTORC1 comme traitement neurologique

Certaines études d'administration de rapamycine chez les souris ont montré qu'une administration intermittente de faibles doses de rapamycine pouvait maintenir une inhibition efficace de mTORC1, en limitant les effets secondaires associés à son administration chronique (Karalis and Bateup, 2021). D'ailleurs une étude d'administration de rapamycine par voie orale suggère l'amélioration de la performance cognitive chez les jeunes souris et la diminution du déclin cognitif chez les souris âgées. Cette étude a montré qu'une diminution de l'activité de la voie mTORC1 de 30% est suffisante pour améliorer les capacités d'apprentissage et de mémorisation des souris dans des tâches de mémoire spatiale, en plus de diminuer les comportements caractéristiques de la dépression et de l'anxiété (Halloran et al., 2012).

Lorsque transposé dans des modèles d'hyperactivité pathologique de la voie mTORC1, comme chez des souris *Tsc1* $-/+$ et *Tsc2* $-/+$, l'administration de rapamycine constitue un traitement efficace contre les épilepsies, les déficits de mémoire spatiale et l'hyperactivation de la voie mTORC1 (Deli et al., 2012; Cambiaghi et al., 2013). Cela étant dit, il a également été montré que l'administration de rapamycine par infusion hippocampique, directement après une tâche d'apprentissage de la peur, inhibe la formation et la consolidation de mémoire de peur. Son administration par infusion dans le cortex préfrontal médian cause une perte de la mémoire de peur à long terme, en laissant la mémoire de peur à court terme intacte (Deli et al., 2012). Ces résultats suggèrent que la rapamycine et les rapalogues peuvent être un traitement efficace de plusieurs symptômes neurologiques mais que leur utilisation doit être planifiée de façon à diminuer de façon modérée et intermittente l'activité de mTORC1, afin de limiter les effets secondaires indésirables.

Cela étant dit, des études cliniques récentes utilisant everolimus comme traitement neurologique ont été réalisées chez des patients présentant un TSA ou une sclérose tubéreuse de Bourneville (TSC). Les résultats de ces études sont peu concluants quant à l'efficacité de la rapamycine ou de ses analogues pour traiter les symptômes neurologiques associés à ces maladies neurodéveloppementales. Par contre, ces résultats peuvent être attribuables à une variété de facteurs, dont la variabilité de l'âge, la variabilité du dosage utilisé, le nombre de traitements symptomatiques utilisés au préalable, ainsi que le degré probablement peu optimal d'inhibition de mTORC1 (Mizuguchi et al., 2019; Overwater et al., 2019). Des études cliniques plus rigoureuses tenant en compte les facteurs mentionnés ci-haut devraient être réalisées avant de trancher sur

l'efficacité d'un traitement à la rapamycine ou aux rapalogues pour les déficits cognitifs associés à diverses maladies neurodéveloppementales.

Développement de nouveaux agents de régulation pharmacologique de mTORC1

Considérant les limites de l'utilisation d'inhibiteurs classiques de la voie mTORC1 et AKT, d'autres composés pharmacologiques agissant sur la voie mTORC1 sont actuellement en développement, comme DL001 et EN6. EN6 est une petite molécule particulièrement prometteuse qui, *in vivo*, diminue la phosphorylation de S6K ainsi que celle de 4EBP1, en plus d'augmenter l'autophagie, le tout, sans altérer la signalisation AKT (Karalis and Bateup, 2021). Cette inhibition de la voie mTORC1 est médiée par l'interaction covalente entre EN6 et la sous-unité ATP6V1A des ATPases à protons vacuolaires (vATPases) des lysosomes, qui cause un changement conformationnel menant au découplage des v-ATPases et de RAGULATOR. Ce découplage inhibe ainsi le recrutement de mTORC1 au lysosome. EN6 agit sur la voie mTORC1, et ce, sans affecter la voie mTORC2, limitant les effets secondaires associés à l'inhibition chronique de cette voie (Chung et al., 2019). Quant à lui, DL001 est un composé agissant sur FKBP12 de la même façon que la rapamycine. L'avantage principal de son utilisation est que DL001 est beaucoup plus sélectif pour mTORC1 que la rapamycine, ce qui lui confère des propriétés thérapeutiques semblables, tout en limitant les effets secondaires métaboliques et immunitaires causés par l'inhibition de mTORC2 lors d'un traitement chronique à la rapamycine (Schreiber et al., 2019).

Complexe TSC1-TSC2-TBC1D7

Le complexe TSC1-TSC2-TBC1D7 interagit avec RHEB au lysosome

Le complexe composé de TSC1, TSC2 et du membre 7 de la famille à domaine TBC1 (TBC1D7) est reconnu comme étant un intégrateur des signaux de stress, des facteurs de croissance, des nutriments, etc, qui permet de réguler plusieurs processus cellulaires, dont la croissance cellulaire, la synthèse protéique et le métabolisme cellulaire (Huang and Manning, 2008). C'est à la surface du lysosome que le complexe TSC1-TSC2-TBC1D7 inhibe RHEB, l'activateur principal de la voie mTORC1 en réponse à l'absence de facteurs de croissance (Huang and Manning, 2008; Dibble and Cantley, 2015). En effet, un modèle d'activation constitutive de Rheb au stade embryonnaire E15 chez la souris a montré que l'activité de Rheb cause l'augmentation de la phosphorylation de S6K, un effecteur de la voie mTORC1, directement en aval de celui-ci (Nguyen et al., 2019). De façon intéressante, l'activation constitutive de Rheb a aussi pour effet de causer de l'hypertrophie neuronale et la myélinisation excessive, et ce, même à faible activation constitutive. À plus fortes doses, elle cause également l'épilepsie, ainsi qu'une migration neuronale inadéquate (Norrmen and Suter, 2013; Nguyen et al., 2019). RHEB joue aussi un rôle dans la voie de signalisation Notch et son activation constitutive dans les neuroblastes cause leur différenciation prématurée et altère la migration neuronale. RHEB joue aussi un rôle dans le maintien du complexe TSC1-TSC2-TBC1D7 à la surface du lysosome en absence de facteurs de croissance (Potheraveedu et al., 2017). Il a été montré que lorsque RHEB est partiellement supprimé, le complexe TSC1-TSC2-TBC1D7 se trouve au niveau du cytoplasme, où il est inactif, comme dans des conditions énergétiquement propices à la croissance et la prolifération cellulaire (Menon et al., 2014).

Le complexe TSC1-TSC2-TBC1D7 inhibe mTORC1 en conditions énergétiquement appauvries

En absence de facteurs de croissance, le complexe TSC1-TSC2-TBC1D7 se retrouve en grande majorité à la surface du lysosome et ses sous-unités sont colocalisées avec la protéine membranaire associée au lysosome (LAMP) 2 (Huang and Manning, 2008; Menon et al., 2014; Dibble and Cantley, 2015). Des études de colocalisation en immunofluorescence réalisées dans des cellules 293 embryonnaires de rein humain (HEK293FT) ont montré que TSC2 est colocalisé avec LAMP2

en conditions énergétiquement appauvries. Par ailleurs, le retrait d'acides aminés du milieu de culture cause cet effet après seulement 15 minutes (Demetriades et al., 2014).

De façon surprenante, lorsque TSC1 ou TBC1D7 est partiellement supprimé de fibroblastes d'embryons de souris (MEF), la localisation de TSC2 aux lysosomes n'est pas affectée, malgré que la quantité totale de TSC2 soit diminuée. De plus, l'activité RHEB-GAP inhibitrice de TSC2 est diminuée, indépendamment de la phosphorylation par AKT, rendant la signalisation mTORC1 résistante au retrait de facteurs de croissance (Dibble et al., 2012; Betz and Hall, 2013). Ceci suggère que TSC2 a la capacité de se lier au lysosome en l'absence de la formation du complexe TSC1-TSC2-TBC1D7, mais que sa présence et son utilité y sont limitées par un manque de stabilité et une dégradation accrue (Dibble and Cantley, 2015). Dans des MEFS *TSC2*^{-/-}, le retrait d'acides aminés du milieu cause une augmentation de l'activité de la voie mTORC1 jusqu'à deux jours plus tard, après quoi les cellules commencent à mourir (Demetriades et al., 2014). Ceci suggère que la présence de TSC2 et sa fonction au lysosome sont nécessaires pour avoir une réponse appropriée à la privation énergétique, qu'elle provienne d'un manquement en facteurs de croissance ou en acides aminés.

De plus, dans des cellules dont TBC1D7 a été partiellement supprimé, on note une augmentation de la phosphorylation d'effecteurs de la voie de signalisation mTORC1, comme S6K, S6 et 4EBP1, dans des conditions appauvries en facteurs de croissance. Ceci suggère que dans ces cellules, l'activation de la voie mTORC1 devient indépendante de l'état énergétique de la cellule. Cela étant dit, le retrait des acides aminés du milieu cause un délai d'induction de l'autophagie mais ne cause pas une augmentation de l'activité de mTORC1 (Dibble et al., 2012; Betz and Hall, 2013). Ces résultats suggèrent que la présence de TBC1D7 est nécessaire à la régulation négative de mTORC1 en réponse à l'absence de facteurs de croissance, mais pas d'acides aminés.

La dissociation du complexe TSC1-TSC2-TBC1D7 du lysosome permet l'activité de mTORC1 en conditions énergétiquement propices

La signalisation par l'insuline et les facteurs de croissance cause une dissociation du complexe TSC1-TSC2-TBC1D7 de la surface du lysosome par le biais de la signalisation AKT. L'activation subséquente de mTORC1 peut être observée après seulement 15 minutes de stimulation insulinique

(Huang and Manning, 2008; Menon et al., 2014; Dibble and Cantley, 2015). Globalement, le glucose, l'énergie, les facteurs de croissance et l'oxygène ont un effet inhibiteur sur le complexe TSC1-TSC2-TBC1D7, permettant l'activité de RHEB, donc celle de mTORC1. Le mécanisme par lequel RHEB active mTORC1 est toujours peu connu (Dibble and Cantley, 2015). Il est important de noter que la signalisation insulinique ne fait que stimuler le retrait du complexe TSC1-TSC2-TBC1D7 de la membrane lysosomale, sans modifier la stabilité du complexe (Menon et al., 2014). En effet, la signalisation insulinique réduit le degré de colocalisation entre TBC1D7 et LAMP 1, mais pas celle entre TBC1D7 et TSC2, indiquant que le complexe se retire du lysosome en demeurant intact. Dans ces conditions, une certaine quantité de TSC1 et de TSC2 monomériques demeure liée aux lysosomes, indiquant que seul le complexe intact se dissocie de la membrane lysosomale lors de la stimulation par l'insuline. Le retrait du complexe TSC1-TSC2-TBC1D7 de la membrane lysosomale en conditions énergétiquement riches est indépendant de la présence ou non d'acides aminés dans le milieu (Menon et al., 2014).

La stabilité du complexe TSC1-TSC2-TBC1D7 dépend de la présence de chacune de ses sous-unités

La formation du complexe TSC1-TSC2-TBC1D7 est médiée par la formation de deux sous-complexes, soit TSC1-TBC1D7 et TSC1-TSC2. TBC1D7 n'interagit de façon directe qu'avec TSC1, qui lui permet d'interagir de façon indirecte avec TSC2 (Yang et al., 2021). L'interaction entre le sous-complexe TSC1-TBC1D7 est régie par le biais d'acides aminés comme la Valine88, la Valine94 et la Leucine114, retrouvés dans les hélices $\alpha 4$ et $\alpha 5$ de TBC1D7. Ces hélices sont encodées par l'exon 4 de TBC1D7. Lorsque cet exon est supprimé par stratégie de délétion en phase du cadre de lecture dans des HEK293T, il y a abolition de la liaison du sous complexe TSC1-TBC1D7, suggérant que cette région est critique à leur interaction (Santiago Lima et al., 2014). TBC1D7 interagit également avec une deuxième molécule de TSC1 à l'aide de l'extrémité C-terminale de son hélice $\alpha 4$. Un dimère de TSC1 s'assemble grâce à une interaction parallèle entre leurs hélices $\alpha 1$ respectives pour former un lien de type coiled coil. Le sous-complexe TSC1-TBC1D7 s'assemble naturellement en hétérotétramère, composé de 2 molécules de TSC1 et de 2 molécules de TBC1D7 (Santiago Lima et al., 2014; Gai et al., 2016; Qin et al., 2016). TBC1D7 peut également être retrouvé sous forme monomérique, dans quel cas son patron d'expression est

diffus au sein du cytoplasme. En présence de TSC1, son patron d'expression devient principalement partiellement diffus et partiellement ponctiforme, indiquant son agglomération sous forme de complexe à la surface de compartiments subcellulaires (Gai et al., 2016). Cela étant dit, la forme monomérique de TBC1D7 est peu stable et est caractérisée par un rythme de renouvellement très rapide lorsque traité à la cycloheximide, un inhibiteur de synthèse protéique, comparativement à la forme retrouvée en sous-complexe avec TSC1 (Dibble et al., 2012).

L'interaction de TBC1D7 avec le sous-complexe TSC1-TSC2 a été confirmée par radioimmunoprécipitation réciproque à l'aide d'anticorps contre TSC1, TSC2 et TBC1D7. De plus, une étude de spectrométrie de masse a révélé que sous forme de complexe, le ratio stœchiométrique du complexe TSC1-TSC2-TBC1D7 est de 1:1:1, mais que ce ratio peut changer en fonction des concentrations de chaque molécule présente dans le milieu (Dibble et al., 2012; Qin et al., 2016). La masse endogène du complexe a été évaluée à 2MDa, ce qui correspond à un complexe hétérotrimérique composé de pentamères de chaque sous-unité (Menon et al., 2014). Ce complexe est particulièrement stable et résiste à des concentrations salines largement supérieures à la normale physiologique, sans pour autant résister à des concentrations élevées de dodécylsulfate de sodium (SDS) (Dibble et al., 2012). Par contre, lorsqu'une de ses composantes est manquante, le complexe TSC1-TSC2-TBC1D7 se dégrade rapidement. Ceci a été démontré à l'aide d'une lignée cellulaire cancéreuse « Henrietta Lacks » (HeLa) dont TSC1 a été partiellement supprimé à l'aide de petits acides ribonucléiques (ARNs) interférents (siARN). Dans ces HeLa, TBC1D7 est retrouvé uniquement sous sa forme monomérique et n'interagit pas avec TSC2. Dans une lignée différente de HeLa dont TSC2 a été partiellement supprimé, TBC1D7 et TSC1 se lient, mais de façon largement amoindrie par rapport à la normale. La majorité de TBC1D7 se retrouve sous sa forme monomérique. Dans une troisième lignée où TBC1D7 est partiellement supprimé, TSC1 et TSC2 sont retrouvés uniquement sous leurs formes monomériques. Cette étude suggère que la présence de TBC1D7 et son association avec TSC1 sont nécessaires à la formation du complexe TSC1-TSC2-TBC1D7 (Dibble et al., 2012; Fitzian et al., 2021). De plus, les mutations de *TSC1* engendrent une dégradation de TSC2, suggérant la nécessité de l'association du sous-complexe TSC1-TSC2, donc du complexe TSC1-TSC2-TBC1D7 dans son entièreté, pour la stabilité de ses composantes (Huang and Manning, 2008).

TBC1D7 est conservé évolutivement

TBC1D7 est une protéine, générée à partir d'un transcrit composée de 7 exons codants (8 exons au total), comportant un total de 293 acides aminés. Elle est hautement conservée évolutivement et sa forme globalement globulaire est constituée de 15 hélices α . Sa région d'interaction avec TSC1 est particulièrement bien conservée, suggérant l'existence d'orthologues du sous-complexe TBC1D7-TSC1 chez une grande variété d'eucaryotes (Gai et al., 2016). TBC1D7 est retrouvé au niveau du cytoplasme, ainsi que dans le noyau et à la surface de membranes d'une multitude de compartiments subcellulaires dépendamment de l'apport énergétique (Sato et al., 2010). L'ARN de TBC1D7 est exprimé de façon non-spécifique dans une grande variété de tissus, autant chez l'humain que chez la souris. Cela étant dit, des données d'hybridation *in situ* chez la souris ont montré une expression plus élevée de TBC1D7 dans le néocortex, dans l'hippocampe, ainsi que dans l'amygdale, trois régions communément associées avec les fonctions cognitives supérieures (Allen Mouse Brain Atlas).

Modélisation de déficits associés à la voie mTORC1

Les modèles *in vitro* de suppression des composantes du complexe TSC1-TSC2-TBC1D7 ont des altérations morphologiques

De façon semblable à l'activation constitutive de RHEB *in vitro*, la suppression de TSC1 au sein de certaines cellules dans du tissu sain cause une augmentation de la taille du soma des cellules transfectées. La taille des cellules double en 20 jours, suggérant une hyperactivation de mTORC1. Des effets similaires sont observés en supprimant TSC2 (Tavazoie et al., 2005). De même, dans les cellules dont TBC1D7 est partiellement supprimé, on retrouve une augmentation de la taille des cellules, après seulement 24h (Dibble et al., 2012). Ces résultats suggèrent que la taille du soma dépend de l'activité régulatrice du complexe TSC1-TSC2-TBC1D7 et que cette régulation n'a pas lieu si une de ses composantes est dysfonctionnelle.

Les modèles *in vivo* de suppression des composantes du complexe TSC1-TSC2-TBC1D7 ont des altérations morphologiques et comportementales

En ce qui a trait aux modèles *in vivo*, les mutations dominantes causant une perte de fonction de Tsc1 chez la drosophile sont associées à une augmentation de la taille des yeux, causée par une augmentation de la prolifération cellulaire additionnée à une augmentation de la taille du soma (Huang and Manning, 2008). Chez la drosophile dont *Tbc1d7* a été supprimé, il y a également une augmentation de la croissance cellulaire, qui cause secondairement une hypertrophie des organes. Ces drosophiles sont globalement plus grosses que les drosophiles de type sauvage lorsqu'elles sont jeunes mais aussi à l'âge adulte (Ren et al., 2018). Les souris affectées d'une délétion conditionnelle de *Tsc1* possèdent également des neurones plus gros et une augmentation du nombre d'épines dendritiques, malgré leur arborisation dendritique primaire normale. Ces déficits neuroanatomiques sont corrigés par la rapamycine (Tang et al., 2014). Globalement, chez les modèles murins *Tsc1*^{-/+} et *Tsc2*^{-/+}, on retrouve des altérations morphologiques des neurones comme un soma plus large et des épines dendritiques plus longues et évasées. On retrouve également des déficits synaptiques au niveau de la signalisation glutamatergique chez ces souris, ainsi que des déficits de la LTD. Ces souris présentent également des déficits cognitifs lors de l'évaluation comportementale (Tavazoie et al., 2005; Potheraveedu et al., 2017).

Les modèles *in vivo* de dérégulation de la voie mTORC1 ont des altérations morphologiques et comportementales

La suppression conditionnelle d'ATG7, une protéine liée à l'autophagie en aval de mTORC1, chez la souris inhibe l'élagage synaptique, sans affecter la production de nouvelles épines dendritiques. Les déficits comportementaux retrouvés chez ces souris sont similaires à ceux retrouvés chez des souris *Tsc1*^{-/+} ou *Tsc2*^{-/+} (Tang et al., 2014). De plus, l'administration de rapamycine renverse les déficits comportementaux des souris *Tsc2*^{-/+} mais pas des souris avec suppression conditionnelle d'ATG7, suggérant la nécessité de l'activation de l'autophagie pour la cognition. Ceci renforce aussi l'idée que les inhibiteurs classiques de la voie mTORC1 ont une efficacité limitée puisqu'ils n'ont pas d'effets sur l'entièreté de ses effecteurs, seulement sur certains d'entre eux comme S6K (Choo et al., 2008; Tang et al., 2014; Karalis and Bateup, 2021).

