

Université de Montréal

**Anomalies oculaires chez le modèle murin *C57BL/6Toupee* :
implications sur la variabilité phénotypique du syndrome
CHARGE et sur le rôle de *FAM172A* dans le
développement oculaire**

par Elizabeth Leduc

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en Biologie moléculaire
Option maladies complexes chez l'humain

Août, 2019

© Elizabeth Leduc, 2019

Résumé

Le syndrome CHARGE est une maladie génétique rare dont l'acronyme désigne les principales anomalies initialement identifiées pour décrire ce syndrome : colobome, problèmes cardiaques, atrésie des choanes, retard mental et de développement, anomalies génitales et défauts aux oreilles. Les patients présentent des combinaisons hautement variables d'anomalies et ce même entre individus d'une même famille. La principale cause de ce syndrome est une mutation du gène *CHD7*, mais de nouveaux gènes dont la mutation peut également engendrer ce syndrome, tel *FAM172A*, ont récemment été identifiés. Le modèle murin *Toupee* porte une mutation dans le gène *Fam172a* et présente les principales caractéristiques du syndrome CHARGE. Fait intéressant, si *FVB**Toupee* présente dans une forte proportion le colobome oculaire, 55% des individus *B6**Toupee*^{Tg/Tg} et 16% des individus *B6**Toupee*^{Tg/+} présentent de la microphthalmie et de l'anophtalmie.

Ces anomalies oculaires ont tout d'abord été caractérisées. Les études menées ont notamment permis d'identifier que chez *B6**Toupee* la microphthalmie et l'anophtalmie sont beaucoup plus fréquentes dans l'œil droit et qu'elles se déclinent en plusieurs degrés variables d'atteinte au globe oculaire.

Par la suite, l'étude comparative des modèles *Toupee*^{Tg/Tg} et *Chd7*^{Gt/+} a été réalisée dans les fonds génétiques FVB et C57Bl/6. Des différences significatives de pénétrance de même que des divergences phénotypiques ont permis de déterminer que l'identité du gène à l'origine du syndrome CHARGE et que le fond génétique modulent tous deux le développement phénotypique du syndrome CHARGE.

Finalement, l'étude de doubles hétérozygotes *FVB**Toupee*^{Tg/+}; *Chd7*^{Gt/+} a permis de confirmer une interaction génétique modérée entre *Fam172a* et *Chd7* tandis que l'investigation de la mortalité néonatale chez *Chd7*^{Gt/+} a permis de suspecter des problèmes d'alimentation.

Mots-clés : Syndrome CHARGE, *Fam172a*, *Chd7*, variabilité phénotypique, fond génétique, colobome, microphthalmie, anophtalmie, développement oculaire

Abstract

CHARGE syndrome is a rare genetic disease for which the acronym stands for the main characteristics initially identified to describe the syndrome: coloboma, heart problems, choanal atresia, retarded growth and development, genital anomalies and ear defects. Patients present highly variable combinations of anomalies, even between members of the same family. The main cause of this syndrome is a mutation in the *CHD7* gene, but new genes whose mutation can also give rise to this syndrome, such as *FAM172A*, were recently identified. The *Fam172a* gene is mutated in the *Toupee* mouse model, which presents the main characteristics of CHARGE syndrome. Interestingly, while *FVB**Toupee* animals present coloboma in a strong proportion, 55% of *B6**Toupee*^{Tg/Tg} individuals and 16% of *B6**Toupee*^{Tg/+} individuals present microphthalmia and anophthalmia.

First, detailed characterization of these ocular anomalies revealed that microphthalmia and anophthalmia are much more frequent in the right eye of *B6**Toupee* mice, with varying degrees of severity.

Then, comparative analysis of *Toupee*^{Tg/Tg} and *Chd7*^{Gt/+} models in FVB and C57Bl/6 genetic backgrounds further revealed significant differences in penetrance and phenotypic presentation, suggesting that the identity of the causative gene and the genetic background both modulate phenotypic outcome of CHARGE syndrome.

Finally, characterization of *FVB**Toupee*^{Tg/+};*Chd7*^{Gt/+} double heterozygotes confirmed a moderate genetic interaction between *Fam172a* and *Chd7* while investigations of *Chd7*^{Gt/+} neonatal mortality allowed to suspect feeding problems.

Keywords : CHARGE syndrome, *Fam172a*, *Chd7*, phenotypic variability, genetic background, neonatal mortality, coloboma, microphthalmia, anophthalmia, eye development

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures	vii
Liste des sigles et abréviations.....	ix
Remerciements.....	xii
1. Introduction.....	13
1.1. Syndrome CHARGE.....	13
1.1.1. Classification.....	13
1.1.2. Caractéristiques.....	16
1.1.3. Génétique	19
1.1.4. Mécanismes moléculaires	21
1.1.5. Diagnostiques connexes.....	21
1.2. CHD7	21
1.2.1. Structure	21
1.2.2. Fonctions.....	22
1.2.3. Modèles murins.....	23
1.3. FAM172A	25
1.3.1. Structure	25
1.3.2. Localisation et expression.....	25
1.3.3. Interactions.....	25
1.3.4. Fonctions.....	26
1.3.5. Modèle murin <i>Toupee</i>	28
1.4. L'œil.....	32
1.4.1. Anatomie et fonctionnement global.....	32
1.4.2. Développement	34
1.4.3. Contribution des CCN.....	35

1.4.4. Régulation génique	37
1.4.5. Anomalies oculaires dans le syndrome CHARGE	39
1.4.6. Microphthalmie et anophtalmie	39
1.5. Hypothèses et objectifs	41
2. Méthodes.....	43
2.1. Animaux.....	43
2.2. Génotypage et sexage	43
2.3. Histologie.....	44
2.4. Analyses du squelette.....	44
2.5. Colobome.....	45
2.6. Tests de respiration	45
2.7. Immunohistochimie	45
2.8. Analyses transcriptomiques	45
2.9. Analyses statistiques	46
3. Résultats.....	47
3.1. Microphthalmie et anophtalmie chez <i>B6Toupee^{Tg/+}</i> et <i>B6Toupee^{Tg/Tg}</i>	47
3.1.1. Aspect général.....	47
3.1.2. Développement et histologie.....	48
3.1.3. Cavité orbitaire.....	51
3.1.4. Analyse du transcriptome des CCN de <i>FVB</i> <i>Toupee</i> à E10.5	52
3.2. Étude comparative des modèles <i>Toupee^{Tg/Tg}</i> et <i>Chd7^{Gt/+}</i> dans les fonds génétiques FVB et B6.....	54
3.2.1. Effet du fond génétique.....	54
3.2.2. Effet du gène muté	55
3.3. Interaction génétique.....	56
3.4. Mortalité néonatale chez <i>Chd7^{Gt/+}</i>	60
3.4.1. Présentation générale	60
3.4.2. Difficultés respiratoires.....	60
3.4.3. Problèmes d'alimentation	60
3.4.4. Défauts aux nerfs crâniens	62
4. Discussion.....	64

4.1. Développement de la microphthalmie et de l'anophtalmie	64
4.1.1. Spécificité du modèle <i>B6Toupee</i>	64
4.1.2. Biais droit et biais femelle	65
4.1.3. Pistes développementales.....	66
4.1.4. Pistes géniques	68
4.1.5. Contribution des CCN.....	70
4.1.6. Perspectives futures	71
4.2. Développement phénotypique du syndrome CHARGE	73
4.2.1. Influence du fond génétique.....	73
4.2.2. Influence du gène muté.....	75
4.2.3. Intégration et perspectives futures	76
4.3. Interaction génétique <i>Chd7-Fam172</i>	77
4.4. Mortalité néonatale chez <i>Chd7^{Gt/+}</i>	78
Conclusion	81
Bibliographie.....	I
Annexes.....	IX

Liste des tableaux

Tableau 1 : Exemples de neurocristopathies classées selon le type et le compartiment affecté.	14
Tableau 2 : Évolution des critères pour le diagnostic du syndrome CHARGE.....	18
Tableau 3 : Présentation phénotypique du syndrome CHARGE et pénétrance.....	18
Tableau 4 : Modèles murins portant une mutation dans le gène <i>Chd7</i>	24
Tableau 5: Caractéristiques majeures et mineures du syndrome CHARGE présentées par <i>FVB Toupee^{Tg/Tg}</i>	29
Tableau 6 : Facteurs de transcription nécessaires à la spécification et à la différenciation des différents types cellulaires rétiniens.....	38
Tableau 7 : Dérégulation de l'expression de gènes impliqués dans le développement oculaire chez <i>FVB Toupee^{Tg/Tg}</i>	53
Tableau 8 : Répartition génotypique de la descendance issue de croisements <i>FVB Toupee^{Tg/+}</i> par <i>FVB Chd7^{Gt/+}</i>	59
Tableau 9 : Capacités respiratoires et coloration d'embryons E18.5 à l'issue des tests de respiration.	62
Tableau 10 : Liste exhaustive des gènes recherchés dans le transcriptome des CCN à E10.5 (<i>FVB WT; G4-RFP</i> vs <i>FVB ToupeeTg/Tg; G4-RFP</i>).....	X
Tableau 11 : Répartition des anomalies oculaires en fonction du sexe des individus affectés...X	
Tableau 12 : Répartition des individus <i>FVB Chd7^{Gt/+}</i> selon le sexe phénotypique.....	XI
Tableau 13 : Sexage chromosomique des femelles <i>FVB Chd7^{Gt/+}</i>	XI

Liste des figures

Figure 1 : Cellules de la crête neurale.....	15
Figure 2 : Régions de la crête neurale.....	15
Figure 3 : Mutations de <i>CHD7</i> recensées dans le syndrome CHARGE.....	20
Figure 4 : Domaines présomptifs des isoformes long (L), moyen (M) et court (S) de FAM172A chez la souris.....	25
Figure 5 : Mécanismes d'action du complexe AGO2-RISC.	27
Figure 6 : Site d'insertion du transgène chez <i>Toupee</i>	28
Figure 7 : Événements dérégulés chez les CCN de <i>FVB</i> <i>Toupee</i> ^{Tg/Tg}	31
Figure 8 : Structure de l'œil humain et murin.....	34
Figure 9 : Développement de l'œil chez les vertébrés.....	35
Figure 10 : Origine, migration et différenciation des CCN crânielles lors du développement oculaire.....	36
Figure 11 : Spectre MAC.....	40
Figure 12: Proportion d'individus atteints de microphthalmie et d'anophtalmie en fonction du génotype pour la lignée <i>B6</i> <i>Toupee</i>	47
Figure 13 : Étude de l'état (unilatéral/bilatéral) et de l'hémisphère affecté par certaines anomalies chez le modèle <i>B6</i> <i>Toupee</i> ^{Tg/Tg}	48
Figure 14 : Développement oculaire postnatal de la microphthalmie et de l'anophtalmie chez le modèle <i>B6</i> <i>Toupee</i>	50
Figure 15 : Développement oculaire embryonnaire pour la microphthalmie et l'anophtalmie chez le modèle <i>B6</i> <i>Toupee</i>	51
Figure 16 : Comparaison des cavités orbitaires.	52
Figure 17 : Patrons de pigmentation chez <i>B6</i> <i>Toupee</i> et <i>FVB</i> <i>Toupee</i>	54
Figure 18 : Analyse comparative des anomalies observées chez <i>Toupee</i> ^{Tg/Tg} et <i>Chd7</i> ^{Gt/+} en fond génétique FVB et B6.....	57
Figure 19 : Phénotypes divergents entre les modèles murins <i>Toupee</i> ^{Tg/Tg} et <i>Chd7</i> ^{Gt/+}	58
Figure 20 : Comparaison de la pénétrance de 11 anomalies entre les simples hétérozygotes <i>FVB</i> <i>Chd7</i> ^{Gt/+} et <i>FVB</i> <i>Toupee</i> ^{Tg/+} et les doubles hétérozygotes <i>FVB</i> <i>Chd7</i> ^{Gt/+} ; <i>Toupee</i> ^{Tg/+}	59
Figure 21 : Mortalité néonatale chez <i>Chd7</i> ^{Gt/+}	61

Figure 22 : Défauts aux neurofilaments chez <i>Chd7^{Gt/+}</i>	63
Figure 23 : Globes oculaires pour une microphthalmie apparente présentant une déformation du globe oculaire.....	IX
Figure 24 : Phénotypes oculaires chez <i>B6Toupee</i> à E12.5	IX
Figure 25 : Aspect des nouveau-nés pour une portée FVB comptant trois individus sans tache de lait.....	IX

Liste des sigles et abréviations

Aa : Acide aminé

ADN : Acide désoxyribonucléique

Ago2 : «Argonaute RISC Catalytic Component 2»

Arb2 : «Argonaute-binding Protein 2»

ARN : Acide ribonucléique

B6 : C57Bl/6

Bmp : «Bone Morphogenetic Protein»

Bmp4 : « Bone Morphogenetic Protein 4»

CCN: Cellules de la crête neurale

Chd7 : «Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7»

CN : Crête neurale

C-terminal : Carboxy-terminal

D-V : Dorso-ventral

E0-19 : Jour embryonnaire 0-19

EPR : Épithélium pigmentaire rétinien

Fam172a : «Family With Sequence Similarity 172 Member A»

G4 : Gata4, « GATA Binding Protein 4»

Gt : «Gene-trapped»

H3K4me3 : Tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3

H3K27me3 : Tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3

HE : Hématoxyline-éosine

HepG2 : Cellules hépatocytaires de foie

Lhx2 : «Lim Homeobox 2»

mi-ARN : Micro-ARN

Mitf : «Microphthalmia-Associated Transcription Factor»

MPO : Mésoenchyme péri-oculaire

Otx2 : «Orthodenticle Homeobox 2»

P0-25 : Jour postnatal 0-25

Pax6 : « Paired Box 6»

PBSMT : PBS, 2% lait instantané, 0,05% Triton X-100

P-D : Proximo-distal

Pdb : Paire de bases

PFA : Paraformaldéhyde

Rax: «Retina And Anterior Neural Fold Homeobox»

RE: Réticulum endoplasmique

RFP : «Red Fluorescent Protein»

RISC : «RNA-induced silencing complex»

Six3 : «Six Homeobox 3»

Six6 : «Six Homeobox 6»

Sox2 : « SRY-Box 2»

Sox9 : «SRY-Box 9»

Stra6: « Stimulated By Retinoic Acid 6»

Tbx3 : «T-Box 3»

Tbx5 : «T-Box 5»

TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse

Tg : Transgène

Tgf β : « Transforming Growth Factor-Beta»

Tyr : «Tyrosinase»

Vax1 : «Ventral Anterior Homeobox 1»

Vax2: «Ventral Anterior Homeobox 2»

VO : Vésicule optique

Vsx2 : «Visual System Homeobox 2»

*Un petit pas dans la compréhension de la maladie et avec une pensée pour les cobayes qui
l'ont permis.*

Remerciements

Un merci tout d'abord à mon directeur de maîtrise, le Pr Nicolas Pilon, pour la confiance qu'il a placée en moi, mais également pour ses réponses et solutions face à mes questionnements et difficultés et pour son aide et support lors des activités de rédaction, de préparation aux colloques et autres.

J'aimerais également adresser mes remerciements aux membres du laboratoire dont Fatiha Azouz, Benoit Grondin, Tatiana Cardinal, Rodolphe Soret, Séphora Sallis, Ouliana Souchkova, Mostafa Esmael et Grégoire Bonnamour pour leur amitié et leur support. Un merci particulier à Félix-Antoine Bérubé-Simard pour sa patience à répondre à un nombre infini de questions.

Finalement, je remercie Simon Bichara-Allard et Elizabeth Godin, qui ont suivi conjointement leur parcours à la maîtrise, pour leur support moral.

1. Introduction

1.1. Syndrome CHARGE

Le syndrome CHARGE (OMIM #214800) est une maladie génétique rare qui affecte environ un nouveau-né sur 8 500-15 000 en fonction de la région géographique et du diagnostic [1].

1.1.1. Classification

1.1.1.1. Neurocristopathies, définition et origine

Le syndrome CHARGE appartient à la classe des neurocristopathies. Les neurocristopathies regroupent un ensemble hétérogène de maladies pour lesquelles l'atteinte peut être localisée ou syndromique ([Tableau 1](#)). Elles ont pour origine commune des défauts de migration, de division, de différenciation et/ou de survie des cellules de la crête neurale, engendrant la dysplasie des tissus et/ou organes dérivés [2].

Les cellules de la crête neurale (CCN) sont une population de cellules souches embryonnaires multipotentes. Elles se distinguent par leur grande capacité migratoire ainsi que par leur différenciation cellulaire tardive. Lors du développement embryonnaire, elles migrent de la partie dorsale du tube neural vers de nombreuses régions de l'organisme pour donner naissance à plusieurs types cellulaires (ex : neurones, mélanocytes, cellules endocrines, cellules gliales, ostéoblastes) ([Figure 1](#)) [3].

On distingue quatre catégories de CCN selon leur position rostrocaudale le long du tube neural, soit les CCN crâniennes (ou céphaliques), vagues, troncales et sacrées ([Figure 2](#)). Chaque catégorie de CCN présente un potentiel développemental différent. Les CCN crâniennes donnent naissance au mésenchyme crâniofacial, qui se différencie par la suite pour générer os, cartilage, neurones crâniens, cellules gliales et tissus conjonctifs [4].

Tableau 1 : Exemples de neurocristopathies classées selon le type et le compartiment affecté.
Adapté de [2].

Type of neurocristopathy	Skin	Peripheral nervous system	Endocrine	Pharyngo cephalic	Dental anomalies
Cancer					
Isolated	Melanoma Merkel cell carcinoma	Neuroblastoma Schwannoma Neuroblastoma Paranglioma	Pheochromocytoma Familial or sporadic Medullary thyroid carcinoma Chromaffin paraganglioma Carcinoid tumors	Hemangiocyoma Nonchromaffin paraganglioma (ear)	
Syndromic	Neurofibromatosis 1 Neurocutaneous melanosis	Hirshsprung	Multiple endocrine neoplasia 2A ₁ B ₁	Congenital central hypoventilation	
Malformations					
Isolated	Congenital giant nevus Piebaldism	Hirshsprung		Cerebrodural arterio-venous malformation Cleft palate/lip Isolated conotruncal cardiopathies Aplasia of lacrimal and salivary glands	Tooth aplasia Generation of extra teeth Cusp defects
Syndromic	Sturge Weber	Waardenburg Familial dysautonomia type 2	Allgrove Barforth-Lazarus	Rieger Binder Moebius Johanson-Blizzard Treacher Collins-Franceschetti CHARGE Di George Pierre Robin Holoprocencephaly Kallmann Craniofrontonasal Goldenhar Orofacial digital Multiplesclerosis	

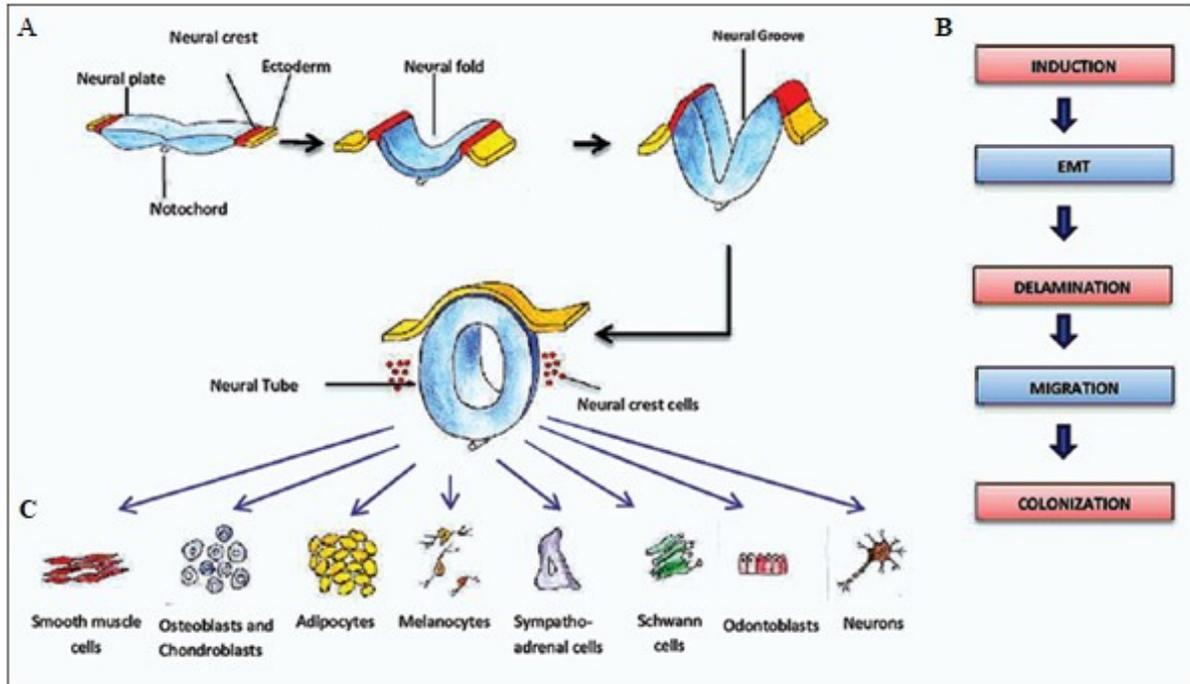


Figure 1 : Cellules de la crête neurale. (A) Origine des CCN lors de la formation du tube neural (B) Étapes du développement des CCN (C) Exemples de types cellulaires dérivés des CCN. Rouge, plaque neurale/CCN; Jaune, ectoderme; Bleu, Neuroépithélium/tube neural. Adapté de [5].

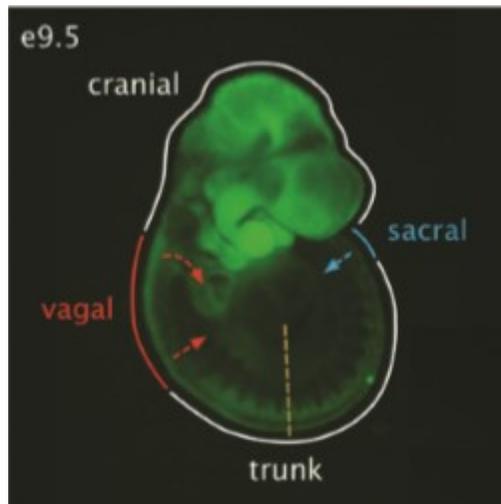


Figure 2 : Régions de la crête neurale. Adapté de [6].

1.1.1.2. Facteurs influençant le développement des neurocristopathies

Les neurocristopathies sont connues pour leur pénétrance incomplète (ex : maladie de Hirschsprung), laquelle suggère le rôle de facteurs non génétiques [7, 8]. Il est d'ailleurs avéré que l'environnement affecte la sévérité des anomalies développées dans le cadre de neurocristopathies. Par exemple, la fente palatine est plus fréquente dans les populations souffrant de malnutrition tandis que la consommation d'alcool pendant la grossesse entraîne le syndrome d'alcoolisme fœtal. Il a également été démontré que la migration et la survie des CCN est perturbée par l'alcool et que le développement des CCN est compromis en présence d'insuffisance ou d'excès en acide rétinoïque. La malnutrition, l'acide rétinoïque et l'alcool sont ainsi des exemples de facteurs environnementaux qui influencent le développement des CCN et qui peuvent engendrer ou inhiber l'apparition d'anomalies. Il est proposé que c'est en raison de leur migration et du maintien de leur multipotence sur une longue période que les CCN sont très sensibles à de légères modifications environnementales [9-12].

L'épigénétique est un facteur potentiel pouvant affecter le développement des neurocristopathies puisque les marques épigénétiques sont impliquées dans le développement et la migration des CCN. Les marques épigénétiques jouent notamment un rôle dans l'établissement et la maintenance de la multipotence des CCN ainsi que dans leur spécification et différenciation [13]. Dans les cellules souches embryonnaires, *Sox10*, *Mitf*, *Snail2* et *Pax3*, qui jouent des rôles clé dans le développement et la migration des CCN, sont ainsi porteurs d'une rare combinaison de marques épigénétiques activatrices H3K4me3 et répressives H3K27me3 [14]. De plus, des lignées des souris mutées pour *Aebp2*, impliqué dans la formation des marques H3K27me3, ont révélé que des niveaux aberrants de cette marque épigénétique engendrent des anomalies s'assimilant aux neurocristopathies. Cela souligne l'importance de l'épigénétique pour les CCN [13]. Il est d'ailleurs suspecté que l'environnement affecte le développement des neurocristopathies via la modulation des marques épigénétiques [7].

1.1.2. Caractéristiques

1.1.2.1. Évolution des critères diagnostiques

Décrit en 1979 de façon indépendante par Hittner *et al.* et Hall, ce n'est qu'en 1981 que Pagon *et al.* y associent l'acronyme CHARGE, qui représente les principales anomalies

initialement identifiées comme étant caractéristiques de ce syndrome : Colobome oculaire, défauts cardiaques (Hheart defects), Atrésie choanale, Retard mental et de développement, anomalies Génitales et défauts aux oreilles (Ear defects) [15-17]. Dès lors, les anomalies sont divisées en caractéristiques majeures, fréquentes dans ce syndrome et peu fréquentes dans d'autres, et en caractéristiques mineures, fréquentes dans ce syndrome et dans d'autres syndrome également. La définition clinique de la maladie a par la suite évolué selon les critères de Blake (1995), puis de Verloes (2005). Selon les critères de Blake, on présente comme caractéristiques majeures le colobome oculaire, l'atrésie choanale, les anomalies des nerfs crâniens et les défauts aux oreilles internes/externes et comme caractéristiques mineures les anomalies génitales, le retard de croissance, les malformations cardiovasculaires, la fente palatine, la fistule tracheoseophagienne et les anomalies craniofaciales. Les critères d'inclusion alors proposés sont de 4 caractéristiques majeures ou 3 majeures et 3 mineures [18, 19]. Les critères de Verloes proposés par la suite définissent plutôt parmi les critères majeurs le colobome, l'atrésie des choanes et l'hypoplasie des canaux semi-circulaires et comme critères mineurs les dysfonctions rhombencéphaliques, les dysfonctions de l'axe hypothalamo-hypophyseaires, les anomalies aux oreilles, les malformations aux organes médiastinaux et le retard mental. Il est proposé que les cas de syndrome CHARGE typiques correspondent à 3 critères majeurs ou deux majeurs et deux mineurs, que les cas incomplet correspondent à 2 majeurs et un mineur et que les cas atypiques correspondent à 2 majeurs ou 1 majeur et 3 mineurs [20]. Dans les dernières années, une autre modification a été proposée intégrant à l'atrésie des choanes de la fente palatine (les deux étant jugés mutuellement exclusifs) ainsi que la détection d'un variant pathogénique de *CHD7* (Tableau 2) [21]. Le diagnostic clinique actuel repose sur une combinaison des critères de Blake (révisés en 2006) et de Verloes [19].

1.1.2.2. Variabilité et pénétrance

Les patients CHARGE présentent des combinaisons hautement variables de caractéristiques majeures et mineures. La variabilité phénotypique de ce syndrome est ainsi très élevée et ce même entre individus d'une même famille. Pour les cas familiaux, le parent présente généralement un phénotype faible ou asymptomatique tandis que les enfants présentent un phénotype plus sévère [22].

Tableau 2 : Évolution des critères pour le diagnostic du syndrome CHARGE. Adapté de [21, 23].