De plus, les souris avec suppression de l'homologue de la phosphatase et tensine (PTEN), un inhibiteur de l'activation de la voie PI3K-AKT en amont de mTORC1, présentent une hyperactivité de la voie mTORC1. Celle-ci est accompagnée d'une hypertrophie neuronale, d'une arborisation dendritique anormale, de la macrocéphalie, de l'épilepsie et des problèmes d'apprentissage social. De plus, ces souris présentent une augmentation globale de la relâche synaptique de neurotransmetteurs (Graber et al., 2013; Lim and Crino, 2013). Ces souris présentent également une augmentation de la myélinisation, qui est renversée par la rapamycine (Norrmen and Suter, 2013).

Des souris possédant des mutations de gain de fonction de EIF4, un acteur principal de la traduction en aval de mTORC1, ont une traduction protéique accrue. EIF4 est une sous-unité du complexe d'initiation de la traduction, qui facilite le recrutement des ARNm aux ribosomes et qui est séquestrée par 4EBP1 jusqu'à la phosphorylation de 4EBP1 par mTORC1 (Santini et al., 2013; Morita et al., 2015). Chez ces souris, la traduction protéique accrue a pour conséquence de causer des anomalies synaptiques, dont une LTD accrue au sein de l'hippocampe ainsi qu'une augmentation de récepteurs métabotropiques au glutamate. Ces altérations sont également associées à la présence de comportements répétitifs, l'altération des comportements sociaux, ainsi qu'à des problèmes de flexibilité cognitive au Morris Water Maze et au test de l'extinction de la peur. Cette étude suggère que l'augmentation de la traduction dans un modèle murin peut mener à

des phénotypes comportementaux rappelant ceux des souris modélisant des TSA (Santini et al., 2013).

Ensemble, ces résultats suggèrent qu'une dérégulation de la voie mTORC1, qu'elle soit en amont ou en aval de celle-ci, cause des effets délétères chez les modèles murins. Elles se traduisent par des signes similaires, mais réagissent différemment à un seul et même traitement. Ceci renforce l'intérêt du séquençage génomique dans le diagnostic des patients, afin de leur proposer un traitement approprié.

Certains modèles murins de maladies n'étant pas classifiées comme mTOR-opathies présentent une altération de la voie mTORC1

Dans bien des cas, même des maladies qui ne sont pas considérées à la base comme des mTOR-opathies présentent des altérations dans la signalisation mTORC1. Par exemple, dans des modèles du syndrome de Rett, associé à des mutations de *MECP2*, on note une diminution de la signalisation mTORC1, ainsi que de la phosphorylation d'effecteurs en aval comme S6K. Ces souris possèdent une arborisation dendritique simplifiée et un dysfonctionnement synaptique (Yuan et al., 2020). De plus, dans certains modèles murins de schizophrénie, on note une augmentation de l'activité de la voie mTORC1 dans le cortex préfrontal. Ces souris présentent également des déficits comportementaux associés à la schizophrénie, tels que des déficits sociaux et cognitifs (Meffre et al., 2012).

Les patients atteints de TSC et du syndrome TBC1D7 sont affectés différemment

Les patients atteints de TSC présentent un large éventail de déficits communs

Les patients ayant des mutations de *TSC1* ou de *TSC2* ont un syndrome autosomal dominant, la TSC, qui se caractérise entre autres par une présence d'hamartomes cérébraux, d'hydrocéphalie, d'épilepsie réfractaire, de déficience intellectuelle et de TSA (Crino, 2013). Plusieurs comorbidités sont associées à la TSC comme des problèmes d'humeur, d'anxiété ainsi que de flexibilité au sens cognitif (Cambiaghi et al., 2013). La majorité des patients TSC ont également des malformations focales dans le lobe frontal, comme des tubercules corticaux, qui se calcifient parfois avec l'âge (Crino, 2013; Nguyen et al., 2019). Ceux-ci peuvent varier en grosseur, mais leur taille n'est en aucun cas corrélée à la sévérité des symptômes retrouvés chez les patients. De plus, les patients ont généralement une myélinisation anormale, ainsi qu'une teneur élevée en astrocytes au sein des tubercules corticaux, suggérant un déficit particulier dans la régulation de la production et la lyse de lipides au sein de celles-ci (Crino, 2013; Karalis and Bateup, 2021).

En temps normal, l'activité de la voie mTORC1 diminue avec l'âge. Par contre, cette diminution n'est pas retrouvée chez les patients *TSC2*^{-/+}. De plus, l'autophagie est grandement diminuée chez ces patients, ce qui résulte en une augmentation de la densité d'épines dendritique des neurones pyramidaux de la couche 5 dans le lobe temporal, sans modification de la longueur ou du diamètre des épines dendritiques. Ceci suggère que la diminution de l'autophagie cause une diminution de l'élagage synaptique lors de la période de raffinement. Ces déficits neuroanatomiques sont aussi retrouvés chez la souris *Tsc2*^{-/+} et sont corrigés par la rapamycine chez la souris (Tang et al., 2014).

De façon intéressante, dans 15% des cas de TSC, les patients n'ont pas de mutations de *TSC1* ou de *TSC2*, suggérant l'implication potentielle d'une autre composante du complexe TSC1-TSC2-TBC1D7. Le séquençage des exons de *TBC1D7* chez des patients TSC ne possédant pas de mutations de *TSC1* ou *TSC2* n'a pas révélé de mutations de *TBC1D7*. Ceci suggère que la sous-unité TBC1D7 n'est pas encodée par un gène « *TSC3* » et que *TBC1D7* ne peut pas être mis en cause dans les cas inexplicables de TSC (Dibble et al., 2012; Crino, 2013).

Les mutations de *TBC1D7* causent un syndrome

Nous caractériserons ici l'ensemble des signes cliniques rapportés chez les patients atteints de mutations bialléliques de *TBC1D7* de «syndrome TBC1D7 » puisque les signes cliniques associés à celles-ci se manifestent chez la plupart des patients, sans cause autre que la mutation donnée. Le syndrome TBC1D7 se transmet selon un mode autosomal récessif. Les patients atteints de ce syndrome sont de sexe féminin et masculin et sont tous porteurs de mutations bialléliques, alors que les membres de la famille qui sont hétérozygotes ne sont pas atteints (Capo-Chichi et al., 2013; Alfaiz et al., 2014). Comme il est communément le cas des maladies récessives, la consanguinité augmente grandement les risques d'atteinte de syndrome TBC1D7. En effet, dans 2 des 3 familles caractérisées par rapport clinique, les patients atteints du syndrome étaient nés d'un couple consanguin (Capo-Chichi et al., 2013; Alfaiz et al., 2014; Taskiran et al., 2021).

Diverses mutations de *TBC1D7* sont retrouvées chez les patients

Comme il est le cas pour plusieurs gènes, une variété de mutations causent un phénotype similaire chez les patients. Par exemple, une des mutations de *TBC1D7* retrouvées chez les patients est la mutation Y180fsX1. Cette mutation se caractérise par un changement de cadre de lecture et une troncation au nucléotide suivant le 180^e acide aminé. Cette mutation est retrouvée dans l'exon 6 (Capo-Chichi et al., 2013). Une autre des mutations retrouvées chez des patients est la mutation R7TfsX21. Cette mutation se caractérise par un changement de cadre de lecture, une modification du 7^e acide aminé et une troncation 21 nucléotides en aval. Elle se retrouve dans l'exon 2 (Alfaiz et al., 2014). Une autre mutation relevée chez un patient est la mutation c.666-2A>G, se trouvant dans un site d'épissage à la jonction intron-exon en amont de l'exon 7 (Taskiran et al., 2021). Malgré le nombre limité de cas rapportés dans la littérature scientifique, bien d'autres mutations de *TBC1D7* ont été relevées chez des patients et sont comptabilisées sur ClinVar ([tbc1d7\[gene\] - ClinVar - NCBI \(nih.gov\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/gene/tbc1d7)). On retrouve par exemple la mutation V250fs (NM_016495.6), causant un changement du cadre de lecture au 250^e acide aminé dans l'exon 7, ainsi que c.665+8G>A (NM_016495.6), se trouvant près de la jonction intron-exon en aval de l'exon 6. Ces deux mutations additionnelles sont intéressantes puisqu'elles sont associées à la mégalencéphalie, un des signes cliniques retrouvés dans le syndrome TBC1D7.

Le syndrome TBC1D7 possède un éventail de signes cliniques incertain

De façon globale, les patients atteints du syndrome TBC1D7 présentent une mégalencéphalie primaire, ainsi qu'une déficience intellectuelle de sévérité variable (Capo-Chichi et al., 2013; Alfaiz et al., 2014; Taskiran et al., 2021). L'examen à l'imagerie par résonance magnétique (IRM) de certains des patients a confirmé l'absence d'anomalies ventriculaires et d'anomalies de l'espace sous-arachnoïdien, suggérant que la mégalencéphalie n'est pas secondaire à une hydrocéphalie et est causée uniquement par une augmentation du volume du tissu cérébral. L'IRM n'a pas révélé de présence de tubercules corticaux ou de nodules sous-épendymaires chez les patients, deux caractéristiques souvent retrouvés chez des patients porteurs de mutations de *TSC1* ou *TSC2* (Capo-Chichi et al., 2013).

Bien que la plupart des patients n'aient été évalués qu'une seule fois, une seconde évaluation de deux patientes atteintes du syndrome TBC1D7 à un âge plus avancé (30-33ans) a permis d'élargir l'éventail de signes cliniques associés au syndrome TBC1D7. En plus de la mégalencéphalie primaire et de la déficience intellectuelle, ces patientes ont des déficits ostéoarticulaires, des dislocations patellaires, des anomalies comportementales, des difficultés d'apprentissage, des psychoses, la maladie céliaque, de la myopie, de l'astigmatisme et du prognatisme (Alfaiz et al., 2014). Une étude plus approfondie d'autres patients en âge plus avancé permettra d'élucider si ces nouveaux signes cliniques sont associés au syndrome TBC1D7 ou s'ils proviennent de quelque autre origine. De façon intéressante, aucun des patients n'est diagnostiqué avec un TSA ou avec de l'épilepsie, deux comorbidités très fréquentes de la déficience intellectuelle et de la mégalencéphalie (Srivastava and Schwartz, 2014).

L'étude biochimique des lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCL) dérivées des patients révèle une hyperactivation de la voie mTORC1

L'évaluation clinique des patients atteints du syndrome TBC1D7 a aussi permis d'étudier la biochimie du syndrome à l'aide de LCLs dérivées des patients. Des études par immunobavardage (WB) ont montré que la protéine TBC1D7 est absente dans tous les cas, suggérant qu'elle est dégradée. De plus, dans les LCL de tous les patients, on retrouve une augmentation de l'activité des effecteurs de la voie mTORC1 comme S6K, S6 et 4EBP1, suggérant l'hyperactivation de

mTORC1 de façon globale (Capo-Chichi et al., 2013; Alfaiz et al., 2014). En ce qui a trait à la dégradation de l'ARNm, elle semble différer dépendamment de l'emplacement de la mutation. Chez les patients porteurs de la mutation Y180fsX1, l'ARNm de *TBC1D7* est absent des LCLs, suggérant sa dégradation. Considérant qu'un traitement des LCLs à la puromycine, un inhibiteur de traduction, restaure l'expression de la protéine tronquée, il est fort probable que l'ARNm soit dégradé par la voie de dégradation des ARN non-sens (NMD). Par contre, chez les patients porteurs de R7TfsX21, l'ARNm de *TBC1D7* est présent en quantité amoindrie suggérant ainsi sa dégradation partielle. Le traitement des LCLs de ces patientes à la puromycine ne restaure pas l'expression de la protéine tronquée, suggérant que celle-ci échappe à la dégradation par voie NMD. Les LCLs de ces patients présentent également un délai dans l'induction de l'autophagie, qui est renversé par la réintroduction de *TBC1D7* de type sauvage par transfection (Alfaiz et al., 2014). L'étude biochimique des LCLs dérivées des patients atteints du syndrome *TBC1D7* nous renseigne sur l'idée que diverses mutations causent un profil biochimique semblable. En effet, elles causent toutes une hyperactivation de la voie mTORC1 résultant en une atteinte sur une multitude d'effecteurs en aval comme S6K, S6, 4EBP1, p62, impliquées dans différents processus cellulaires.

Des mutations de *TBC1D7* sont aussi associées à d'autres maladies

Malgré que le syndrome *TBC1D7* soit bien conservé chez les patients porteurs de mutations bialléliques de *TBC1D7*, des mutations de cette protéine sont parfois retrouvées dans d'autres maladies. D'ailleurs, des études génomiques réalisées chez l'humain ont mis en évidence une association entre deux variants de *TBC1D7*, l'un dans une région régulant l'expression du gène et l'autre dans un intron, et deux désordres du neurodéveloppement, le syndrome de Tourette (TS) et le trouble de l'attention avec hyperactivité (TDAH). Il a également été proposé que ce gène joue un rôle dans les migraines (Anttila et al., 2013; Tsetsos et al., 2016). Cela étant dit, il n'est pas improbable que ces associations avec d'autres maladies soit en fait un indicateur de comorbidités du syndrome *TBC1D7*, comme le TS, le TDAH sont des comorbidités communes pour une variété de maladies neurodéveloppementales (Hansen et al., 2018). De façon surprenante, une augmentation de l'expression de *TBC1D7* est également associée aux cancers des poumons. Considérant que son rôle en oncologie est normalement en tant que suppresseur tumoral, il est

probable que sa présence augmentée soit un indicateur de mécanisme de rétrocontrôle pour limiter la croissance et la prolifération anarchique de cellules tumorales (Sato et al., 2010).

But et hypothèses

Le but de notre étude est de générer un modèle murin possédant un allèle non fonctionnel de *Tbc1d7* et de caractériser le profil cognitivo-comportemental et physique de ce modèle. Notre hypothèse est que la perte de la fonction de TBC1D7 cause des déficits cognitifs en induisant une hyperactivité de la voie mTORC1 dans le cerveau. Notre hypothèse concernant l'aspect physique du modèle est que l'hyperactivité globale de mTORC1 au sein du cerveau est la cause d'une mégalencéphalie primaire.

Matériel et méthodes

Stratégie de production du modèle murin

Pour procéder à la production du modèle de souris, nous avons collaboré avec le McGill Integrated Core for Animal Modeling (MICAM). Le design original de la mutation à induire par la technologie CRISPR-Cas9 consiste à supprimer la région fonctionnellement nécessaire à l'interaction entre TBC1D7 et TSC1, limitant ainsi l'assemblage et la stabilité du complexe TSC1-TSC2. La littérature nous informe que cette région est encodée principalement par l'exon 4, qui est fonctionnellement nécessaire à l'interaction TBC1D7-TSC1 (Santiago Lima et al., 2014). Nous avons décidé d'établir un design de délétion des exons 3 et 4 par insertion d'un gabarit contenant uniquement les deux premiers codons de l'exon 3 pour agir comme site accepteur d'une insertion de séquence comprenant un codon STOP, suivi d'un changement du cadre de lecture par insertion de 4 nucléotides. Le reste des exons 3 et 4, ainsi que l'intron 3-4 et une partie de l'intron 4-5 a été supprimé dans ce gabarit. Les bras d'homologie du gabarit se retrouvaient directement en amont de l'exon 3 (à la frontière exon-intron) et en aval de l'exon 4 dans l'intron 4-5 (Figure 2).

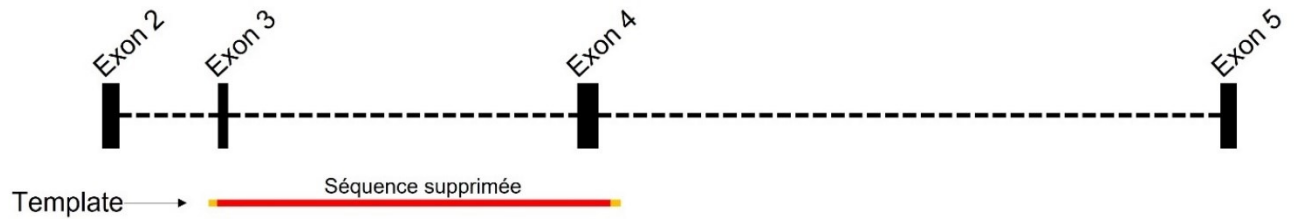


Figure 2. Représentation schématique à l'échelle de la stratégie de production du modèle murin.

Bien que *Tbc1d7* soit composé de 8 exons, seule la région des exons 2 à 5 (incluant les introns) est nécessaire à la compréhension du design du modèle murin et est représentée. Les blocs noirs représentent les exons, alors que les lignes noires pointillées représentent les introns. Le gabarit utilisé est flanqué de bras d'homologies (représentés en jaune) qui sont complémentaires aux paires de bases situées directement en amont de l'exon 3 et légèrement en aval de l'exon 4, dans l'intron 4-5. L'emplacement des bras d'homologie est indiqué précisément. La région se trouvant entre ces bras d'homologie correspond précisément à la région supprimée (représentée en rouge) d'une taille de 3708 paires de bases.

Dans la mesure où on a une délétion de ces deux exons et où la séquence est insérée, nous obtenons à la fois un codon STOP, un changement de cadre de lecture, et une délétion des exons 3 et 4, garantissant ainsi la troncation de la protéine. Cela étant dit, la technologie CRISPR-Cas9 a une efficacité plutôt limitée pour ce qui est des insertions. Notre design nous assure par contre que dans la mesure où les exons 3 et 4 sont supprimés, sans insertion de la séquence planifiée, la protéine sera tout de même tronquée puisque les exons 2 et 5 ne sont pas en phase un avec l'autre. La dernière éventualité est qu'il n'y ait pas d'insertion de la séquence voulue et qu'il n'y ait pas de délétion des exons 3 et 4. Dans ce cas, la coupure des brins d'acides désoxyribonucléiques (ADN) par CRISPR engendre tout de même un mécanisme de réparation non-homologue (NHEJ), qui peut produire d'autres allèles non-fonctionnels potentiellement intéressants. Ce design expérimental nous permet d'obtenir une multitude d'allèles différents, augmentant ainsi les chances de produire un modèle représentant fidèlement les patients. Les injections effectuées par le MICAM ont produit plusieurs souriceaux comportant des mutations différentes, dont deux ont semblé d'intérêt pour nous. La première lignée (fondateur 7056) résulte en une délétion complète des exons 3 et 4, sans insertion de la séquence planifiée. Les souris descendantes de cette lignée donnaient naissance à des souris homozygotes viables. Cette lignée était génotypée à l'aide de réaction de polymérisation en chaîne (PCR), en utilisant des amorces se trouvant en amont et en aval de la délétion. La deuxième lignée (fondateur 7058) résulte en une mutation de NHEJ, qui se situe sur un site d'épissage en début de l'exon 3. Les souris hétérozygotes descendantes de cette lignée se reproduisent sans problème mais ne donnent pas naissance à des souriceaux homozygotes viables. Cette lignée était génotypée par analyse de fusion des courbes à haute résolution (HRM). Les amorces utilisées pour le génotypage par HRM se trouvaient 40 nucléotides en amont du NHEJ dans l'exon 3 et 42 nucléotides en aval de ce même NHEJ. Puisque les patients sont porteurs de mutations bialléliques et que cette lignée n'a donné naissance à aucune souris homozygote, cette lignée a été sacrifiée et nous avons concentré nos efforts sur la caractérisation de la lignée 7056, qui sera le sujet du présent manuscrit. Les détails concernant les séquences utilisées pour la production du modèle murin et pour le génotypage des souris produites sont indiqués au Tableau 1. Nous référerons aux souris de cette lignée comme suit : *Tbc1d7* *+/+* pour les souris de type sauvage, *Tbc1d7* *-/+* pour les souris hétérozygotes et *Tbc1d7* *-/-* pour les souris homozygotes.