	Major criteria	Minor criteria	Diagnostic
Pagon (1981) (CHARGE)	1.Choanal atresia 2.Ocular coloboma	1.Heart defects 2.Retarded growth/development, central nervous system anomalies 3.Genital hypoplasia 4.Ear anomalies, deafness	>4/6 criteria with at least 1 major
Blake (1998) (4 Cs)	1.Coloboma, microphthalmia 2.Choanal atresia 3. Ear abnormalities 4.Cranial nerve dysfunction	1.Genital hypoplasia, delayed/incomplete pubertal development 2. Developmental delay, hypotonia, mental retardation 3.Heart malformation 4.Growth deficiency 5.Cleft lip/palate 6. Tracheoesophageal defects 7.Distinctive face characteristics	4 major or 3 major and 3 minor criteria
Verloes (2005) (3 Cs)	1.Coloboma with or without microphthalmia 2.Choanal atresia 3.Hypoplastic semicircular canals	1.Rhombencephalic dysfunction 2.Hypothalamo hypophyseal dysfunction 3.Abnormal middle or external ear 4. Heart or esophagus malformation 5.Mental retardation	Typical CHARGE : 3 major or 2 major and 2 minor criteria Partial/incomplete CHARGE : 2 major and 1 minor criteria Atypical CHARGE: 2 major or 1 major and 3 minor criteria
Hale <i>et al.</i> (2016)	1.Coloboma 2.Choanal atresia or cleft palate 3.Abnormal ears, hypoplastic semicircular canals 4.Pathogenic <i>CHD7</i> variant	1.Cranial nerve dysfunction 2.Feeding difficulties 3.Structural brain anomalies 4.Developmental delay, autism 5.Heart or esophagus malformation 6.Renal anomalies 7.Skeletal/limb anomalies	2 major and any number of minor criteria

La pénétrance est donc incomplète pour l'ensemble des anomalies du syndrome CHARGE, les anomalies présentées le plus fréquemment étant le colobome, les défauts aux nerfs crâniens et les défauts aux oreilles internes (Tableau 3) [18].

Tableau 3 : Présentation phénotypique du syndrome CHARGE et pénétrance [18].

Features	Details	Frequency
Coloboma	Iris, retina, choroid, disc or microphthalmia	75–90%
Choanal atresia/stenosis	Unilateral or bilateral, bony or membranous.	65%
Cranial nerve anomalies	Facial nerve palsy, auditory, vestibular, vagal (swallowing problems) CNS abnormalities can also involve arhinencephaly, holoprosencephaly spectrum, forebrain and hindbrain abnormalities.	Facial: 50–90% CNS abnormalities 55–85%
Characteristic ear anomalies	Outer ear tends to be symmetrically misshapen, low set, anteverted, cup shaped, wide with reduced vertical height Triangular concha is a common finding Microtia, hypoplasia of the auditory canal and preauricular tags can also be seen Middle: ossicular malformation Cochlear: mondini defect Temporal: absent/hypoplastic semicircular canals. Highly predictive of the presence of a <i>CHD7</i> mutation ^{7,9}	Outer ear 95–100% Inner ear: 90%
Genital hypoplasia	Males: micropenis/cryptorchidism. Females: hypoplastic labia Delayed puberty	50–70%
Developmental delay	IQ < 70 is present in over 70%	70%
Cardiovascular malformation	Usually conotruncal, AV canal and aortic arch abnormalities	50–85%
Growth deficiency	Hypothalamo-hypophyseal dysfunction leading to short stature and pubertal delay. Often birth centiles are low-normal, around 10th centile.	70–80%
Orofacial cleft	Cleft lip/palate	15–20%
Distinctive facial features	Square face, prominent forehead, prominent nasal bridge and columella, flat midface	NA
Additional features	Omphalocele/umbilical hernia Bony scoliosis/hemivertebrae Renal anomalies: dysgenesis, horseshoe/ectopic kidney Hand and limb anomalies in 37%: polydactyly, J-shaped 'hockey stick' palmar flexion crease Short neck, sloping shoulders, nipple anomalies Immune deficiency	NA

AV, atrioventricular; CNS, central nervous system; IQ, intelligence quotient; NA, not applicable.

1.1.2.3. Viabilité et prise en charge

Les multiples anomalies du syndrome CHARGE peuvent engendrer des risques variables de mortalité dès les premiers jours suivant la naissance, la première année de vie étant d'ailleurs la plus critique pour la survie des patients. Ainsi, 30% des enfants atteints du syndrome CHARGE décèdent avant l'âge de 5 ans [22]. En raison de la diversité des systèmes affectés, les enfants atteints du syndrome CHARGE sont suivis par de multiples cliniciens : généticien, endocrinologue, pédiatre, immunologiste, otorhinolaryngologiste, cardiologiste, ophtalmologiste, etc [18].

1.1.3. Génétique

La cause principale du syndrome CHARGE, retrouvée chez 60-80% des patients, est une mutation du gène *CHD7*, un gène codant pour une protéine de remodelage de la chromatine. Les mutations de *CHD7* engendrent dans la plupart des cas la formation d'une protéine anormale

dégradée prématurément [21, 25, 26]. Ces mutations sont généralement *de novo*, mais certains cas familiaux sont répertoriés via une transmission autosomale dominante [17]. Des cas de mosaïcismes dans les cellules germinales ou somatiques sont aussi recensés chez les parents de fratries atteintes du syndrome CHARGE [22]. On dénombre plus de 500 mutations pathogéniques du gène *CHD7* [27]. Le type de mutation le plus courant est une mutation hétérozygote mononucléotidique qui affecte la fonction de la protéine. 44% des mutations de *CHD7* répertoriées dans le syndrome CHARGE sont des mutations non-sens, 34% engendrent une modification du cadre de lecture, 11% affectent les sites d'épissage et 8% sont des mutations faux-sens. Les délétions complètes d'exons et les microdélétions ne sont observées que dans 5% des cas (Figure 3) [28]. Toutefois, 14-17% des individus portant une mutation du gène *CHD7* ne sont pas classés CHARGE selon les critères de Blake et Verloes. Les études réalisées jusqu'à présent n'ont pas réussi à établir de liens génotype-phénotype pour expliquer les importantes variations phénotypiques observées entre patients hormis une association entre des mutations faux-sens de *CHD7* et un phénotype atypique par rapport à des pertes de fonctions ou des délétions qui engendrent un phénotype typique [17, 29].

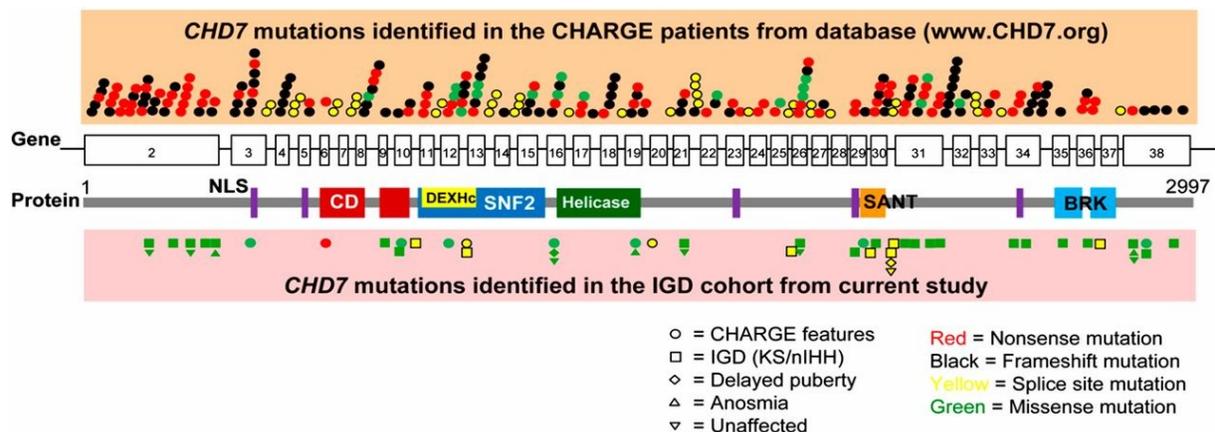


Figure 3 : Mutations de *CHD7* recensées dans le syndrome CHARGE [30].

De nouveaux gènes ont récemment été identifiés dont la mutation entraîne également le syndrome CHARGE. Ces gènes codent pour des régulateurs de la chromatine à l'image de *CHD7* (*EP300*, *KMT2D* et *KDM6A**), pour des facteurs d'épissage (*PUF60* et *EFTUD2**), pour des facteurs de transcription (*RERE*), pour des protéines de l'interface chromatine-splicéosome (*FAM172A*) ou autre (*SEMA3E**) (*incertain) [31].

1.1.4. Mécanismes moléculaires

Avec la seule identification de *CHD7* comme origine du syndrome CHARGE, le mécanisme pathogénique évoqué était la dérégulation de la transcription due au remodelage de la chromatine [32-34]. Toutefois, les analyses menées sur des patients CHARGE, les interactions identifiées entre *FAM172A*, *CHD7* et *AGO2* ainsi que le modèle murin *Toupee* ont mené à l'hypothèse que la dérégulation de l'épissage alternatif co-transcriptionnel serait en fait le mécanisme pathogénique sous-jacent au syndrome CHARGE, toutes mutations confondues (voir [Section 1.3.3.](#) et [Section 1.3.5.3.](#) pour les détails) [27].

1.1.5. Diagnostiques connexes

D'autres pathologies présentent des caractéristiques recoupant celles du syndrome CHARGE tels le syndrome de Kabuki, le syndrome de délétion 22q11.2, le spectre oculo-auriculo-vertébral, l'association *VACTERL* ou les embryopathies liées à des tératogènes [18]. Des mutations dans le gène *CHD7* ont d'ailleurs été identifiées chez des patients atteints de telles conditions, soit les syndromes de Kallman, Omenn-like et de délétion 22q11.2 [22]. Des gènes récemment associés au syndrome CHARGE, *EFTUD2*, *KMT2D* et *KDM6A* sont également mutés dans certaines de ces conditions, soit la dysostose acrofaciale 1 de type Nager, le syndrome Kabuki et la dysostose madibulo-faciale de type Guion-Almeida [31].

1.2. CHD7

1.2.1. Structure

Le gène *CHD7* est localisé sur le chromosome 8 (8q12.1) [18]. Ce gène, de 188 kb, contient 38 exons et engendre une protéine de 2997 aa [35]. Chez les mammifères, les protéines CHD sont au nombre de 9 et se divisent en 3 familles selon le type de chromodomaine et la présence d'autres domaines fonctionnels. Elles sont toutes des enzymes ATP dépendantes qui régulent l'accès à l'ADN via le remodelage de la chromatine par la restructuration des nucléosomes. Les protéines CHD possèdent deux chromodomaines en N-terminal ainsi qu'un domaine hélicase/ATPase SNF2-like central. Avec *CHD6*, *CHD8* et *CHD9*, *CHD7* appartient à la troisième famille. Ces enzymes se distinguent des autres par la présence de deux domaines

BRK, d'un domaine de liaison à l'ADN en C-terminal, d'un domaine SANT et de domaines CR [36]. CHD7 murin possède en plus quatre domaines de localisation nucléaire (Figure 3) [37]. Malgré leur similarité de structure, les enzymes de ce groupe remplissent des fonctions différentes entre autre en raison d'une spécificité de substrat différente [38].

1.2.2. Fonctions

CHD7 s'associe en larges complexes, agit sur le positionnement des histones par rapport à l'ADN et régule ainsi l'expression de milliers de gènes [25]. Plus précisément, CHD7 catalyse le glissement des nucléosomes, qu'ils soient adjacents à de courts ou à de longs segments d'ADN de liaison [38]. CHD7 ne semble pas présenter de préférence pour certaines séquences ADN en particulier, mais se lie préférentiellement à des résidus lysine de segments portant la marque H3K4me1 ou à des complexes qui varient selon le type cellulaire. Ces complexes incluent d'autres protéines de remodelage de la chromatine, des histones méthyltransférases et des facteurs de transcription. CHD7 est ainsi enrichi près de centaines de régions activatrices, préférentiellement distales, et près des sites de départ de la transcription afin de contrôler la transcription génique [17, 22, 39].

Dans les CCN, le recrutement de CHD7 à la chromatine dépend partiellement d'une interaction directe avec SOX2 [40]. CHD7 peut également y interagir avec les protéines du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF pour l'ajustement fin des niveaux d'expression de nombreux gènes clé du réseau régulateur des CCN. La création d'une crête neurale multipotente nécessite la coopération de CHD7 et PBAF ainsi que l'expression de FOXD3, laquelle est sous le contrôle de CHD7, OCT3/4, SOX2 et NANOG [32, 33]. CHD7 joue également un rôle dans la différenciation neuronale dans l'oreille interne, la placode nasale, le cervelet, la zone subventriculaire et l'hippocampe. Dans le système nerveux central, les oreilles et le cœur, l'inhibition ou la modulation de la signalisation BMP est un mécanisme par lequel CHD7 contrôle le développement [41].

Chez les cellules mammifères non dérivées de la crête neurale, CHD7 serait impliqué dans l'épissage alternatif de nombreux gènes selon le contexte spatio-temporel et sa présence sur la chromatine est observée à des sites d'épissages [27, 42]. Son principal partenaire d'interaction est d'ailleurs PARP1, lequel jouerait un rôle dans l'épissage via l'interaction avec

des protéines associées à la chromatine, des pré-ARNm (ARN pré-messager) et des facteurs d'épissage [32, 43].

Un des gènes réprimés par CHD7 est *p53*. La surexpression de *p53* mène d'ailleurs à des phénotypes similaires au syndrome CHARGE. Cela suggère que la surexpression de *p53* pourrait être une des causes sous-jacentes aux anomalies CHARGE [44]. CHD7 pourrait également avoir un rôle oncogénique, notamment dans le cancer des poumons à petites cellules [36, 45].

1.2.3. Modèles murins

Plusieurs modèles murins porteurs d'une mutation du gène *Chd7* ont été créés par différents groupes de chercheurs. Générés par ENU, les modèles murins *Cyclone (Cycn)*, *Dizzy (Dzy)*, *Eddy (Edy)*, *Flouncer (Flo)*, *Leda (Lda)*, *Metis (Mt)*, *Orbitor (Obt)*, *Tornado (Todo)*, *Whirligig (Whi)* et *Carousel (Crsl)* ont permis d'identifier neuf différents allèles murins de *Chd7* engendrant des comportements de *circling* et de *head-bobbing* corrélés avec de la dysfonction vestibulaire chez les hétérozygotes. Ces modèles présentaient également d'autres anomalies avec une pénétrance variable [37]. Les modèles *Wheels (Whl)* et *Carousel (Crsl)* ont aussi été identifiés comme présentant des phénotypes semblables, mais la mutation pathogénique n'a pas pu être précisément identifiée (Tableau 4) [46].

Le modèle *Chd7^{Gt/+}* a été généré par l'utilisation de cellules souches embryonnaires *gene-trapped* pour générer une protéine CHD7 non fonctionnelle (Tableau 4). L'insertion génétique perturbe l'épissage des exons 1 et 2 et engendre un transcrite contenant les cassettes B-galactosidase et hygromycine. La résultante est un allèle fonctionnellement nul de *Chd7* qui pourrait tout de même admettre un très faible niveau de transcrite *wildtype*. Les individus *Chd7^{Gt/+}* et *Chd7^{Gt/Gt}* présentent des défauts de survie, de croissance et de développement des oreilles, des yeux, de l'hypophyse, du cerveau, du cœur et des structures crâniofaciales. *Chd7^{Gt/+}* montre un retard de croissance marqué ainsi que du *head-bobbing* et du *circling*, avec des défauts aux canaux semi-circulaires [26]. Les femelles sont sous-fertiles et moins maternelles tandis qu'environ 12% des mâles *Chd7^{Gt/+}* présentent de la réversion sexuelle [26, 27]. Les embryons *Chd7^{Gt/+}* marquent un retard de rotation à E10.5. Les embryons *Chd7^{Gt/Gt}* présentent en plus de la mortalité embryonnaire et de l'hypoplasie du neuroépithélium, de l'éminence

optique, de la cavité olfactive, de la poche de Rathke et des membres postérieurs. Au regard des différences entre homozygotes et hétérozygotes, la fonction de CHD7 est dose-dépendante [26].

Tableau 4 : Modèles murins portant une mutation dans le gène *Chd7*. Adapté de [46].

Strain (s)	Allele	Protein effect	Strain (s)	Allele	Protein effect
<i>Wheels</i> (<i>Whl</i>)	Maps to chr 4	NA	<i>Volchok</i> (<i>Vlk</i>)	4705T-A	Y1459X
<i>Carousel</i> (<i>Crsl</i>)	Not reported	NA	<i>Looper</i>	5690C-A	S1897X
<i>Whirligig</i> (<i>Whi</i>)	2918G-A	W973X	<i>Coa1</i>	2155A-T	K719X
<i>Flouncer</i> (<i>Flo</i>)	IVS 27+ 2T-C	Donor splice site; S1864X	<i>Ome</i>	Exon 2-3 deletion	Loss of protein
<i>Tornado</i> (<i>Toda</i>)	IVS3 + 2-C	Donor splice site; H549X	<i>Chd7^{60/+}</i>	Gene trapped sequences inserted in intron 1	Loss of protein translation due to interrupted ribosomal entry site; expresses β -galactosidase from the <i>Chd7</i> promoter
<i>Eddy</i> (<i>Edy</i>)	307C-T	Q103X	<i>Chd7^{rr}</i>	Gene trapped sequences inserted in intron 4	Reporter fusion
<i>Leda</i> (<i>Lda</i>)	3195T-A	Y1066X	<i>Chd7^{rk}</i>	Gene trapped sequences inserted in intron 36	Reporter fusion
<i>Orbitron</i> (<i>Obt</i>)	3945T-A	Y1315X	<i>Chd7^{lox}</i>	Floxed exon 2	Conditional loss of exon 2, containing the ATG start site for transcription
<i>Cyclone</i> (<i>Cycn</i>)	4286T-A	L1429X	<i>Chd7^{fl}</i>	Floxed exon 3	Conditional loss of exon 3
<i>Metis</i> (<i>Mt</i>)	IVS 22-2A-G	Acceptor splice site; V1688X			
<i>Dizzy</i> (<i>Dz</i>)	5536G-T	E1846X			

Par la suite, deux autres lignées ont été générées par la méthode *gene-trap*, *Chd7^{rk}* et *Chd7^{rr}*, et quatre par la méthode ENU, *Volchok* (*Vlk*), *Looper*, *Coa-1* et *Ome* (Tableau 4). Les premiers présentent du *circling* chez les hétérozygotes et de la mortalité chez les homozygotes, ainsi que diverses anomalies additionnelles tels des défauts cardiaques ou aux neurofilaments [47]. Le modèle *Looper* présente une vaste étendue d'anomalies caractéristiques du syndrome CHARGE (retard de croissance, anomalies oculaires, défauts aux oreilles, asymétrie craniofaciale) tandis que les modèles *Volckok* et *Coa-1*, identifiés pour leur comportement de *circling* associé à des anomalies oculaires chez *Coa-1*, ont plutôt été étudiés respectivement pour leurs anomalies cérébrales et aux oreilles [48-50]. Le modèle *Ome* est l'unique modèle CHARGE identifié développant de l'otite moyenne, infection qui affecte plus souvent les patients CHARGE que les individus sains [51].

1.3. FAM172A

1.3.1. Structure

Le gène *Fam172a* (C5orf21, NM_032042) est un gène relativement peu étudié situé sur le chromosome 5 (Chr5q15). Chez l'humain, le gène mesure 456,69 kb et comprend 10 exons qui mènent à la formation d'une protéine de 416 aa [56]. *Fam172a* est fortement conservé (93% d'homologie entre humain et murin). Chez la souris, trois isoformes principaux de FAM172A ont été identifiés, de 417, 371 et 307aa. Les domaines présumés identifiés selon les analyses bio-informatiques comprennent pour tous les isoformes, de C-terminal à N-terminal, un signal de rétention au réticulum endoplasmique (RE), un domaine Arb2 central, un motif serine hydrolase (dont l'activité a été confirmée) et un signal bipartite de localisation au noyau. La forme longue comprendrait également un peptide signal ainsi qu'un domaine de dimérisation, ce dernier se retrouvant également dans la forme moyenne (Figure 4) [27].

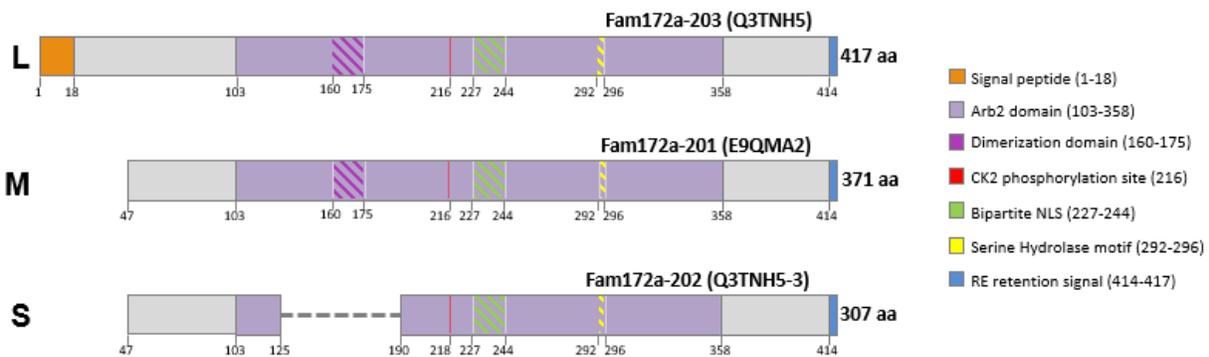


Figure 4 : Domaines présumés des isoformes long (L), moyen (M) et court (S) de FAM172A chez la souris [57].

1.3.2. Localisation et expression

Au niveau subcellulaire, FAM172A est localisé au noyau ainsi que dans le cytoplasme, où il est souvent enrichi dans le RE [27].

Au cours du développement embryonnaire, FAM172A est grandement exprimé, dont dans les tissus neuraux. Son expression chez la souris est pratiquement ubiquitaire entre E8.5 et E12.5 [27].

1.3.3. Interactions

FAM172A interagit avec AGO2 présumément via le domaine Arb2 et peut lier l'ARN et l'ADN. La formation efficace de complexes FAM172A-AGO2 requiert d'ailleurs l'un de ces deux types d'acides nucléiques. Il a aussi été démontré que CHD7 interagit physiquement avec AGO2 et FAM172A et que la liaison CHD7-AGO2 est favorisée en présence de FAM172A. Les autres partenaires d'interaction de FAM172A marquent un enrichissement en protéines de la chromatine et en facteurs d'épissage [27].

1.3.3.1. AGO2

Les microARN inhibent l'expression génique par inhibition de la traduction et/ou dégradation des ARNm. Ces procédés sont effectués via les complexes RISC, lesquels contiennent comme composante essentielle une protéine de la famille argonaute (1-2 chez la mouche, 1-4 chez les mammifères). Le complexe spécifique AGO2-RISC lie EIF4E, ce qui bloque l'interaction entre EIF4E et EIF4G et rend impossible l'étape de reconnaissance de la coiffe-5'. Cela inhibe l'expression des ARNm poly(A)⁺. Dans certains cas précis, et qui requièrent FXR1, AGO2-RISC peut activer la traduction d'ARNm poly(A)⁻ (Figure 5) [52].

Chez les mammifères, AGO1 et AGO2 faciliteraient également le recrutement du spliceosome et moduleraient la vitesse d'élongation de l'ARN polymérase II, influençant ainsi l'épissage alternatif [55].

1.3.4. Fonctions

Au regard des interactions identifiées (Section 1.3.3.) l'hypothèse soulevée est que FAM172A permet de stabiliser les interactions protéiques entre les composantes de la chromatine et de la machinerie d'épissage. Ce mécanisme impliquerait ainsi FAM172A dans l'épissage alternatif co-transcriptionnel [27]. Les analyses cellulaires et transcriptomiques réalisées sur *FVB Toupee^{Tg/Tg}* seront décrites dans la Section 1.3.5.3..

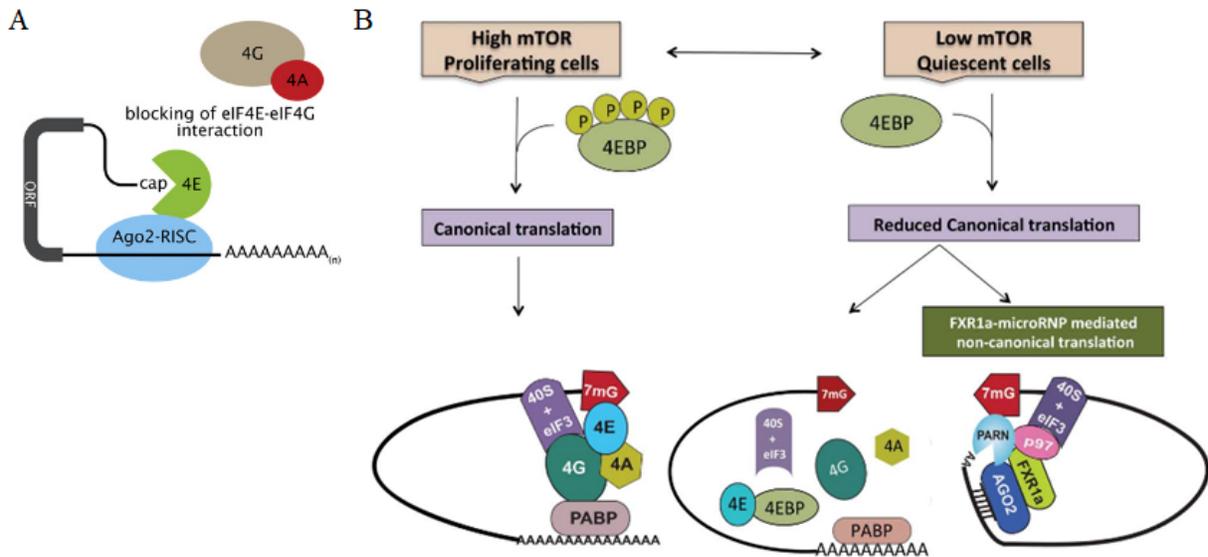


Figure 5 : Mécanismes d'action du complexe AGO2-RISC. A) Inhibition de la traduction. Le complexe AGO2-RISC lie EIF4E, ce qui bloque l'interaction avec EIF4G et inhibe la traduction à l'étape de reconnaissance de la coiffe 5'. B) Activation de la traduction. Quand l'activité de mTOR est élevée, la synthèse protéique est effectuée via la voie canonique coiffe dépendante. Lorsque l'activité mTOR est faible, 4EBP est déphosphorylé, lie EIF4E et inhibe la traduction en bloquant la liaison avec EIF4G. De hauts niveaux de FXRN1a permettent la formation de complexes microARN-protéine composés d'un microARN, d'AGO2 et d'un isoforme de FXR1a qui promeut la traduction. Le complexe lie l'extrémité 3'UTR de l'ARNm et recrute p97/DAP5 et PARN, lesquels remplacent EIF4G et EIF4E dans la liaison de la sous-unité ribosomale EIF3–40S et de la coiffe 5'. Cette voie alternative permet la traduction de certains ARNm spécifiques de manière non canonique [53, 54].