Tableau 1. – Détails concernant le protocole de production du modèle murin

ARN guide en amont avec séquence PAM	CAAAGCTTCTCGATGTCTAG AGG
ARN guide en aval avec séquence PAM	GGCGTGTGTGGATCAACTCT AGG
Template utilisé 5' > 3'	gagctaggcggttttaagaagtgaaattgcacgttcagtgtgtgagcccacggga catttctaactgttcttttccttctcttagACATCTAATTTGCttaggtcttc atgactgctaggcaagtgttctaccactgagccacgccactaacactttatTTTTctg gctgctgctactactactactactattact
Longueur du bras d'homologie en amont	86 nucléotides
Longueur du bras d'homologie en aval	100 nucléotides
Amorce en amont pour le génotypage de la lignée 7056 par PCR	Paire 1 : TAATGCCCATGGTAGAGGGGA Paire 2 : TTACCTCCGCACCATGACAC
Amorce en aval pour le génotypage de la lignée 7056 par PCR	Paire 1 : AACTGTAGGAGGGCAGACCA Paire 2 : AACTGTAGGAGGGCAGACCA
Amorce en amont pour le génotypage de la lignée 7058 par HRM	ATTGCACGTTTCAGTGCTGTG
Amorce en aval pour le génotypage de la lignée 7058 par HRM	CAACGCGCGATACATGGATG

Souris utilisées

Toutes les procédures où des souris expérimentales ont été utilisées ont été approuvées par le Comité Institutionnel des Bonnes pratiques Animales en Recherche et sont conformes aux normes du Conseil Canadien de Protection des Animaux. Les souris ont été hébergées à l'animalerie du Centre de Recherche du CHU Sainte-Justine selon les conditions standard. Elles avaient accès à de la nourriture et de l'eau *ad libitum* et étaient hébergées dans une pièce ayant un cycle de lumière standard de 12h. Les souris expérimentales utilisées sont les souris mutantes *Tbc1d7* $-/-$ et les souris contrôles sont leurs congénères de type sauvage *Tbc1d7* $+/+$. Malgré l'augmentation de la variabilité attendue, les deux sexes ont été inclus dans l'ensemble des études comportementales puisque le syndrome TBC1D7 est présent dans les deux sexes chez l'humain et méritent tous deux d'être étudiés (Capo-Chichi et al., 2013; Alfaiz et al., 2014; Taskiran et al., 2021). Au total, 24 souris *Tbc1d7* $+/+$ (15 M, 9 F) ont été utilisées et 22 souris *Tbc1d7* $-/-$ (7 M, 15 F). À noter que l'ensemble des souris n'a pas été utilisé pour tous les tests, pour des raisons de logistique. Par contre, l'ensemble des souris ayant été utilisées pour les derniers tests comportementaux a subi tous les tests comportementaux, afin d'éliminer quelque biais possible causé par une exposition différente à d'autres tests comportementaux (McIlwain et al., 2001).

Design expérimental- tests comportementaux

Afin de caractériser le phénotype cognitivo-comportemental des souris *Tbc1d7* $-/-$, celles-ci ont été soumises à une batterie de tests comportementaux, sans que l'expérimentateur ne connaisse le génotype des souris. Considérant que la voie mTORC1 est importante pour plusieurs facettes de la mémoire, comme la mémoire de peur à long terme, la reconnaissance, la facilitation à long terme, etc, nous avons construit une batterie de test qui évaluait différents aspects de l'apprentissage et la mémoire (Deli et al., 2012). Les tests ont été effectués dans l'ordre suivant afin de limiter l'impact des tests préalablement effectués par les souris : test d'enfouissement de billes, test de labyrinthe en T, test en champ ouvert, test de reconnaissance de nouveaux objets et test de conditionnement contextuel à la peur (McIlwain et al., 2001). Au moins une journée de repos était offerte aux souris entre chacun des tests comportementaux, sauf entre le test en champ ouvert et le test de reconnaissance de nouveaux objets, qui avaient lieu le même jour comme le test en champ ouvert doublait comme une habituation à l'appareillage utilisé pour le test de reconnaissance de nouveaux

objets. Sachant que les patients ont déjà des déficits cognitifs en bas âge et que ceux-ci perdurent dans le temps, les tests comportementaux commençaient lorsque les souris étaient âgées d'environ 40 jours (Capo-Chichi et al., 2013; Alfaiz et al., 2014). Cet âge correspond à environ 10 jours après leur sevrage, ce qui donne suffisamment de temps aux souris à s'habituer à vivre sans leurs parents et à l'expérimentateur de les manipuler suffisamment pour limiter leur stress et coïncide avec leur période d'adolescence où elles sont plus actives (Semple et al., 2013). Une semaine avant le début des tests, l'expérimentateur manipulait régulièrement et délicatement les souris afin de limiter le stress de la manipulation lors des jours d'expérimentation. Le poids et l'état de santé des souris était surveillé par le personnel de l'animalerie, ainsi que l'expérimentateur pendant la durée des tests comportementaux. Toutes les souris utilisées dans l'ensemble des tests comportementaux avaient un état de santé adéquat à l'expérimentation. Pour des raisons logistiques, l'ensemble des tests comportementaux ont eu lieu en après-midi, débutant vers 13h, dans des conditions de basse luminosité. Les souris étaient transportées dans la salle d'expérimentation au minimum 1 heure avant le début des tests comportementaux afin de les habituer à l'environnement. La seule exception a été faite pour le test de conditionnement contextuel à la peur, afin d'éviter de causer un stress préalable aux souris, puisque l'environnement risque d'être associé à une mémoire aversive, ce qui biaiserait à la base les résultats de ce test. Pour ce test, elles étaient habituées dans une antichambre adjacente à la salle de comportement et étaient maintenues dans cette pièce pendant leurs temps d'attentes de ré-exposition. Suite à l'expérimentation, les souris ont été divisées en deux groupes, la moitié des souris ont servies à la pesée du cerveau ainsi qu'à la récolte d'échantillons protéiques pour les expériences de WB, alors que l'autre moitié a été anesthésiée à l'aide d'une solution de kétamine (100mg/kg) et de xylazine (10mg/kg) puis sacrifiée par perfusion transcardiaque avec une solution tampon (PBS 1X) puis de la paraformaldéhyde 4% (PFA). Les cerveaux ont été récoltés, et laissés à 4°C dans la PFA 4% jusqu'au lendemain. Les cerveaux ont ensuite été submergés dans le sucrose 30%, puis laissés dans cette solution à 4°C jusqu'à ce que les cerveaux coulent dans le fond de la solution. Ils ont ensuite été inclus dans un composé de température de coupe optimal (OCT) pour des expériences immunohistochimiques futures.

Test d'enfouissement de billes

Les murins expriment une variété de comportements répétitifs comme le toilettage, la locomotion circulaire, le reniflement compulsif et le creusage. Comme les patients atteints de TSA, les souris modélisant ces maladies présentent parfois une exacerbation des comportements répétitifs. Par ailleurs, le test d'enfouissement de billes est un paradigme sensible à des petits changements dans les comportements répétitifs chez les murins, ce pourquoi il a été sélectionné (Moy et al., 2006; Silverman et al., 2010; Angoa-Perez et al., 2013).

Pour ce test, chaque souris a été placée individuellement dans une cage comportant 5cm d'épaisseur de litière sur laquelle étaient disposées 20 billes de trois couleurs différentes disposées en format de 4 colonnes et 5 lignes. Les souris ont été positionnées à l'intérieur de la cage du côté opposé aux billes, faisant face à celles-ci (Figure 3). Les cages ont été refermées et les souris ont pu explorer le contenu de la cage pendant 30 minutes. Après 30 minutes, les souris ont été délicatement retirées de leurs cages d'expérimentation, de façon à ne pas modifier le nombre de billes enfouies, et remplacées avec leurs congénères dans leurs cages communes. Le nombre de billes enfouies a été compté manuellement par un expérimentateur, en procédant à l'aveugle. Pour ce test, de la nouvelle litière était utilisée pour chaque souris afin de limiter les effets potentiels d'odeur résiduelle d'une autre souris. Les billes ont été nettoyées à l'éthanol 70% entre chaque utilisation.

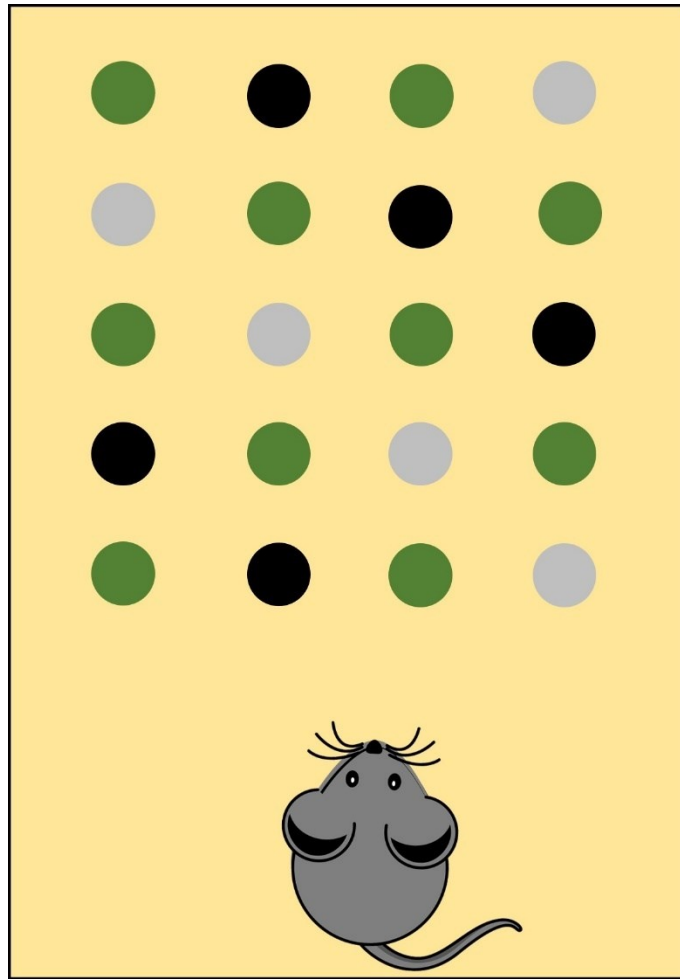


Figure 3. Schéma représentatif de la configuration des billes lors du test d'enfouissement de billes.

Les billes en verre de trois couleurs différentes sont disposées sur de la litière, en alternance de couleurs, d'un côté de la cage. Au début du test, la souris est déposée délicatement à l'extrémité opposée de la cage, faisant face aux billes.

Test du labyrinthe en T

Lors du premier jour d'expérimentation, les souris ont été placées individuellement dans le bras de départ de l'appareillage de labyrinthe surélevé en T. Elles ont été maintenues dans le bras de départ pendant 10 secondes, avant d'ouvrir l'accès au reste du labyrinthe. Les souris ont ensuite eu un total de 2 minutes pour sélectionner un bras du labyrinthe à explorer. La sélection d'un bras du labyrinthe consiste au bras dans lequel la souris place la totalité de son corps (de son museau au bout de sa queue) en premier. Lorsque la souris a effectué un choix, elle a été maintenue dans le bras sélectionné pendant 10 secondes avant d'être sortie du labyrinthe. Une minute plus tard, la souris a été replacée dans le bras de départ et a pu effectuer un second choix de bras à explorer. L'expérimentateur comptabilisait manuellement les résultats au moment du test, en plus d'enregistrer le test par vidéo. Une alternance a été comptabilisée si la souris a sélectionné consécutivement les deux bras disponibles lors de la même journée de test. Cette expérience a été répétée pendant trois jours consécutifs. Après trois jours, une moyenne a été calculée pour déterminer l'indice d'alternation de chaque souris. L'appareillage était nettoyé avec de l'éthanol 70% entre chaque souris et les matières fécales et urinations étaient comptabilisées et retirées de l'appareillage.

Test en champ ouvert

Le test en champ ouvert a été effectué dans une arène ouverte ayant les dimensions 45cm x 45cm. Lors de ce test, les souris ont été individuellement placées au centre de l'appareillage, et ont pu explorer l'arène pendant 5 minutes, pendant lesquelles elles ont été filmées. À la fin de cette exploration, les souris ont été replacées dans leurs cages respectives. L'arène était nettoyée avec de l'éthanol 70% entre chaque souris et les matières fécales et urinations étaient comptabilisées et retirées de l'appareillage. Les vidéos résultantes de cette expérience ont été analysées de façon semi-automatique à l'aide de l'application Optimouse sur Matlab. Les zones dessinées consistaient en une zone contenant l'arène entière de 45cm x 45cm, puis une zone « centrale » de 35cm x 35cm. Le temps passé dans chacune de ces zones a été comptabilisé afin d'établir le pourcentage de temps passé dans la zone centrale et en périphérie, afin de déterminer si les souris avaient un

comportement de thigmotaxie plus élevé que la normale. De plus, la distance totale parcourue, ainsi que la vitesse moyenne ont été comptabilisées.

Test de reconnaissance de nouveaux objets

Les souris ont été filmées à chacune des étapes de ce test. Au premier jour d'expérimentation, les souris ont été placées individuellement dans une arène de champ ouvert de dimensions 45cm x 45cm pendant une durée de 5 minutes afin de leur donner le temps de se familiariser avec l'appareillage. Cette période d'habituation a également doublé comme test en champ ouvert. Dix minutes plus tard, elles ont été replacées dans l'appareillage, mais cette fois-ci avec deux objets identiques (objet familier) disposés du même côté de l'appareillage de façon équidistante par rapport au centre. Elles ont pu explorer l'appareillage et les objets pendant dix minutes, après lesquelles elles ont été sorties de l'appareillage. Dix minutes plus tard, un des deux objets a été remplacé par un objet de taille similaire mais de couleur et/ou de forme différente (nouvel objet). Les souris ont pu explorer l'appareillage et les objets dans celui-ci pendant une période de dix minutes, après laquelle elles ont été replacées avec leurs congénères dans leurs cages communes jusqu'au lendemain. Le lendemain, le nouvel objet de la veille était modifié pour un autre nouvel objet, encore une fois de dimensions similaires mais de couleur et/ou de forme différente. Les souris ont pu explorer l'appareillage et les objets s'y trouvant pendant une période de 10 minutes avant d'être replacées avec leurs congénères dans leurs cages communes (Figure 4). L'arène et les objets étaient nettoyés avec de l'éthanol 70% entre chaque souris et les matières fécales et urinations étaient comptabilisées et retirées de l'appareillage. En ce qui a trait à l'analyse de ce test comportemental, les vidéos de chaque étape et pour chaque souris ont été analysées de façon semi-automatique grâce à l'application Optimouse, puis révisées manuellement. Deux zones circulaires de 77,25cm² ont été dessinées, en ayant pour centre chacun des objets, afin de déterminer le temps d'exploration des objets. Le temps d'exploration des objets est défini comme le temps que le museau de la souris passe dans la zone dessinée autour de l'objet. Cela étant dit, le temps la souris passait sur le dessus des objets a été exclu des analyses comme il n'est pas considéré comme de l'exploration active des objets. À l'aide de ces analyses, un temps d'exploration total (temps pendant lequel le museau est dans la zone de l'objet familier, additionné au temps pendant lequel le museau est dans la zone du nouvel objet) a été calculé pour le test de reconnaissance de nouvel

objet à 10 minutes et à 24heures. Un indice de discrimination a également été calculé pour chaque souris à 10 minutes et à 24heures, en soustrayant le temps passé dans la zone de l'objet familier du temps passé dans la zone du nouvel objet, le tout divisé par le temps d'exploration total.

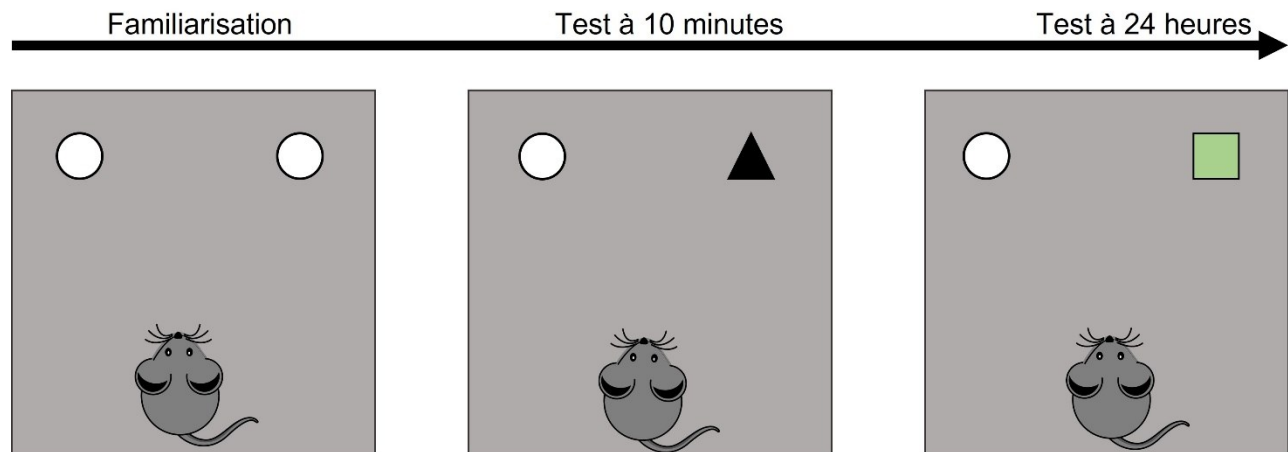


Figure 4. Représentation schématique du paradigme de test de reconnaissance de nouveaux objets.

Deux objets identiques sont placés de façon équidistante au centre lors de la familiarisation. Lors des étapes subséquentes, un des objets est modifié pour un objet de taille semblable mais de couleur et/ou de forme différente. Le même objet est modifié pour les deux étapes de rappel. Au début du test, les souris sont placées individuellement dans l'arène de champ ouvert, du côté opposé aux objets, leur faisant face.

Test du conditionnement contextuel à la peur

En ce qui a trait au conditionnement contextuel à la peur, celui-ci est administré à l'aide d'un appareillage automatisé, consistant en une chambre dont les murs sont modifiables et dont le plancher en grillage métallique peut transmettre des chocs à l'aide du système de contrôle par ordinateur : FreezeFrame. Au premier jour d'expérimentation, les souris ont d'abord été habituées individuellement à chacun des contextes (A et B) utilisés pour l'expérimentation pendant 3 minutes. Le contexte A est caractérisé par des murs blancs, le grillage découvert, ainsi qu'un lavage uniquement à l'éthanol 70% entre chaque souris. Le contexte B est caractérisé par des murs noirs et blancs, le grillage couvert par un plancher blanc, ainsi qu'un lavage uniquement au peroxyde d'hydrogène entre chaque souris. Une fois l'habituation effectuée, les souris ont été replacées dans leurs cages respectives avec leurs congénères. Au deuxième jour d'expérimentation, les souris ont d'abord été placées individuellement dans le contexte A pour l'apprentissage de la peur. Dans ce contexte, les souris ont reçu 3 chocs de 0.5mA d'une durée de 2 secondes à intervalles irréguliers après les 2 premières minutes dans l'appareillage, lors desquelles elles ne recevaient aucun choc. La durée totale de la présence de la souris dans l'appareillage est de 5 minutes 30 secondes. Suite aux trois chocs, les souris ont été sorties de l'appareillage et placées en repos dans une cage individuelle contenant une parcelle de leur nid. Après 1h, elles ont été réexposées au contexte A pendant 5 minutes, puis sorties de l'appareillage et placées en repos. Puis, 1h plus tard, elles ont été exposées au contexte B, dans lequel elles n'ont pas reçu de choc, pendant 5 minutes. Elles ont ensuite été replacées avec leurs congénères jusqu'au lendemain. Au troisième jour d'expérimentation, 24h suivant l'exposition aux chocs, les souris ont d'abord été placées dans le contexte A pendant 5 minutes, puis dans le contexte B 1h plus tard pendant 5 minutes, avec un repos dans une cage contenant une parcelle de leur nid comme la veille. Les souris ont été replacées avec leurs congénères et ont été exposées une dernière fois aux deux contextes pendant 5 minutes, 10 jours suivant l'exposition aux chocs (Figure 5). À noter que les deux contextes étaient nettoyés entre chaque souris avec le produit approprié et que les matières fécales et les urinations étaient comptabilisées. Les vidéos expérimentales enregistrées sur FreezeFrame ont ensuite été analysées manuellement par un expérimentateur qui monitorait le temps d'immobilité lors de chaque exposition au contexte A et au contexte B. Pour ce qui est de l'apprentissage de la peur, considérant que les chocs sont administrés à des intervalles irréguliers, les 60 secondes suivant chaque choc

ont été analysées. Pour ce qui est des expositions subséquentes à chacun des contextes, la durée totale de l'exposition au contexte a été prise en compte.