Précédemment, jusqu'à l'association récente avec le syndrome CHARGE, *Fam172a* était essentiellement connu pour son implication dans le cancer colorectal. FAM172A est surexprimé dans les tissus affectés par le cancer colorectal et est associé à un pronostic défavorable incluant le développement de métastases et une plus faible espérance de vie. Si FAM172A est essentiel à la progression du cycle cellulaire et à la prolifération des cellules HepG2, sa présence à haute concentration provoque un arrêt en phase S. Dans la majorité des cas, cet effet est corrélé avec la localisation cytoplasmique de FAM172A [58]. Dans le carcinome hépatocellulaire, l'expression de FAM172A est plutôt diminuée et cette diminution

augmente le stress au RE via la libération des ions Ca^{2+} liés à FAM172A. Cela contribue à l'hépatocarcinogénèse. Le traitement de cellules HepG2 avec FAM172A engendre une forte augmentation de NOTCH3, NF- κ B et cyclineE. Ces éléments laissent croire que FAM172A aurait un rôle de suppresseur de tumeurs [56].

1.3.5. Modèle murin *Toupee*

1.3.5.1. Création du modèle

Le modèle *Toupee* a été généré par l'insertion aléatoire d'un mini-gène de tyrosinase dans le pronoyau de zygotes FVB/N lors d'un criblage pour identifier des gènes importants au développement des CCN. Chez les souris FVB, l'insertion du transgène permet le rétablissement de la pigmentation, mais son incorporation dans un gène important aux CCN, desquelles sont dérivées les mélanocytes, engendre une pigmentation non uniforme. Les souris présentant des anomalies aux CCN ont ainsi été sélectionnées sur la base de défauts de pigmentation [59].

Le modèle *Toupee* doit son nom à la tache non pigmentée que les hétérozygotes ($FVB\textit{Toupee}^{Tg/+}$) présentent au sommet du crâne, qui rappelle un toupet, et au comportement de *circling* présenté par les homozygotes ($FVB\textit{Toupee}^{Tg/Tg}$). Pour la lignée *Toupee*, le transgène est localisé dans le dernier intron du gène *Fam172a*, ce qui engendre une expression résiduelle du gène d'environ 15%. *Toupee* est ainsi une allèle hypomorphique de *Fam172a* (Figure 6) [27].

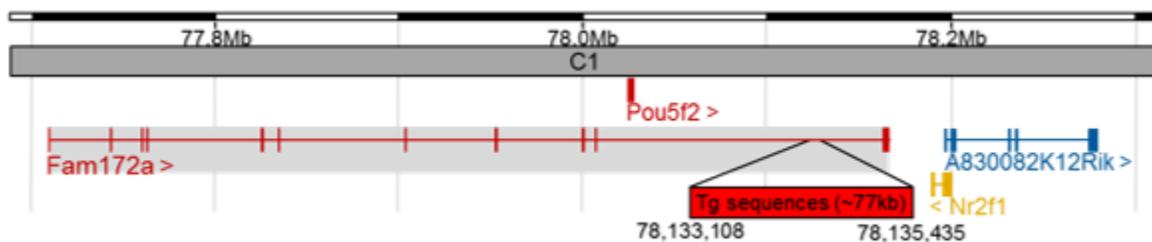


Figure 6 : Site d'insertion du transgène chez *Toupee* [27].

1.3.5.2. Phénotype

$FVB\textit{Toupee}^{Tg/+}$ ne présente généralement comme seul défaut apparent qu'un défaut partiel de pigmentation tandis que $FVB\textit{Toupee}^{Tg/Tg}$ présente une dépigmentation presque totale, mais également un ensemble d'anomalies qui phénotypent le syndrome CHARGE. Parmi ces anomalies se trouvent le colobome oculaire, la fente palatine et les défauts aux canaux

semicirculaires, qui correspondent à des caractéristiques majeures du syndrome CHARGE. Les caractéristiques mineures les plus fréquemment observées chez *FVB Toupee^{Tg/Tg}* sont les anomalies génitales, le retard de croissance, les anomalies cardiaques et les défauts aux nerfs crâniens. Les anomalies génitales recensées incluent plus spécifiquement : micropénis, cryptorchidisme, micro-utérus, sous fertilité et réversion sexuelle (25% des mâles chromosomiques présentent un phénotype femelle). On peut également identifier chez *FVB Toupee^{Tg/Tg}*, mais avec une fréquence moins élevée, des déformations crâniofaciales, de l'hypoplasie du thymus ou du bulbe olfactif (entraînant une diminution de l'odorat) et, dans quelques rares cas, de l'hypoplasie rénale, des malformations aux oreilles externes ou de l'exencéphalie/hydrocéphalie. 20% des *FVB Toupee^{Tg/Tg}* décèdent entre la naissance et P25 avec présence de bulles d'air dans le tractus gastrointestinal, ce qui, combiné au retard de croissance et aux défauts aux nerfs crâniens, suggère des difficultés à se nourrir (Tableau 5) [27].

Tableau 5 : Caractéristiques majeures et mineures du syndrome CHARGE présentées par *FVB Toupee^{Tg/Tg}* [27].

	Abnormality	Frequency	
Major	Coloboma of the eye	86% (n=14) ^a	
	Inner ear defects (circling behavior)	67% (n=61)	
	Cleft palate	21% (n=14)	
Minor	Heart malformation (left ventricular hypertrophy)	80% (n=10)	
	Cranial nerve anomalies (VII, IX and/or X)	60% (n=10)	
	Retardation of growth	61% (n=61)	
	Genital abnormalities	Males (cryptorchidism)	52% (n=27)
		Females (hypoplastic uterine horns)	58% (n=12)
	Thymus hypoplasia	36% (n=22)	
	Olfactory bulb hypoplasia	30% (n=10)	
	Craniofacial malformations	Delayed closure of fontanelles	30% (n=10)
		Twisted skull	18% (n=61)
		Oropharyngeal atresia	16% (n=61)
Kidney hypoplasia	8% (n=12)		

Note: ^a10/14 unilateral, 2/14 bilateral.

1.3.5.3. Analyses cellulaires et transcriptomiques

Chez les embryons *FVB**Toupee*^{Tg/Tg}, l'apoptose est significativement augmentée et la prolifération est diminuée. Chez des explants *Toupee*^{Tg/Tg};*G4-RFP*, la direction et la vitesse de migration des CCN est significativement affectée. Cela occasionnerait un retard de positionnement des CCN, compensé ultérieurement [27].

Le transcriptome des CCN à E10.5 de *FVB**Toupee*^{Tg/Tg};*G4-RFP* a permis d'identifier plus de 3000 gènes dont l'expression est dérégulée d'au moins 1,5 fois, avec un biais pour les gènes dérégulés à la hausse. Ce biais s'accroît quand on considère les gènes dérégulés de plus de 4 fois. Si on considère les gènes du réseau de régulation des CCN, on observe plutôt, au contraire, que ces gènes sont majoritairement (90,1%) dérégulés à la baisse et qu'ils touchent à tous les aspects du développement des CCN. En ordre d'importance, les gènes dérégulés sont associés aux processus métaboliques, à la différenciation cellulaire et à la morphogénèse, à la signalisation cellulaire, à la motilité et au transport, au contrôle du nombre de cellules, à l'expression génique et au développement du système nerveux. Selon le même transcriptome des CCN à E10.5, plus de 1000 événements d'épissage alternatifs dérégulés sont identifiés, lesquels correspondent majoritairement à de l'omission d'exons ou à de la rétention d'introns (Figure 7). Les gènes différenciellement épissés sont impliqués dans les processus métaboliques, la motilité et le transport, la signalisation cellulaire, l'expression génique, le contrôle du nombre de cellules et la différenciation cellulaire et la morphogénèse. 30% de ces gènes ont aussi leur niveau d'expression diminué ou augmenté. Les événements d'épissage alternatif dérégulés en présence de mutations de *Fam172a* et de *Chd7* se superposent [27].

1.3.5.4. Essais thérapeutiques

La rapamycine est un agent thérapeutique qui agit comme inhibiteur de la voie mTOR. L'inhibition de la voie mTOR engendre une diminution de l'expression des gènes codant pour les protéines ribosomales. Cela a pour effet de réduire le nombre de facteurs d'épissage requis dans cette voie et de diminuer la compétition pour la machinerie d'épissage. L'efficacité de l'épissage des autres ARN pré-messager en est ainsi augmentée [60].

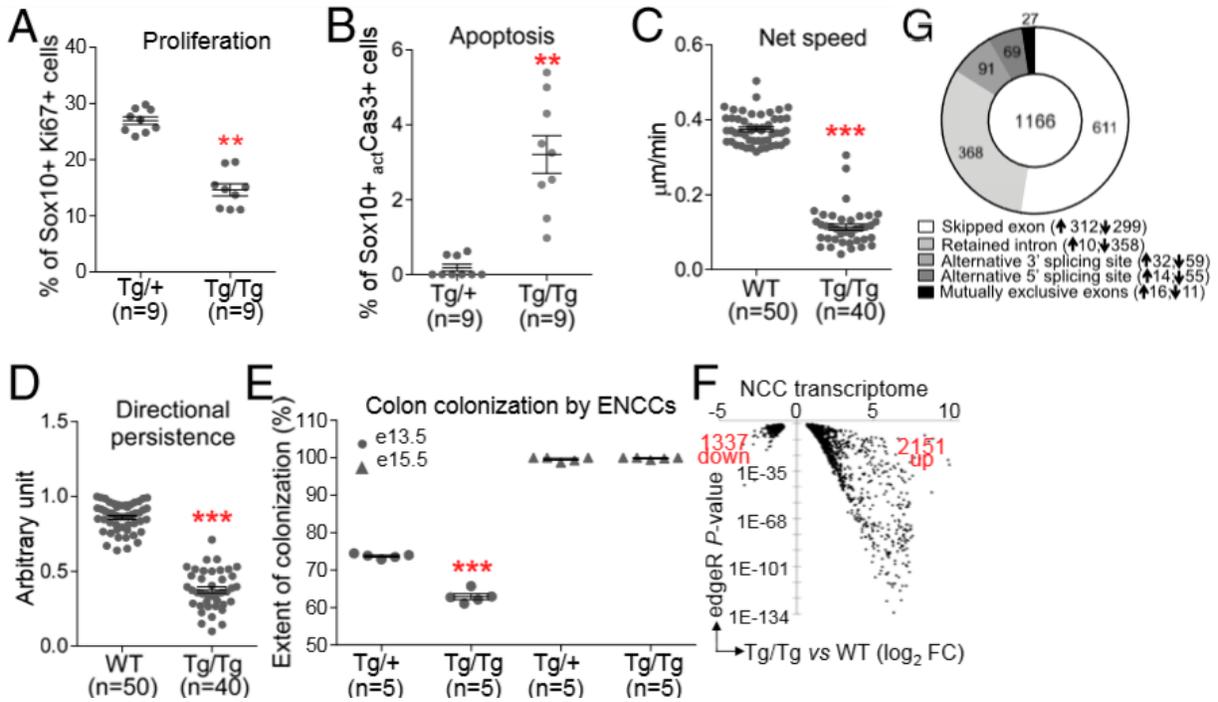


Figure 7 : Événements dérégulés chez les CCN de *FVB Toupee^{Tg/Tg}*. (A) Quantification de la prolifération avec le marqueur Ki67⁺ (B) et de l'apoptose avec le marqueur *actCasp3*⁺, *FVB Toupee^{Tg/+}* vs *FVB Toupee^{Tg/Tg}*. (C) Quantification de la vitesse de migration (D) et de la persistance du mouvement chez des CCN à E10.5, *FVB WT; G4-RFP* vs *FVB Toupee^{Tg/Tg}; G4-RFP*. (E) Quantification de l'étendue du colon colonisée à E13.5 et E15.5, *FVB Toupee^{Tg/+}; G4-RFP* vs *FVB Toupee^{Tg/Tg}; G4-RFP* (F) *Volcano plot* de l'expression génique différentielle et (G) distribution des 1166 événements d'épissages alternatifs dérégulés chez les CCN à E10.5, *FVB WT; G4-RFP* vs *Toupee^{Tg/Tg}; G4-RFP* [27].

Le traitement de lignées lymphoblastoïdes de patients CHARGE avec de la rapamycine (10µM, 30 min) a permis de corriger partiellement les défauts d'épissage observés dans les gènes *CD44*, *COL5A3*, *MICAL2* et *IFT74* et ce pour les événements d'épissage dérégulés à la baisse ainsi que pour les événements d'épissage dérégulés à la hausse [27].

Des essais thérapeutiques ont ensuite été menés *in vivo* chez le modèle *FVB Toupee*. L'injection intrapéritonéale de rapamycine (2 x 1mg/kg, E9.5 à E11.5) à des femelles *FVB Toupee^{Tg/Tg}* gestantes a permis de diminuer de moitié la fréquence du colobome oculaire chez la descendance, observée à E12.5. Toutefois, les embryons ainsi traités montrent des signes de retard de croissance et de résorption [27].

1.3.5.5. Interaction génétique *Fam172a-Chd7*

Des études phénotypiques sur des doubles hétérozygotes de fond mixte *Toupee*^{Tg/+}; *Chd7*^{Gt/+} issus de parents *FVB**Toupee*^{Tg/Tg} et *B6-Sv129**Chd7* ont montré que chez les doubles hétérozygotes, le retard de croissance et le colobome se présentent de façon plus sévère que chez les simples hétérozygotes. Les doubles hétérozygotes présentent également en plus grande proportion de la mortalité pré et postnatale, du *circling* et de la réversion sexuelle. Ces éléments appuient une interaction génétique entre *Fam172a* et *Chd7* [27].

1.4. L'œil

Le modèle murin *Toupee*, suite à sa caractérisation en fond génétique FVB, a été transféré dans le fond génétique B6. Ce changement de fond génétique a engendré des différences de pénétrance pour certaines anomalies ainsi que l'apparition de nouvelles anomalies. L'impact le plus important du changement de fond génétique consiste en l'apparition de microphthalmie et d'anophtalmie chez une proportion importante des individus *B6**Toupee*^{Tg/Tg}, mais également chez certains individus *B6**Toupee*^{Tg/+}.

1.4.1. Anatomie et fonctionnement global

La cornée et le cristallin servent à dévier la lumière sur la rétine, où elle est captée par les photorécepteurs. L'information est ensuite retransmise au cortex visuel via le nerf optique. La contraction ou la dilation des muscles de l'iris en fonction de l'intensité lumineuse permet de moduler la taille de la pupille et de contrôler la quantité de lumière qui pénètre dans l'œil [61]. L'étirement et la relaxation du cristallin par les muscles ciliaires permettent d'ajuster l'acuité de la vision en fonction de la distance entre l'œil et les objets observés [62]. Chez la souris, le cristallin occupe une superficie plus importante de l'œil que chez l'humain [63]. L'humeur aqueuse, située dans la chambre antérieure de l'œil, génère une pression permettant au globe oculaire de garder sa forme et de conserver ses propriétés optiques. L'humeur aqueuse sert également de substitut au flux sanguin pour la cornée et le cristallin, qui doivent demeurer non vascularisés pour conserver leur propriété translucide. L'humeur aqueuse permet ainsi la nutrition, l'évacuation des substances excrétées, le transport de neurotransmetteurs, l'homéostasie, etc [64]. L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) sépare l'apport sanguin de la

choroïde et les photorécepteurs. C'est une structure de support pour les photorécepteurs via le transport des nutriments et des déchets ainsi que le recyclage des rétinoïdes (Figure 8A) [63].

La rétine, dérivée du neuroectoderme, est composée de six types de neurones organisés en trois couches cellulaires séparées par des couches synaptiques. La couche nucléaire externe contient les corps cellulaires des photorécepteurs, cellules photosensibles qui se divisent en deux types, cônes et bâtonnets. Les bâtonnets permettent la vision à faible intensité lumineuse tandis que les cônes permettent la vision des couleurs et de précision en présence d'une bonne intensité lumineuse. Les cônes se divisent en trois catégories, selon l'opsine qu'ils contiennent et la longueur d'onde maximale de sensibilité, soit L- (long, 564 nm), M- (moyen, 533 nm) et S- (court, 437 nm). Chez la souris, la rétine ne contient que les cônes de type M et S. Chez l'humain, la fovéa correspond à une région de la rétine exclusivement composée de cônes, qui permet une haute résolution. La macula adjacente est également enrichie en cônes par rapport à la rétine environnante. L'œil murin ne présente pas ces distinctions. Les segments internes et externes s'étendent de la couche nucléaire externe vers le EPR. Le segment externe renferme des disques membraneux de protéines nécessaires à la phototransduction, comme les opsines. La couche nucléaire interne comprend les cellules amacrines, les cellules bipolaires, les cellules horizontales et les cellules de Muller. Les cellules ganglionnaires, dont les axones forment le nerf optique, sont localisées dans la couche des cellules ganglionnaires. Les couches plexiformes externes et internes contiennent des régions synaptiques (Figure 8B) [63].

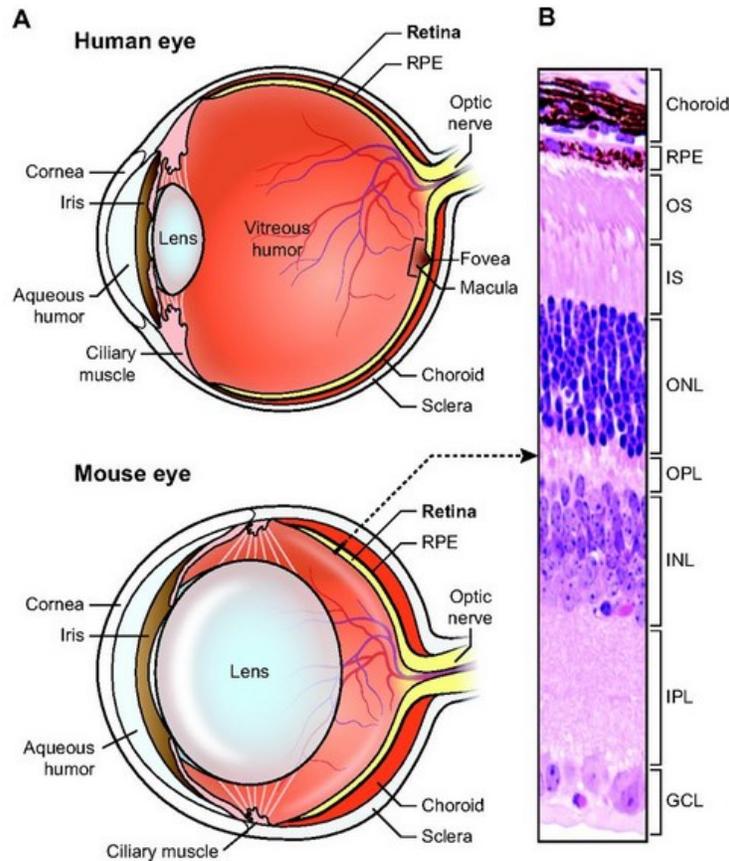


Figure 8 : Structure de l'œil humain et murin. (A) Schéma d'une coupe transversale de l'œil. (B) Rétine avec coloration hématoxyline-éosine. GCL, couche des cellules ganglionnaires; INL, Couche nucléaire interne; IPL, couche plexiforme interne; IS, segment interne; ONL, couche nucléaire externe; OPL, couche plexiforme externe; OS, segment externe; RPE, épithélium pigmenté rétinien [63].

1.4.2. Développement

Lors du développement embryonnaire murin, vers E8.5, la section du tube neural spécifiée en champ optique évagine pour former la vésicule optique (VO). L'évagination se poursuit jusqu'au contact entre la VO et l'ectoderme de surface vers E9.0. Cela induit l'épaississement de l'ectoderme de surface en placode cristalliniennne à E9.5. À E10, la VO et la placode cristalliniennne invaginent pour former la cupule optique bistratifiée et la vésicule cristalliniennne à E10.5. Cette invagination de la vésicule optique engendre la formation d'une ouverture temporaire, la fissure choroïdienne, du côté ventral. Par la suite, la cupule optique se

détache de la vésicule cristallinienne et la fissure choroïdienne se referme. Des fibres se développent dans la vésicule cristallinienne. La différenciation de la cupule optique se poursuit, avec la couche interne qui se différencie en neurorétine et la couche externe en EPR [65, 66]. Dans la rétine, les sept types cellulaires proviennent des mêmes cellules progénitrices rétinienne multipotentes et se développent dans une séquence hautement conservée : cellules ganglionnaires, cellules horizontales, cônes, cellules amacrines, cellules bipolaires, bâtonnets, puis cellules de Muller [67]. Les axones des cellules ganglionnaires cheminent le long de la tige optique pour former le nerf optique. L'ectoderme situé devant le cristallin forme la cornée [68]. Chez l'humain, ces mêmes étapes se produisent entre le 22^e et le 33^e jour de gestation (Figure 9) [69].

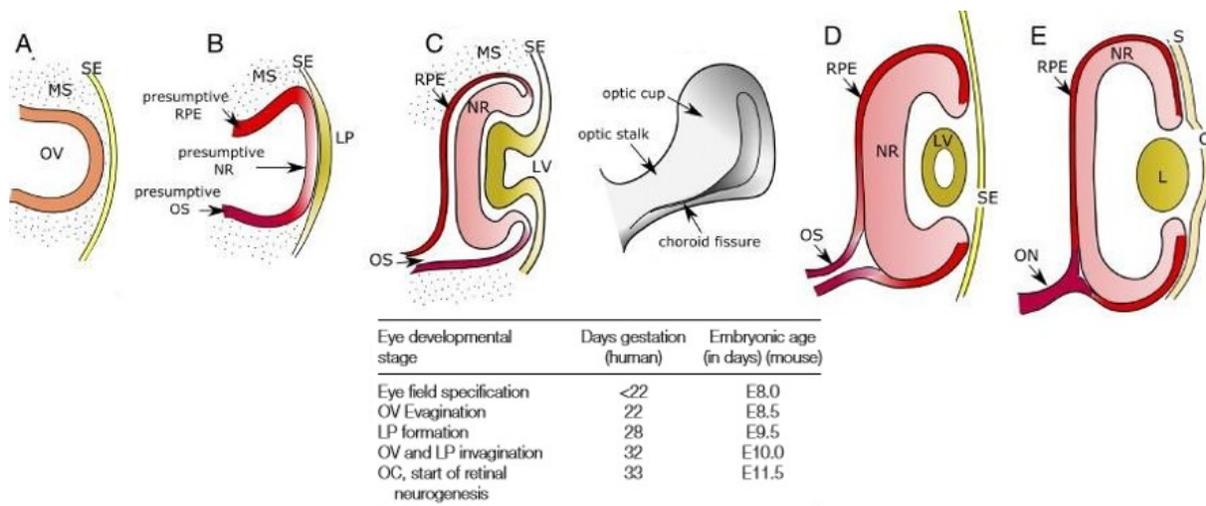


Figure 9 : Développement de l'œil chez les vertébrés. C, cornée; L, cristallin; LP, placode cristallinienne; LV, vésicule cristallinienne; MS, mésenchyme; NR, rétine neurale; ON, nerf optique; OS, tige optique; OV, vésicule optique; S, sclère; SE, ectoderme de surface. Adaptée de [68, 69].

1.4.3. Contribution des CCN

Lors du développement oculaire, les CCN crânielles migrent du tube neural jusqu'à la périphérie postérieure de la cupule optique pour former le mésenchyme péri-oculaire (MPO) parmi d'autres structures crâniocfaciales (Figure 10) [3].

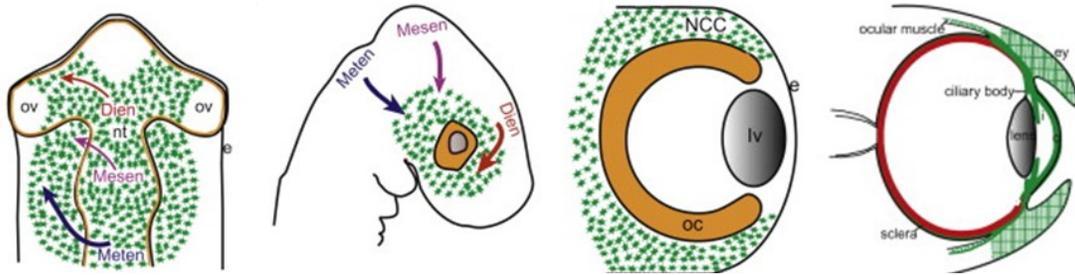


Figure 10 : Origine, migration et différenciation des CCN crânielles lors du développement oculaire. Vert, CCN et structures dérivées; Gris, vésicule cristallinienne et cristallin; Orange, cupule optique; Rouge, rétine. C, cornée; Dien, diencephale; e, ectoderme; ey, paupière; Iv, vésicule cristallinienne; Mesen, mésencéphale; Meten, métencéphale; NCC, cellules de la crête neurale; nt, tube neural; OC, cupule optique; OV, vésicule optique. Adaptée de [70].

Les progéniteurs du MPO sont ensuite soumis à une série de signaux qui dirigent leur migration et leur différenciation pour former les structures antérieures de l'œil. Chez l'humain, les CCN migrent en trois vagues tandis que chez la souris, elles migrent en deux. Chez l'humain, la première vague migre entre le cristallin et l'ectoderme de surface afin de former l'endothélium cornéen. La seconde vague migre entre l'épithélium cornéen et l'endothélium pour former les kératinocytes du stroma cornéen [3]. Chez la souris, ces structures sont issues d'une même vague de migration [70]. Finalement, la dernière vague migre entre la cornée postérieure et le segment antérieur de la cupule optique pour contribuer au corps ciliaire et au stroma de l'iris. La section du MPO située entre le segment antérieur de l'œil et l'endothélium se développe par la suite en réseau trabéculaire et en canal de Schlemm. Les progéniteurs du MPO dérivés des CCN contribuent ainsi directement à certaines structures antérieures de l'œil, soit l'endothélium cornéen, le stroma cornéen, le stroma de l'iris, le stroma et les muscle des corps ciliaires, la sclère et le réseau trabéculaire (Figure 10) [3].

Un autre rôle crucial des CCN dans le développement oculaire est de servir de centre de signalisation pour le *patterning* du primordium de l'ectoderme oculaire. Les CCN participent ainsi à la spécification de l'EPR à partir de la cupule optique, à l'induction des glandes lacrymales à partir de l'ectoderme de surface et à la différenciation de la tige optique à partir de l'épithélium neural [71, 72]. L'interaction du MPO avec les cellules de l'épithélium de surface permettent également le bon développement des paupières [73].

Des études ont récemment démontré qu'une partie des péricytes et des cellules musculaires lisses vasculaires qui entourent les cellules endothéliales de la vasculature hyaloïde, rétinienne, choroïdienne et du nerf optique est dérivée des CCN. Ceci dit, la pleine mesure de la contribution des CCN au développement de l'œil ainsi que l'identité de l'ensemble des gènes impliqués demeure incomplète [3].

En accord avec le rôle important du MPO dans le développement oculaire, des défauts de développement ou de migration des CCN affectent les structures dérivées et peuvent engendrer des dysgénésies du segment antérieur. Les dysgénésies du segment antérieur englobent un ensemble de désordres qui affectent la fonction des structures situées à l'avant de la surface vitrée, soit la cornée, l'iris, le cristallin, la sclère, le corps ciliaire, le réseau trabéculaire et le canal de Schlemm [3]. Elles comprennent notamment le colobome, l'aniridie, les cataractes, l'hypoplasie de l'iris, le glaucome et plusieurs autres [74].

1.4.4. Régulation génique

Au niveau du neuroépithélium, le champ optique est spécifié par les facteurs de transcriptions RX1/RAX, PAX6, SIX3, LHX2, TLL/TLX, OPTX2/SIX6 et ET/TBX3. Ces facteurs de transcription sont nécessaires et suffisants au développement oculaire [75]. Afin de permettre le développement de deux yeux, SHH, régulé par SIX3, permet la division ventrale du champs optique [76, 77].

L'évagination de la VO est permise grâce à RAX tandis que SHH en assure le *patterning* proximo-distal (P-D) et dorso-ventral (D-V) [78]. Plus précisément, pour l'axe P-D, SHH contrôle l'expression proximale de PAX6 et distale de PAX2. Pour l'axe D-V, SHH entraîne l'expression ventrale de VAX1/2 alors que l'identité dorsale requiert BMP4, qui y induit TBX5 [79-81]. L'augmentation et la maintenance des niveaux d'expression de VAX2 et TBX5 requièrent LHX2, également essentiel pour le passage de la VO à la cupule optique [82].

Pour la cupule optique, la spécification de la neurorétine et de l'EPR se fait conformément aux axes D-V et P-D établis. La spécification ainsi que la maintenance de l'EPR font appel à la voie WNT via des signaux TGFβ en provenance du MPO [71, 83]. TGFβ induit l'expression de MITF et de OTX2 qui lient et activent les gènes requis pour la différenciation de l'EPR, soit *Qnr71*, *Tyr*, *Trp1* et *Trp2* [84]. FGF1/2, exprimés par l'ectoderme de surface, et

SIX3 spécifient la neurorétine tandis que VSX2, aussi exprimé par l'ectoderme de surface, inhibe MITF et permet de maintenir la neurorétine [83, 85, 86].

Pendant le développement de la rétine, de nombreux facteurs de transcriptions sont requis pour maintenir la multipotence des progéniteurs rétiniens, promouvoir leur différenciation et spécifier le destin cellulaire. Les facteurs de transcription nécessaires pour la spécification et la différenciation des différents types cellulaires rétiniens sont décrits dans le [Tableau 6](#).

Tableau 6 : Facteurs de transcription nécessaires à la spécification et à la différenciation des différents types cellulaires rétiniens. Adapté de [69].

Retina cell type	Transcription factors expressed
Retinal ganglion cell	<i>Atoh7, Brn3b, Dlx1/Dlx2</i>
Horizontal cell	<i>Foxn4, Ptf1a, Onecut1</i>
Cone photoreceptor	<i>Otx2, Crx, Rorβ, Trp2, Blimp1</i>
Amacrine cell	<i>Foxn4, Ptf1a, Math3, NeuroD</i>
Rod photoreceptor	<i>Otx2, Crx, Nrl, Blimp1</i>
Bipolar cell	<i>Vsx2, Mash1, Math3</i>
Müller glia	<i>Notch1, Hes1, Hes5, Sox2, Sox8, Sox9</i>

1.4.4.1. Rôle de *Chd7* dans le développement oculaire

À E9.5, CHD7 est présent dans l'ectoderme de surface et dans le primordium de l'ectoderme neural. CHD7 persiste dans l'ectoderme de surface pendant l'induction de la placode cristallinienne, la formation de la vésicule cristallinienne et le développement des fibres cristalliniennes à E12.5. Par la suite, l'expression de CHD7 est visible dans la tige optique et dans les deux strates de la cupule optique. CHD7 demeure exprimé dans la rétine pendant la spécification et la différenciation des lignées neuronales. CHD7 n'est pas exprimé dans le MPO pendant ces étapes du développement [41].

La formation de la cupule optique et de la vésicule cristallinienne ainsi que la fermeture de la fissure choroïdienne requièrent l'expression de CHD7 dans l'ectoderme neural tandis que la bonne croissance du cristallin nécessite l'expression de CHD7 dans l'ectoderme de surface. Si CHD7 n'est pas exprimé dans l'ectoderme de surface, cela empêche l'induction du cristallin, ce qui perturberait les signaux subséquents de l'ectoderme de surface sur la vésicule optique et serait la principale cause de défauts de morphogénèse de la cupule optique. Par contre,

l'expression de CHD7 n'est requise ni pour la spéciation P-D de l'ectoderme neural ni pour la spécification de la rétine, des neurones ou de l'EPR. Une hypothèse évoquée pour expliquer ces observations implique la signalisation BMP [41].

1.4.5. Anomalies oculaires dans le syndrome CHARGE

Le colobome oculaire est une des caractéristiques principales du syndrome CHARGE. Le syndrome CHARGE est d'ailleurs le syndrome le plus communément associé au colobome [3]. Chez les patients CHARGE, il est habituellement question de colobome rétinien, de la choroïde ou du nerf optique, tandis que les colobomes affectant le disque optique, l'iris ou la paupière sont plus rares [22]. Cette condition chez les patients CHARGE peut affecter un œil ou, plus fréquemment, les deux yeux et peut affecter la vision selon la taille et la localisation du colobome. Certains patients présentent aussi de la microphthalmie couplée au colobome [17]. De façon moins fréquente, il est parfois également mention d'anophtalmie [24]. En raison des anomalies oculaires et des anomalies aux oreilles externes et internes, le syndrome CHARGE est la deuxième cause de surdité-cécité derrière le syndrome d'Usher [17].

1.4.6. Microphthalmie et anophtalmie

1.4.6.1. Définition

La microphthalmie se définit comme la présence d'un œil réduit en taille. Cliniquement, elle désigne un œil dont la longueur axiale est inférieure de deux déviations standards à la longueur axiale moyenne (19 mm à un an et 21 mm à l'âge adulte) [87-89]. L'anophtalmie correspond à une absence de globe oculaire malgré la présence d'annexes oculaires (paupières, conjonctive, appareil lacrymal) [89]. L'anophtalmie clinique désigne l'absence apparente d'œil. L'anophtalmie réelle est très rare puisqu'il est commun de retrouver des résidus de structures oculaires dans la cavité orbitaire.

1.4.6.2. Présentation globale

La microphthalmie et l'anophtalmie sont les plus sévères malformations oculaires [87-89]. Elles affectent entre 1/5 000 et 1/10 000 individu et sont responsables de 3,2%-11,2 % des cas de cécité. Comme c'est le cas dans le syndrome CHARGE, ces anomalies peuvent être

combinées à d'autres anomalies oculaires, tel le colobome (anophtalmies/microphtalmies complexes) ainsi qu'à des déficiences et malformations développementales (anophtalmies/microphtalmies syndromiques) [90]. Elles se retrouvent à l'état unilatéral ou bilatéral et peuvent alors se présenter en combinaisons variables. Avec le colobome, qui désigne toute anomalie résultant d'un défaut de fermeture de la fissure choroïdienne, elles forment le spectre MAC (microphtalmie/anophtalmie/colobome) (Figure 11) [89].

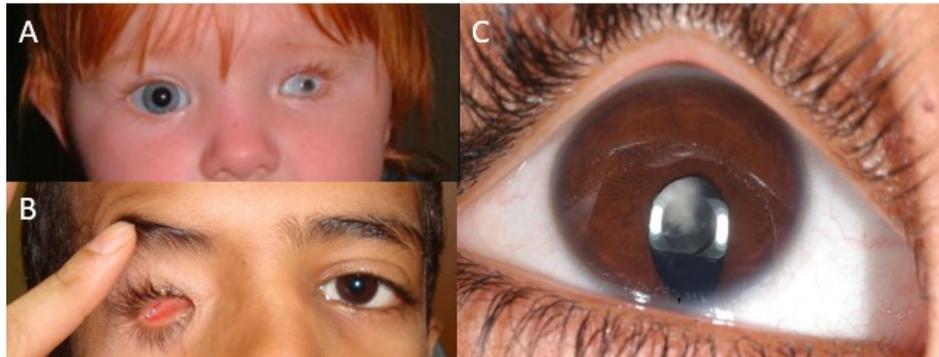


Figure 11 : Spectre MAC (A) Microphtalmie (B) Anophtalmie (C) Colobome [91, 92].

1.4.6.3. Causes

L'anophtalmie et la microphtalmie peuvent être engendrées par des facteurs environnementaux ou génétiques affectant les premières étapes du développement de l'œil, soit de la spécification du champ optique jusqu'à la formation de la cupule optique [41]. L'acide rétinoïque, la thalidomide, l'alcool et la rubéole, sont ainsi des exemples de facteurs environnementaux pouvant causer de l'anophtalmie ou de la microphtalmie. Pour les causes génétiques, les gènes mutés peuvent appartenir au groupe des facteurs de transcriptions, comme *PAX6*, *RAX*, *VSX2*, *FOXE3* et *SOX2*, lequel est d'ailleurs responsable de 4%-20% des cas de microphtalmie/anophtalmie. [93-95] D'autres gènes connus pour causer la microphtalmie ou l'anophtalmie sont *OTX2*, *STRA6*, *BCOR*, *HCCS*, *BMP4*, *SMOC1*, *GDF6*, *SHH*, *VAX1* et *SIX6* [69, 95]. Toutefois, $\frac{3}{4}$ des anophtalmies/microphtalmies ne peuvent pas être associées à une cause génétique, potentiellement en raison de l'identification incomplète de l'entièreté des gènes associés à ces anomalies. Par contre, le Consortium International du phénotypage de la souris a pour but de générer et phénotyper des modèles nuls pour chacun des gènes murins codant pour une protéine (~24 000) dans un fond unifié C57Bl/6N. Parmi les 4364 gènes évalués jusqu'à

présent, 48 ont été identifiés pour causer de la microphthalmie et 36 de l'anophtalmie. Environ 75% de ces gènes n'avaient pas été associés à ce type de pathologie précédemment. Ces efforts pourraient éventuellement permettre l'identification d'une proportion bien plus importante des gènes liés à la microphthalmie et à l'anophtalmie chez l'humain [96].

1.4.6.4. Fond génétique murin C57Bl/6

Chez les souris de fond génétique C57Bl/6 (B6), la microphthalmie et l'anophtalmie affectent naturellement <1-8% des individus selon les lignées [97]. Ces anomalies sont marquées par deux biais, les biais droit et femelle. En effet, chez les souris B6, la microphthalmie et l'anophtalmie se retrouvent 5,8 fois plus souvent dans l'œil droit que dans l'œil gauche et affectent 6,2 fois plus fréquemment les femelles que les mâles [98]. Ces biais sont conservés chez certains mutants présentant des anomalies oculaires et perdus chez d'autres [96, 97]. La raison évoquée dans la littérature pour expliquer le biais droit implique des différences environnementales entre les deux yeux lors du développement, mais la cause réelle de ce biais n'a pas été identifiée [97].

Les souris C57Bl/6N, contrairement aux souris C57Bl/6J, possèdent la mutation *Rd8* (*retinal degeneration 8*) dans le gène *Crd1*. Cette mutation consiste en la délétion d'un nucléotide, ce qui engendre un décalage du cadre de lecture et un codon stop prématuré. La protéine résultante est amputée des domaines cytoplasmiques et transmembranaires [99]. Les conséquences de cette mutation sont la discontinuité et la fragmentation des jonctions adhérentes de la *zonula adherens* de la rétine, la dysplasie des photorécepteurs (incluant le raccourcissement des segments internes et externes) ainsi que la dégénérescence des photorécepteurs, laquelle corrèle avec la présence de taches claires dues à des plis rétiniens [99, 100].

1.5. Hypothèses et objectifs

Initialement, les modèles murins pour le syndrome CHARGE disponibles au laboratoire étaient *FVB Toupee* et *B6-Sv129 Chd7*. Ces modèles ont été transférés vers des fonds génétiques FVB et B6 purs.

Lorsque le modèle *Toupee* a été transféré dans le fond génétique B6, une certaine proportion des hétérozygotes et des homozygotes ont développé de la microphthalmie et de l'anophtalmie, des anomalies oculaires non identifiées dans le fond génétique FVB. Ces anomalies laissent croire que *Fam172a* joue un rôle important dans le développement oculaire. Le premier but du projet de maîtrise, afin éventuellement de mieux comprendre ce rôle, était donc de caractériser la microphthalmie et l'anophtalmie chez *B6Toupee*.

En procédant à cette étude, il m'a été donné de constater que les individus *B6Toupee^{Tg/Tg}* présentaient d'autres anomalies, comme la malocclusion, non partagées par *FVB^{Tg/Tg}Toupee^{Tg/Tg}* ou *Chd7^{Gt/+}*, ou alors en proportions très différentes. Ces observations ont mené à l'hypothèse que le fond génétique et le gène muté influencent le développement phénotypique du syndrome CHARGE. Un second objectif était donc de prouver cette hypothèse par la caractérisation plus approfondie des modèles *Toupee^{Tg/Tg}* et *Chd7^{Gt/+}* dans les fonds génétiques FVB et B6.

Parallèlement, puisqu'une interaction génétique entre *Fam172a* et *Chd7* avait été identifiée par l'étude des doubles hétérozygotes (*Toupee^{Tg/+};Chd7^{Gt/+}*) de fond mixte, un objectif annexe était de valider cette interaction génétique avec des fonds génétiques unifiés.

Finalement, les individus *FVB^{Gt/+}Chd7^{Gt/+}* et *B6^{Gt/+}Chd7^{Gt/+}* étaient présents en proportions inférieures aux ratios mendéliens attendus au sevrage, ce qui suggère une forte mortalité embryonnaire ou néonatale. La mortalité observée chez *FVB^{Gt/+}Chd7^{Gt/+}* et *B6^{Gt/+}Chd7^{Gt/+}* étant plus importante que celle identifiée dans la littérature, un dernier objectif était donc d'identifier le moment et la cause du décès pour les deux lignées.

2. Méthodes

2.1. Animaux

Toutes les procédures effectuées sur des animaux ont été approuvées par le Comité Institutionnel de Protection des Animaux de l'Université du Québec à Montréal, accrédité par le Conseil Canadien de Protection des Animaux. Les souris *Chd7^{+/Gt}* ont été obtenues du laboratoire du Pr Donna Martin et rétrocroisées en fond FVB/N et C57Bl/6N* (87-94% B6, mortalité néonatale compilée pour des souris B6 pures) [26]. Les souris *Toupee* ont été générées par injection d'un minigène de tyrosinase dans des zygotes FVB/N, puis rétrocroisées en fond C57Bl/6N [59]. Les souris *FVB Toupee^{Tg/+}; Chd7^{Gt/+}* (doubles hétérozygotes) sont issues de croisements *FVB Toupee^{Tg/+}* par *FVB Chd7^{Gt/+}*. Les analyses phénotypiques postnatales ont été menées sur un nombre similaire de mâles et de femelles, hormis pour les souris *FVB Chd7^{Gt/+}* (Tableau 18). Une à 52 portées ont été étudiée(s) par expérience. Le jour embryonnaire 0.5 (E0.5) correspond à la journée de détection du bouchon vaginal. Pour récolter les embryons, les femelles gestantes ont été sacrifiées, les cornes utérines prélevées, puis les muscles utérins, la déciduale et le sac vitellin disséqués afin d'en extraire l'embryon. Les animaux sacrifiés ont été anesthésiés à l'isoflurane, puis euthanasié avec une concentration croissante de CO₂.

2.2. Génotypage et sexage

Les souris *Wildtype*, *Toupee^{Tg/+}* (hétérozygotes) et *Toupee^{Tg/Tg}* (homozygotes) ont été génotypées en fonction de la coloration de leur pelage (Figure 17). Les sacs vitellins d'embryons *Wildtype*, *Toupee^{Tg/+}* et *Toupee^{Tg/Tg}* ont été génotypés par PCR avec l'ADN polymérase Taq standard (Feldan) pour les allèles *wildtype* (5'- GAAGTGGGAACAAAACACCCTTGG -3' et 5'- GTAAGGCTCGCACTGACATAGC -3') et mutante (5'- GGGAGTAAGTCCTACCAAT GTTAAATC -3' et 5'- TGACCTTCTAAACAGTCCCATATCCCC -3') avec des amorces bordant le site d'insertion du transgène. Le programme utilisé consiste en une dénaturation initiale de 2 min à 96°C, puis 35 cycles de 30s à 96°C, 30s à 64°C et 1min à 72°C, avec une élongation finale de 5 min à 72°C. Les souris et sacs vitellins d'embryons *Wildtype* et *Chd7^{Gt/+}* ont été génotypés par PCR selon le programme décrit ci-haut (5'- GCTCGCTTTTCAACCTCATTACG -3', 5'- ATCAACAATGCC AACCCAGGC -3' et 5'-

CCTCCGATTGACTGAGTCGC -3') en utilisant une paire d'amorces bordant le site d'insertion ainsi qu'une amorce localisée dans l'insertion. Le sexage a également été effectué par PCR en ciblant un gène spécifique aux mâles, *Zfy* (5'-GACCAGATTGTTGTGGAAGTACAAG -3' et 5'-CCAGTATATCTGAAGTGTCAGCTG -3'), et la paire de gènes paralogues *Smcx/Smcy* (5'-TGAAGCTTTTGGCTTTGAG -3' et 5'-CCACTGCCAAATTCTTTGG -3') qui génère un amplicon de 300 pb pour les femelles et de 280 pb pour les mâles.

2.3. Histologie

Les globes oculaires ont été pesés immédiatement après prélèvement à l'aide d'une balance analytique AUW320 (Shimadzu). Le pourcentage de réduction du globe oculaire a été calculé individuellement pour chaque individu par la différence entre la masse de l'œil sain et la masse de l'œil atteint sur la masse de l'œil sain. En cas d'anomalie oculaire bilatérale, la masse d'un œil sain d'une souris de même sexe et d'âge et de poids similaire a été utilisée. Par la suite, les tissus ont été fixés au paraformaldéhyde (PFA) 4% à 4°C pendant 16h et déshydratés avec un gradient d'éthanol puis de xylène. Les tissus ont ensuite été déposés dans des bains de paraffine pendant 2-3h, avant enrobage, coupe en sections de 8 µm et coloration hématoxyline-éosine (HE).

2.4 Analyses du squelette

Les crânes adultes, les oreilles internes et les crânes d'embryons E18.5 pour observation de la fente palatine ont été colorés au bleu d'alcan-alizarine rouge [102]. Après fixation à l'éthanol 95% et retrait de la peau, les tissus ont été colorés au bleu d'alcan 0,03% dans l'éthanol/acide acétique (4:1), digérés au KOH 2%, colorés à l'alizarine rouge 0,1%, puis décolorés dans une solution de KOH 1%/glycérol 20%. L'aire des cavités orbitaires a été calculée avec le logiciel ImageJ. Les cas de malocclusion ont été identifiés par le service d'animalerie.

2.5. Colobome

Un microscope (Leica M205 FA) a été utilisé afin d'observer la présence ou l'absence de la fissure choroïdienne à E13.5. Les observations ont été menées sur l'embryon entier (lignées *Toupee* et *B6Chd7*) ou sur des coupes histologiques sagittales de l'embryon pour la lignée non pigmentées (lignée *FVBChd7*). Le colobome a été identifié par la persistance de la fissure choroïdienne.

2.6. Tests de respiration

Afin de tester les capacités respiratoires des souris à la naissance, des embryons E18.5 (légèrement avant terme) ont été prélevés, déposés sur une plaque chauffante à 37°C et observés pendant 1h avec stimulation manuelle pendant les premières 15 minutes, puis de façon sporadique. Au terme de l'heure d'observation, la survie, la coloration et les capacités respiratoires des embryons ont été notées.

2.7. Immunohistochimie

Les neurofilaments ont été colorés par immunohistochimie (2H3) selon des protocoles existants [101]. Après dissection et fixation au PFA, les embryons ont été déshydratés avec un gradient de méthanol puis conservés à -20°C. Par la suite, les embryons ont été transférés dans une solution de méthanol/DMSO/H₂O₂ (4:1:1), réhydratés et lavés au tampon phosphate salin additionné de 2% de lait instantané et de 0,5% de triton X-100 (PBSMT). Les embryons ont été incubés pendant 16h à 4°C avec l'anticorps anti-2H3 (Developmental Studies Hybridoma Bank) dilué 1:200 dans du PBSMT, puis lavés au PBSMT. Ensuite, ils ont été incubés avec l'anti-IgG de souris HRP 1:500, lavés au PBSMT et au tampon phosphate salin additionné de 0,2% d'albumine de sérum bovin et de 0.5% de triton X-100 (PBTX) et révélés par ajout de 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride.

2.8. Analyses transcriptomiques

Les données transcriptomiques ont été obtenues d'un transcriptome précédemment effectué et publié [27]. L'analyse du transcriptome a été effectuée au Centre d'Innovation

Génome Québec pour la génération de la librairie, le séquençage avec la plateforme HiSeq (Illumina) et les analyses bio-informatiques. Les librairies ont été générées et séquencées à partir de trois répliques biologiques par génotype (*G4-RFP* et *Toupee^{Tg}/Tg;G4-RFP*) obtenus d'embryons E10.5 dissociés et triés pour l'expression de la RFP avec un trieur cellulaire BD FACSJazz (BD Biosciences). Seulement deux répliques par génotype rencontraient les standards de qualité pour les analyses bioinformatiques. Les séquences de 100-pdb appariées (51-84 millions de lectures par échantillon) ont été comparées au génome de référence mm10. L'analyse différentielle des niveaux de transcription a été réalisée avec les logiciels DESeq et edgeR tandis que l'analyse de l'épissage alternatif a été réalisée avec le logiciel rMATS. Les valeurs P ont été corrigées avec la méthode de Benajmini-Hochberg.

2.9. Analyses statistiques

Lorsqu'applicable, les valeurs étaient présentées selon la moyenne \pm SEM ou selon la pénétrance de l'anomalie \pm SEM, calculée selon la loi de Bernoulli, avec (n) le nombre total d'individus/de yeux observés. Pour identifier une différence significative de distribution entre deux groupes de données binaires, le test de Khi^2 d'indépendance (l'effectif de toutes les classes >5) ou le test exact de Fisher (l'effectif d'une ou de plusieurs classes ≤ 5) ont été réalisés avec le logiciel R version 3.6.1. Pour déterminer si les distributions varient par rapport aux ratios théoriques attendus, des tests de khi^2 de conformité ont été effectués. Les distributions étaient considérées significativement différentes si la valeur P calculée était inférieure 0.05.

3. Résultats

3.1. Microphthalmie et anophtalmie chez $B_6Toupee^{Tg/+}$ et $B_6Toupee^{Tg/Tg}$

3.1.1. Aspect général

Chez $B_6Toupee$, les homozygotes et les hétérozygotes présentent de la microphthalmie et de l'anophtalmie. Pour $B_6Toupee^{Tg/Tg}$ la pénétrance de ces phénotypes est de 35,7% et 19,1% respectivement tandis que pour $B_6Toupee^{Tg/+}$ elle est de 11,1% et de 5,6% (Figure 12). Les anomalies oculaires sont d'ailleurs de façon générale le seul phénotype observable chez les individus $B_6Toupee^{Tg/+}$ symptomatiques, ce qui inscrirait $B_6Toupee^{Tg/+}$ comme un modèle pour le spectre MAC.

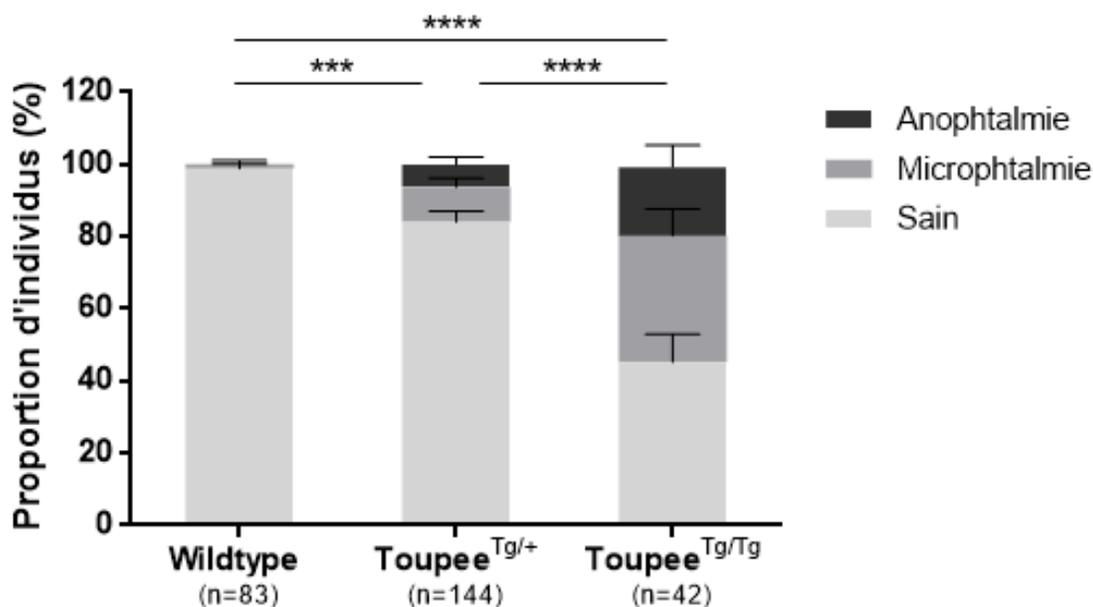


Figure 12: Proportion d'individus atteints de microphthalmie et d'anophtalmie en fonction du génotype pour la lignée $B_6Toupee$. ** $P \leq 0.01$ *** $P \leq 0.001$ **** $P \leq 0.0001$ (test du χ^2 et test exact de Fisher).

La microphthalmie et l'anophtalmie peuvent être observées à l'état bilatéral ou unilatéral et se combiner au colobome et/ou à de l'opacité cornéenne et se présenter alors en combinaisons variables affectant le même œil ou les deux yeux. Toutefois, la plupart des microphthalmies et anophtalmies se présentent à l'état unilatéral (98,4%), avec un très fort biais vers la droite (91,1%). Les défauts aux oreilles internes, la tête inclinée et la déviation crâniofaciale ont été observés afin d'identifier si le biais droit est restreint à l'œil. Les défauts aux oreilles internes ainsi que l'inclinaison de la tête semblent répartis de façon aléatoire. Toutefois, la déformation crâniofaciale affecte exclusivement le côté droit, mais le nombre d'observations (n=4) est peu élevé (Figure 13).

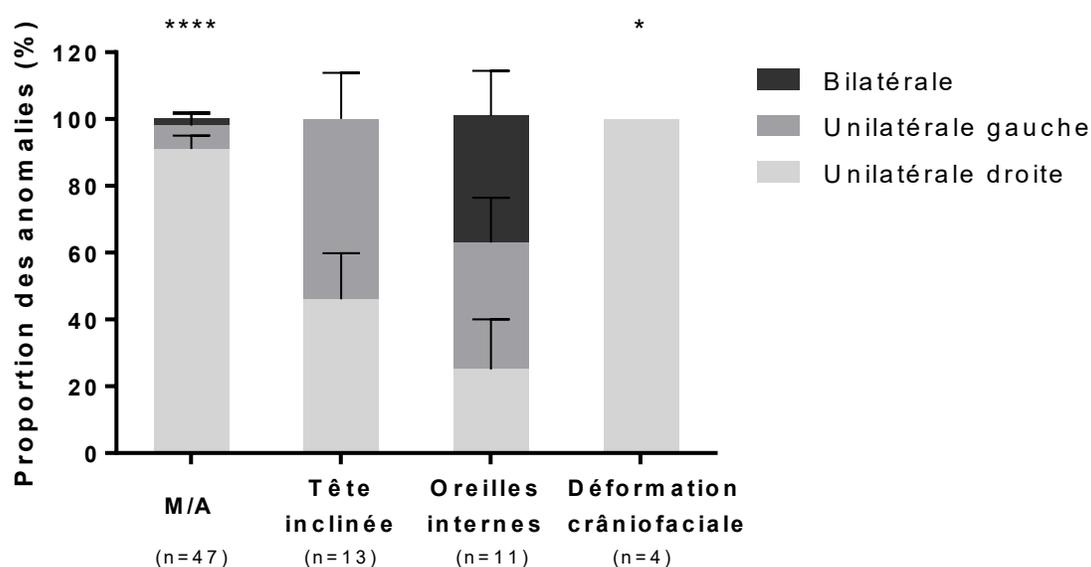


Figure 13 : Étude de l'état (unilatéral/bilatéral) et de l'hémisphère affecté par certaines anomalies chez le modèle *B6Toupee^{Tg/Tg}*. M/A, microphthalmie/anophtalmie * $P \leq 0.05$ **** $P \leq 0.0001$ (test de conformité du χ^2 , proportions théoriques de 50% pour les événements unilatéraux).