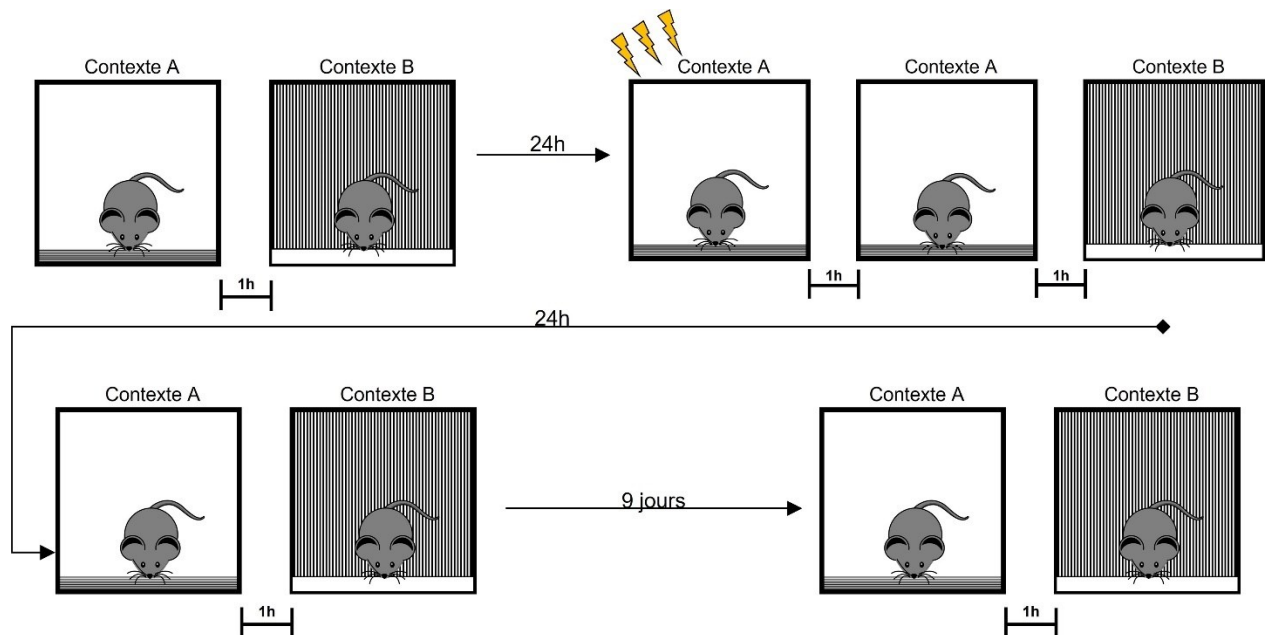


Figure 5. Représentation schématique du protocole utilisé pour le test de conditionnement contextuel à la peur.

Le contexte A est composé de murs blancs, avec un plancher en grillage métallique et est nettoyé à l'aide d'éthanol 70%. Le contexte B est composé de murs noirs et blancs, avec un plancher en plastique blanc et est nettoyé au peroxyde d'hydrogène.

Confirmation de la délétion de *Tbc1d7* chez la souris *Tbc1d7* ^{-/-}

Préparation d'échantillons de protéines

Afin de confirmer la suppression de *Tbc1d7* chez la souris *Tbc1d7* ^{-/-}, nous avons procédé à des expériences d'immunobuvardage, avec un anticorps monoclonal anti-TBC1D7 (Cell Signaling Technology, #14949). Les souris utilisées aux fins de cette expérimentation ont été sacrifiées puis disséquées. Leur cerveau a été pesé, tel qu'expliqué à la section « Mesure de la masse du cerveau ». Un échantillon du cortex frontal et un échantillon de l'hippocampe a été récolté chez chaque souris et conservé sur glace. La lyse a été effectuée à l'aide d'un tampon de radioimmunoprécipitation (Ripa) froid (TrisHCl 50mM, NaCl 150mM, Triton 0,1%, Déoxycholate de Sodium 0,5%, SDS 0,1%). Au moment de l'expérimentation, à cette solution de Ripa était ajoutée une solution d'inhibiteurs de phosphatases PhosphoSTOP (Roche, #4906845001) et de protéases (Thermo Fisher, #A32955) représentant 10% du volume total de Ripa. Les échantillons ont ensuite été homogénéisés à l'aide d'un sonicateur Branson Sonifier 250 jusqu'à homogénéisation apparente du tissu. Les échantillons ont ensuite été passés au travers d'une seringue 28G à de multiples reprises pour optimiser la lyse, puis incubées à 4°C pendant 1h. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 16 000g pendant 20 minutes à une température de 4°C. Les surnageants ont été récoltés puis leur concentration protéique a été évaluée à l'aide d'un test de Bradford.

Test de Bradford

Des duplicatas de quatre standards ont été préparés à l'aide de dilutions en série de sérum d'albumine de bovin (BSA) à des concentrations de 20µg/ml, 10µg/ml, 5µg/ml et 2,5µg/ml. À 800µl de chacun de ces standards a été ajouté 200µl de réactif de Bradford (BioRad, # 5000006) et le tout a été placé dans une cuvette. Afin de déterminer la concentration protéique des échantillons collectés, 4µl du surnageant récolté après la centrifugation ont été dilués dans 36µl d'eau. 10µl de cette solution a été ajoutée à 790µl d'eau et 200µl de réactif de Bradford et le tout a été placé dans une cuvette. Les standards et les solutions de protéines ont été délicatement mélangées par inversion, puis incubées cinq minutes avant d'être analysées avec un spectrophotomètre (Eppendorf BioPhotometer) afin d'évaluer la concentration en protéines de chaque échantillon. Ces concentrations ont ensuite été utilisées pour déterminer la quantité

appropriée de la solution protéique à utiliser pour les expériences de WB. Les échantillons ont été aliquotés afin d'éviter un excès d'épisodes de gel-dégel et conservés à -20°C.

WB

Lors de la préparation des échantillons de WB, une concentration de 30µg de protéine a été utilisée. La quantité appropriée de chaque échantillon protéique a été prélevée et ajoutée à 4µl de tampon Laemmli 2X (BioRad, #1610737) et le volume total a été ajusté à 15µl avec de l'eau sans nucléases. Le tout a été incubé sur une plaque chauffante pendant 5 minutes à 95°C, centrifugé à l'aide d'une centrifugeuse de table puis mis sur glace 1 minute, avant d'être conservé à température ambiante. Ces échantillons ont été chargés dans les puits d'un gel Mini-PROTEAN TGX 12% à 10 puits (BioRad, #4561044) et ont migré 90 minutes à 90 Volts, puis ont été transférés sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) (BioRad, #162-0177), préalablement activée au méthanol 100%. Le transfert a été effectué pendant 90 minutes à 60 Volts. Les membranes de PVDF ont été incubées dans une solution de blocage de BSA à 5% pendant 1 heure à température ambiante sur un agitateur. Elles ont ensuite été incubées à 4°C avec la solution d'anticorps primaire, élevé chez la souris, Tbc1d7 (Cell Signaling Technology, #14949) 1 : 1000 dans une solution de BSA à 0.25% jusqu'au lendemain. Les membranes ont été sorties de la solution d'anticorps primaire et lavées 3 fois 10 minutes à l'aide de tampon TBST 1X (20mM Tris, 150mM NaCl, 0,1% Tween-20, pH=7,6) sur un agitateur à température ambiante. Suivant ces lavages, les membranes ont été incubées dans une solution d'anticorps secondaire de chèvre contre IgG H et L de souris conjugué à la peroxidase de raifort (HRP) (Abcam, ab6789) 1 : 10 000 dans une solution de BSA à 0.25% pendant 1 heure sur un agitateur à température ambiante. Les membranes ont été retirées de la solution d'anticorps secondaire, puis lavées 3 fois 10 minutes à l'aide d'un tampon TBS 1X sur un agitateur à température ambiante. Un liquide révélateur de type ECL (ThermoScientific, #32109) a ensuite été appliqué sur la membrane de façon à couvrir sa surface. Les membranes ont été imagées à l'aide d'un ChemiDoc (BioRad). Suite à l'imagerie, les membranes ont été incubées dans un tampon de « stripping » dans un bain marie à 55°C pendant 30 minutes, lavées à l'eau distillées, puis re-bloquées à l'aide d'une solution de BSA à 5% sous agitation pendant 1 heure à température ambiante. S'en est suivi l'incubation avec l'anticorps primaire contre l'actine élevé chez le lapin (NovusBio, #AC-15) 1 :5000 dans une solution de BSA à 0.25% sous agitation à 4°C jusqu'au

lendemain. Trois lavages de 10 minutes ont été effectués avec du TBST 1X, puis les membranes ont été incubées dans une solution d'anticorps secondaire de chèvre contre IgG H et L de lapin conjugué au HRP (Abcam, #ab6721) 1 : 10 000 dans du BSA à 0,25% pendant 1 heure sous agitation à température ambiante. Les membranes ont été retirées de la solution d'anticorps secondaire, puis lavées 3 fois 10 minutes à l'aide d'un tampon TBS 1X sur un agitateur à température ambiante. Un liquide révélateur de type ECL (ThermoScientific, #32109) a ensuite été appliqué sur la membrane de façon à couvrir sa surface et les membranes ont été imagées à l'aide d'un ChemiDoc (BioRad).

Mesure de la masse du cerveau

Pour mesurer la masse du cerveau des souris, nous avons disséqué les cerveaux de souris de sexe masculin et féminin suite au sacrifice pour la récolte de tissus servant aux WB. L'âge de dissection varie entre P36 et P94. Cela étant dit, comme la masse du cerveau des murins atteint 90% de sa masse totale au 20^e jour postnatal, il est justifié de comptabiliser la masse des cerveaux de l'entièreté de ces souris (Semple et al., 2013). Lors de la dissection, nous avons conservé le cerveau du bulbe olfactif (rostralement) à l'arrière du cervelet (caudalement), de façon à obtenir une mesure la plus précise possible, sachant qu'il pouvait tout de même y avoir de la variabilité, surtout causé par le niveau exact de coupe caudalement au cervelet. La masse humide des cerveaux frais ont été pesés à l'aide d'une microbalance Sartorius.

Analyses statistiques

Tous les résultats présentés dans ce manuscrit sont présentés comme la moyenne \pm l'écart-type de la moyenne. Pour l'entièreté des tests statistiques, effectués à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6, le seuil de significativité a été établi à $p < 0.05$. Les tests statistiques utilisés sont les suivants.

Pour chaque jeu de donné récolté, une analyse de la variance (ANOVA) à deux facteurs (âge et génotype) a été utilisée pour déterminer s'il y a un effet de sexe au sein du jeu de données. Dans le cas où il n'y avait pas de différence significative entre les sexes et pas d'interaction entre le sexe

et le génotype, les souris des deux sexes ont été comptabilisées ensemble afin d'accroître la puissance statistique. De tous les jeux de données, un effet de sexe n'a été observé que pour la masse du cerveau et de la masse corporelle. Dans ce cas, un test t pour des échantillons non-appariés avec correction de Welch a été appliqué séparément pour la masse du cerveau des mâles et des femelles. Nous avons également appliqué cette même procédure pour la masse corporelle des mâles et des femelles.

Pour les jeux de données ne comportant pas de données répétées, nous avons utilisé un test de Mann Whitney avec l'ensemble des souris de sexe masculin et féminin afin de déterminer s'il y avait une différence significative entre les souris *Tbc1d7* $-/-$ et *Tbc1d7* $+/+$. Cette procédure a été appliquée pour le test d'enfouissement de billes, le test du labyrinthe en T, le test en champ ouvert ainsi que le test de reconnaissance de nouveaux objets.

Pour les jeux de données comportant des données répétées, nous avons utilisé une ANOVA à deux facteurs à mesures répétées, avec un test de comparaisons multiples de Bonferroni (pour le conditionnement contextuel à la peur) et un test de comparaisons multiples de Tukey (pour l'apprentissage de la peur).

Résultats

Caractérisation génétique du modèle murin *Tbc1d7* *-/-*

Le modèle murin *Tbc1d7* *-/-* possède une délétion des exons 3 et 4

Nous avons su générer avec succès un modèle murin de perte de fonction de *Tbc1d7* qui consiste en une délétion complète des exons 3 et 4, dont l'importance pour l'interaction avec *Tsc1* a été discuté plus haut. Le séquençage génomique réalisé par le MICAM des souris *Tbc1d7* possédant l'allèle non-fonctionnel a effectivement montré la délétion complète des exons 3 et 4 de *Tbc1d7*. Les souris *Tbc1d7**-/+* descendantes de cette lignée se reproduisent et donnent naissance à des portées de grosseurs normales et selon un ratio mendélien (Figure 6). Le génotypage était effectué à l'âge de sevrage, à environ 28 jours. En ce qui a trait à la reproduction des souris *Tbc1d7* *-/-*, leur reproduction n'a toujours pas été caractérisée. La délétion des exons 3 et 4 devraient en théorie causer une troncation de *Tbc1d7* à la fin de l'exon 2 puisque les exons 2 et 5 de *Tbc1d7* ne sont pas en phase l'un avec l'autre. Nous suspicions que la protéine tronquée, ou son ARNm, serait instable et probablement dégradée. Pour vérifier si *Tbc1d7* était exprimé chez la souris *Tbc1d7* *-/-*, nous avons procédé à des analyses par WB.

Ratio Mendélien

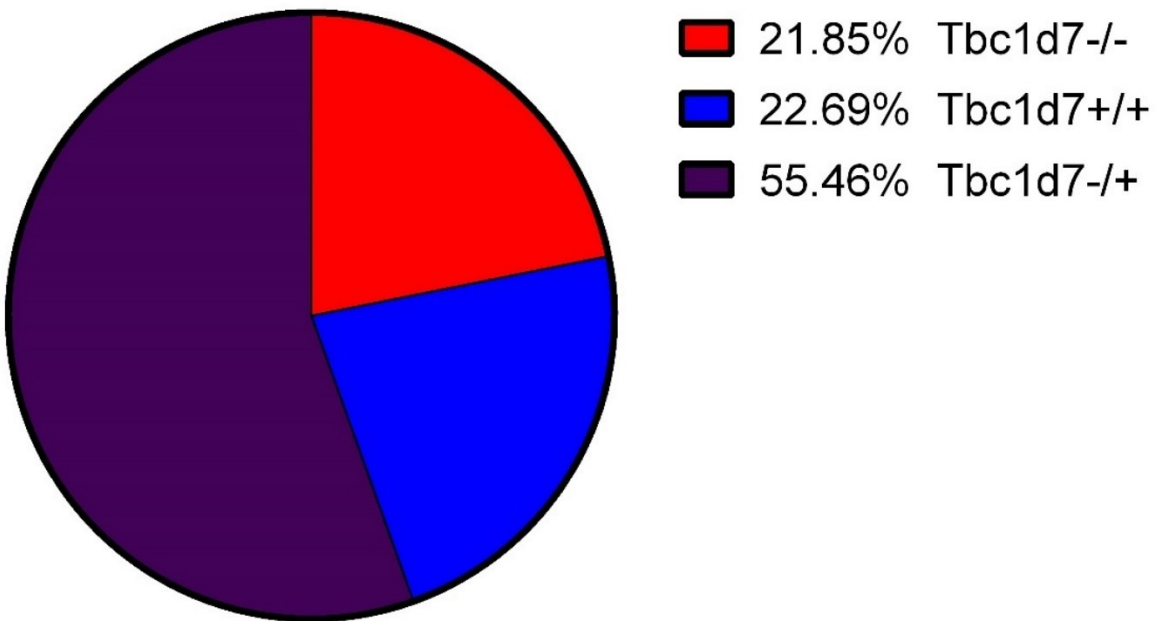


Figure 6. Ratio de génotypes découlant d'un croisement *Tbc1d7*^{-/+} x *Tbc1d7*^{-/+}.

Le croisement entre des souris hétérozygotes produit un ratio mendélien de génotypes à 3 semaines, où le génotypage a été effectué.

Les souris *Tbc1d7* *-/-* n'expriment pas Tbc1d7

Les WB effectués avec des échantillons de cortex des souris *Tbc1d7* *-/-* et *Tbc1d7* *+/+* avec 30 μ g de protéines ont révélé qualitativement que Tbc1d7 est absent chez les souris *Tbc1d7* *-/-* alors qu'il est présent chez les souris *Tbc1d7* *+/+* (Figure 7). Ces expériences ont été répliquées à 3 reprises chez 4 souris de chaque génotype. Ceci nous indique que notre modèle de souris *Tbc1d7* *-/-* réplique l'absence de la protéine retrouvée chez certains patients atteints du syndrome TBC1D7 (Capo-Chichi et al., 2013; Alfaiz et al., 2014). De concert avec la validation de notre modèle par WB, nous avons cherché à confirmer si certains aspects comportementaux caractéristiques du syndrome TBC1D7 étaient également présents chez la souris *Tbc1d7* *-/-*.

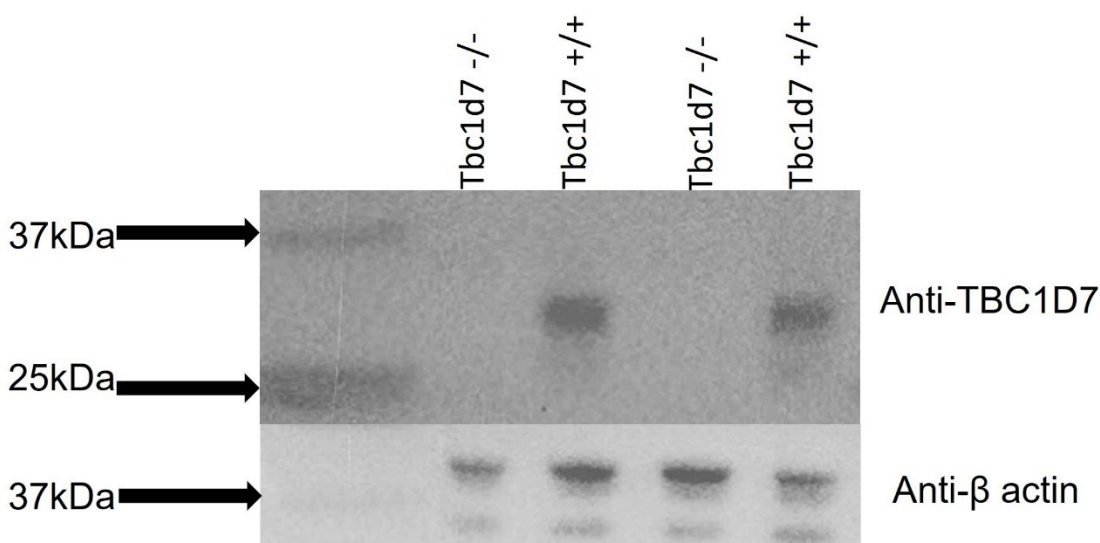


Figure 7. Confirmation de la perte d'expression de Tbc1d7 chez les souris *Tbc1d7* *-/-*.

La perte d'expression de Tbc1d7 chez les souris *Tbc1d7* *-/-* a été confirmée qualitativement par une étude effectuée par WB. La présente figure constitue un exemple représentatif de l'expression de Tbc1d7 chez ces souris.

Caractérisation comportementale des souris *Tbc1d7* *-/-*

Les souris *Tbc1d7* *-/-* sont hypoactives au test d'enfouissement de billes

Une des premières caractéristiques que nous avons cherché à étudier chez les souris *Tbc1d7* *-/-* est leur activité dans un test de détection de stéréotypies, le test d'enfouissement de billes. Malgré que les stéréotypies ne soient pas rapportées chez les patients du syndrome TBC1D7, elles sont fréquemment rapportées chez les patients atteints de TSC, ainsi que les patients atteints de d'autres mTOR-opathies (Butler et al., 2005; Capo-Chichi et al., 2013). Les résultats obtenus à ce test nous montre que les souris *Tbc1d7* *-/-* enfouissent en fait moins de billes que les souris *Tbc1d7* *+/+*, et ce, indépendamment de leur sexe ($p = 0.0033$, $n=24$ *Tbc1d7* *+/+*, 9F, 15M, $n=22$ *Tbc1d7* *-/-*, 15F,7M). Ceci nous indique que le comportement naturel et stéréotypé du creusage est altéré à la baisse chez les souris *Tbc1d7* *-/-* (Figure 8). Il est intéressant de noter que ces résultats indiquent que, comme les patients atteints du syndrome TBC1D7, les souris *Tbc1d7* *-/-* n'exhibent pas de comportements répétitifs caractéristiques d'une foule de mTOR-opathies et de syndromes autistiques (Silverman et al., 2010; Tsai et al., 2012; Greco et al., 2013). Au contraire, elles sont moins actives que la norme.