3.1.2. Développement et histologie

La dissection de cas de microphthalmies et la pesée des globes oculaires révèle des yeux de taille normale (44%) ou de taille réduite (67%). Ces deux cas de figure pour la microphthalmie seront donc référés comme de la «microphthalmie apparente» et de la «microphthalmie réelle».

Les souris adultes atteintes de microphthalmie présentent à la naissance des yeux d'apparence saine ou avec de la microphthalmie (Figure 14).

Pour la microphthalmie apparente, le globe oculaire semble parfois plus enfoncé dans l'orbite (énophtalmie) ou alors la fente palpébrale semble anormalement étroite. Toutefois, ces observations n'ont pas été systématiquement recensées de telle sorte qu'il n'est pas possible de savoir si elles s'appliquent à tous les cas de microphthalmie apparente. Certains yeux avec de la microphthalmie apparente présentent de la déformation, suggérant que l'œil ait pu se développer différemment en raison de contraintes physiques (Annexes, Figure 23). La structure générale des coupes histologiques ne montre à priori pas de défauts structuraux pour la microphthalmie apparente (Figure 14).

Pour la microphthalmie réelle, les cas recensés montrent une diminution de 15 à 51% de la masse du globe oculaire. La microphthalmie réelle est visible dès E11.5 (Figure 15). À E12.5, de la microphthalmie modérée à sévère est discernable et se présente souvent accompagnée d'un colobome prononcé (Annexes, Figure 24). Pour plusieurs stades de développement (ex : E10.5, E11.5 et E15.5), certaines coupes HE montrent également une rotation de la cupule optique (Figure 15). Selon les colorations HE, la morphologie globale de l'œil adulte est conservée. Pour certains spécimens, les structures sont toutes proportionnellement réduites, tandis que pour d'autres, certaines structures spécifiques (cristallin, chambre antérieure et rétine) sont plus amplement affectées (Figure 14).

Pour l'anophtalmie, la dernière série de prélèvements a permis de récupérer des structures s'apparentant à de la microphthalmie sévère ou à un résidu de globe oculaire dégénéré chez tous les individus disséqués (Figure 14). Ces observations suggèrent que les cas d'anophtalmie réelle (absence complète de structures oculaires) n'existent pas chez *B6Toupee*. Il est donc considéré que l'anophtalmie consiste en de la «microphthalmie sévère» ($>1\text{mm}^2$, 10-20% masse œil sain) dans 33% des cas et en de la «microphthalmie extrême» ($<1\text{mm}^2$, masse négligeable) dans 67% des cas. Les deux cas de figure pour l'anophtalmie seront référés en ces termes. Les individus adultes souffrant d'anophtalmie ont été identifiés à partir de nouveau-nés avec apparence de microphthalmie et d'anophtalmie (Figure 14).

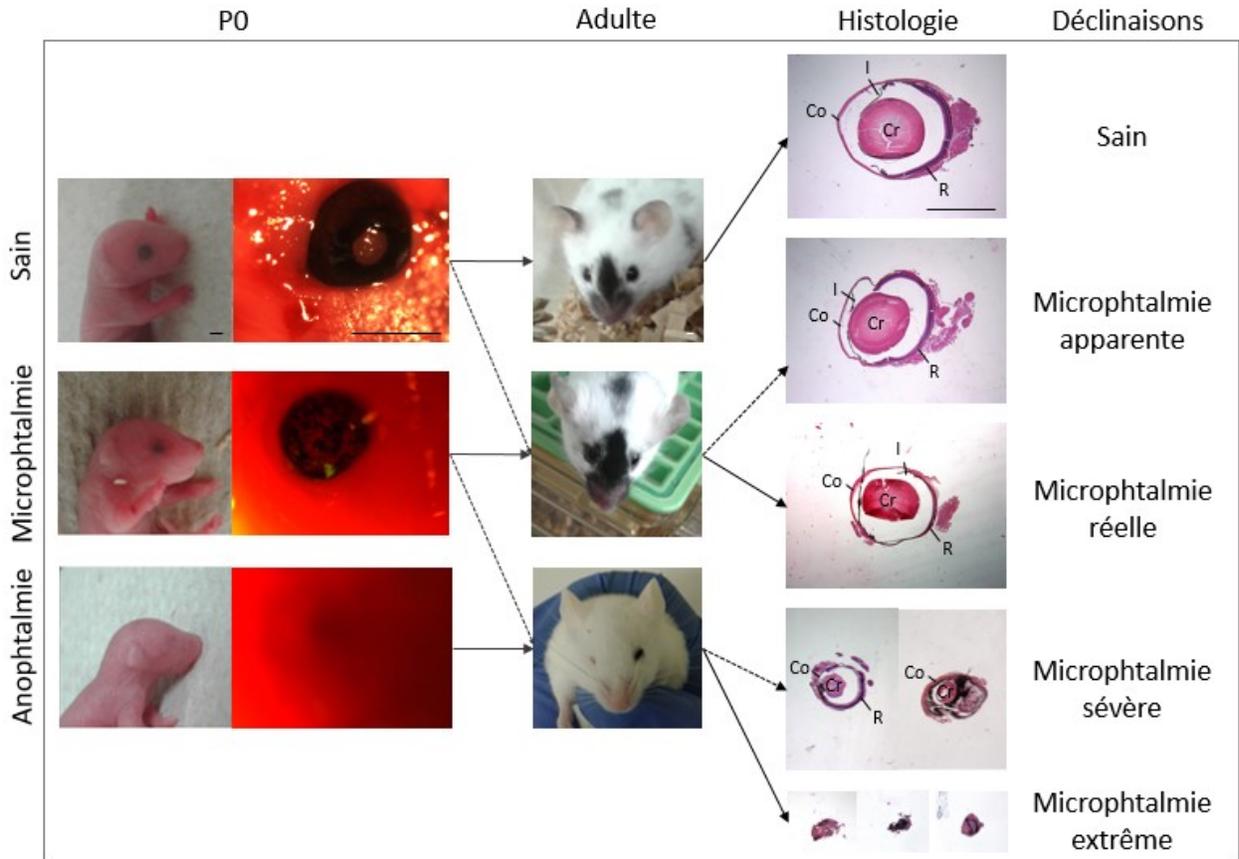


Figure 14 : Développement oculaire postnatal de la microphthalmie et de l'anophtalmie chez le modèle *B6Toupee*. P0, spécimens vivants (n=22- >150) et photographies de l'œil suite à la dissection des paupières (n=1-6); Adulte, spécimens vivants (n=42-144) et colorations HE de coupes sagittales de l'œil (n=3-8). Individus *B6Wildtype* pour la catégorie Sain et *B6Toupee*^{Tg/+} et *B6Toupee*^{Tg/Tg} pour les catégories Microphthalmie et Anophtalmie. Une flèche représente une relation avérée tandis que la corrélation entre le type de trait (plein, pointillé) marque les relations qui sont suspectées. Barre d'échelle, 1mm. Co, cornée; I, iris; Cr, cristallin; R, rétine.

La microphthalmie sévère de même que la microphthalmie extrême sont interprétées comme de l'anophtalmie en raison de l'absence d'ouverture palpébrale, les paupières demeurant jointes. Aucun cas d'anophtalmie n'a pu être observé avant E15.5 et l'individu observé à ce stade présentait des structures pigmentées dans la cavité orbitaire (Figure 15). Selon les coupes histologiques, la microphthalmie sévère peut présenter une structure globale conservée, ou alors une perte partielle de structure, laquelle est totale pour la microphthalmie extrême (Figure 14).

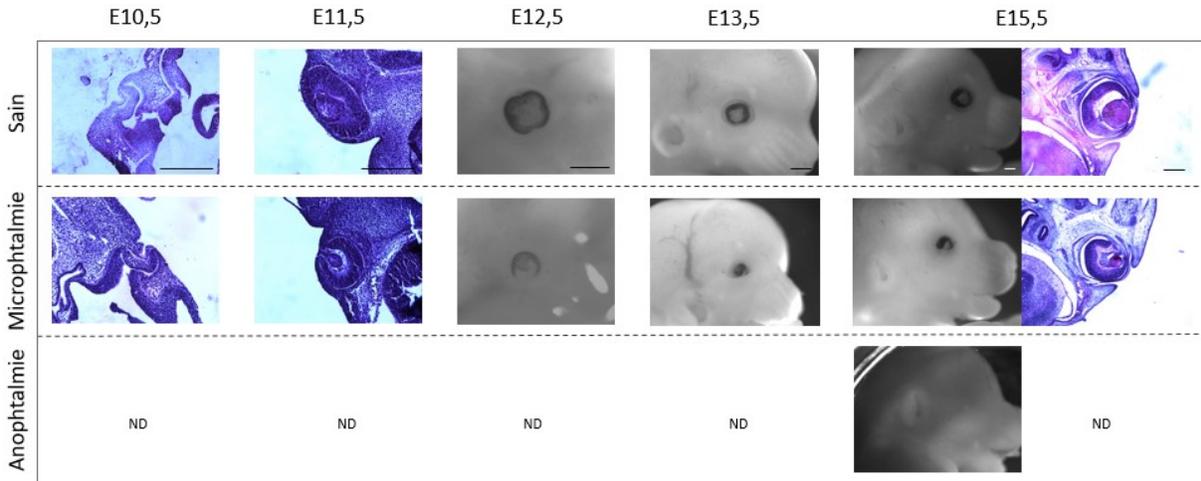


Figure 15 : Développement oculaire embryonnaire pour la microphthalmie et l'anophtalmie chez le modèle *B6Toupee*. E10.5 (n=4-7), E11.5 (n=6-21), E15.5 (n=1-2), coloration HE de coupes histologiques frontales de l'embryon; E12.5 (n=8-57), E13.5 (n=6-99), E15.5 (n=4-65), photographie noir et blanc de l'embryon entier. Individus *B6Wildtype* ou *B6Toupee^{Tg/+}* sans anomalie pour la catégorie Sain et *B6Toupee^{Tg/+}* et *B6Toupee^{Tg/Tg}* pour les catégories Microphthalmie et Anophtalmie. ND, non disponible. Barre d'échelle, 500µm.

3.1.3. Cavité orbitaire

Afin d'identifier si l'atteinte est restreinte au globe oculaire ou si elle s'étend à la cavité orbitaire, les crânes de souris adultes présentant de la microphthalmie et de l'anophtalmie ont été colorés au bleu d'alcan et à l'alizarine rouge. Les individus atteints de microphthalmie unilatérale montrent des cavités orbitaires de taille identique tandis que ceux atteints d'anophtalmie unilatérale marquent un léger étranglement de la cavité orbitaire de l'œil atteint (Figure 16).

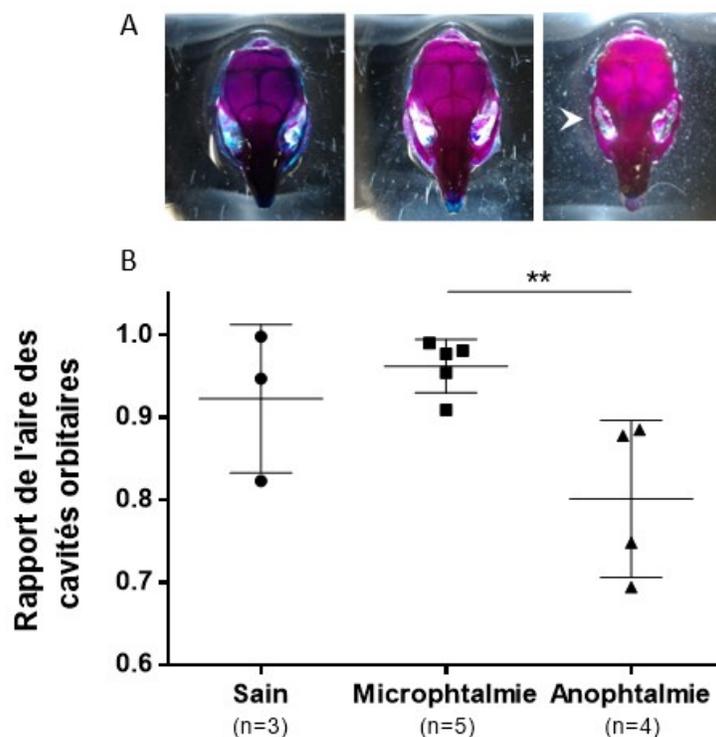


Figure 16 : Comparaison des cavités orbitaires. (A) Crânes de souris adultes colorés à l'alizarine rouge et au bleu d'alcian représentatifs de chaque condition : sans anomalie oculaire, microphthalmie unilatérale droite et anophthalmie unilatérale droite avec étrécissement de la cavité orbitaire (tête de flèche). (B) Rapport de l'aire des cavités orbitales.

3.1.4. Analyse du transcriptome des CCN de *FVB Toupee* à E10.5

Puisque le transcriptome des CCN à E10.5 (*FVBWT;G4-RFP* vs *FVB Toupee^{Tg/Tg};G4-RFP*) avait préalablement été effectué et que le stade utilisé précède légèrement l'apparition des premiers signes de microphthalmie et d'anophthalmie, ce transcriptome a été examiné afin d'identifier des pistes préliminaires pour expliquer l'apparition de la microphthalmie et de l'anophthalmie chez *Toupee*. Des gènes importants au développement de l'œil et/ou connus pour causer de la microphthalmie ou de l'anophthalmie ont été examinés afin de déterminer si leur niveau d'expression ou leur épissage varie selon ce transcriptome ([Annexes, Tableau 10](#)).

Parmi les gènes du développement oculaire recherchés dans le transcriptome, aucun ne montre une dérégulation significative de l'épissage ([Tableau 7](#)). En contrepartie, plusieurs de ces gènes montrent une dérégulation des niveaux d'expression, soit *Bmp7*, *Dlx1*, *Hes5*, *Lhx2*,

Mitf, *Notch1*, *Onecut1*, *Rorb*, *Sox2*, *Sox8*, *Sox9*, *Stra6*, *Tbx3*, *Tyr*. Ceux-ci sont généralement diminués de moitié, hormis pour *Rorb* et *Tyr*, dérégulés au tier de leur niveau d'expression, ainsi que pour *Mitf*, dérégulé au quart de son niveau d'expression chez les contrôles (Tableau 7). Parmi les gènes ainsi dérégulés, *Sox2* est impliqué de nombreux aspects du développement de l'embryon et du développement oculaire, dont dans le développement de l'EPR. *Lhx2* et *Tbx3* sont impliqués dans la spécification du champs optique, *Bmp7*, puis *Mitf*, dans les étapes médianes du développement oculaire dont le passage de la VO à la cupule optique et la fermeture de la fissure choroïdienne et *Stra6* contribue au développement global de l'œil en contrôlant l'expression de plusieurs gènes ou en permettant l'apport en vitamine A, essentielle au développement oculaire [75, 84, 103-107]. *Sox2*, *Sox8*, *Sox9*, *Hes5* et *Notch1* sont impliqués dans la spécification et dans la différenciation des cellules de Muller, tandis que pour *Dlx1*, ce sont les cellules ganglionnaires, pour *Onecut1* les cellules horizontales et les cônes, pour *Rorb* les cônes et pour *Tyr* l'EPR [69, 84]. *Bmp7*, *Lhx2*, *Mitf*, *Sox2* et *Stra6* ont été identifiés comme pouvant causer de la microphthalmie ou de l'anophtalmie chez l'humain ou chez la souris [69, 93-95, 105, 107].

Tableau 7 : Dérégulation de l'expression de gènes impliqués dans le développement oculaire chez *FVB**Toupee*^{Tg/Tg}. Tiré du transcriptome des CCN dissociées de *FVB**WT* :*G4-RFP* vs *FVB**Toupee*^{Tg/Tg} :*G4-RFP* à E10.5, p-value <0,05.

Dérégulation	Gène	Ratio <i>Toupee</i> ^{Tg/Tg} /Contrôle
Niveau d'expression	<i>Bmp7</i>	0,52
	<i>Dlx1</i>	0,52
	<i>Hes5</i>	0,45
	<i>Lhx2</i>	0,55
	<i>Mitf</i>	0,26
	<i>Notch1</i>	0,43
	<i>Onecut1</i>	0,44
	<i>Rorb</i>	0,33
	<i>Sox2</i>	0,54
	<i>Sox8</i>	0,40
	<i>Sox9</i>	0,57
	<i>Stra6</i>	0,57
	<i>Tbx3</i>	0,46
	<i>Tyr</i>	0,35

3.2. Étude comparative des modèles *Toupee*^{Tg/Tg} et *Chd7*^{Gt/+} dans les fonds génétiques FVB et B6

Deux modèles pour le syndrome CHARGE, *Toupee*^{Tg/Tg} et *Chd7*^{Gt/+}, ont été caractérisés à l'égard d'une quinzaine d'anomalies caractéristiques du syndrome et ce pour deux fonds génétiques différents, FVB et B6, dans le but d'identifier l'impact du fond génétique et du gène muté sur le développement phénotypique.

3.2.1. Effet du fond génétique

Le modèle *Toupee* a été généré par insertion d'un mini-gène de tyrosinase, lequel permet de rétablir la pigmentation chez les individus FVB. L'insertion du transgène engendre toutefois une pigmentation non uniforme chez *Toupee*^{Tg/+} et *Toupee*^{Tg/Tg} en raison de l'insertion dans un gène important aux CCN. Comme premier impact du fond génétique, on peut observer que la dépigmentation affecte plus fortement les individus *B6Toupee* que les individus *FVB**Toupee*. En effet, *FVB**Toupee*^{Tg/+} n'est dépigmenté qu'au sommet du crâne tandis que *B6Toupee*^{Tg/+} est dépigmenté sur presque l'entièreté du corps, hormis le museau. *FVB**Toupee*^{Tg/Tg} conserve de la pigmentation au niveau des yeux et des oreilles alors que *B6Toupee*^{Tg/Tg} ne conserve de pigmentation qu'au niveau des yeux (Figure 17).

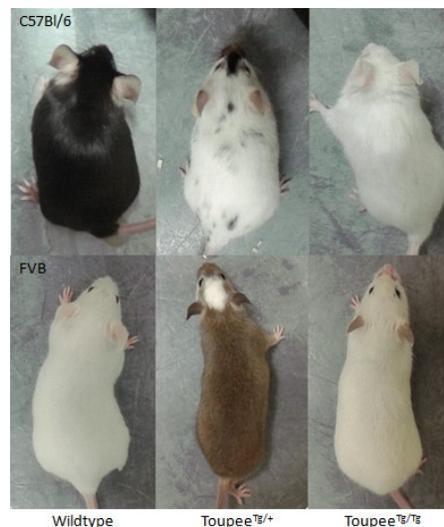


Figure 17 : Patrons de pigmentation chez *B6Toupee* et *FVB**Toupee*. Modèle généré par insertion d'un mini-gène de tyrosinase dans le gène *Fam172a*.

En second lieu, il s'avère que le fond génétique influence significativement la pénétrance de presque toutes les anomalies étudiées pour un moins un des deux modèles (Figure 18). Ainsi, la *circling* est plus fréquent et beaucoup plus rapide chez *FVB**Toupee*^{Tg/Tg} que chez *B6**Toupee*^{Tg/Tg}. Le phénotype d'*head-bobbing*, la tête inclinée et la malocclusion montrent une plus forte pénétrance chez les individus *Toupee*^{Tg/Tg} de fond génétique B6. Le colobome est deux fois plus présent chez les souris *FVB**Toupee*^{Tg/Tg} tandis que la microphthalmie et l'anophtalmie sont accrues chez *B6**Toupee*^{Tg/Tg}. D'ailleurs, la microphthalmie et l'anophtalmie sont également présents chez une proportion de *B6**Toupee*^{Tg/+}, tandis que *FVB**Toupee*^{Tg/+} est vraisemblablement asymptomatique hormis pour la dépigmentation. La réversion sexuelle n'est observée que chez *FVB**Toupee*^{Tg/Tg} et non chez *B6**Toupee*^{Tg/Tg}. La fente palatine, absente chez les souris *B6**Chd7*^{Gt/+}, montre pourtant une pénétrance presque complète chez les souris *FVB**Chd7*^{Gt/+}. Pour *Toupee*^{Tg/Tg}, les défauts aux oreilles internes sont plus importants chez les individus B6 que FVB. Le retard de croissance est plus pénétrant pour *B6**Chd7*^{Gt/+} que pour *FVB**Chd7*^{Gt/+}. Des défauts locomoteurs n'ont été observés que chez les individus B6 des deux modèles. La mortalité néonatale est accrue chez les souris *B6**Chd7*^{Gt/+} par rapport aux souris *FVB**Chd7*^{Gt/+} et augmente d'ailleurs avec l'enrichissement en fond B6 (Figure 18, Figure 21). En contrepartie, il n'y aurait apparemment pas de mortalité néonatale en fond mixte (50% FVB-50% B6) (Figure 21). Ainsi, 13 des 15 anomalies étudiées montrent des différences de pénétrance marquée entre les individus B6 et FVB pour au moins un des deux modèles, mettant en évidence un rôle du fond génétique dans le développement phénotypique du syndrome CHARGE (Figure 18).

3.2.2. Effet du gène muté

Si on compare plutôt les deux modèles étudiés, qui représentent des pertes de fonctions pour deux gènes différents, *Fam172a* et *Chd7*, déjà il s'avère que les individus présentant les anomalies CHARGE sont les homozygotes pour *Toupee* et les hétérozygotes pour *Chd7*.

De plus, des différences importantes de pénétrance sont également observables entre les deux modèles (Figure 18). L'*head-bobbing* est plus fréquent chez *FVB**Chd7*^{Gt/+} que chez *FVB**Toupee*^{Tg/Tg}. La tête inclinée, non observée pour *B6**Chd7*^{Gt/+}, affecte pourtant près de la moitié des individus *B6**Toupee*^{Tg/Tg}. La malocclusion et la microphthalmie affectent une proportion plus importante de souris *B6**Toupee*^{Tg/Tg} que de souris *B6**Chd7*^{Gt/+}. La déformation crâniofaciale est

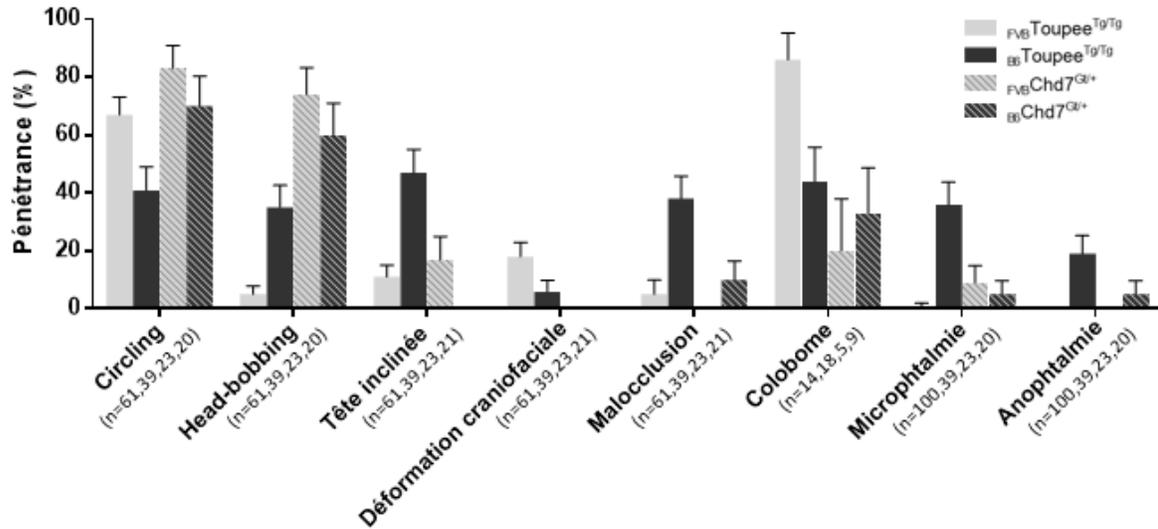
non observée dans le modèle $Chd7^{Gt/+}$, mais présente une certaine pénétrance chez $Toupee^{Tg/Tg}$. Le colobome est beaucoup plus fréquent pour les individus $Toupee^{Tg/Tg}$ que $Chd7^{Gt/+}$ dans le fond génétique FVB. La pénétrance de la fente palatine est accrue chez $B6Toupee^{Tg/Tg}$ et plus rare chez $B6Chd7^{Gt/+}$, alors qu'on observe l'inverse pour le fond génétique FVB. La fermeture partielle des paupières affecte une proportion moins importante d'individus $B6Chd7^{Gt/+}$ que de $B6Toupee^{Tg/Tg}$. Les défauts aux oreilles internes montrent une pénétrance presque complète pour $FVBChd7^{Gt/+}$ tandis que ce type d'anomalie est rare pour $FVBToupee^{Tg/Tg}$. Pour le fond génétique FVB, le retard de croissance est plus fréquent chez $Toupee^{Tg/Tg}$ tandis que pour le fond génétique B6, il est plus fréquent chez $Chd7^{Gt/+}$. La mortalité néonatale est très faible pour $Toupee^{Tg/Tg}$, mais est excessivement élevée pour $Chd7^{Gt/+}$ (Figure 18). Notons également que les anomalies affectées par le fond génétique sont différentes pour $Toupee^{Tg/Tg}$ et $Chd7^{Gt/+}$ (Figure 18).

Certaines anomalies, bien que nommées selon les mêmes termes, se présentent également de façon différente selon le modèle. Ainsi, pour les oreilles internes, le défaut présenté par $Toupee^{Tg/Tg}$ correspond à des oreilles à l'aspect partiellement ou totalement gonflé tandis que chez $Chd7^{Gt/+}$, le défaut consiste en l'absence de canaux ou en la présence de canaux incomplets (principalement le canal latéral). Pour la fente palatine, les souris $Toupee^{Tg/Tg}$ montrent une absence de l'os présphénoïde tandis que pour les souris $Chd7^{Gt/+}$, c'est une fermeture incomplète du palais. Finalement, les souris $Toupee^{Tg/Tg}$ présentant des difficultés motrices se déplacent couchées sur le flanc tandis que les individus $Chd7^{Gt/+}$ avec des difficultés motrices présentent une patte postérieure flexe tendue vers l'arrière. Si dans le premier cas, les problèmes locomoteurs disparaissent avec la croissance de la souris, dans le second cas elles persistent à l'âge adulte (Figure 19).

3.3. Interaction génétique

Des doubles hétérozygotes $FVB\textit{Toupee}^{Tg/+};\textit{Chd7}^{Gt/+}$ ont été générés afin de confirmer l'interaction génétique entre *Fam172a* et *Chd7* dans un fond génétique unifié. Les doubles hétérozygotes B6 n'ont pas été étudiés en raison de l'impossibilité d'obtenir des individus $B6Chd7^{Gt/+}$ purs, requis pour les croisements.

$B6^{TP}$ vs $B6^{Ch}$			***		*		*	
FVB^{TP} vs FVB^{Ch}	****			*		*		
FVB^{Ch} vs $B6^{Ch}$								
FVB^{Tp} vs $B6^{Tp}$	*	***	***		**	*	****	***



$B6^{TP}$ vs $B6^{Ch}$	*		*	**		****
FVB^{TP} vs FVB^{Ch}			*	**	*	****
FVB^{Ch} vs $B6^{Ch}$			***	***	***	*
FVB^{Tp} vs $B6^{Tp}$		**		***		*

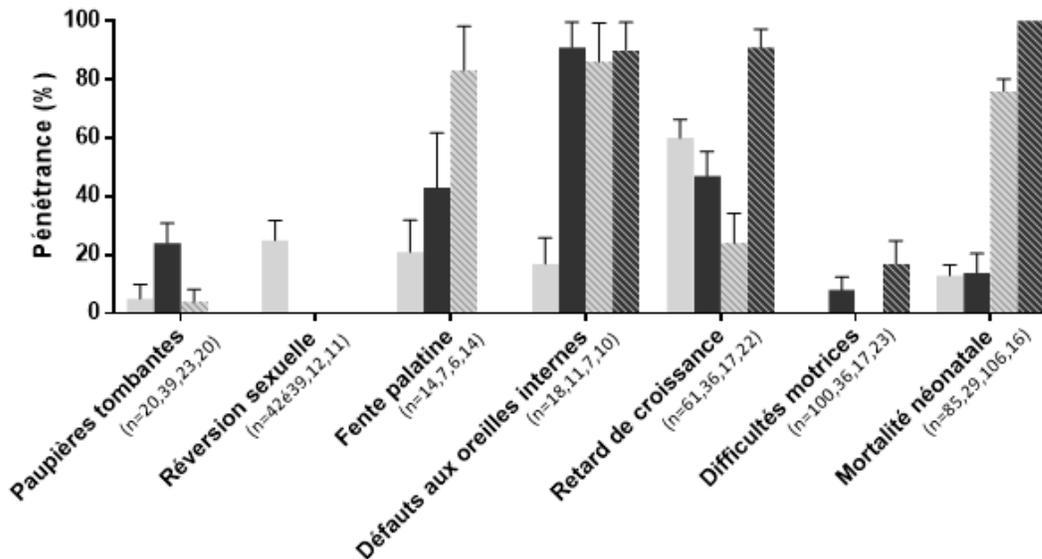


Figure 18 : Analyse comparative des anomalies observées chez *Toupee^{Tg/Tg}* et *Chd7^{Gt/+}* en fond génétique FVB et B6. TP, *Toupee^{Tg/Tg}* ; Ch, *Chd7^{Gt/+}* * $P \leq 0.05$ ** $P \leq 0.01$ *** $P \leq 0.001$ **** $P \leq 0.0001$ (test du χ^2 et test exact de Fisher).

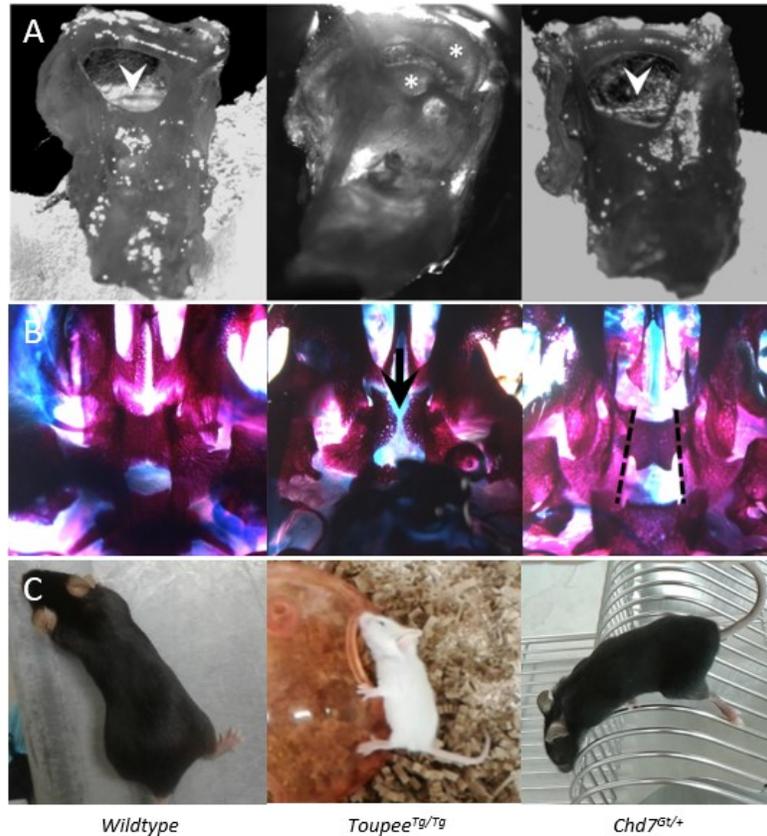


Figure 19 : Phénotypes divergents entre les modèles murins *Toupee^{Tg/Tg}* et *Chd7^{Gt/+}*. (A) Oreilles internes de souris adultes présentant des canaux gonflés (astérisque) et une absence du canal latéral (tête de flèche). Coloration à l'alizarine rouge, photographie en noir et blanc. (B) Coloration alizarine rouge-bleu d'alciyan de crânes à E18.5 montrant l'absence de l'os présphénoïde (flèche) et la fermeture incomplète du palais (pointillés) à E18.5. (C) Difficultés motrices. Locomotion sur le flanc (centre) et extension du membre postérieur gauche (droite).

Selon des tests d'ajustement, la distribution génotypique de la descendance de croisements *FVB Toupee^{Tg/+}* par *FVB Chd7^{Gt/+}* ne diffère pas de celle attendue, que ce soit à E13.5, E18.5, P0 ou en considérant la mortalité néonatale. Les résultats à P0 ainsi que la mortalité néonatale montrent d'ailleurs clairement que les ratios *FVB Toupee^{Tg/+}; Chd7^{Gt/+}* et *FVB Chd7^{Gt/+}* sont similaires et que la mortalité néonatale n'est pas accrue chez les doubles hétérozygotes (Tableau 8). Pour la mortalité, les résultats obtenus ne permettent donc pas de conclure à une interaction génétique entre *Fam172a* et *Chd7*.

Tableau 8 : Répartition génotypique de la descendance issue de croisements $FVB\text{Toupee}^{Tg/+}$ par $FVB\text{Chd7}^{Gt/+}$. Pourcentage théorique de 25% pour chaque génotype.

	Wildtype (%)	$Toupee^{Tg/+}$ (%)	$Chd7^{Gt/+}$ (%)	$Toupee^{Tg/+};Chd7^{Gt/+}$ (%)	Nombre total (n)
E13,5	19	29	19	33	21
E18,5	27	27	30	16	37
P0	19	32	26	23	47
Décès néonataux	13	13	47	27	15

En comparant un certain nombre d'anomalies, on constate que la pénétrance est très semblable pour les individus $FVB\text{Toupee}^{Tg/+};Chd7^{Gt/+}$ et $FVB\text{Chd7}^{Gt/+}$, $FVB\text{Toupee}^{Tg/+}$ étant presque toujours asymptotique. Seuls le phénotype d'*head-bobbing*, la microphthalmie, l'anophtalmie et le retard de croissance ont une pénétrance légèrement plus élevée chez les doubles hétérozygotes (Figure 20). La différence de pénétrance observée pour l'anophtalmie est d'ailleurs presque significative (P=0,065). Fait intéressant, cette anomalie est observée chez les doubles hétérozygotes alors qu'elle n'a jamais été observée chez $FVB\text{Toupee}^{Tg/+}$, $FVB\text{Chd7}^{Gt/+}$ ou $FVB\text{Toupee}^{Tg/Tg}$ dans nos colonies. L'apparition de ce nouveau phénotype en fond génétique FVB appuie l'hypothèse d'une interaction génétique entre *Chd7* et *Fam172a*.

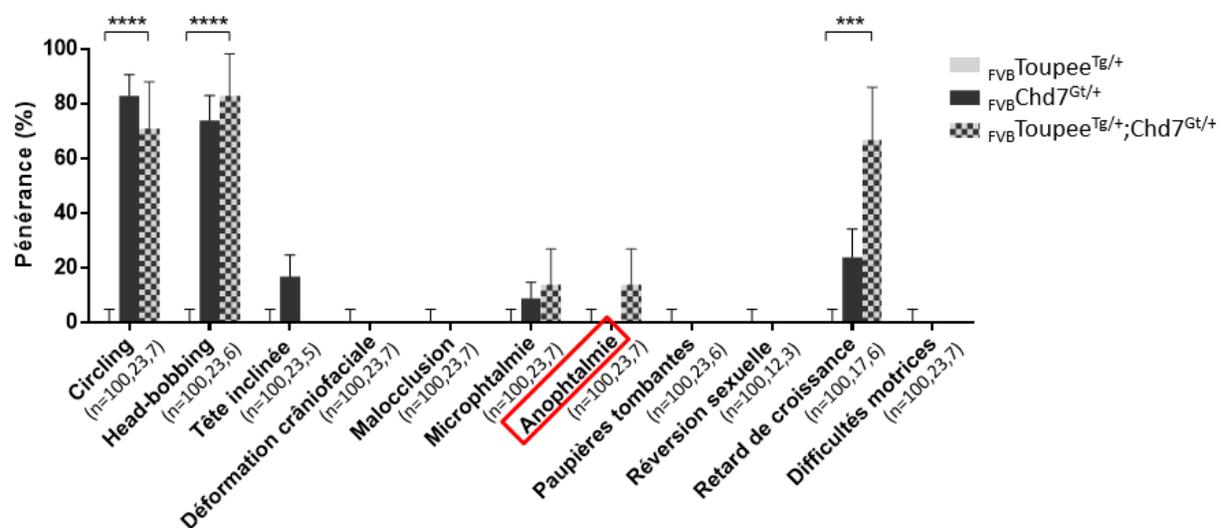


Figure 20 : Comparaison de la pénétrance de 11 anomalies entre les simples hétérozygotes $FVB\text{Chd7}^{Gt/+}$ et $FVB\text{Toupee}^{Tg/+}$ et les doubles hétérozygotes $FVB\text{Chd7}^{Gt/+};\text{Toupee}^{Tg/+}$. ***P≤0.001 ****P ≤ 0.0001 (test exact de Fisher).

3.4. Mortalité néonatale chez *Chd7^{Gt/+}*

3.4.1. Présentation générale

Pour la descendance *Chd7^{Gt/+}* de croisements *Chd7^{Gt/+}* par *Wildtype*, les individus de fond génétique mixte présentent le ratio mendélien attendu à la naissance et au sevrage (50%), indiquant la survie des individus *Chd7^{Gt/+}*. En fond génétique FVB pur, 76% des individus *FVBChd7^{Gt/+}* décèdent avant le sevrage. En fond B6, à partir de la N3, la majorité des individus *B6Chd7^{Gt/+}* décèdent avant le sevrage avec une proportion qui, globalement, augmente avec l'enrichissement en fond B6. Ainsi, 79%, 71% et 100% des individus *B6Chd7^{Gt/+}* en N3, N4 et N5 respectivement meurent avant P25. La mortalité en N5 rend impossible l'obtention de *B6Chd7^{Gt/+}* pures (Figure 21). Selon les ratios mendéliens à la naissance et les observations menées sur les portées, la mortalité survient dans les premiers 0-48h après la naissance.

3.4.2. Difficultés respiratoires

En raison d'un aspect légèrement bleuté des nouveau-nés décédés pouvant suggérer de la cyanose, les capacités respiratoires ont été testées. Les tests de respiration menés sur des portées des deux fonds génétiques n'ont pas permis de distinguer les mutants *Chd7^{Gt/+}* des *Wildtype* en termes de détresse respiratoire et/ou de mortalité, ce qui suggère que les troubles respiratoires ne seraient potentiellement pas la cause de la mortalité (Tableau 9).

3.4.3. Problèmes d'alimentation

Les nouveau-nés décédés ont tous en commun l'absence de tache de lait, pouvant indiquer des difficultés alimentaires [108]. Deux portées FVB ont pu être observées entre la naissance et la mort et présentaient à P1 un nombre d'individus blanchâtres sans tache de lait correspondant au nombre de morts *Chd7^{Gt/+}* recensés à P2, soutenant l'hypothèse des problèmes de nutrition pour *FVBChd7^{Gt/+}* (Annexes, Figure 25). Pour *B6Chd7^{Gt/+}*, les observations sont moins tranchées puisque les portées observées qui comptaient des petits sans tache de lait ne présentent pas de mortalité, une mortalité plus faible que le nombre d'individus sans tache de lait ou une mortalité plus tardive autour de l'âge du sevrage. Chez *FVBChd7^{Gt/+}*, la majorité (83%) des individus présentent une fente palatine (Figure 18), laquelle est une des causes de mortalité

identifiées chez divers mutants *Chd7*. Cette anomalie pourrait alors expliquer la cause de la mort chez *FVBChd7^{Gt/+}*. Toutefois, aucun individu *B6Chd7^{Gt/+}* n'a été identifié avec une fente palatine. La mortalité *B6Chd7^{Gt/+}* ne peut donc pas être due à la présence de fente palatine.

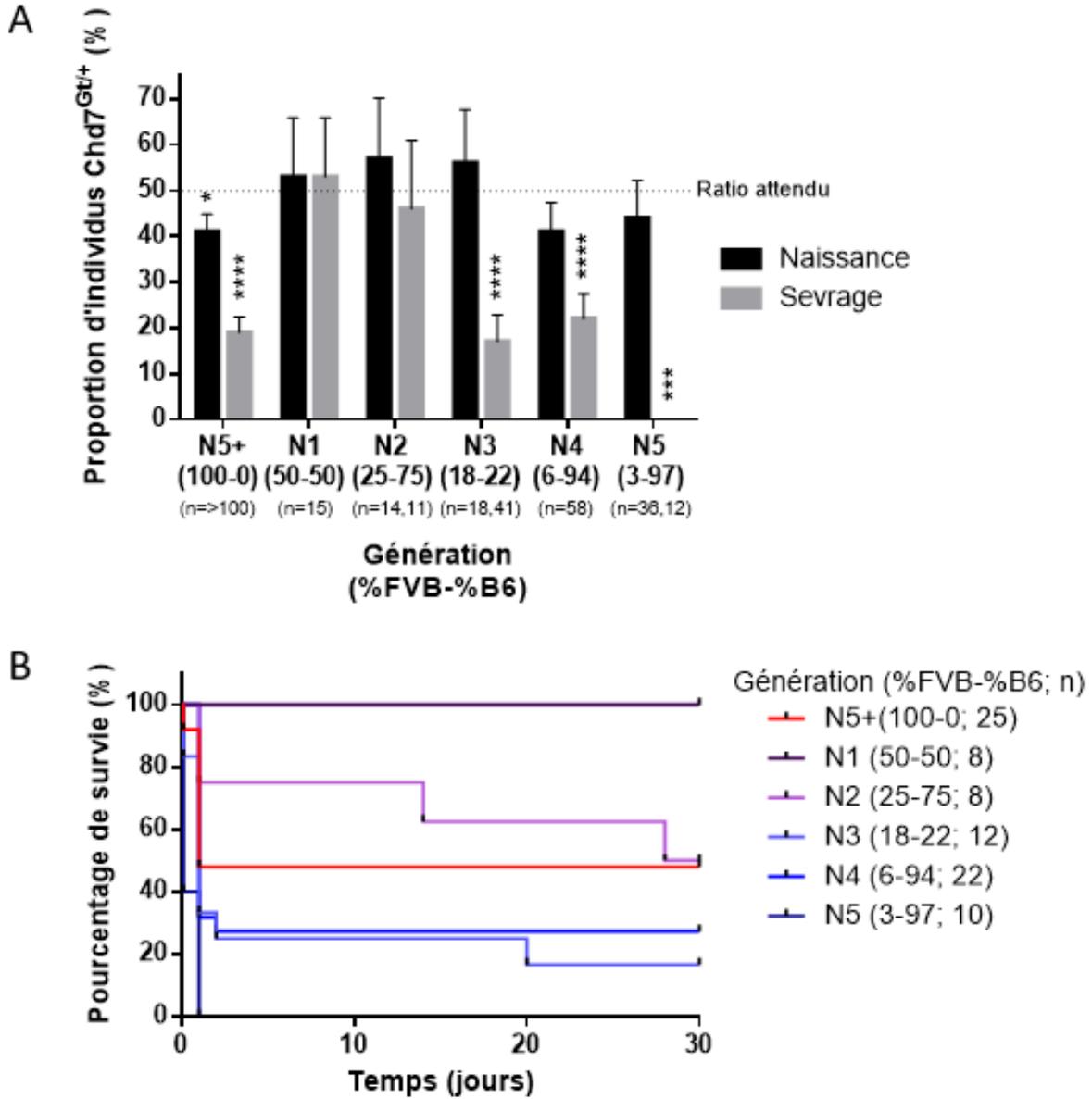


Figure 21 : Mortalité néonatale chez *Chd7^{Gt/+}*. (A) Pourcentage d'individus *Chd7^{Gt/+}* à la naissance et au sevrage et (B) courbe de survie des individus *Chd7^{Gt/+}* en fonction de la proportion en fond génétique FVB et B6. * $P \leq 0.05$ *** $P \leq 0.001$ **** $P \leq 0.0001$ (test de conformité du χ^2 , proportions théoriques de 50%)

Tableau 9 : Capacités respiratoires et coloration d'embryons E18.5 à l'issue des tests de respiration.

	Observations	Génotypes
FVB	Respiration facile - rosés	7 WT, 6 Chd7
	Halètements - bleutés	4 WT, 5 Chd7
	Décès	2 Chd7
B6	Respiration facile - rosés	2 WT, 2 Chd7
	Halètements - bleutés	1 Chd7
	Décès	2 WT

3.4.4. Défauts aux nerfs crâniens

Le nerfs crâniens V, VII, IX, X, XI et XII sont impliqués dans le processus de déglutition. Des anomalies à ces nerfs peuvent par conséquent compromettre l'alimentation [109]. Pour *FVBChd7^{Gt/+}*, la moitié des embryons marqués par immunohistochimie pour visualiser les neurofilaments montrent un prolongement du nerf facial (VII) vers le nerf glossopharyngien (IX) qui ne semble pas présent chez les contrôles. De plus, un individu avec une interruption du nerf glossopharyngien et un individu avec un embranchement du nerf facial dirigé vers la partie postérieure de l'embryon plutôt que vers le 1^{er} arc brachial ont été observés. Chez *B6Chd7^{Gt/+}*, tous les individus observés présentent une interruption unilatérale ou bilatérale du nerf glossopharyngien. La jonction distale du nerf glossopharyngien et du nerf vague (X) a également été observée. Le nerf facial montre parfois plusieurs embranchements surnuméraires ou un embranchement secondaire dont la direction est contraire à celle attendue, tel que décrit pour *FVBChd7^{Gt/+}*. Le nerf trijumeau (V) semble montrer un retard de croissance chez certains individus pour lesquels les prolongements du nerf, si présents, sont plus courts que ceux des contrôles. La majorité des individus Chez *B6Chd7^{Gt/+}* semblent en plus avoir le nerf hypoglosse (XII) moins développé que chez les contrôles (Figure 22).

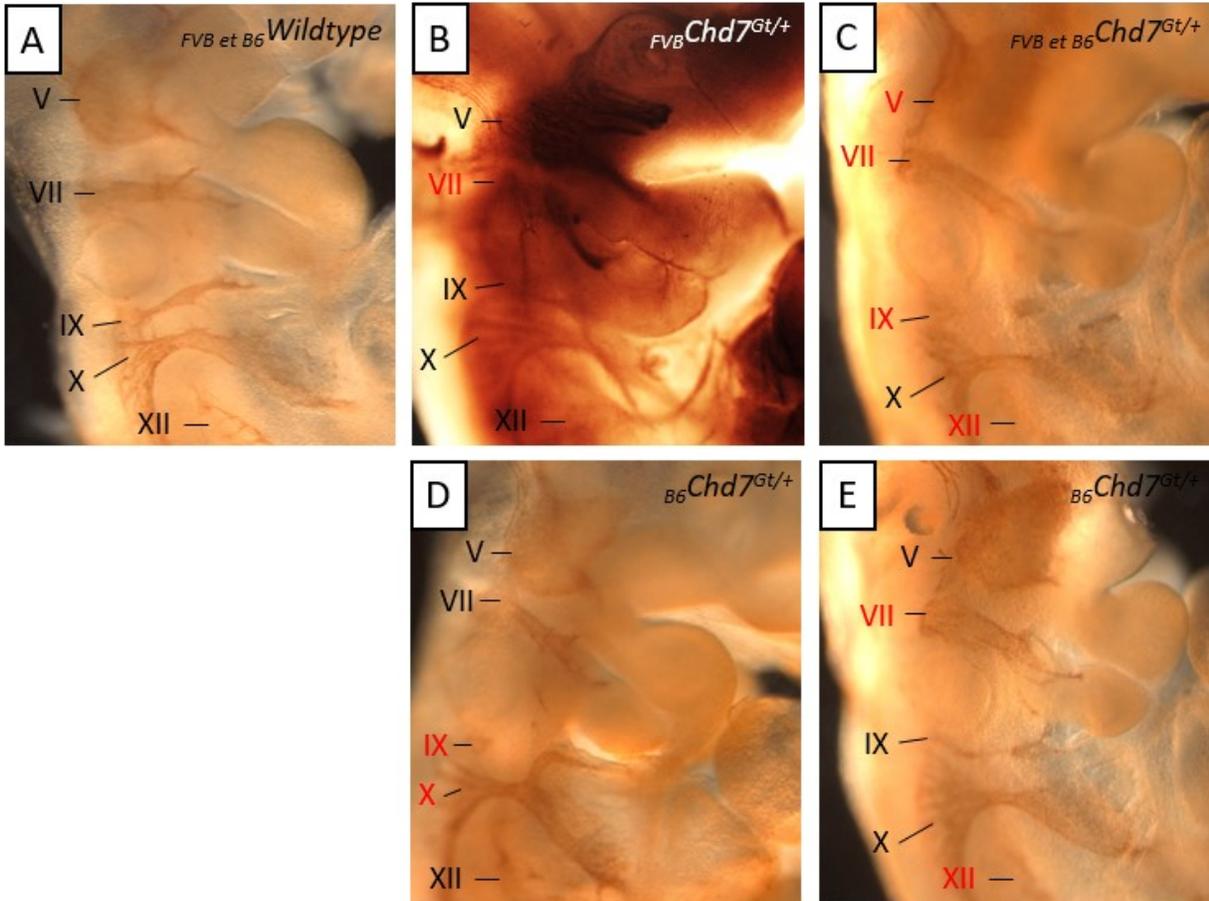


Figure 22 : Défauts aux neurofilaments chez *Chd7^{Gt/+}*. Coloration immunohistochimique des neurofilaments (2H3) sur des embryons entiers à E10.5. Embryons *Wildtype* (n=15) (A), *FVBChd7^{Gt/+}* (n=8, 4 avec défauts) et *B6Chd7^{Gt/+}* (n=5, 5 avec défauts) (B-E) présentant une jonction anormale entre le nerf facial et le nerf glossopharyngien (B), l'absence de protrusion du nerf trijumeau (C), des embranchements anormaux du nerf facial (C, E), une interruption du nerf glossopharyngien (C, D), un sous-développement du nerf hypoglosse (C, D) et/ou une jonction distale des nerfs glossopharyngien et vague (D).

4. Discussion

Le modèle *Toupee*, portant une mutation dans le gène *Fam172a*, est un modèle murin pour le syndrome CHARGE. Chez *B6Toupee*, une proportion importante des individus présente de la microphthalmie et de l'anophtalmie avec une incidence fortement accrue dans l'œil droit, contrairement aux individus *FVB**Toupee*. Le présent mémoire a permis de déterminer que ces anomalies auraient une origine vers E10.5 et qu'elles se déclinent en un éventail de cas de figure avec des degrés variables de diminution du globe oculaire et d'atteinte structurelle.

La comparaison de *Toupee*^{Tg/Tg} avec *Chd7*^{Gt/+} dans les fonds génétiques FVB et B6 a permis de déterminer que le fond génétique et le gène pathogénique peuvent influencer le développement phénotypique du syndrome CHARGE. L'obtention de doubles hétérozygotes *FVB**Toupee*^{Tg/Tg} ; *Chd7*^{Gt/+} a permis de confirmer une interaction génétique modérée entre *Chd7* et *Fam172a* et l'étude de la mortalité néonatale chez *Chd7*^{Gt/+} suggérerait que des problèmes d'alimentation pourraient être en cause.

4.1. Développement de la microphthalmie et de l'anophtalmie

4.1.1. Spécificité du modèle *B6Toupee*

On note l'apparition de microphthalmie et d'anophtalmie chez *B6Toupee*, alors qu'elles sont très rares ou inexistantes chez *FVB**Toupee* et *Chd7*^{Gt/+} (Figure 18). Sachant que les souris *B6**Wildtype* ont une sensibilité à l'égard des anomalies oculaires, on peut poser que le fond génétique B6 et la mutation de *Fam172a* engendrent chacun une sensibilité à l'égard du développement d'anomalies oculaires, mais qu'ils en déclenchent peu seuls, par exemple en raison de mécanismes compensatoires. Par contre, lorsque les deux sont réunis, en raison d'une double propension aux anomalies oculaires et d'une interaction possible entre les deux, la probabilité de développer de telles anomalies devient beaucoup plus importante. En extrapolant ces résultats chez l'humain, on pourrait poser qu'une mutation de *FAM172A* pourrait engendrer des anomalies oculaires si l'individu possède dans son génome des allèles prédisposant à ce type d'anomalies.

Pour la microphthalmie et l'anophtalmie, le modèle *Toupee* a été étudié dans le fond C57Bl/6N, lequel porte la mutation *Rd8* dans le gène *Crb1* [99]. Puisque cette mutation mène à l'apparition de dysplasie rétinienne, il n'est pas recommandé d'utiliser cette souche de souris pour étudier des anomalies oculaires [110]. Par contre, dans une étude visant à déterminer l'impact de la mutation *Rd8*, la microphthalmie et la dyscorie/corectopie n'ont été identifiées que chez 1-2% des souris et ont donc été jugées sporadiques et non inculpables aux lésions spécifiques C57Bl/6N/*Rd8* [111]. De plus, l'interférence de la mutation *Rd8* avec les études oculaires résulte en l'observation de défauts chez les souris mutantes et chez les souris contrôles [110]. Chez *B6Toupee*, la pénétrance de la microphthalmie et de l'anophtalmie est nettement supérieure chez les souris mutantes (Figure 12). Ainsi, pour les études effectuées jusqu'à présent, le fond génétique C57Bl/6N, bien que non idéal, ne semble pas un obstacle majeur, surtout si une attention particulière est portée aux caractéristiques des souris *Wildtype* pour identifier les éléments spécifiques uniquement à *Toupee*^{Tg/+} et *Toupee*^{Tg/Tg}. Toutefois, il serait envisageable de transférer ultérieurement la mutation *Toupee* dans le fond génétique C57Bl/6J pour corriger la situation, surtout si des analyses plus poussées de la rétine sont menées.

4.1.2. Biais droit et biais femelle

Les anomalies oculaires chez les souris *B6Wildtype* affectent 5,8 fois plus souvent l'œil droit et 6,2 fois plus souvent les femelles [98]. Chez *B6Toupee*, la microphthalmie et l'anophtalmie sont 13 fois plus importantes dans l'œil droit, mais ne présentent pas de biais femelle (Figure 13, Annexes, Tableau 11). Pour expliquer l'aggravation du biais droit et l'absence du biais femelle, on pourrait évoquer que l'interaction de *Fam172a* avec les éléments responsables des biais droit et femelle est différente. On pourrait également supposer que la sensibilité aux anomalies oculaires chez *B6Toupee* est suffisamment importante pour surpasser le biais femelle et affecter les individus des deux sexes.