Test d'enfouissement de billes

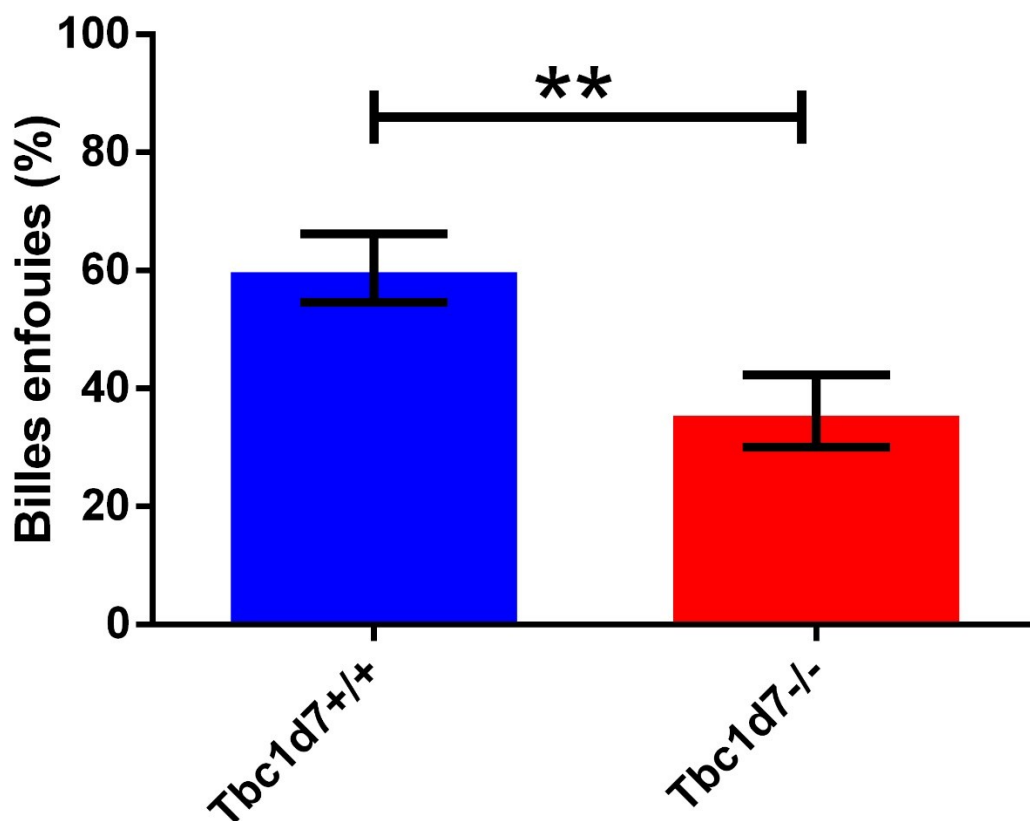


Figure 8. Activité des souris *Tbc1d7* ^{-/-} au test d'enfouissement de billes.

Les souris *Tbc1d7* ^{-/-} enfouissent significativement moins de billes que les souris *Tbc1d7* ^{+/+}. Les données des mâles et des femelles ont été comptabilisées, puisqu'il y a absence de différence sexuelle. **, $p < 0.01$. ($p = 0.0033$, $n = 24$ *Tbc1d7* ^{+/+}, 9F, 15M, $n = 22$ *Tbc1d7* ^{-/-}, 15F, 7M).

Les souris *Tbc1d7* *-/-* n'ont pas de déficits de mémoire de travail au test du labyrinthe en T

Bien qu'il soit peu clair si les patients atteints du syndrome TBC1D7 démontrent des déficits de mémoire à court terme, comme la mémoire de travail, une déficience intellectuelle et des difficultés d'apprentissage ont été observées chez tous les patients, suggérant l'implication de déficits mnésiques (Capo-Chichi et al., 2013; Alfaiz et al., 2014; Taskiran et al., 2021). En ce qui a trait aux résultats du test de labyrinthe en T, il n'y a pas de différence significative dans l'indice d'alternation entre les souris *Tbc1d7* *-/-* et *Tbc1d7* *+/+*, et ce, indépendamment du sexe ($P=0.9001$, $n=12$ *Tbc1d7* *+/+*, 6F, 5M, $n=18$ *Tbc1d7* *-/-*, 12F, 6M), ce qui suggère que la mémoire de travail des souris *Tbc1d7* *-/-* est intacte (Figure 9). Afin d'évaluer si la déficience intellectuelle retrouvée chez les patients est aussi retrouvée chez les souris *Tbc1d7* *-/-*, nous avons procédé à d'autres tests de mémoire, comme le test de reconnaissance de nouveaux objets.

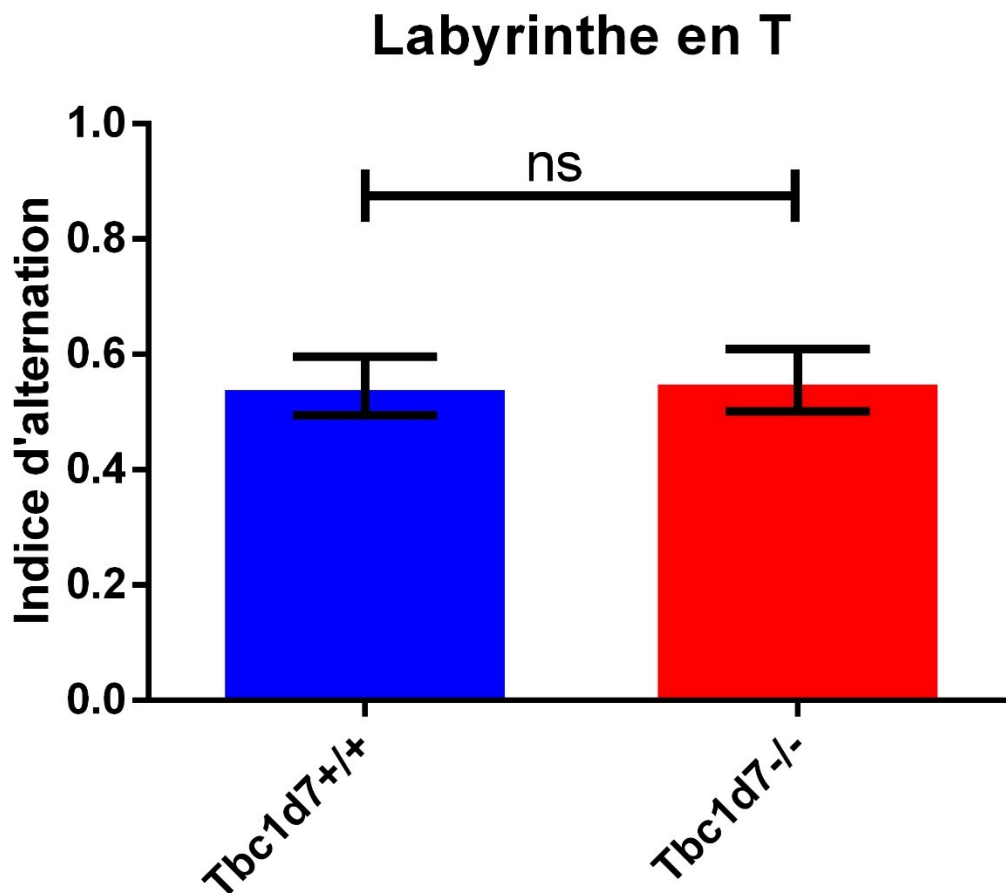


Figure 9. Alternation des souris *Tbc1d7*^{-/-} au test du labyrinthe en T.

Les souris *Tbc1d7*^{-/-} présentent un indice d'alternation similaire à celui des souris *Tbc1d7*^{+/+} au test du labyrinthe en T. Les données des mâles et des femelles ont été comptabilisées, puisqu'il y a absence de différence sexuelle. ns: non significatif. (P=0.9001, n=12 *Tbc1d7*^{+/+}, 6F, 6M, n=18 *Tbc1d7*^{-/-}, 12F, 6M).

Les souris *Tbc1d7*^{-/-} n'ont pas de déficits comportementaux en champ ouvert

Bien que l'anxiété ait été décrite comme un des symptômes survenant à l'âge adulte chez certains patients TBC1D7, les souris *Tbc1d7*^{-/-} ne présentent pas de signes d'anxiété en champ ouvert. Elles passent un pourcentage de temps similaire en zone centrale à leurs compatriotes de type sauvage ($p=0.7405$, $n=12$ *Tbc1d7*^{+/+}, 6F, 6M, $n=18$ *Tbc1d7*^{-/-}, 12F, 6M) (Alfaiz et al., 2014). Il n'y a pas non plus de différence significative en ce qui a trait à la vitesse de déplacement ($p=0.5415$, $n=12$ *Tbc1d7*^{+/+}, 6F, 6M, $n=18$ *Tbc1d7*^{-/-}, 12F, 6M) ou la distance totale parcourue en champ ouvert ($p=0.9761$, $n=12$ *Tbc1d7*^{+/+}, 6F, 6M, $n=18$ *Tbc1d7*^{-/-}, 12F, 6M).

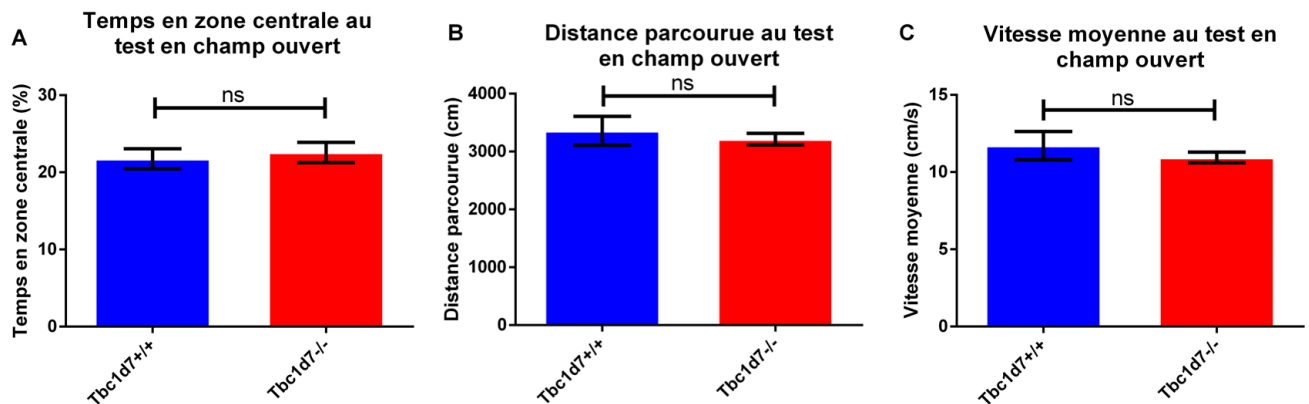


Figure 10. Activité des souris *Tbc1d7*^{-/-} au Test en champ ouvert.

Les souris *Tbc1d7*^{-/-} ne présentent pas d'anomalies dans leur temps d'exploration de la zone centrale, par rapport à la zone périphérique. ($p=0.7405$, $n=12$ *Tbc1d7*^{+/+}, 6F, 6M, $n=18$ *Tbc1d7*^{-/-}, 12F, 6M) (A) Elles ne présentent pas non plus d'anomalies dans la distance qu'elles parcourent ($p=0.9761$, $n=12$ *Tbc1d7*^{+/+}, 6F, 6M, $n=18$ *Tbc1d7*^{-/-}, 12F, 6M) (B) ou la vitesse de leurs déplacements ($p=0.5415$, $n=12$ *Tbc1d7*^{+/+}, 6F, 6M, $n=18$ *Tbc1d7*^{-/-}, 12F, 6M) (C). ns: non significatif.

Les souris *Tbc1d7* *-/-* n'ont pas de déficits mnésiques au test de reconnaissance de nouveaux objets

Nous avons procédé au test de reconnaissance de nouveaux objets, en utilisant deux périodes de rappel, une à 10 minutes et une à 24 heures, afin d'évaluer si les souris possèdent des déficits mnésiques à court et/ou à moyen terme. En ce qui concerne le test de reconnaissance de nouvel objet à 10 minutes, il n'y a pas de différence significative de temps d'exploration total des objets ($p=0.9665$, $n=12$ *Tbc1d7* *+/+*, 6F, 6M, $n=18$ *Tbc1d7* *-/-*, 12F, 6M) ou d'indice de discrimination des objets entre les souris *Tbc1d7* *-/-* et *Tbc1d7* *+/+* ($p=0.5980$, $n=12$ *Tbc1d7* *+/+*, 6F, 6M, $n=18$ *Tbc1d7* *-/-*, 12F, 6M). Pour ce qui est du test de reconnaissance de nouvel objet à 24 heures, il n'y a pas non plus de différence significative de temps d'exploration total des objets ($p=0.3452$, $n=11$ *Tbc1d7* *+/+*, 5F, 6M, $n=17$ *Tbc1d7* *-/-*, 11F, 6M) ou d'indice de discrimination des objets entre les souris *Tbc1d7* *-/-* et *Tbc1d7* *+/+* ($p=0.4278$, $n=11$ *Tbc1d7* *+/+*, 5F, 6M, $n=17$ *Tbc1d7* *-/-*, 11F, 6M). Le fait que le temps d'exploration totale et la discrimination des objets ne soient pas significativement différentes entre les souris *Tbc1d7* *-/-* et *Tbc1d7* *+/+*, autant à 10 minutes qu'à 24 heures, suggère que les souris *Tbc1d7* *-/-* n'ont pas de déficits de mémoire à court ou à moyen terme (Figure 11). Afin de confirmer cette constatation, nous avons voulu effectuer un autre test d'apprentissage et de mémorisation, qui est révélateur chez plusieurs modèles murins.

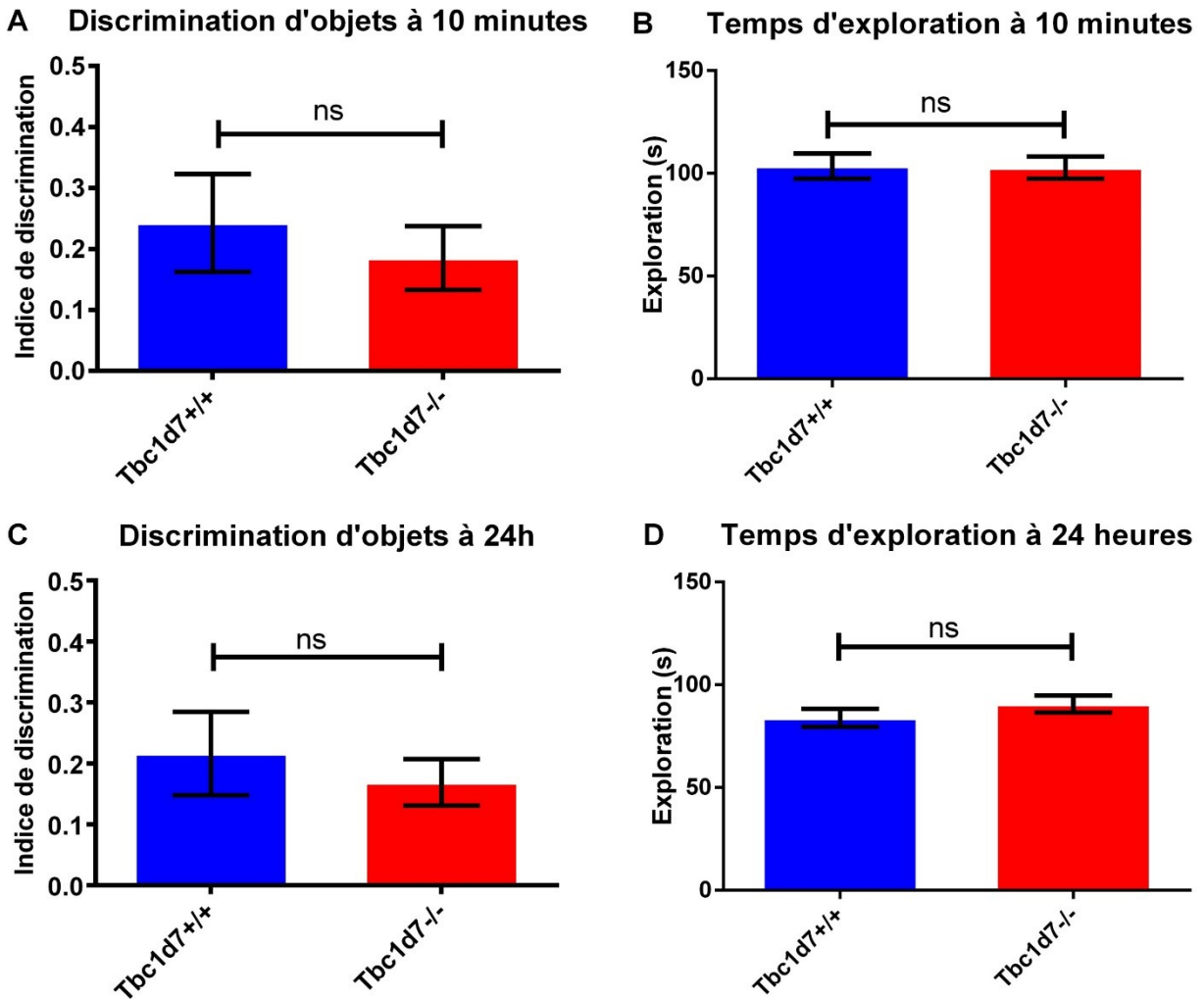


Figure 11. Exploration des objets par les souris *Tbc1d7*^{-/-} au test de reconnaissance de nouveaux objets.

Au test de rappel à 10 minutes, la discrimination des objets ($p=0.5980$, $n=12$ *Tbc1d7*^{+/+}, 6F, 6M, $n=18$ *Tbc1d7*^{-/-}, 12F, 6M) (A) et le temps total d'exploration sont inaltérés chez les souris *Tbc1d7*^{-/-} ($p=0.9665$, $n=12$ *Tbc1d7*^{+/+}, 6F, 6M, $n=18$ *Tbc1d7*^{-/-}, 12F, 6M) (B). Au test de rappel à 24 heures, la discrimination des objets ($p=0.4278$, $n=11$ *Tbc1d7*^{+/+}, 5F, 6M, $n=17$ *Tbc1d7*^{-/-}, 11F, 6M) (C) et le temps d'exploration total sont également inaltérés ($p=0.3452$, $n=11$ *Tbc1d7*^{+/+}, 5F, 6M, $n=17$ *Tbc1d7*^{-/-}, 11F, 6M) (D). ns: non significatif.

Les souris *Tbc1d7* $-/-$ ont un déficit de mémoire de peur à long terme au test de conditionnement contextuel à la peur

Comme il a été évalué que certains patients atteints du syndrome TBC1D7 présentait des difficultés d'apprentissage, nous avons voulu vérifier s'il en était également le cas chez les souris *Tbc1d7* $-/-$ (Alfaiz et al., 2014). Pour ce qui est de l'apprentissage de la peur chez les souris *Tbc1d7* $-/-$, l'ANOVA a révélé que le temps d'immobilité augmentait en fonction du nombre de chocs, ce qui est un indicateur fidèle de l'apprentissage de la peur ($p < 0.0001$, $n=9$ *Tbc1d7* $+/+$, 6F, 3M, $n=14$ *Tbc1d7* $-/-$, 9F, 5M). De plus, l'ANOVA a indiqué une absence d'effet de génotype pour ce qui est de l'apprentissage de la peur. Les souris *Tbc1d7* $-/-$ et *Tbc1d7* $+/+$ démontrent donc un niveau d'immobilité similaire suivant l'exposition aux chocs ($p=0.8013$, $n=9$ *Tbc1d7* $+/+$, 6F, 3M, $n=14$ *Tbc1d7* $-/-$, 9F, 5M) indiquant que les souris *Tbc1d7* $-/-$ apprennent à répondre aux chocs aussi bien que les souris *Tbc1d7* $+/+$. Cela nous indique que les souris *Tbc1d7* $-/-$ n'ont pas de déficit d'apprentissage de la peur (Figure 12).

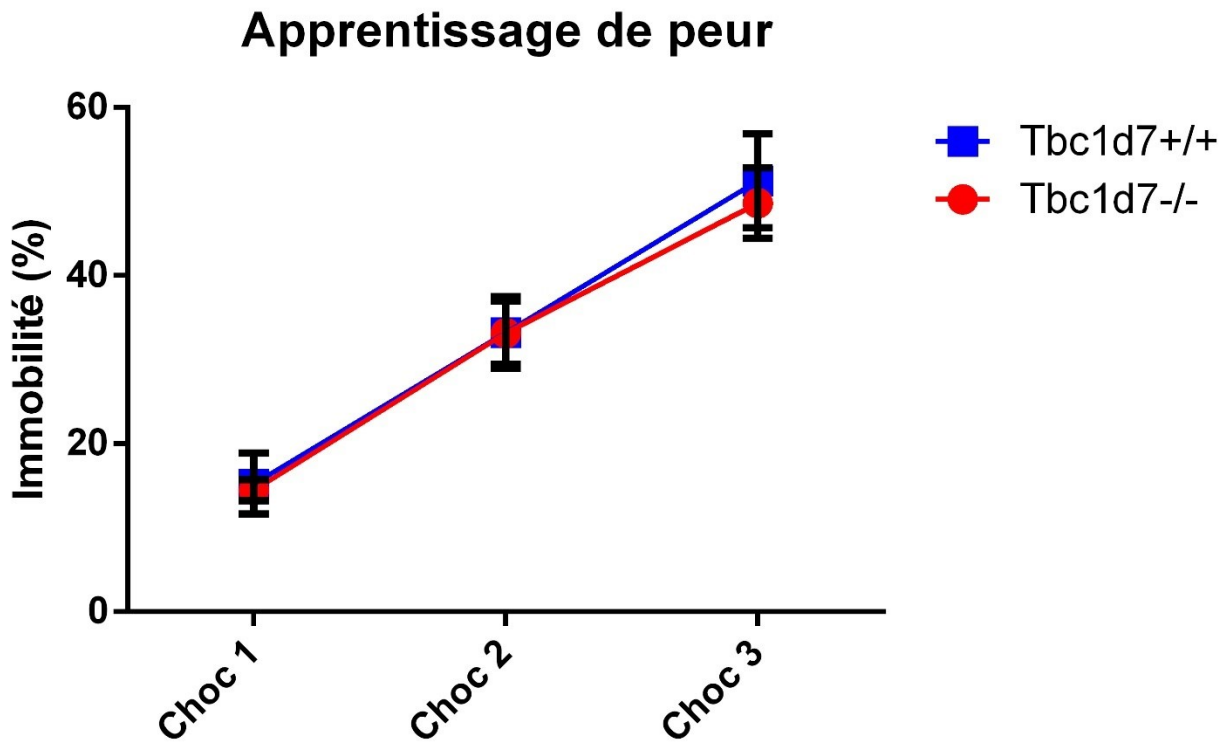


Figure 12. Apprentissage de la peur chez les souris *Tbc1d7* $-/-$ au test du conditionnement contextuel à la peur.

Les souris *Tbc1d7* $-/-$ ont des capacités d'apprentissage similaires aux souris *Tbc1d7* $+/+$ lors de l'apprentissage de la peur au test du conditionnement contextuel à la peur. ($p=0.8013$, $n=9$ *Tbc1d7* $+/+$, 6F, 3M, $n=14$ *Tbc1d7* $-/-$, 9F, 5M).

La mémoire à court, à moyen et à long terme, ainsi que la reconnaissance de l'environnement spatial des souris a été évaluée grâce à des expositions subséquentes au contexte A et au contexte B. À l'examen statistique, un effet de temps a été infirmé alors qu'un effet de génotype a été confirmé dans le contexte A, mais celui-ci n'était apparent qu'au test de mémoire à long terme, 10 jours après l'exposition aux chocs ($p > 0.9999$ à 1h, $p = 0.2025$ à 24h et $p = 0.0194$ à 10 jours, $n = 9$ *Tbc1d7* +/+, 6F, 3M $n = 14$ *Tbc1d7* -/-, 9F, 5M). Ces résultats suggèrent que les souris *Tbc1d7* -/- ont une mémoire de peur intacte à court et à moyen terme, mais que leur mémoire de peur à long terme est affectée à la baisse (Figure 13).

En ce qui a trait au contexte B où les souris n'ont jamais reçu de chocs, nous avons voulu vérifier si les souris *Tbc1d7* -/- présentaient une généralisation de la peur, un indicateur de déficit de reconnaissance de l'environnement. À l'analyse statistique, aucun effet de temps ou de génotype n'était significatif ($p > 0.9999$ à 1h, $p > 0.9999$ à 24h, $p > 0.9999$ à 10 jours, $n = 9$ *Tbc1d7* +/+, 6F, 3M $n = 14$ *Tbc1d7* -/-, 9F, 5M). Ces résultats indiquent que les souris *Tbc1d7* -/- avaient les mêmes capacités de distinction de l'environnement où elles avaient reçu des chocs que les souris *Tbc1d7* +/+ et que les déficits de mémoire au contexte A qui apparaissent à 10 jours ne sont pas attribuables à une reconnaissance erronée de l'environnement (Figure 13).

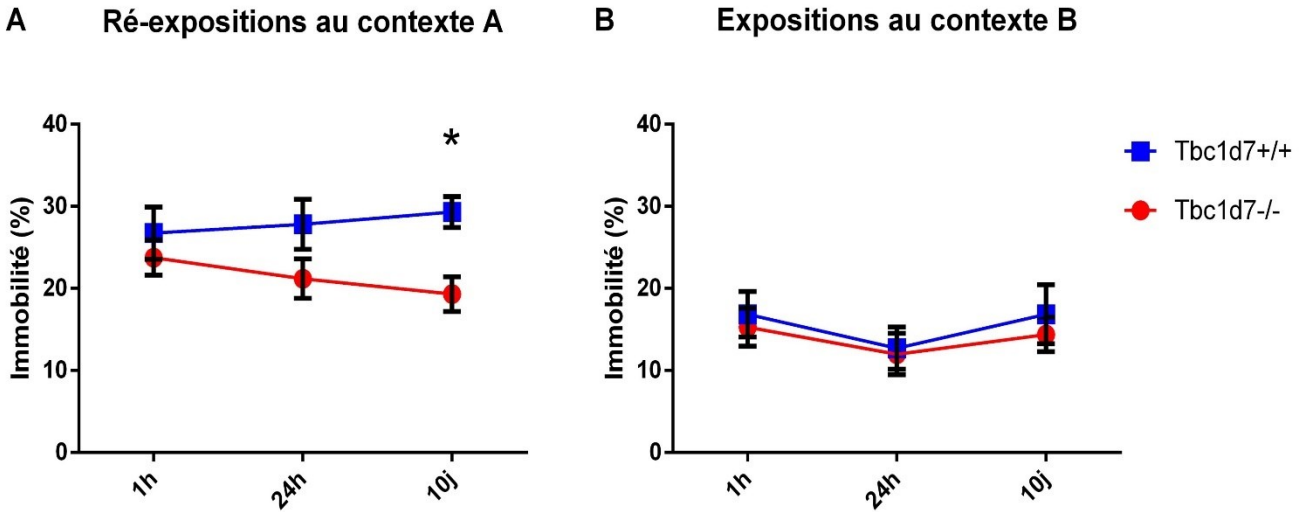


Figure 13. Mémoire et discrimination du contexte des souris *Tbc1d7* $-/-$ au test de conditionnement contextuel à la peur.

Les souris *Tbc1d7* $-/-$ démontrent une mémoire de peur similaire aux souris *Tbc1d7* $+/+$ à court et à moyen terme, mais pas à long terme, dans le contexte A ($p > 0.9999$ à 1h, $p = 0.2025$ à 24h et $p = 0.0194$ à 10 jours, $n = 9$ *Tbc1d7* $+/+$, 6F, 3M $n = 14$ *Tbc1d7* $-/-$, 9F, 5M) (A). Les souris *Tbc1d7* $-/-$ démontrent une mémoire de peur similaire aux souris *Tbc1d7* $+/+$ dans le contexte B, et ce, à chaque exposition ($p > 0.9999$ à 1h, $p > 0.9999$ à 24h, $p > 0.9999$ à 10 jours, $n = 9$ *Tbc1d7* $+/+$, 6F, 3M $n = 14$ *Tbc1d7* $-/-$, 9F, 5M) (B). *, $p < 0.05$.

Caractérisation de la mégalencéphalie chez les souris *Tbc1d7* *-/-*

Les souris *Tbc1d7* *-/-* de sexe masculin présentent une augmentation de la masse du cerveau

En combinant les données retrouvées sur ClinVar et celles des patients caractérisés dans la littérature scientifique, la mégalencéphalie est le phénotype qui est le plus communément exprimé chez les patients atteints du syndrome TBC1D7 (Capo-Chichi et al., 2013; Alfaiz et al., 2014; Taskiran et al., 2021). Il est donc naturel que nous ayons voulu vérifier si ce phénotype fortement conservé chez l'homme est aussi retrouvé chez les souris *Tbc1d7* *-/-*. En ce qui a trait à la masse du cerveau, elle est significativement plus élevée chez les mâles *Tbc1d7* *-/-* que chez les mâles *Tbc1d7* *+/+* ($p=0.0317$, $n=5$ *Tbc1d7* *+/+*, $n=5$ *Tbc1d7* *-/-*). De façon intéressante, on ne retrouve pas de différence significative entre la masse des cerveaux des femelles *Tbc1d7* *-/-* et *Tbc1d7* *+/+* ($p=0.1783$, $n=6$ *Tbc1d7* *+/+*, $n=7$ *Tbc1d7* *-/-*). Afin de déterminer si cet effet était attribuable à une augmentation générale de la masse des souris, nous avons aussi comparé la masse totale des souris comptabilisées dans le calcul de la masse du cerveau. La masse corporelle des souris mâles ne change pas significativement en fonction du génotype ($p=0.8016$, $n=5$ *Tbc1d7* *+/+*, $n=5$ *Tbc1d7* *-/-*) et celle des souris femelles non plus ($p=0.1096$, $n=6$ *Tbc1d7* *+/+*, $n=7$ *Tbc1d7* *-/-*). Cela étant dit, nous pouvons conclure que la masse cérébrale des souris *Tbc1d7* *-/-* de sexe masculin est significativement augmentée, et ce, sans être associée à des effets systémiques sur la masse de la souris. Cet effet n'est pas retrouvé chez les femelles *Tbc1d7* *-/-* comme leur masse cérébrale et leur masse corporelle totale demeurent toutes deux inchangées (Figure 14). L'ensemble des phénotypes observés chez les souris *Tbc1d7* *-/-* est présenté et comparé aux phénotypes trouvés chez les patients à l'aide du tableau 2.

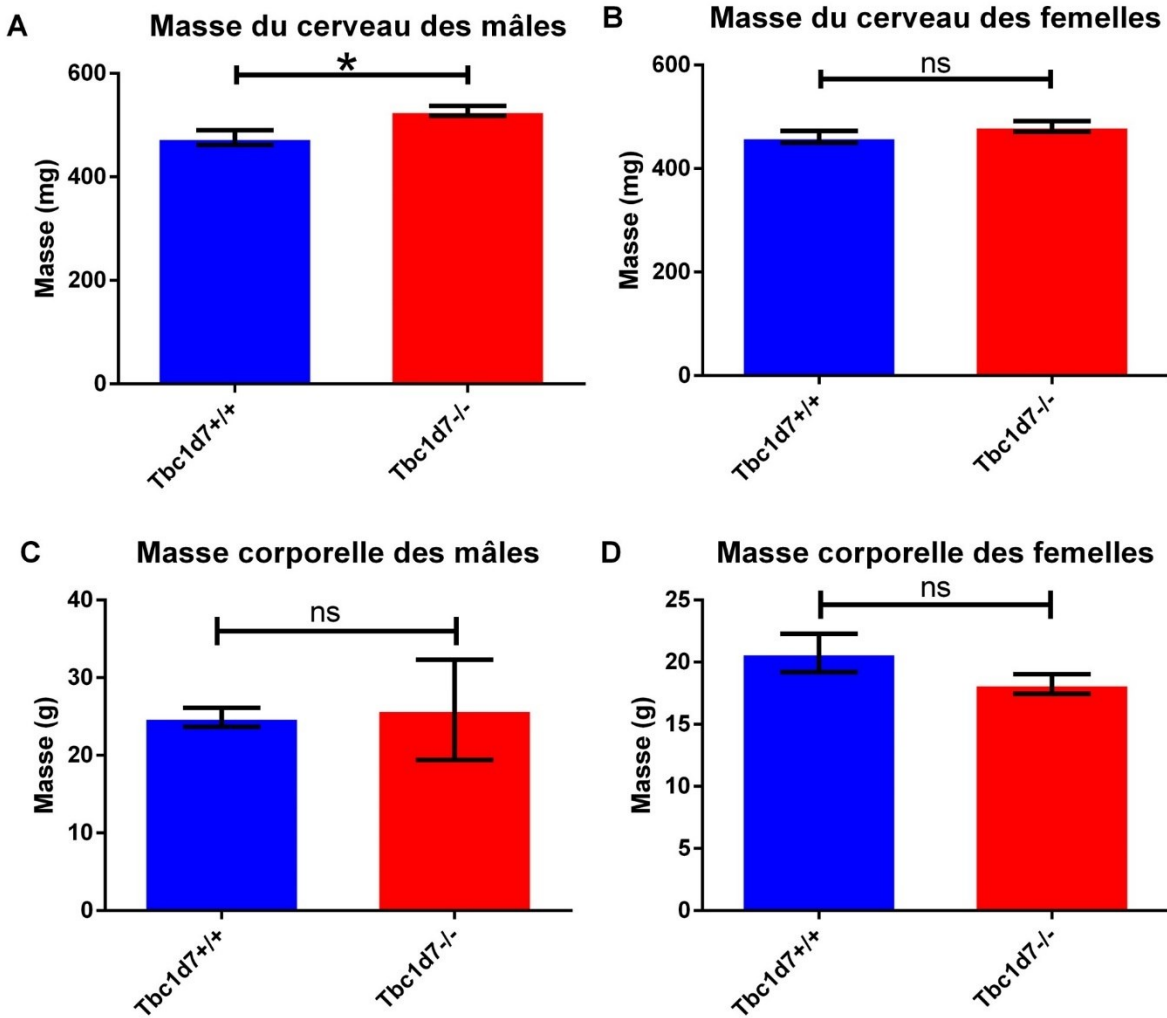


Figure 14. Phénotype physique retrouvé chez les souris *Tbc1d7*^{-/-}.

La masse du cerveau des souris *Tbc1d7*^{-/-} de sexe masculin (p=0.0317, n= 5 *Tbc1d7*^{+/+}, n=5 *Tbc1d7*^{-/-}) (A) et de sexe féminin (p=0.1783, n= 6 *Tbc1d7*^{+/+}, n=7 *Tbc1d7*^{-/-}) (B) est empreinte de dysmorphie sexuelle et n'est augmentée significativement que chez les mâles *Tbc1d7*^{-/-}. La masse corporelle des souris *Tbc1d7*^{-/-} de sexe masculin (p=0.8016, n= 5 *Tbc1d7*^{+/+}, n=5 *Tbc1d7*^{-/-}) (C) et de sexe féminin (p=0.1096, n= 6 *Tbc1d7*^{+/+}, n=7 *Tbc1d7*^{-/-}) (D) n'est pas affectée. *, p<0.05, ns: non-significatif.

Tableau 2. – Tableau comparatif des phénotypes observés chez les patients et les souris

	Patients <i>TBC1D7</i> -/-		Souris <i>Tbc1d7</i> -/-	
	M	F	M	F
Mégalencéphalie	+	+	+	-
Difficultés d'apprentissage	+	+	-	-
Déficits de mémoire	+	+	+ (long terme)	+ (long terme)
Stéréotypie	-	-	-	-
Altération de comportements exploratoires	ND	ND	-	-
Anxiété	ND	+	-	-
Altération de la locomotion	+ (délai)	+ (délai)	-	-

Discussion

Comportements répétitifs

Les résultats obtenus au test de l'enfouissement de billes suggèrent que les souris *Tbc1d7* $-/-$ ne présentent pas de stéréotypies. En effet, elles enfouissent significativement moins de billes que les souris *Tbc1d7* $+/+$. Ceci peut être un indicateur d'hypoactivité, comme il est commun de retrouver dans les modèles murins du syndrome de Rett (Moy et al., 2006). Alternativement, ceci peut être un indicateur du désintérêt des souris pour leur environnement, et a également été observé chez certains modèles murins de déficience intellectuelle et de TSA (Greco et al., 2013; Gilbert et al., 2020). Cela étant dit, il est surprenant que les souris *Tbc1d7* $-/-$ exhibent un comportement hypoactif et/ou désintéressé lors du test d'enfouissement de billes, alors qu'elles présentent un comportement exploratoire normal en champ ouvert ainsi que lors du test de reconnaissance de nouveaux objets. Une explication possible est que le test d'enfouissement de billes représente peu d'intérêt pour les souris compte tenu que l'environnement dans lequel elles effectuent le test est similaire aux cages dans lesquelles elles sont hébergées et dans lesquelles elles peuvent creuser comme bon leur semble. Il est intéressant de comparer ce résultat à celui de souris dont *Tsc1* est supprimé dans leurs cellules de Purkinje, qui possèdent des comportements répétitifs de toilettage (Tsai et al., 2012). Il n'est pas impossible que les souris *Tbc1d7* $-/-$ démontrent d'autres comportements répétitifs et qu'elles aient tout simplement peu d'intérêt pour l'enfouissement de billes. Des études d'activité en contexte naturel, dans leurs cages d'hébergement, devraient être menées afin d'évaluer la présence ou l'absence d'autres comportements stéréotypiques chez les souris *Tbc1d7* $-/-$.

Locomotion et comportements exploratoires

Les résultats obtenus au test en champ ouvert suggèrent que les souris *Tbc1d7* $-/-$ n'ont pas d'altérations locomotrices ou de déficits exploratoires puisqu'elles se déplacent à la même vitesse que les souris *Tbc1d7* $+/+$ et parcourent la même distance qu'elles en champ ouvert. Cette constatation est renforcée par les résultats exploratoires obtenus au test de reconnaissance de nouveaux objets lors duquel aucune différence n'a été observée dans aucun des temps d'exploration

totaux. De même, les souris *Tsc2* $-/+$ n'ont pas non plus d'altérations locomotrices en champ ouvert et ne présentent pas d'altérations exploratoires au test de reconnaissance de nouveaux objets (Tang et al., 2014). Cependant, l'expérimentateur a noté que lors du test de reconnaissance de nouveaux objets, certaines souris avaient des comportements maladroits et tombaient régulièrement des objets sur lesquels elles étaient perchées. Bien qu'il soit possible que ce ne soit qu'une coïncidence, il est aussi possible que les souris *Tbc1d7* $-/-$ aient des problèmes d'équilibre qui leur causent des chutes, ce qui n'est évidemment pas évalué à l'aide du test en champ ouvert. Par ailleurs, comme *Tbc1d7* est exprimé dans la plupart des tissus, il n'est pas impossible qu'une composante cérébelleuse ou même neuromusculaire cause des comportements maladroits chez les souris *Tbc1d7* $-/-$ (Allen Mouse Brain Atlas). Afin de vérifier cette hypothèse, des études comportementales d'équilibre et de coordination devraient être conduites, comme la marche sur poutre (« beam walking ») et le rotarod (Kawamura et al., 2021).