La raison du biais droit demeure inconnue, mais l'hypothèse avancée par la littérature impliquerait une différence environnementale entre les deux yeux en développement [112]. Un mécanisme aussi précoce et global que le flux nodal généré dans le nœud ventral, ou toute asymétrie gauche-droite systémique des niveaux d'expression (ex : *Lefty2*, *Pitx2*) résultant de cet événement ne semble pas impliqué puisque le biais droit n'est pas généralisé (Figure 13)

[113]. Par conséquent, un facteur d'asymétrie plus spécifique oculaire ou crâniofacial serait plus cohérent. L'identification chez le planaire (*Dugesia japonica*), considéré comme un organisme symétrique, d'anomalies oculaires avec un biais droit du à l'inhibition de l'activité H⁺/K⁺-ATPase suggère une asymétrie fonctionnelle de cette pompe à ions. Cela laisse présager que les yeux possèdent une information sur leur positionnement gauche-droite et fourni une piste d'exploration pour identifier des causes du biais oculaire droit chez la souris, d'autant plus que la pompe H⁺/K⁺-ATPase serait impliquée dans la mise en place de l'asymétrie chez un certain nombre d'espèces (*Hemicentrotus pulcherrimus*, *Ciona intestinalis* et *Xenopus*) [114].

Pour la déformation crâniofaciale, malgré un faible nombre d'observations, le même biais droit semble se dessiner. De plus, la présence d'anomalies oculaires dans l'œil droit combinée à de la déformation crâniofaciale vers la droite pourrait laisser croire à une influence développementale de l'une des anomalies sur l'autre. Il ne serait donc pas étonnant que chez *B6Toupee* le biais droit s'étende à la déformation crâniofaciale. Le recensement de cette anomalie pourrait être poursuivi afin de répondre à cette question.

4.1.3. Pistes développementales

Selon les analyses effectuées, divers cas de figure sont observés pour la microphthalmie (microphthalmie apparente et microphthalmie réelle) et l'anophtalmie (microphthalmie sévère et microphthalmie extrême). Selon les observations menées à P0, il est proposé que la microphthalmie apparente provient de nouveau-nés aux yeux sains, la microphthalmie réelle et la microphthalmie sévère de nouveau-nés avec de la microphthalmie et la microphthalmie extrême de nouveau-nés avec apparence d'anophtalmie (Figure 14). Toutefois, ces relations ne sont pas confirmées et des observations comparant les phénotypes à la naissance et les résultats des dissections pourraient les valider.

Pour la microphthalmie apparente, l'énophtalmie et/ou une ouverture réduite de la fente palpébrale ont été envisagées pour expliquer le phénotype. La fente palpébrale étroite pourrait maintenir physiquement l'œil enfoncé dans l'orbite ou, comme le ptosis, être la conséquence de l'énophtalmie [115]. L'énophtalmie pourrait être confirmée à l'aide de la résonance magnétique ou de la tomодensitométrie, mais cela nécessite un appareillage particulier [116,

117]. Comme cette anomalie peut être combinée au ptosis, les souris souffrant de ptosis-like pourraient également être investiguées pour l'énophtalmie [115].

Pour la microphthalmie réelle, les coupes histologiques présentent des structures globalement réduites, mais où la rétine, le cristallin ou la chambre antérieure présentent parfois une réduction légèrement plus importante (Figure 14). On pourrait alors poser un mécanisme influençant le développement global de l'œil pour la microphthalmie, mais combiné à une certaine atteinte aux gènes responsables du développement spécifique des structures nommées ci-haut. La microphthalmie réelle est observable dès E11.5. Des coupes histologiques supplémentaires sont nécessaires, mais à priori, les vésicules et cupules optiques présentent un aspect normal à E9.5 et E10.5. On pourrait alors poser que l'origine vraisemblable de la microphthalmie serait vers E10.5-E11.0. Comme l'organisation du globe oculaire est conservée, mais que les structures sont réduites, on peut envisager un défaut de prolifération cellulaire ou de survie, un problème de différenciation des progéniteurs, un problème de motilité engendrant la présence d'un nombre insuffisant de CCN dans la région oculaire, des niveaux de signalisation ou une réponse cellulaire trop faibles pour induire la pleine croissance des structures, etc.

Pour l'anophtalmie engendrée par de la microphthalmie sévère, le phénotype apparent est du à l'absence d'ouverture palpébrale. Il peut être envisagé que l'absence d'ouverture palpébrale inhibe physiquement la croissance du globe oculaire, en bloquant sa progression hors de l'orbite, ou moléculairement, via la signalisation entre la paupière et le globe oculaire en développement. À l'inverse, un œil trop petit ne permet pas de soutenir les paupières, ce qui favorise la proximité entre les deux paupières et leur apposition.

Pour la microphthalmie extrême, l'absence apparente d'œil à E15.5 et P0 serait due à la taille extrêmement réduite des résidus oculaires. Cette taille extrêmement réduite ainsi que la perte complète de structure suggèrent une origine précoce et/ou une perturbation majeure. Toutefois, comme l'anophtalmie réelle est vraisemblablement inexistante et que l'anophtalmie apparente n'est pas visible avant E15.5, l'absence de spécification du champ optique ou l'absence de formation de la vésicule optique ne sont pas considérées. Sachant qu'à E12.5 on observe de la microphthalmie plus et moins prononcée (Annexes, Figure 24), l'hypothèse envisagée serait donc que l'œil se développe avec de la microphthalmie, puis que dans certains

cas l'atteinte devient trop importante et/ou que des erreurs de *patterning* du MPO sur la cupule optique sont engendrées en raison de la rotation de la cupule optique, le tout résultant en une perte de structure menant à l'effondrement de la cupule optique et à une possible résorption partielle. Les processus cellulaires alors en jeu pourraient être différents ou plus prononcés que ceux discutés ci-haut pour la microphthalmie réelle de façon à engendrer une perturbation plus profonde de la structure oculaire (ex : erreurs importantes de signalisation, de réponse cellulaire ou de morphogénèse, apoptose massive, etc).

La réduction de la fente palpébrale dans la microphthalmie apparente, l'absence d'ouverture palpébrale malgré la présence d'un globe d'une certaine taille dans la microphthalmie sévère, et les paupières semi-fermées (ptosis-like) chez *B6Toupee* suggèrent que les paupières seraient une composante non négligeable du portrait des anomalies oculaires chez *B6Toupee*. La distinction de quatre sous-types de microphthalmies/anopthalmies met clairement en évidence la variabilité des anomalies oculaires chez *B6Toupee*, ce qui s'inscrit dans le même ordre d'idée que la variabilité phénotypique globale du syndrome CHARGE.

4.1.4. Pistes géniques

Afin d'identifier des pistes préliminaires de gènes dérégulés en présence d'une mutation de *Fam172a*, le transcriptome des CCN à E10.5 *FVBWT;G4-RFP* vs *FVBToupee^{Tg/Tg};G4-RFP* a été utilisé. Toutefois, ce transcriptome tient compte uniquement des CCN alors que l'expression de *Fam172a* et le développement oculaire ne sont pas restreints à ce type cellulaire. À l'opposé, ce transcriptome a été effectué à partir d'un embryon entier et n'est pas restreint à l'œil. De plus, ce transcriptome a été réalisé à partir d'embryons FVB alors que la microphthalmie et l'anopthalmie sont plutôt observables chez les individus B6. Finalement, sachant que le développement oculaire débute dès E8.5-E9.0 et se poursuit jusqu'après la naissance, ce transcriptome n'était à priori pas optimal. Toutefois, comme les CCN contribuent tout de même directement à certaines structures oculaires, qu'elles participent au *patterning* de la cupule optique, que des étapes importantes du développement oculaire occurrent à E10.5 et que l'origine suspectée de la microphthalmie est à E10.5-E11.0, alors ce transcriptome peut tout de même révéler certaines pistes intéressantes [3, 65, 66].

Pour la dérégulation de l'épissage, aucun gène du développement oculaire ou connu pour être impliqué dans la microphthalmie ou l'anophtalmie n'a été identifié (Tableau 7). Ces observations semblent donc dans l'état actuel concorder difficilement avec l'hypothèse impliquant *Fam172a* dans l'épissage alternatif co-transcriptionnel, ce qui pourrait laisser présager un autre mécanisme d'action de *Fam172a*. Il faut cependant prendre en considération que la liste des gènes recherchés (Annexes, Tableau 10) n'est pas exhaustive notamment parce que l'entière des gènes impliqués dans la microphthalmie et dans l'anophtalmie, et donc dans le développement oculaire, n'est pas connue [96]. De plus, avec un transcriptome plus pertinent ciblé sur la région oculaire, les résultats seront probablement différents et pourraient permettre l'identification de gènes du développement oculaire dont l'épissage est dérégulé. On ne peut donc pas conclure que la dérégulation de l'épissage alternatif n'est pas impliquée dans l'apparition des anomalies oculaires chez *B6Toupee* sur la base de cette seule analyse [96].

Parmi les gènes dont les niveaux d'expression sont dérégulés, seront discutés ceux connus pour causer la microphthalmie ou l'anophtalmie, soit *Bmp7*, *Lhx2*, *Mitf*, *Sox2* et *Stra6* (Tableau 7). *Lhx2* est impliqué entre autres dans la spécification du champ optique. Un défaut aussi précoce ne serait pas cohérent avec les observations ci-haut. *Bmp7* participe à la formation de la fissure choroïdienne et régule directement *Pax6*, notamment lors de l'induction de la placode cristallinienne [118, 119]. L'absence de formation de la fissure choroïdienne corrèle difficilement avec le colobome oculaire. Il y a également absence apparente de dérégulation de *Pax6*. *Bmp7* semble donc également moins pertinent pour expliquer les anomalies oculaires chez *B6Toupee*. Par contre, *Mitf* et *Sox2* semblent être des pistes plus prometteuses. *Mitf* peut engendrer de la microphthalmie via la malformation de la fissure choroïdienne, ce qui entraîne un écoulement du fluide vitreux et inhibe ainsi la croissance de la cupule optique [120]. On peut d'ailleurs observer pour les embryons avec microphthalmie à E12.5 une ouverture plus marquée de la fissure choroïdienne, ce qui soutiendrait ce mécanisme (Annexes, Figure 24). Cependant, *Mitf* est également un régulateur majeur du développement des mélanocytes [121]. Par conséquent, la dérégulation de *Mitf* pourrait être liée à la perte de pigmentation chez *Toupee*^{Tg/Tg} en plus/plutôt qu'aux anomalies oculaires. *Sox2*, pour sa part, régule un ensemble de procédés développementaux dont le développement oculaire (ex : activation de *Rax*, développement de l'EPR, détermination de la rétine neurale, etc) [40, 122]. C'est d'ailleurs le gène le plus

fréquemment impliqué dans les cas de microphthalmie/anophtalmie chez l'humain [95]. Une mutation de *Sox2* peut également causer des retards mentaux et de croissance, des anomalies génitales (micropénis et cryptorchidie) et des fistules eosophagiennes, ce qui en fait, ajouté à l'interaction connue entre SOX2 et CHD7, une piste intéressante pour expliquer les anomalies oculaires chez *B6Toupee*, mais également d'autres anomalies associées au syndrome CHARGE [40]. Finalement, *Stra6* permet l'assimilation de la vitamine A, essentielle au développement et à la croissance du globe oculaire [106]. Sa transcription est augmentée en présence d'acide rétinoïque, qui est un dérivé de la vitamine A. Si les effets de mutations de *Stra6* sont moins prononcés chez la souris que chez l'humain, ce gène pourrait possiblement contribuer à l'aggravation des phénotypes oculaires et la baisse de ses niveaux d'expression pourrait potentiellement accentuer l'impact de l'environnement sur le développement des anomalies oculaires [123].

Parmi les autres gènes dont les niveaux d'expression sont dérégulés, notons la présence de nombreux gènes requis pour la spécification et la différenciation des cellules de Muller, *Hes5*, *Notch1*, *Sox2*, *Sox8* et *Sox9* [69]. En coupes histologiques, seul l'aspect global a été étudié, mais au regard de ces informations, il pourrait être intéressant d'effectuer un marquage spécifique sur les cellules de Muller afin de déterminer si cette population cellulaire est significativement diminuée chez *Toupee^{Tg/Tg}*.

4.1.5. Contribution des CCN

Parmi les anomalies oculaires engendrées par des défauts aux CCN, il est principalement mention de dysgénésie du segment antérieur, de glaucome ou de colobome, mais pas de microphthalmie ou d'anophtalmie [3]. Cela s'explique par la grande contribution des CCN aux structures antérieures de l'œil. Toutefois, la microphthalmie et l'anophtalmie ne se limitent pas aux seules structures antérieures. Bien que les CCN contribuent également au développement postérieur de l'œil via la signalisation par le MPO, ces observations, l'apport de cellules non CN au globe oculaire ainsi que l'expression de *Fam172a* dans des cellules non CN laissent croire que les anomalies oculaires observées chez *B6Toupee* auraient vraisemblablement une origine non exclusivement CN. Toutefois, comme l'interaction du MPO avec l'épithélium de surface permet le bon développement des paupières et que ces dernières semblent jouer un rôle dans les

anomalies oculaires chez *B6Toupee*, on peut envisager une implication des CCN à ce niveau. De plus, comme il y a un apport des CCN au réseau vasculaire de l'œil et que la persistance de la vasculature hyaloïde, communément unilatérale, peut entraîner de la microphthalmie et du colobome, on peut suspecter une influence CN à ce niveau également [3, 124]. Afin de confirmer ou d'infirmer un rôle du réseau vasculaire fœtal dans le développement des anomalies oculaires chez *B6Toupee*, des marquages rétiniens avec ColIV ou CD31 pourraient être réalisés [125].

Dans un autre ordre d'idée, la malocclusion observée chez les individus *B6Toupee*^{Tg/Tg}, *FVB**Toupee*^{Tg/Tg} et *B6Chd7*^{Gt/+} est une caractéristique qui n'a pas été associée avec le syndrome CHARGE. Toutefois, les CCN forment le mésenchyme de la tête, duquel se développe le squelette crâniofacial, et contribuent spécifiquement à la dentine des dents [126, 127]. La malocclusion est donc d'origine CN et est d'ailleurs retrouvée dans certaines neurocristopathies apparentées au syndrome CHARGE, tel le syndrome de Kabuki [128]. La présentation par un modèle murin du syndrome CHARGE d'une anomalie associée au syndrome de Kabuki renforce l'idée d'une connexion entre ces deux syndromes.

4.1.6. Perspectives futures

Afin de mieux définir le rôle de *Fam172a* dans l'œil, il serait pertinent dans un premier temps d'y déterminer le patron d'expression exact de *Fam172a*, suspecté presque ubiquitaire. Cela pourra être effectué avec des marquages immunofluorescents contre FAM172A (ou contre la GFP avec le modèle *Fam172a*^{GFP}) sur des coupes histologiques de l'œil à certaines étapes clés du développement (ex : E9.5, E10.5, E11.5, E13.5).

Certaines pistes géniques ont été identifiées via le transcriptome *FVB**WT*;*G4-RFP* vs *FVB**Toupee*^{Tg/Tg};*G4-RFP* des CCN à E10.5, mais ce transcriptome n'est pas optimal, d'où la nécessité de réaliser une étude transcriptomique mieux ciblée. Pour ce faire, les patrons d'expression de FAM172A pourront être analysés conjointement aux coupes histologiques (Figure 14, Figure 15) afin d'identifier les stades qui semblent les plus pertinents pour une analyse transcriptomique. Si l'expression de FAM172A est ubiquitaire à tous les stades, au regard des analyses histologiques, le stade sélectionné serait aux alentours de E10.5-E11.0, soit juste avant l'apparition de la microphthalmie. Pour le(s) stade(s) sélectionné(s), si la taille des embryons le permet, le MPO et la cupule optique d'embryons *B6Wildtype* et *B6Toupee*^{Tg/Tg}

pourront être prélevés et le transcriptome séquencé. Les gènes dont les niveaux d'expression ou dont l'épissage est dérégulé pourront faire l'objet d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) afin de déterminer si FAM172A lie les promoteurs, les régions régulatrices ou les sites d'épissage de ces gènes. L'analyse conjointe d'un transcriptome *FVB Toupee^{Tg/Tg}* pourrait également être envisagée afin de fournir une piste supplémentaire pour identifier les gènes dont la dérégulation serait à l'origine de la microphthalmie et de l'anophtalmie chez *B6 Toupee^{Tg/Tg}*, sur la base que la dérégulation serait moins importante chez *FVB Toupee^{Tg/Tg}*. Par contre, il n'est pas exclu que la divergence de phénotype oculaire entre les deux fonds soit due à d'autres facteurs (ex : interactions, éléments régulateurs, épigénétique, etc).

Étant donné le potentiel de *Sox2* et *Mitf* pour expliquer les anomalies oculaires observées, si un nouveau transcriptome tarde à être obtenu, leur niveau d'expression pourrait être étudié via RT-qPCR afin de confirmer ou d'infirmer une dérégulation chez *B6 Toupee^{Tg/Tg}*. De plus, étant donné l'impact positif du traitement à la rapamycine qui permet de réduire d'environ 50% la pénétrance du colobome chez *FVB Toupee^{Tg/Tg}*, il pourrait être intéressant de tester cet agent chez *B6 Toupee* afin de déterminer si le potentiel thérapeutique peut s'étendre à la microphthalmie et à l'anophtalmie. Étant donné que certains effets nocifs ont été observés chez les embryons traités, optimiser le traitement lors de la nouvelle étude serait également pertinent dans une perspective d'utilisation thérapeutique future [27].

Éventuellement, les stades du développement oculaire où l'expression de FAM172A est critique pourraient être investigués en utilisant le système Cre-Lox, avec une Cre inducible au tamoxifène (ex : Rosa26 CreER(T2)) et un modèle murin pour *Fam172a* flanqué de sites loxP (*Fam172a^{Flox/Flox}*), lequel devrait être créé [129]. Le même modèle *Fam172a^{Flox/Flox}* pourrait conjointement être utilisé pour déterminer les tissus où l'expression de *Fam172a* est requise avec des Cre tissus spécifiques, tels que *Le-Cre* (ectoderme de surface) et *Rx-Cre* (ectoderme neural) [41]. Ces exemples sont basés sur les expériences menées pour identifier le rôle de *Chd7* dans le développement oculaire et peuvent donc servir de base. Cependant, des Cre spécifiques à d'autres tissus pourraient être sélectionnées, comme *Lhx2-Cre* (marges ciliaires de la cupule optique) ou *Vmd3-Cre* (RPE) selon les sites d'expressions de *Fam172a* qui seront identifiés par immunomarquages [130, 131]. Les organoïdes auraient aussi pu présenter une piste intéressante pour des expériences visant à comprendre le rôle de *Fam172a* dans l'œil, mais cette technologie

se limite actuellement à des organoïdes rétiniens et semble donc trop restrictive compte tenu des anomalies étudiées.

4.2. Développement phénotypique du syndrome CHARGE

4.2.1. Influence du fond génétique

La comparaison des modèles *Toupee*^{Tg/Tg} et *Chd7*^{Gt/+} dans deux fonds génétiques différents, FVB et B6, a permis de démontrer l'influence du fond génétique sur le développement phénotypique du syndrome CHARGE puisque 14 anomalies présentent des différences majeures de pénétrance selon le fond génétique (Figure 18). De plus, le modèle *Toupee* présente des patrons de pigmentation différents selon le fond génétique, impliquant un impact différent sur les mélanocytes ou sur leurs précurseurs (Figure 17). Ces observations sont cohérentes avec de précédentes études ayant observé ou suspecté un effet du fond génétique sur la pénétrance de certaines anomalies chez des mutants *Chd7*. Par exemple, les mutants *Wheels* démontrent un effet significatif du fond génétique sur les comportements de *circling* et de *head-bobbing*, lesquels varient de 25% dans un fond mixte à 100% dans un fond B6 [132]. Ces éléments sont également cohérents avec l'influence avérée du fond génétique dans le développement d'autres neurocristopathies, telle la maladie de Hirschsprung, chez la souris et chez l'humain (chez l'humain, le fond génétique désignant ici l'ensemble des variants génétiques présentés par un individu) [133, 134].

Pour expliquer les différences induites par le fond génétique chez la souris, des variants génétiques, appelés modificateurs, peuvent influencer le développement des anomalies. L'influence phénotypique d'un fond génétique sur une anomalie peut être due à un ou plusieurs de ces modificateurs ainsi qu'à une interaction complexe entre ces modificateurs, qui peut elle-même être modulée par l'environnement ou par d'autres facteurs génétiques [135]. En raison de ces modificateurs, certaines étapes de régulation pourraient être différentes, faire intervenir des protéines légèrement différentes, générer des interactions différentes, engendrer des niveaux variables de transcrits et de protéines, etc. Les différents fonds génétiques murins présentent des marques épigénétiques différentes et des degrés différents de condensation de la chromatine [136]. Sachant l'influence de l'épigénétique sur les CCN et les neurocristopathies, il est possible

de se questionner à savoir si ces variabilités épigénétiques et de condensation de la chromatine peuvent expliquer en partie l'influence du fond génétique. Le même questionnement pourrait s'appliquer entre individus d'une même colonie, à savoir si les quelques centaines de sites épigénétiques divergents entre individus d'une même lignée pourraient moduler l'apparition des anomalies et engendrer des différences phénotypiques malgré un génome identique [137].

Comme il est connu que le fond génétique influe sur l'apparition de certains phénotypes chez la souris, cet élément en soi n'est pas une nouveauté, bien que maintenant confirmé pour les modèles du syndrome CHARGE [132-134]. Par contre, en observant les anomalies qui sont favorisées selon le fond génétique dans la présente étude, cela pourrait permettre d'identifier d'autres sensibilités des fonds génétiques à l'image de la prédisposition du fond génétique B6 pour les anomalies oculaires [97]. Cette propension est d'ailleurs appuyée par la présence d'anomalies oculaires aggravées (microphthalmie et anophthalmie) en plus grande proportion en fond B6 au détriment d'anomalies oculaires de moindre gravité (colobome). Ainsi, les résultats obtenus à la [Figure 18](#) pourraient suggérer une propension du fond génétique B6 pour développer des anomalies dentaires ou aux oreilles internes, des problèmes moteurs ou de la mortalité précoce alors que le fond FVB pourrait prédisposer à des anomalies comportementales, cognitives ou autre favorisant le *circling*. Ces informations pourraient influencer le choix du fond génétique pour des études ultérieures portant sur ces catégories d'anomalies.

Identifier l'influence du fond génétique est pertinent pour expliquer une partie de l'importante variabilité du syndrome CHARGE chez l'humain puisque ceux-ci possèdent de très nombreux variants distribués sur l'ensemble du génome. Sachant cela, il pourrait être intéressant de regarder si les phénotypes CHARGE présentent certaines tendances selon l'origine ethnique des patients, ces tendances pouvant toutefois également alors traduire un effet de l'environnement. À plus petite échelle, le fond génétique pourrait expliquer la variabilité phénotypique entre parents et enfants CHARGE portant la même mutation pathogénique puisque 50% du génome de l'enfant peut comporter des variants différents dus à la contribution génétique du second parent.

4.2.2. Influence du gène muté

La présente étude a permis de mettre clairement en évidence l'influence du gène muté sur le développement phénotypique du syndrome CHARGE puisque trois anomalies, la fente palatine, les défauts aux oreilles internes et les difficultés motrices se présentent de façon différente entre les modèles *Toupee*^{Tg/Tg} et *Chd7*^{Gt/+} (Figure 19). S'ajoutent à ces différences une pénétrance variable pour la majorité des anomalies, une influence du fond génétique sur des anomalies différentes entre les deux modèles et la présence des anomalies chez les homozygotes pour *Toupee*^{Tg/Tg} et chez les hétérozygotes pour *Chd7*^{Gt/+} (Figure 18). Chez l'humain, la pénétrance des anomalies est différente entre les patients *CHD7* positifs et *CHD7* négatifs, ce qui valide ces observations [22].

Par contre, notons que la présence des défauts chez les homozygotes *Toupee*^{Tg/Tg} et non chez les hétérozygotes, comme pour *Chd7*^{Gt/+}, pourrait s'expliquer entre autres par une expression résiduelle de *FAM172A* (15%) en raison d'un allèle hypomorphique ou par une redondance génétique pour *Fam172a* ou pour les gènes impliqués dans les mêmes voies moléculaires [27]. La récente création via CRISPR de souris *knock-out* pour *Fam172a* devrait permettre d'éliminer l'expression résiduelle de *FAM172A*. Il pourra d'ailleurs être intéressant d'observer si pour ce modèle les hétérozygotes sont plus fortement affectés et si la microphthalmie et l'anophtalmie sont présentes en fond génétique FVB également.

On peut constater pour certaines anomalies qu'un des deux fonds génétiques favorise une plus forte pénétrance, peu importe le modèle (ex : anophtalmie). Il en est de même pour le modèle, qui favorise systématiquement le développement de certaines anomalies peu importe le fond génétique (ex : mortalité néonatale). D'autres cas semblent montrer une interaction entre le fond génétique et le gène muté où l'effet combiné est plus important que l'effet additionné de chacun (ex : malocclusion). Finalement, pour quelques anomalies, ce sont les souris B6 d'un modèle qui sont le plus affectées alors que pour l'autre modèle ce sont les souris FVB qui sont le plus affectées (ex : fente palatine). Pour expliquer la diversité des scénarios, on peut poser que les interactions entre *Fam172a* ou *Chd7* et les modificateurs sont différentes et qu'elles produisent des effets par conséquent variables, de telle sorte que la combinaison de la mutation d'un certain gène avec un modificateur donné engendre un certain événement, qui est accentué, diminué ou inversé en présence d'un autre modificateur.

4.2.3. Intégration et perspectives futures

Comme une influence du fond génétique et du gène muté est visible, mais que la corrélation avec les anomalies n'est pas de 100%, il semblerait juste de dire que le fond génétique et le gène en cause prédisposent à certaines anomalies sans qu'elles en soient inhérentes. Cela pourrait d'ailleurs expliquer pourquoi les études menées chez l'humain n'ont pas réussi à relier certains types de mutations ou certains allèles avec des phénotypes précis.

La variabilité phénotypique entre individus murins génétiquement identiques recensée pour les modèles *Chd7^{Gt/+}*, *Toupee^{Tg/Tg}* (Figure 18), *Wheels* et autres de même que la variabilité phénotypique entre jumeaux/jumelles atteint(e)s du syndrome CHARGE suggèrent que des facteurs autres que la séquence ADN pourraient être impliqués [26]. Un effet de dosage et/ou de temporalité pourrait être en jeu. Considérant que *Fam172a* régule les niveaux d'expression et l'épissage de certains gènes, si le niveau d'expression d'un de ces gènes ou d'un isoforme est légèrement plus haut ou plus bas qu'un seuil critique en raison d'un bruit de fond variable entre individus (stochastique), cela peut engendrer l'apparition ou non d'une anomalie. Si l'influence est dose-dépendante, alors une modification des niveaux d'expression peut engendrer un phénotype plus ou moins sévère. Si le déséquilibre génique apparaît plus ou moins tôt dans le développement, cela pourrait également influencer le développement de l'anomalie. Par exemple, un désordre tôt dans le développement oculaire peut engendrer de l'anophtalmie, mais s'il survient plus tardivement alors ce phénotype n'est pas observé. Les niveaux géniques murins au sein d'une même lignée peuvent également varier d'un individu à l'autre en raison d'un nombre variable de copies d'ADN, élément inhérent malgré des croisements minutieux [138].