Anxiété

Les souris *Tbc1d7* $-/-$ ne démontrent pas de comportement de thigmotaxie supérieur à celui des souris *Tbc1d7* $+/+$ en champ ouvert. Ceci suggère que les souris *Tbc1d7* $-/-$ ne sont pas plus anxieuses que les souris *Tbc1d7* $+/+$ (Simon et al., 1994). De même, les souris *Tsc2* $-/+$ de sexe masculin ne démontrent pas de comportements d'anxiété au test en champ ouvert (Tang et al., 2014). Par contre, les souris *Tsc2* $-/+$ de sexe féminin démontrent des comportements d'anxiété au test en champ ouvert, suggérant un effet de sexe pour ce phénotype (Sare et al., 2020). Cela étant dit, nous n'avons pas relevé d'effets de sexe en ce qui a trait à l'anxiété des souris *Tbc1d7* $-/-$ au test en champ ouvert.

Apprentissage

Les résultats obtenus à l'entraînement des souris au conditionnement contextuel à la peur suggèrent que les souris *Tbc1d7* $-/-$ ont des capacités d'apprentissage similaires à celles des souris *Tbc1d7* $+/+$, signifiant que l'altération de la mémoire à long terme des souris *Tbc1d7* $-/-$ n'est pas attribuable à un déficit d'apprentissage. De même, bien que les souris *Tsc1* $-/+$ montrent des

déficits de flexibilité cognitive lors de l'apprentissage d'un nouvel emplacement de plateforme au Morris Water Maze, elles ne présentent pas de déficits dans l'apprentissage initial de l'emplacement de la plateforme (Tsai et al., 2012). De plus, les souris possédant une suppression de *Tsc1* dans leurs interneurons ne présentent pas de déficits dans l'apprentissage contextuel de la peur (Haji et al., 2020).

Mémoire

Les résultats obtenus chez les souris *Tbc1d7* *-/-* suggèrent que leur mémoire à long terme est altérée, alors que leur mémoire à court et moyen terme est préservée. En effet, les souris *Tbc1d7* *-/-* ne présentent pas de déficits de mémoire de travail au test du labyrinthe en T, ni de déficits de mémoire à court terme au test de reconnaissance de nouveaux objets ou au conditionnement contextuel à la peur. De plus, contrairement aux souris *Tsc1* *-/+* et *Tsc2* *-/+*, les souris *Tbc1d7* *-/-* ne présentent en aucun cas un déficit dans la distinction des contextes au conditionnement contextuel à la peur (Goorden et al., 2007; Ehninger et al., 2008; Haji et al., 2020). Il est intéressant de noter un effet sur la mémoire à long terme, puisque celle-ci requiert la synthèse protéique afin de stabiliser les modifications de réseaux neuronaux (Karalis and Bateup, 2021). Une hypothèse plausible est que la dérégulation de la synthèse protéique causée par la perte de régulation de mTORC1 est à la base de ces déficits de mémoire à long terme. Ceci expliquerait aussi pourquoi les souris *Tbc1d7* *-/-* ne présentent pas de déficits à court terme.

En ce qui a trait à la mémoire à moyen terme, elle semble également préservée dans le paradigme de conditionnement contextuel à la peur et de reconnaissance de nouveaux objets. Malgré que la mémoire à moyen terme semble visuellement moins bonne chez les souris *Tbc1d7* *-/-* que chez les souris *Tbc1d7* *+/+* dans le paradigme de comportement contextuel à la peur, cet effet n'est pas significatif. Il n'est par contre pas impossible qu'une augmentation du nombre de souris sujettes au test du conditionnement contextuel à la peur modifie ces résultats. Cela correspondrait par ailleurs au phénotype observé chez les souris *Tsc1* *-/+*, qui présentent des déficits de mémoire à moyen terme au conditionnement contextuel à la peur (Goorden et al., 2007). Statistiquement parlant, les souris *Tbc1d7* *-/-* ne présentent un déficit que 10 jours après leur exposition aux chocs. Il est par contre difficile de conclure que les souris *Tbc1d7* *-/-* n'ont pas de déficits de mémoire au

conditionnement contextuel à la peur plus tôt ou de plus grande sévérité que ceux discutés dans ce manuscrit puisque la mémoire est mesurée indirectement par la peur qu'exhibent les souris via leur immobilité. Cela étant dit, dans bien des cas, les souris démontraient d'autres comportements pouvant être associés à la peur lorsque replacés dans le contexte A après y avoir reçu des chocs. Un de ces comportements est le saut, qui est associé à une recherche d'échappatoire chez la souris. Ce comportement est considéré comme une réponse active à la peur, contrairement à l'immobilité qui est considéré comme une réponse passive à celle-ci (Fadok et al., 2017). Il a été montré que ce comportement est dépendant du contexte; il n'est évoqué que dans le contexte où les souris reçoivent des chocs et s'atténue avec l'extinction de la peur associée à ce contexte (Totty et al., 2021). De même, lors de notre expérimentation, il a été noté que certaines souris expérimentales sautaient de façon répétitive lorsque replacées dans le contexte A, biaisant ainsi les résultats de mémoire de peur. Il a également été noté par l'expérimentateur que lors du retrait des souris de l'appareillage en contexte A, les souris *Tbc1d7* *+/+* tentaient fréquemment de sauter pour s'enfuir de l'appareillage, alors que les souris *Tbc1d7* *-/-* se laissaient plus fréquemment prendre délicatement pour sortir de l'appareillage. Les souris *Tbc1d7* *+/+* démontraient aussi fréquemment des comportements d'agression, comme l'agitation rapide de la queue. Ces comportements d'aversion sont un indicateur de la pertinence de revisiter les données comportementales associées au conditionnement contextuel à la peur afin de vérifier s'il y a une altération du comportement échappatoire, un indicateur de la peur peu souvent utilisé mais non trivial dans l'évaluation du caractère passif ou actif de la peur (Fadok et al., 2017).

Notons également que le conditionnement contextuel à la peur sollicite des structures comme l'amygdale, l'hippocampe et le cortex préfrontal médian (Goorden et al., 2007; Curzon et al., 2009). Les modèles murins *Tsc1* *-/+* et *Tsc2* *-/+* exhibent des déficits dans la mémoire spatiale hippocampe-dépendante au Morris Water Maze et à la distinction de contextes au conditionnement contextuel à la peur (Goorden et al., 2007; Ehninger et al., 2008; Haji et al., 2020). Il est par ailleurs intéressant de constater que les souris *Tbc1d7* *-/-* ne présentent qu'un déficit de mémoire à long terme dans ce paradigme, sans déficits dans la distinction des deux contextes. Une possibilité pouvant expliquer ces résultats est que l'extinction de la peur soit plus rapide chez les souris *Tbc1d7* *-/-* que chez les souris *Tbc1d7* *+/+*. La vérification de cette hypothèse nécessite l'utilisation d'un paradigme d'extinction de la peur et serait pertinente à l'évaluation de la flexibilité cognitive des souris *Tbc1d7* *-/-*.

En ce qui a trait à la mémoire à court et moyen terme au test de reconnaissance de nouveaux objets, une très grande variabilité de l'indice de discrimination des objets a été observée chez les souris, ce qui limite l'interprétation possible des résultats. Certaines souris *Tbc1d7* $+/+$ présentaient d'ailleurs anormalement une préférence pour l'objet familier. Contrairement aux souris *Tbc1d7* $-/-$, les souris *Tsc2* $-/+$ et les souris avec suppression conditionnelle de *Atg7* présentent un déficit de mémoire à court terme au test de reconnaissance de nouveaux objets qui n'est pas attribuable à une modification de l'exploration totale des objets. Cela étant dit, ces souris ont tout de même un indice de discrimination positif, indiquant que malgré que leur mémoire soit altérée par rapport aux souris de type sauvage, elles préfèrent tout de même explorer le nouvel objet (Tang et al., 2014). Afin de vérifier si les souris *Tbc1d7* $-/-$ présentent des déficits de mémoire similaires, l'expérience devra être répétée avec un plus grand nombre de souris afin de limiter la variabilité des données.

Masse du cerveau

En ce qui a trait à la masse corporelle des souris *Tbc1d7* $-/-$, elle n'est pas significativement différente de celle des souris *Tbc1d7* $+/+$, et ce, indépendamment du sexe. Par contre, pour ce qui est de la masse du cerveau des souris *Tbc1d7* $-/-$, nous notons une augmentation significative par rapport à leurs congénères, et ce, seulement chez les mâles. Ce résultat est surprenant considérant qu'aucun des autres résultats ne présentent d'effets de sexe et mène à un questionnement fondamental sur l'impact d'une mutation qui, à la base, n'est pas liée aux chromosomes sexuels. La réponse se trouve peut-être dans une constatation effectuée à la naissance d'un enfant de sexe masculin atteint du syndrome TBC1D7, qui présentait déjà une macrocéphalie à ce moment, alors que cette constatation n'a pas été faite chez sa sœur, également atteinte du syndrome. Par contre, à l'âge de 9 ans, elle présentait une mégalencéphalie (Capo-Chichi et al., 2013). Il est possible que cette constatation soit une coïncidence, mais il est également possible que la mégalencéphalie apparaisse plus tard chez les femmes que chez les hommes. Bien qu'un effet significatif sur la masse du cerveau n'ait été observée que chez les souris de sexe masculin, il est possible qu'un effet semblable soit retrouvé chez les souris de sexe féminin dans d'autres conditions expérimentales. Plusieurs hypothèses sont plausibles pour expliquer le résultat que nous avons observé. La première hypothèse est que la taille de l'effet est moins grande chez les femelles qu'elle ne l'est chez les mâles. Dans ce cas, une augmentation du nombre de souris utilisées dans le cadre de cette

expérience pourrait renseigner sur la présence ou l'absence d'un effet significatif chez les femelles. Une seconde hypothèse plausible est que la mesure de la masse du cerveau est effectuée à un âge inapproprié chez les femelles. Dans le cas d'une croissance cérébrale hâtive mais s'estompant dans le temps, la fenêtre temporelle choisie serait trop tardive pour noter un effet. Dans le cas contraire où la croissance du cerveau serait lente mais continue, une mesure à un âge plus avancé serait de mise. Cela étant dit, une étude appropriée à mener pour confirmer ou infirmer cette hypothèse serait de déterminer le rythme de croissance du cerveau à l'aide d'une étude longitudinale. Il serait intéressant de vérifier cette hypothèse à l'aide de paradigmes permettant de suivre la croissance du volume du cerveau chez les souris. Un paradigme approprié pour cette étude serait un suivi à long terme par IRM *in vivo*, qui permettrait d'acquérir des données sur la dysmorphie sexuelle associée à la mégalencéphalie. La troisième hypothèse plausible est qu'il n'y a pas de différence significative chez les femelles, ce qui pourrait être un dimorphisme sexuel parmi tant d'autres. Ceux-ci sont particulièrement communs, entre autres, en ce qui a trait au volume des régions corticales et sous-corticales. En effet, il a été démontré chez la souris que le sexe de l'animal et la présence d'androgènes module le volume du cerveau de façon différente chez des souris XX, XY et XO (Raznahan et al., 2013). De plus, certains modèles murins de trisomie 21 présentent d'importants dimorphismes sexuels à un niveau moléculaire et comportemental (Minter and Gardiner, 2021).

Afin de mieux comprendre le phénotype d'augmentation de la masse du cerveau retrouvée chez les mâles *Tbc1d7* *-/-*, nous avons décidé d'effectuer des IRM *in vivo* chez les mâles âgés de 45 jours. Nous avons décidé de procéder avec un protocole *in vivo* afin de nous permettre de déterminer si les souris *Tbc1d7* *-/-* possèdent un mégalencéphalie primaire comme il est le cas chez les patients ou si celle-ci est secondaire à une hydrocéphalie, qui est évidemment indétectable au moment de la dissection. Le protocole d'IRM *in vivo* permet à la fois d'éliminer l'effondrement des ventricules, causé par l'absence de liquide céphalo-rachidien après la perfusion des souris, qui rend l'analyse de la taille des ventricules inexacte. De plus, le protocole d'IRM *in vivo* a comme avantage de limiter la diminution régionalement hétérogène de volume cérébral causée par la PFA (Holmes et al., 2017). Globalement, l'analyse des souris *Tbc1d7* *-/-* nous renseignera sur la cause neuroanatomique de l'augmentation de la masse totale du cerveau. Nos résultats préliminaires, effectuée avec 3 souris de chaque génotype, suggèrent une augmentation du volume total du cerveau chez les souris *Tbc1d7* *-/-* de sexe masculin par rapport à leurs compatriotes *Tbc1d7* *+/+*.

D'autres IRMs sont planifiées afin de spécifier le phénotype par une analyse volumétrique de régions corticales et sous-corticales précises. Il est rapporté chez l'humain que dans la majorité des cas de macrocéphalie associée à l'autisme, l'augmentation du volume du tissu cérébral est attribuable à l'augmentation de la matière blanche (Williams et al., 2008). De même, il a été soulevé que certains patients atteints du syndrome TBC1D7 présentaient un élargissement du corps calleux (Capo-Chichi et al., 2013). Nos analyses d'IRM futures nous permettront de déterminer s'il en est également le cas pour les souris *Tbc1d7* -/-.

Perspectives

Bien que certaines expériences futures aient déjà été mentionnées au cours de la discussion, celles-ci étaient relatives à des observations déjà effectuées. Cela étant dit, ce projet prometteur n'en est qu'à ses débuts et divers aspects méritent d'être étudiés. Tout d'abord, d'un point de vue comportemental, il est évidemment pertinent de reproduire une variété d'expériences qui ont préalablement été effectuées chez les souris *Tsc1* +/- ou *Tsc2* +/- afin de mieux distinguer les effets de la dysfonction de chacune de ces sous-unités du complexe TSC1-TSC2-TBC1D7. Des études de sociabilité sont de mise puisque les comportements sociaux sont globalement altérés chez les souris *Tsc1* +/- et *Tsc2* +/- . Une batterie de paradigmes de comportements sociaux devrait être effectuée chez les souris *Tbc1d7* -/. De plus, les patients atteints du syndrome TBC1D7 ont des délais développementaux (Capo-Chichi et al., 2013; Alfaiz et al., 2014). L'expérimentateur a également noté au cours de l'expérimentation comportementale que certaines souris adultes conservaient des comportements généralement associés à l'enfance, comme les « morsures d'amour ». Il serait pertinent d'évaluer l'évolution développementale des souris *Tbc1d7* -/ à l'aide de l'étude des vocalisations ultrasoniques, qui sont altérées chez les souris *Tsc1* +/- et *Tsc2* +/- (Ehninger and Silva, 2011; Tsai et al., 2012). Une fois qu'il sera confirmé que les phénotypes observés sont dépendants de mTORC1, il serait également pertinent de tenter un traitement à la rapamycine, avec un paradigme approprié, pour renverser les phénotypes comportementaux observés.

En plus des études comportementales, des études morphologiques devraient être réalisées. À cet effet, des études histologiques du cerveau entier sont planifiées prochainement. De plus, des études immunohistochimiques devraient être effectuées pour évaluer l'impact de la perte de fonction de

Tbc1d7 sur la morphologie cellulaire *in vivo*. L'étude de la taille du soma, ainsi que de la complexité de l'arborisation dendritique devrait être réalisée chez ces souris afin de comparer ces résultats avec ceux obtenus chez les souris *Tsc1* *-/+* et *Tsc2* *-/+*, ainsi qu'avec les modèles *in vitro* de suppression de TBC1D7 qui sont mentionnés dans l'introduction (Tavazoie et al., 2005; Dibble et al., 2012; Tang et al., 2014; Potheraveedu et al., 2017). Des études d'expression devraient également être menées afin de déterminer si TBC1D7 est exprimé dans tous les types cellulaires ou s'il se trouve enrichi dans certaines populations.

Aussi, il est évidemment pertinent de procéder à une évaluation de l'activité de la voie de signalisation mTORC1 en évaluant la proportion de phosphorylation de ses effecteurs à l'aide d'une technique de WB, ainsi que de tenter un traitement à la rapamycine afin de vérifier si les phénotypes observés chez la souris *Tbc1d7* *-/-* sont bel et bien médiés par la voie mTORC1. Il serait d'autant plus intéressant de procéder à ces expériences dans des conditions énergétiques différentes, afin de déterminer dans quelles conditions la voie mTORC1 devient hyperactive.

La dernière expérience proposée vise à réguler la voie mTORC1 via les acides aminés, qui eux, régissent la voie mTORC1 indépendamment du complexe TSC1-TSC2-TBC1D7. Tel que mentionné précédemment, l'absence d'acides aminés cause rapidement un détachement de mTORC1 du lysosome et une inactivation des voies en aval, même en présence de facteurs de croissance (Dibble and Cantley, 2015). Cela étant dit, il pourrait être intéressant de vérifier si différents paradigmes de jeûne intermittent ou de restriction calorique peuvent inhiber mTORC1 chez la souris *Tbc1d7* *-/-*. Par ailleurs, ce type de traitement non-pharmacologique est déjà étudié dans des modèles de cancers colorectaux chez la souris et provoque une diminution de la prolifération accompagnée d'une diminution de la taille de tumeurs (Weng et al., 2020). L'évaluation de ce traitement non-pharmacologique chez la souris *Tbc1d7* *-/-* et sa comparaison avec un traitement à la rapamycine pourrait représenter une percée clinique importante pour le traitement de patients atteints du syndrome TBC1D7. Elle pourrait se révéler être une voie de traitement alternative dans les cas où les traitements à la rapamycine sont inefficaces, comme il semble être le cas pour les patients de TSC (Mizuguchi et al., 2019; Overwater et al., 2019).

Conclusions

Le but de notre étude consistait à étudier un modèle translationnel de perte de fonction de TBC1D7. Nous avons réussi à générer un modèle de souris possédant une perte de fonction de *Tbc1d7*, causée par la suppression de ses exons 3 et 4, qui sont importants pour l'interaction entre TBC1D7 et TSC1 (Santiago Lima et al., 2014). L'absence de *Tbc1d7* a été confirmée chez la souris *Tbc1d7* ^{-/-} à l'aide de WB, ce qui réplique bien le phénotype biochimique retrouvé chez les patients (Capo-Chichi et al., 2013; Alfaiz et al., 2014). La caractérisation cognitivo-comportementale de notre modèle murin a également révélé d'intéressants résultats quant à l'hypoactivité et/ou le désintérêt des souris *Tbc1d7* ^{-/-} dans une tâche d'enfouissement de billes. Notre étude a également suggéré que les souris *Tbc1d7* ^{-/-} présentent uniquement un déficit de mémoire à long terme au conditionnement contextuel à la peur, ce qui est possiblement un indicateur de la cause des déficits cognitifs chez l'humain. Cela étant dit, le conditionnement contextuel à la peur fait appel à diverses structures neuroanatomiques comme l'amygdale mais aussi l'hippocampe et le cortex frontal et cingulaire (Curzon et al., 2009). Il est donc fort possible que le déficit cognitif retrouvé chez la souris soit lié à l'hyperactivité de la voie mTORC1 au sein de ces structures. Des études d'activité de cette voie de signalisation devront être réalisées afin de vérifier cette hypothèse. De plus, notre évaluation de la masse cérébrale a révélé une augmentation de celle-ci chez les souris *Tbc1d7* ^{-/-} de sexe masculin. Ce résultat est consistant avec le phénotype fréquemment retrouvé chez les patients (Capo-Chichi et al., 2013; Alfaiz et al., 2014; Taskiran et al., 2021). Cela étant dit, nous ne pouvons pas conclure sur ce qui est à la base de ces changements macroscopiques. Pour ce faire, plusieurs études devront être réalisées, dont certaines qui sont déjà en cours. Des études IRM, des études histologiques, ainsi que des études d'activité de la voie mTORC1 devront être réalisées pour conclure à ce sujet.

Références bibliographiques

- Alfaiz AA, Micale L, Mandriani B, Augello B, Pellico MT, Chrast J, Xenarios I, Zelante L, Merla G, Reymond A (2014) TBC1D7 mutations are associated with intellectual disability, macrocrania, patellar dislocation, and celiac disease. *Hum Mutat* 35:447-451.
- Angoa-Perez M, Kane MJ, Briggs DI, Francescutti DM, Kuhn DM (2013) Marble burying and nestlet shredding as tests of repetitive, compulsive-like behaviors in mice. *J Vis Exp*:50978.
- Anttila V et al. (2013) Genome-wide meta-analysis identifies new susceptibility loci for migraine. *Nat Genet* 45:912-917.
- Baldassari S, Licchetta L, Tinuper P, Bisulli F, Pippucci T (2016) GATOR1 complex: the common genetic actor in focal epilepsies. *J Med Genet* 53:503-510.
- Bar-Peled L, Schweitzer LD, Zoncu R, Sabatini DM (2012) Ragulator is a GEF for the rag GTPases that signal amino acid levels to mTORC1. *Cell* 150:1196-1208.
- Belelovsky K, Kaphzan H, Elkobi A, Rosenblum K (2009) Biphasic activation of the mTOR pathway in the gustatory cortex is correlated with and necessary for taste learning. *J Neurosci* 29:7424-7431.
- Betz C, Hall MN (2013) Where is mTOR and what is it doing there? *J Cell Biol* 203:563-574.
- Butler MG, Dasouki MJ, Zhou XP, Talebizadeh Z, Brown M, Takahashi TN, Miles JH, Wang CH, Stratton R, Pilarski R, Eng C (2005) Subset of individuals with autism spectrum disorders and extreme macrocephaly associated with germline PTEN tumour suppressor gene mutations. *J Med Genet* 42:318-321.
- Cambiaghi M, Cursi M, Magri L, Castoldi V, Comi G, Minicucci F, Galli R, Leocani L (2013) Behavioural and EEG effects of chronic rapamycin treatment in a mouse model of tuberous sclerosis complex. *Neuropharmacology* 67:1-7.
- Capo-Chichi JM, Tcherkezian J, Hamdan FF, Decarie JC, Dobrzyniecka S, Patry L, Nadon MA, Mucha BE, Major P, Shevell M, Bencheikh BO, Joober R, Samuels ME, Rouleau GA, Roux PP, Michaud JL (2013) Disruption of TBC1D7, a subunit of the TSC1-TSC2 protein complex, in intellectual disability and megalencephaly. *J Med Genet* 50:740-744.
- Choo AY, Yoon SO, Kim SG, Roux PP, Blenis J (2008) Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:17414-17419.
- Chung CY, Shin HR, Berdan CA, Ford B, Ward CC, Olzmann JA, Zoncu R, Nomura DK (2019) Covalent targeting of the vacuolar H(+)-ATPase activates autophagy via mTORC1 inhibition. *Nat Chem Biol* 15:776-785.
- Crino PB (2013) Evolving neurobiology of tuberous sclerosis complex. *Acta Neuropathol* 125:317-332.
- Curzon P, Rustay NR, Browman KE (2009) *Frontiers in Neuroscience*
- Cued and Contextual Fear Conditioning for Rodents. In: *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience* (Buccafusco JJ, ed). Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis. Copyright © 2009, Taylor & Francis Group, LLC.
- Deli A, Schipany K, Rosner M, Hoyer H, Pollak A, Li L, Hengstschlager M, Lubec G (2012) Blocking mTORC1 activity by rapamycin leads to impairment of spatial memory retrieval but not acquisition in C57BL/6J mice. *Behav Brain Res* 229:320-324.

- Demetriades C, Doumpas N, Teleman AA (2014) Regulation of TORC1 in response to amino acid starvation via lysosomal recruitment of TSC2. *Cell* 156:786-799.
- Dibble CC, Cantley LC (2015) Regulation of mTORC1 by PI3K signaling. *Trends Cell Biol* 25:545-555.
- Dibble CC, Elis W, Menon S, Qin W, Klekota J, Asara JM, Finan PM, Kwiatkowski DJ, Murphy LO, Manning BD (2012) TBC1D7 is a third subunit of the TSC1-TSC2 complex upstream of mTORC1. *Mol Cell* 47:535-546.
- Ehninger D, Silva AJ (2011) Rapamycin for treating Tuberous sclerosis and Autism spectrum disorders. *Trends Mol Med* 17:78-87.
- Ehninger D, Han S, Shilyansky C, Zhou Y, Li W, Kwiatkowski DJ, Ramesh V, Silva AJ (2008) Reversal of learning deficits in a *Tsc2*^{+/-} mouse model of tuberous sclerosis. *Nat Med* 14:843-848.
- Fadok JP, Krabbe S, Markovic M, Courtin J, Xu C, Massi L, Botta P, Bylund K, Muller C, Kovacevic A, Tovote P, Luthi A (2017) A competitive inhibitory circuit for selection of active and passive fear responses. *Nature* 542:96-100.
- Fitzian K, Bruckner A, Brohee L, Zech R, Antoni C, Kiontke S, Gasper R, Linard Matos AL, Beel S, Wilhelm S, Gerke V, Ungermann C, Nellist M, Raunser S, Demetriades C, Oeckinghaus A, Kummel D (2021) TSC1 binding to lysosomal PIPs is required for TSC complex translocation and mTORC1 regulation. *Mol Cell* 81:2705-2721 e2708.
- Gai Z, Chu W, Deng W, Li W, Li H, He A, Nellist M, Wu G (2016) Structure of the TBC1D7-TSC1 complex reveals that TBC1D7 stabilizes dimerization of the TSC1 C-terminal coiled coil region. *J Mol Cell Biol* 8:411-425.
- Gilbert J, O'Connor M, Templet S, Moghaddam M, Di Via Ioschpe A, Sinclair A, Zhu LQ, Xu W, Man HY (2020) NEXMIF/KIDLIA Knock-out Mouse Demonstrates Autism-Like Behaviors, Memory Deficits, and Impairments in Synapse Formation and Function. *J Neurosci* 40:237-254.
- Goorden SM, van Woerden GM, van der Weerd L, Cheadle JP, Elgersma Y (2007) Cognitive deficits in *Tsc1*^{+/-} mice in the absence of cerebral lesions and seizures. *Ann Neurol* 62:648-655.
- Graber TE, McCamphill PK, Sossin WS (2013) A recollection of mTOR signaling in learning and memory. *Learn Mem* 20:518-530.
- Greco B, Manago F, Tucci V, Kao HT, Valtorta F, Benfenati F (2013) Autism-related behavioral abnormalities in synapsin knockout mice. *Behav Brain Res* 251:65-74.
- Haji N, Riebe I, Aguilar-Valles A, Artinian J, Laplante I, Lacaille JC (2020) *Tsc1* haploinsufficiency in *Nkx2.1* cells upregulates hippocampal interneuron mTORC1 activity, impairs pyramidal cell synaptic inhibition, and alters contextual fear discrimination and spatial working memory in mice. *Mol Autism* 11:29.
- Halloran J, Hussong SA, Burbank R, Podlutskaya N, Fischer KE, Sloane LB, Austad SN, Strong R, Richardson A, Hart MJ, Galvan V (2012) Chronic inhibition of mammalian target of rapamycin by rapamycin modulates cognitive and non-cognitive components of behavior throughout lifespan in mice. *Neuroscience* 223:102-113.
- Hansen BH, Oerbeck B, Skirbekk B, Petrovski BE, Kristensen H (2018) Neurodevelopmental disorders: prevalence and comorbidity in children referred to mental health services. *Nord J Psychiatry* 72:285-291.
- Hensch TK (2005) Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci* 6:877-888.
- Hillmann P, Fabbro D (2019) PI3K/mTOR Pathway Inhibition: Opportunities in Oncology and Rare Genetic Diseases. *Int J Mol Sci* 20.

- Holmes HE, Powell NM, Ma D, Ismail O, Harrison IF, Wells JA, Colgan N, O'Callaghan JM, Johnson RA, Murray TK, Ahmed Z, Heggenes M, Fisher A, Cardoso MJ, Modat M, O'Neill MJ, Collins EC, Fisher EM, Ourselin S, Lythgoe MF (2017) Comparison of In Vivo and Ex Vivo MRI for the Detection of Structural Abnormalities in a Mouse Model of Tauopathy. *Front Neuroinform* 11:20.
- Huang J, Manning BD (2008) The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem J* 412:179-190.
- Ka M, Smith AL, Kim WY (2017) mTOR controls genesis and autophagy of GABAergic interneurons during brain development. *Autophagy* 13:1348-1363.
- Karalis V, Bateup HS (2021) Current Approaches and Future Directions for the Treatment of mTORopathies. *Dev Neurosci* 43:143-158.
- Karbowniczek M, Zitserman D, Khabibullin D, Hartman T, Yu J, Morrison T, Nicolas E, Squillace R, Roegiers F, Henske EP (2010) The evolutionarily conserved TSC/Rheb pathway activates Notch in tuberous sclerosis complex and *Drosophila* external sensory organ development. *J Clin Invest* 120:93-102.
- Kawamura A, Katayama Y, Kakegawa W, Ino D, Nishiyama M, Yuzaki M, Nakayama KI (2021) The autism-associated protein CHD8 is required for cerebellar development and motor function. *Cell Rep* 35:108932.
- Li J, Kim SG, Blenis J (2014) Rapamycin: one drug, many effects. *Cell Metab* 19:373-379.
- Lim KC, Crino PB (2013) Focal malformations of cortical development: new vistas for molecular pathogenesis. *Neuroscience* 252:262-276.
- Ma J et al. (2010) Mammalian target of rapamycin regulates murine and human cell differentiation through STAT3/p63/Jagged/Notch cascade. *J Clin Invest* 120:103-114.
- Magaway C, Kim E, Jacinto E (2019) Targeting mTOR and Metabolism in Cancer: Lessons and Innovations. *Cells* 8.
- McIlwain KL, Merriweather MY, Yuva-Paylor LA, Paylor R (2001) The use of behavioral test batteries: effects of training history. *Physiol Behav* 73:705-717.
- Meffre J, Chaumont-Dubel S, Mannoury la Cour C, Loiseau F, Watson DJ, Dekeyne A, Seveno M, Rivet JM, Gaven F, Deleris P, Herve D, Fone KC, Bockaert J, Millan MJ, Marin P (2012) 5-HT₆ receptor recruitment of mTOR as a mechanism for perturbed cognition in schizophrenia. *EMBO Mol Med* 4:1043-1056.
- Menon S, Dibble CC, Talbott G, Hoxhaj G, Valvezan AJ, Takahashi H, Cantley LC, Manning BD (2014) Spatial control of the TSC complex integrates insulin and nutrient regulation of mTORC1 at the lysosome. *Cell* 156:771-785.
- Minter R, Gardiner KJ (2021) Trisomy of Human Chromosome 21 Orthologs Mapping to Mouse Chromosome 10 Cause Age and Sex-Specific Learning Differences: Relevance to Down Syndrome. *Genes (Basel)* 12.
- Mizuguchi M, Ikeda H, Kagitani-Shimono K, Yoshinaga H, Suzuki Y, Aoki M, Endo M, Yonemura M, Kubota M (2019) Everolimus for epilepsy and autism spectrum disorder in tuberous sclerosis complex: EXIST-3 substudy in Japan. *Brain Dev* 41:1-10.
- Morita M, Gravel SP, Hulea L, Larsson O, Pollak M, St-Pierre J, Topisirovic I (2015) mTOR coordinates protein synthesis, mitochondrial activity and proliferation. *Cell Cycle* 14:473-480.
- Moy SS, Nadler JJ, Magnuson TR, Crawley JN (2006) Mouse models of autism spectrum disorders: the challenge for behavioral genetics. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 142C:40-51.

- Nguyen LH, Mahadeo T, Bordey A (2019) mTOR Hyperactivity Levels Influence the Severity of Epilepsy and Associated Neuropathology in an Experimental Model of Tuberous Sclerosis Complex and Focal Cortical Dysplasia. *J Neurosci* 39:2762-2773.
- Norrmen C, Suter U (2013) Akt/mTOR signalling in myelination. *Biochem Soc Trans* 41:944-950.
- Overwater IE, Rietman AB, Mous SE, Bindels-de Heus K, Rizopoulos D, Ten Hoopen LW, van der Vaart T, Jansen FE, Elgersma Y, Moll HA, de Wit MY, Disorders EECfN (2019) A randomized controlled trial with everolimus for IQ and autism in tuberous sclerosis complex. *Neurology* 93:e200-e209.
- Patton MH, Blundon JA, Zakharenko SS (2019) Rejuvenation of plasticity in the brain: opening the critical period. *Curr Opin Neurobiol* 54:83-89.
- Potheraveedu VN, Schopel M, Stoll R, Heumann R (2017) Rheb in neuronal degeneration, regeneration, and connectivity. *Biol Chem* 398:589-606.
- Qin J, Wang Z, Hoogeveen-Westerveld M, Shen G, Gong W, Nellist M, Xu W (2016) Structural Basis of the Interaction between Tuberous Sclerosis Complex 1 (TSC1) and Tre2-Bub2-Cdc16 Domain Family Member 7 (TBC1D7). *J Biol Chem* 291:8591-8601.
- Rajgor D, Welle TM, Smith KR (2021) The Coordination of Local Translation, Membranous Organelle Trafficking, and Synaptic Plasticity in Neurons. *Front Cell Dev Biol* 9:711446.
- Raznahan A, Probst F, Palmert MR, Giedd JN, Lerch JP (2013) High resolution whole brain imaging of anatomical variation in XO, XX, and XY mice. *Neuroimage* 83:962-968.
- Ren S, Huang Z, Jiang Y, Wang T (2018) dTBC1D7 regulates systemic growth independently of TSC through insulin signaling. *J Cell Biol* 217:517-526.
- Sanes DH, Reh TA, Harris WA (2012a) 3 - Genesis and migration. In: *Development of the Nervous System (Third Edition)* (Sanes DH, Reh TA, Harris WA, eds), pp 49-75. London: Academic Press.
- Sanes DH, Reh TA, Harris WA (2012b) 2 - Polarity and segmentation. In: *Development of the Nervous System (Third Edition)* (Sanes DH, Reh TA, Harris WA, eds), pp 23-48. London: Academic Press.
- Santiago Lima AJ, Hoogeveen-Westerveld M, Nakashima A, Maat-Kievit A, van den Ouweland A, Halley D, Kikkawa U, Nellist M (2014) Identification of regions critical for the integrity of the TSC1-TSC2-TBC1D7 complex. *PLoS One* 9:e93940.
- Santini E, Huynh TN, MacAskill AF, Carter AG, Pierre P, Ruggero D, Kaphzan H, Klann E (2013) Exaggerated translation causes synaptic and behavioural aberrations associated with autism. *Nature* 493:411-415.
- Sare RM, Lemons A, Figueroa C, Song A, Levine M, Beebe Smith C (2020) Sex-Selective Effects on Behavior in a Mouse Model of Tuberous Sclerosis Complex. *eNeuro* 7.
- Sato N, Koinuma J, Ito T, Tsuchiya E, Kondo S, Nakamura Y, Daigo Y (2010) Activation of an oncogenic TBC1D7 (TBC1 domain family, member 7) protein in pulmonary carcinogenesis. *Genes Chromosomes Cancer* 49:353-367.
- Saxton RA, Sabatini DM (2017) mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 168:960-976.
- Schreiber KH, Arriola Apelo SI, Yu D, Brinkman JA, Velarde MC, Syed FA, Liao CY, Baar EL, Carbajal KA, Sherman DS, Ortiz D, Brunauer R, Yang SE, Tzannis ST, Kennedy BK, Lamming DW (2019) A novel rapamycin analog is highly selective for mTORC1 in vivo. *Nat Commun* 10:3194.
- Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, Ferriero DM, Noble-Haeusslein LJ (2013) Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Progress in Neurobiology* 106-107:1-16.

- Shimobayashi M, Hall MN (2016) Multiple amino acid sensing inputs to mTORC1. *Cell Res* 26:7-20.
- Silverman JL, Yang M, Lord C, Crawley JN (2010) Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nat Rev Neurosci* 11:490-502.
- Simon P, Dupuis R, Costentin J (1994) Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. *Behav Brain Res* 61:59-64.
- Srivastava AK, Schwartz CE (2014) Intellectual disability and autism spectrum disorders: causal genes and molecular mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev* 46 Pt 2:161-174.
- Tang G, Gudsnuk K, Kuo SH, Cotrina ML, Rosoklija G, Sosunov A, Sonders MS, Kanter E, Castagna C, Yamamoto A, Yue Z, Arancio O, Peterson BS, Champagne F, Dwork AJ, Goldman J, Sulzer D (2014) Loss of mTOR-dependent macroautophagy causes autistic-like synaptic pruning deficits. *Neuron* 83:1131-1143.
- Taskiran EZ, Karaosmanoglu B, Kosukcu C, Urel-Demir G, Akgun-Dogan O, Simsek-Kiper PO, Alikasifoglu M, Boduroglu K, Utine GE (2021) Diagnostic yield of whole-exome sequencing in non-syndromic intellectual disability. *J Intellect Disabil Res* 65:577-588.
- Tavazoie SF, Alvarez VA, Ridenour DA, Kwiatkowski DJ, Sabatini BL (2005) Regulation of neuronal morphology and function by the tumor suppressors Tsc1 and Tsc2. *Nat Neurosci* 8:1727-1734.
- Totty MS, Warren N, Huddleston I, Ramanathan KR, Ressler RL, Oleksiak CR, Maren S (2021) Behavioral and brain mechanisms mediating conditioned flight behavior in rats. *Sci Rep* 11:8215.
- Tsai PT, Hull C, Chu Y, Greene-Colozzi E, Sadowski AR, Leech JM, Steinberg J, Crawley JN, Regehr WG, Sahin M (2012) Autistic-like behaviour and cerebellar dysfunction in Purkinje cell Tsc1 mutant mice. *Nature* 488:647-651.
- Tsetsos F, Padmanabhuni SS, Alexander J, Karagiannidis I, Tsifintaris M, Topaloudi A, Mantzaris D, Georgitsi M, Drineas P, Paschou P (2016) Meta-Analysis of Tourette Syndrome and Attention Deficit Hyperactivity Disorder Provides Support for a Shared Genetic Basis. *Front Neurosci* 10:340.
- van Lier M, Saiepour MH, Kole K, Cheyne JE, Zabouri N, Blok T, Qin Y, Ruimschotel E, Heimel JA, Lohmann C, Levelt CN (2020) Disruption of Critical Period Plasticity in a Mouse Model of Neurofibromatosis Type 1. *J Neurosci* 40:5495-5509.
- Vyshedskiy A, Mahapatra S, Dunn R (2017) Linguistically deprived children: meta-analysis of published research underlines the importance of early syntactic language use for normal brain development. *Research Ideas and Outcomes* 3.
- Weng ML, Chen WK, Chen XY, Lu H, Sun ZR, Yu Q, Sun PF, Xu YJ, Zhu MM, Jiang N, Zhang J, Zhang JP, Song YL, Ma D, Zhang XP, Miao CH (2020) Fasting inhibits aerobic glycolysis and proliferation in colorectal cancer via the Fdft1-mediated AKT/mTOR/HIF1alpha pathway suppression. *Nat Commun* 11:1869.
- Wiesel TN, Hubel DH (1963) SINGLE-CELL RESPONSES IN STRIATE CORTEX OF KITTENS DEPRIVED OF VISION IN ONE EYE. *Journal of Neurophysiology* 26:1003-1017.
- Williams CA, Dagli A, Battaglia A (2008) Genetic disorders associated with macrocephaly. *Am J Med Genet A* 146A:2023-2037.
- Yang H, Yu Z, Chen X, Li J, Li N, Cheng J, Gao N, Yuan HX, Ye D, Guan KL, Xu Y (2021) Structural insights into TSC complex assembly and GAP activity on Rheb. *Nat Commun* 12:339.

Yuan ZF, Mao SS, Shen J, Jiang LH, Xu L, Xu JL, Gao F (2020) Insulin-Like Growth Factor-1 Down-Regulates the Phosphorylation of FXYP1 and Rescues Behavioral Deficits in a Mouse Model of Rett Syndrome. *Front Neurosci* 14:20.