Des facteurs environnementaux pourraient potentiellement affecter le développement des anomalies CHARGE, notamment sachant l'influence avérée de l'environnement dans le développement des neurocristopathies [9-12]. Par contre, chez les lignées murines, l'environnement est relativement semblable pour l'ensemble de la colonie. Pourtant, des variations phénotypiques sont observées entre individus d'une même portée hébergés dans une même cage. L'impact de l'environnement est donc plausible chez l'humain mais moins plausible pour expliquer la variabilité murine. Toutefois, afin d'obtenir une vue d'ensemble des causes possibles de variabilité phénotypiques du syndrome CHARGE, il pourrait être intéressant de tester ce facteur. Cela pourrait être réalisé en administrant à des femelles gestantes *B6Toupee*

des doses d'éthanol et d'acide rétinoïque (deux agents connus pour influencer le développement oculaire) afin d'observer si la descendance *B6Toupee^{Tg/Tg}* est plus fortement affectée que les contrôles [11, 12].

Le syndrome CHARGE présente des similarités avec d'autres syndromes pour lesquels plusieurs anomalies sont identiques. *CHD7* et de nouveaux gènes identifiés dans le syndrome CHARGE, *EFTUD2*, *KMT2D* et *KDM6A*, se retrouvent également mutés chez certains patients atteints de ces syndromes, comme le syndrome de Kallman, de délétion 22q11, ou le syndrome de Kabuki [22, 31]. Ces maladies auraient également un mécanisme moléculaire similaire impliquant la dérégulation de l'épissage alternatif co-transcriptionnel [31]. En parallèle, les souris *B6Toupee^{Tg/+}* symptomatiques ne présentent que des anomalies oculaires et s'inscriraient alors plutôt comme un modèle pour le spectre MAC plutôt que pour le syndrome CHARGE. Sachant que le fond génétique ainsi que des facteurs indéterminés influencent le développement phénotypique du syndrome CHARGE, ces éléments renforcent un questionnement récemment soulevé dans la littérature, à savoir si plusieurs de ces conditions apparentées n'auraient pas en fait une origine et un mécanisme commun dus au dérèglement des CCN, et pourraient alors être regroupées en une seule maladie [31]. Au regard de la présente étude, les diverses combinaisons d'anomalies développées à partir de ce même mécanisme et s'assimilant à des syndromes différents pourraient s'expliquer entre autres par l'impact du fond génétique des patients et par l'influence de facteurs non génétiques.

4.3. Interaction génétique *Chd7-Fam172*

L'apparition d'anophtalmie dans un petit nombre d'individus *FVB^{Toupee^{Tg/+};}**Chd7^{Gt/+}* alors que ce phénotype n'avait encore jamais été observé chez *Toupee* ou *Chd7^{Gt/+}* dans le fond génétique FVB appuie l'interaction génétique entre *Chd7* et *Fam172a*. Par contre, l'impact d'une légère diminution de *Chd7* chez *Toupee^{Tg/+}*, estimée à 20%, peut être envisagé et pourrait contribuer au phénotype des doubles hétérozygotes [27].

Étant donné l'interaction moléculaire établie entre CHD7 et FAM172A ainsi que l'aggravation phénotypique présentée par les doubles hétérozygotes de fond mixte, il était attendu que les individus *FVB^{Toupee^{Tg/+};}**Chd7^{Gt/+}* présentent un phénotype plus marqué par rapport aux simples hétérozygotes. Cependant, l'analyse menée était non exhaustive et

impliquait un faible nombre d'individus. Une différence plus importante aurait potentiellement pu être observée en considérant d'autres critères (ex : colobome, poids) avec un plus grand nombre d'individus. De plus, ayant montré l'influence du fond génétique, on peut se questionner à savoir si l'importante variation phénotypique observée en fond mixte entre *Toupee*^{Tg/+}; *Chd7*^{Gt/+}, *FVB**Toupee*^{Tg/+} et *B6-Sv129**Chd7*^{Gt/+} n'est pas faussée. Ainsi, l'aggravation phénotypique observée aurait pu avoir été causée par l'interaction *B6-Toupee*^{Tg/+}, *Sv129-Toupee*^{Tg/+} ou *FVB-Chd7*^{Gt/+} et non exclusivement par l'interaction *Toupee*^{Tg/+}-*Chd7*^{Gt/+}.

Étant donné les résultats des expériences menées en fond mixte ainsi que les résultats des analyses confirmant une interaction moléculaire entre CHD7 et FAM172A, la pertinence de poursuivre cette étude était relativement faible, d'où l'arrêt de ce volet d'expérimentations [27]. Notons également que si CHD7 et FAM172A interagissent physiquement ensemble, les différences relevées entre les modèles *Chd7*^{Gt/+} et *Toupee*^{Tg/Tg} (Section 4.2.2) suggèrent que ces deux gènes sont impliqués dans des voies moléculaires qui se chevauchent partiellement, mais non dans leur entièreté.

4.4. Mortalité néonatale chez *Chd7*^{Gt/+}

Puisqu'il a été démontré que le fond génétique influence le développement phénotypique du syndrome CHARGE, il est possible que la cause de la mortalité soit différente entre les deux fonds génétiques, d'où la discussion des résultats séparément pour *FVB**Chd7*^{Gt/+} et *B6**Chd7*^{Tg/+}.

Malgré un aspect légèrement bleuté des nouveau-nés décédés, les tests de respiration tendent à écarter l'hypothèse des difficultés respiratoires. Pour *FVB**Chd7*^{Gt/+}, deux individus *Chd7*^{Gt/+} sont décédés lors de ces tests, mais 11 ont survécus, alors qu'on attendrait de la cause de la mort qu'elle affecte environ le 2/3 des individus. Le nombre d'individus testés pour B6 est faible, mais les observations semblent convaincantes pour éliminer les difficultés respiratoires comme cause de mortalité (Tableau 9). La méthode employée pourrait également être remise en question, mais comme elle a permis d'identifier clairement des problèmes respiratoires chez un autre modèle, elle semble appropriée pour identifier ce type d'anomalie [57].

Les difficultés à se nourrir semblent donc plus plausibles pour expliquer la mortalité néonatale et corréler avec l'absence de taches de lait. Grâce à l'observation de portées dont les

individus $Chd7^{Gt/+}$ sont décédés suite à des signes de sous-alimentation, cette cause de la mort semble fort probable pour $FVBChd7^{Gt/+}$ (Annexes, Figure 25). Toutefois, il n'est pas exclu que des difficultés d'alimentation soient la résultante d'un autre problème (ex : cardiaque, homéostasie, etc) qui affecte la condition globale du nouveau-né et le rend inapte à se nourrir. Les observations sont moins convaincantes pour B6 puisque la mortalité néonatale est moindre que le nombre d'individus observés sans tache de lait. Cette divergence pourrait être associée au retard de croissance important chez les individus $B6Chd7^{Gt/+}$, les difficultés alimentaires engendrant la mort ou alors un retard de croissance persistant. Cela pourrait suggérer que les problèmes de nutrition pourraient perdurer jusqu'à l'âge adulte. Des problèmes neurologiques concorderaient bien avec cette idée.

La présence de la fente palatine dans une proportion importante d'individus $FVBChd7^{Gt/+}$ laisse croire que cette anomalie pourrait être la cause de la mortalité néonatale dans ce fond génétique, d'autant plus que les pourcentages observés pour la mortalité néonatale (76%) et la fente palatine (83%) sont très similaires (Figure 18). La fente palatine est évoquée parmi les causes de mortalité de certains modèles $Chd7$ puisqu'empêchant la succion efficace du lait du à l'absence de pression négative dans la cavité orale [37, 108]. Cette cause de mortalité est donc d'autant plus plausible.

Les nerfs crâniens impliqués dans l'ingestion du bol alimentaire sont les nerfs V, VII, IX, X, XI et XII [109]. En raison du faible taux de défauts aux nerfs crâniens observé chez $FVBChd7^{Gt/+}$ et de la disparité de ces défauts, ce type d'anomalie est peu probable pour expliquer la majorité des décès $FVBChd7^{Gt/+}$. En revanche, pour $B6Chd7^{Gt/+}$, l'interruption du nerf glossopharyngien chez tous les individus testés ainsi que le sous-développement du nerf hypoglosse chez la majorité d'entre eux représentent une explication plausible pour expliquer les difficultés alimentaires et la mortalité ou le retard de croissance conséquents. Le nerf hypoglosse a pour fonction la mobilité de tous les muscles de la langue hormis le muscle palatoglosse [139]. Le nerf glossopharyngien, responsable de l'innervation motrice au muscle stylopharyngien, permet d'élever le pharynx et le larynx pour avaler. Des anomalies aux nerfs glossopharyngiens et au nerf vague engendrent de la dysphagie, des difficultés à avaler ainsi que de l'interférence avec la respiration [140]. Des anomalies du nerf glossopharyngien pourraient donc à la fois expliquer l'absence de tache de lait chez les nouveau-nés et la

coloration légèrement bleuté malgré la survie aux tests de respiration, l'atteinte aux facultés respiratoires étant modérée.

Outre la fente palatine, les causes de mortalité évoquées pour les mutants *Chd7* comprennent l'atrésie des choanes et les problèmes cardiaques [37]. Chez l'humain, la mortalité de patients CHARGE est associée à des combinaisons de défauts cardiovasculaires, fente palatine, atrésie des choanes, déficience en cellules T et anomalies du système nerveux central [141]. De la mortalité induite par un défaut au système immunitaire semble moins probable dans les conditions d'élevage actuelles. L'atrésie des choanes engendrerait vraisemblablement des problèmes respiratoires plus importants [57]. Les anomalies cardiaques sont donc une voie qu'il pourrait être intéressant d'explorer, ou alors les anomalies au système nerveux central. Considérant que la cause de la mort, à l'image de la malocclusion, n'est pas directement liée au syndrome CHARGE, alors il pourrait aussi être envisagé d'investiguer des problèmes d'homéostasie (hypoglycémie, insuffisance rénale, etc), qui font partie des trois grandes classes de mortalité néonatale, avec les problèmes de respiration et de nutrition [108]. Toutefois, si une hypothèse doit être avancée sur la base des résultats actuels, elle serait que la mortalité néonatale chez *Chd7^{Gt/+}* est due à des difficultés alimentaires engendrées par la fente palatine chez *FVBChd7^{Gt/+}* et par des défauts aux nerfs glossopharyngiens et hypoglosse chez *B6Chd7^{Gt/+}*.

Finalement, une observation non abordée dans les résultats est le biais femelle chez les individus *FVBChd7^{Gt/+}*. On recense trois fois plus de femelles *FVBChd7^{Gt/+}* que de mâles à l'âge adulte alors que des proportions identiques sont attendues (Annexes, Tableau 12). Sachant que de la réversion sexuelle est identifiée chez *Chd7^{Gt/+}* et *FVB Toupee^{Tg/Tg}*, les femelles *FVBChd7^{Gt/+}* ont été sexées [27]. Les résultats indiquent qu'il n'y a pas de réversion sexuelle (Annexes, Tableau 13). Par conséquent, cela soulève un questionnement à savoir si la mortalité néonatale affecte plus fortement les mâles de telle sorte que les individus *FVBChd7^{Gt/+}* survivants présentent un enrichissement en femelles. Pour y répondre, les nouveau-nés *FVBChd7^{Gt/+}* subissant de la mortalité néonatale seront désormais sexés.

Conclusion

En somme, *B6Toupee* est un modèle murin pour le syndrome CHARGE qui présente de la microphtalmie et de l'anophtalmie. La caractérisation de ces anomalies oculaires a permis d'inscrire *Fam172a* parmi les gènes régulateurs du développement oculaire précoce. Cette découverte pourrait éventuellement permettre d'élucider certains cas de microphtalmie et d'anophtalmie pour lesquels aucune origine génétique n'a pu être associée, mais également d'avoir un portrait plus complet de la régulation génique lors du développement oculaire.

La comparaison des modèles *Toupee*^{Tg/Tg} et *Chd7*^{Gt/+} dans les fonds génétiques FVB et B6 a permis dans un premier temps de déterminer que le fond génétique influence la pigmentation chez *Toupee* ainsi que la pénétrance de presque toutes les anomalies chez l'un ou l'autre des deux modèles. Cette étude a également permis d'identifier de nombreuses anomalies dont la pénétrance varie selon le modèle murin ainsi que quelques anomalies dont la présentation varie également. Ces observations ont permis de montrer que le fond génétique et que le gène muté dans le syndrome CHARGE peuvent favoriser le développement de certaines anomalies au détriment d'autres. Ces éléments permettent de fournir des éléments de réponse pour expliquer la grande variabilité phénotypique du syndrome CHARGE, laquelle demeurait jusqu'à présent inexplicée.

Bibliographie

1. Bergman, J.E., et al., *The results of CHD7 analysis in clinically well-characterized patients with Kallmann syndrome*. The Journal of Clinical Endocrinology 2012. **97**(5): p. E858-E862.
2. Etchevers, H.C., J. Amiel, and S. Lyonnet, *Molecular bases of human neurocristopathies*, in *Neural Crest Induction and Differentiation*. 2006, Springer. p. 213-234.
3. Williams, A.L. and B.L. Bohnsack, *Neural crest derivatives in ocular development: discerning the eye of the storm*. Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews, 2015. **105**(2): p. 87-95.
4. Gilbert, S.F., *Developmental Biology*. Sunderland, Massachusetts. 2000, Sinauer Associates, Inc.
5. Shyamala, K., et al., *Neural crest: The fourth germ layer*. Journal of Oral Maxillofacial Pathology, 2015. **19**(2): p. 221.
6. Bergeron, K.F., D. Silversides, and N. Pilon, *The developmental genetics of Hirschsprung's disease*. Clinical Genetics, 2013. **83**(1): p. 15-22.
7. Kim, H., T. Kang, and J. Kim, *Environmental effects on the epigenetics of neural crest cell development*. OA Molecular & Cell Biology, 2013. **1**(1): p. 4.
8. Pingault, V., et al., *A heterozygous endothelin 3 mutation in Waardenburg-Hirschsprung disease: is there a dosage effect of EDN3/EDNRB gene mutations on neurocristopathy phenotypes?* Journal of Medical Genetics, 2001. **38**(3): p. 205-209.
9. Bakari, A., et al., *Case report: congenital aganglionic megacolon in Nigerian adults: two case reports and review of the literature*. Nigerian Journal of Clinical Practice, 2011. **14**(2): p. 249-252.
10. Smithells, R., S. Sheppard, and C. Schorah, *Vitamin deficiencies and neural tube defects*. Archives of Disease in Childhood, 1976. **51**(12): p. 944-950.
11. Ahlgren, S.C., V. Thakur, and M. Bronner-Fraser, *Sonic hedgehog rescues cranial neural crest from cell death induced by ethanol exposure*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(16): p. 10476-10481.
12. Van Gelder, M.M., et al., *Teratogenic mechanisms of medical drugs*. Human Reproduction Update, 2010. **16**(4): p. 378-394.
13. Kim, H., et al., *Aebp2 as an epigenetic regulator for neural crest cells*. PloS one, 2011. **6**(9): p. e25174.
14. Meissner, A., et al., *Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells*. Nature, 2008. **454**(7205): p. 766.
15. Hittner, H.M., et al., *Colobomatous microphthalmia, heart disease, hearing loss, and mental retardation-a syndrome*. Journal of Pediatric Ophthalmology Strabismus, 1979. **16**(2): p. 122-128.
16. Hall, B.D., *Choanal atresia and associated multiple anomalies*. The Journal of Pediatrics, 1979. **95**(3): p. 395-398.
17. Martin, D.M., *Epigenetic developmental disorders: CHARGE syndrome, a case study*. Current Genetic Medicine Reports, 2015. **3**(1): p. 1-7.

18. Hsu, P., et al., *CHARGE syndrome: a review*. Journal of Paediatrics Child Health, 2014. **50**(7): p. 504-511.
19. Antoniou, M.-C., et al., *A novel CHD7 mutation in an adolescent presenting with growth and pubertal delay*. Annals of Pediatric Endocrinology Metabolism, 2019. **24**(1): p. 49-54.
20. Verloes, A., *Updated diagnostic criteria for CHARGE syndrome: a proposal*. American Journal of Medical Genetics Part A, 2005. **133**(3): p. 306-308.
21. Hale, C.L., et al., *Atypical phenotypes associated with pathogenic CHD7 variants and a proposal for broadening CHARGE syndrome clinical diagnostic criteria*. American Journal of Medical Genetics Part A, 2016. **170**(2): p. 344-354.
22. Zentner, G.E., et al., *Molecular and phenotypic aspects of CHD7 mutation in CHARGE syndrome*. American Journal of Medical Genetics Part A, 2010. **152**(3): p. 674-686.
23. Natung, T., et al., *Symmetrical chorioretinal colobomata with craniovertebral junction anomalies in charge syndrome-A case report with review of literature*. Journal of Clinical Imaging Science, 2014. **4**.
24. Ragge, N.K., I.D. Subak-Sharpe, and J.R.O. Collin, *A practical guide to the management of anophthalmia and microphthalmia*. Eye, 2007. **21**(10): p. 1290-1300.
25. Jongmans, M., et al., *CHARGE syndrome: the phenotypic spectrum of mutations in the CHD7 gene*. Journal of Medical Genetics, 2006. **43**(4): p. 306-314.
26. Hurd, E.A., et al., *Loss of Chd7 function in gene-trapped reporter mice is embryonic lethal and associated with severe defects in multiple developing tissues*. Mammalian Genome, 2007. **18**(2): p. 94-104.
27. Bélanger, C., et al., *Dysregulation of cotranscriptional alternative splicing underlies CHARGE syndrome*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2018. **115**(4): p. E620-E629.
28. Blake, K., et al., *Clinical utility gene card for: CHARGE syndrome*. European Journal of Human Genetics, 2011. **19**(9): p. 1017.
29. Bergman, J.E., et al., *CHD7 mutations and CHARGE syndrome: the clinical implications of an expanding phenotype*. Journal of Medical Genetics, 2011. **48**(5): p. 334-342.
30. Balasubramanian, R., et al., *Functionally compromised CHD7 alleles in patients with isolated GnRH deficiency*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014. **111**(50): p. 17953-17958.
31. Bérubé-Simard, F.-A. and N. Pilon, *Molecular dissection of CHARGE syndrome highlights the vulnerability of neural crest cells to problems with alternative splicing and other transcription-related processes*. Transcription, 2019. **10**(1): p. 21-28.
32. Bajpai, R., et al., *CHD7 cooperates with PBAF to control multipotent neural crest formation*. Nature Structural Molecular Biology, 2010. **463**(7283): p. 958.
33. Fujita, K., R. Ogawa, and K. Ito, *CHD7, Oct3/4, Sox2, and Nanog control FoxD3 expression during mouse neural crest-derived stem cell formation*. The FEBS Journal, 2016. **283**(20): p. 3791-3806.
34. Schulz, Y., et al., *CHD7, the gene mutated in CHARGE syndrome, regulates genes involved in neural crest cell guidance*. Human Genetics, 2014. **133**(8): p. 997-1009.
35. Vissers, L.E., et al., *Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome*. Nature Genetics, 2004. **36**(9): p. 955.

36. Chu, X., et al., *Genotranscriptomic meta-analysis of the CHD family chromatin remodelers in human cancers—initial evidence of an oncogenic role for CHD 7*. *Molecular Oncology*, 2017. **11**(10): p. 1348-1360.
37. Bosman, E.A., et al., *Multiple mutations in mouse Chd7 provide models for CHARGE syndrome*. *Human Molecular Genetics*, 2005. **14**(22): p. 3463-3476.
38. Manning, B.J. and T. Yusufzai, *The ATP-dependent chromatin remodeling enzymes CHD6, CHD7, and CHD8 exhibit distinct nucleosome binding and remodeling activities*. *Journal of Biological Chemistry*, 2017. **292**(28): p. 11927-11936.
39. Schnetz, M.P., et al., *Genomic distribution of CHD7 on chromatin tracks H3K4 methylation patterns*. *Genome Research*, 2009. **19**(4): p. 590-601.
40. Engelen, E., et al., *Sox2 cooperates with Chd7 to regulate genes that are mutated in human syndromes*. *Nature Genetics*, 2011. **43**(6): p. 607.
41. Gage, P.J., E.A. Hurd, and D.M. Martin, *Mouse models for the dissection of CHD7 functions in eye development and the molecular basis for ocular defects in CHARGE syndrome*. *Investigative Ophthalmology Visual Science*, 2015. **56**(13): p. 7923-7930.
42. Allemand, E., et al., *A broad set of chromatin factors influences splicing*. *PLoS Genetics*, 2016. **12**(9): p. e1006318.
43. Matveeva, E., et al., *Involvement of PARP1 in the regulation of alternative splicing*. *Cell Discovery*, 2016. **2**: p. 15046.
44. Van Nostrand, J.L., et al., *Inappropriate p53 activation during development induces features of CHARGE syndrome*. *Nature*, 2014. **514**(7521): p. 228.
45. Pleasance, E.D., et al., *A small-cell lung cancer genome with complex signatures of tobacco exposure*. *Nature*, 2010. **463**(7278): p. 184.
46. van Ravenswaaij-Arts, C. and D.M. Martin. *New insights and advances in CHARGE syndrome: Diagnosis, etiologies, treatments, and research discoveries*. in *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*. 2017. Wiley Online Library.
47. Randall, V., et al., *Great vessel development requires biallelic expression of Chd7 and Tbx1 in pharyngeal ectoderm in mice*. *The Journal of Clinical Investigation*, 2009. **119**(11): p. 3301-3310.
48. Ogier, J.M., et al., *CHD7 deficiency in “Looper”, a new mouse model of CHARGE syndrome, results in ossicle malformation, otosclerosis and hearing impairment*. *PloS One*, 2014. **9**(5): p. e97559.
49. Lenz, D.R., et al., *The inner ear phenotype of Volchok (Vlk): An ENU-induced mouse model for CHARGE syndrome*. *Audiological Medicine*, 2010. **8**(3): p. 110-119.
50. Jiang, X., et al., *The mutation in Chd7 causes misexpression of Bmp4 and developmental defects in telencephalic midline*. *The American Journal of Pathology*, 2012. **181**(2): p. 626-641.
51. Tian, C., et al., *Otitis media in a new mouse model for CHARGE syndrome with a deletion in the Chd7 gene*. *PloS One*, 2012. **7**(4): p. e34944.
52. Iwasaki, S. and Y. Tomari, *Argonaute-mediated translational repression (and activation)*. *Fly*, 2009. **3**(3): p. 205-208.
53. Bukhari, S.I. and S. Vasudevan, *FXR1a-associated microRNP: A driver of specialized non-canonical translation in quiescent conditions*. *RNA Biology*, 2017. **14**(2): p. 137-145.

54. Iwasaki, S., T. Kawamata, and Y. Tomari, *Drosophila argonaute1 and argonaute2 employ distinct mechanisms for translational repression*. *Molecular Cell*, 2009. **34**(1): p. 58-67.
55. Ameyar-Zazoua, M., et al., *Argonaute proteins couple chromatin silencing to alternative splicing*. *Nature Structural Molecular Biology*, 2012. **19**(10): p. 998.
56. Feng, Z., et al., *FAM172A induces S phase arrest of HepG2 cells via Notch 3*. *Oncology Reports*, 2013. **29**(3): p. 1154-1160.
57. Bérubé-Simard, F.-A., et al., *Fam172a contributes to Ago2 nuclear localization in order to regulate alternative splicing and neural crest cell development*. . À soumettre à EMBO J.
58. Liu, W., et al., *Expression of family with sequence similarity 172 member A and nucleotide-binding protein 1 is associated with the poor prognosis of colorectal carcinoma*. *Oncology Letters*, 2017. **14**(3): p. 3587-3593.
59. Pilon, N., *Pigmentation-based insertional mutagenesis is a simple and potent screening approach for identifying neurocristopathy-associated genes in mice*. *Rare Diseases*, 2016. **4**(1): p. 4483-96.
60. Munding, E.M., et al., *Competition between pre-mRNAs for the splicing machinery drives global regulation of splicing*. *Molecular Cell*, 2013. **51**(3): p. 338-348.
61. Winn, B., et al., *Factors affecting light-adapted pupil size in normal human subjects*. *Investigative Ophthalmology Visual Science*, 1994. **35**(3): p. 1132-1137.
62. Crawford, K.S., P.L. Kaufman, and L. Bito, *The role of the iris in accommodation of rhesus monkeys*. *Investigative Ophthalmology Visual Science*, 1990. **31**(10): p. 2185-2190.
63. Veleri, S., et al., *Biology and therapy of inherited retinal degenerative disease: insights from mouse models*. *Disease Models Mechanisms*, 2015. **8**(2): p. 109-129.
64. Goel, M., et al., *Aqueous humor dynamics: a review*. *The Open Ophthalmology Journal*, 2010. **4**: p. 52.
65. Dimanlig, P.V., et al., *The upstream ectoderm enhancer in Pax6 has an important role in lens induction*. *Development*, 2001. **128**(22): p. 4415-4424.
66. Wawersik, S. and R.L. Maas, *Vertebrate eye development as modeled in Drosophila*. *Human Molecular Genetics*, 2000. **9**(6): p. 917-925.
67. Young, R.W., *Cell differentiation in the retina of the mouse*. *The Anatomical Record*, 1985. **212**(2): p. 199-205.
68. Bharathan, N.K., *The Role of the RX3/Otx Pathway in Zebrafish Eye Development*. 2014, Virginia Commonwealth University.
69. Zagozewski, J., Q. Zhang, and D. Eisenstat, *Genetic regulation of vertebrate eye development*. *Clinical Genetics*, 2014. **86**(5): p. 453-460.
70. Jasarapura-Agrawal, S. and P.Y. Lwigale, *Neural Crest Cells in Ocular Development*, in *Neural Crest Cells*. 2014, Elsevier. p. 189-203.
71. Fuhrmann, S., E.M. Levine, and T.A. Reh, *Extraocular mesenchyme patterns the optic vesicle during early eye development in the embryonic chick*. *Development*, 2000. **127**(21): p. 4599-4609.
72. Gage, P.J., et al., *Fate maps of neural crest and mesoderm in the mammalian eye*. *Investigative ophthalmology visual science*, 2005. **46**(11): p. 4200-4208.
73. Le Lièvre, C.S. and N. Le Douarin, *Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos*. *Development*, 1975. **34**(1): p. 125-154.

74. Trainor, P., *Neural crest cells: evolution, development and disease*. 2013: Academic Press.
75. Zuber, M.E., et al., *Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors*. *Development*, 2003. **130**(21): p. 5155-5167.
76. Chiang, C., et al., *Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function*. *Nature*, 1996. **383**(6599): p. 407.
77. Jeong, Y., et al., *Regulation of a remote Shh forebrain enhancer by the Six3 homeoprotein*. *Nature Genetics*, 2008. **40**(11): p. 1348.
78. Mathers, P., et al., *The Rx homeobox gene is essential for vertebrate eye development*. *Nature*, 1997. **387**(6633): p. 603.
79. Sasagawa, S., et al., *Axes establishment during eye morphogenesis in Xenopus by coordinate and antagonistic actions of BMP4, Shh, and RA*. *Genesis*, 2002. **33**(2): p. 86-96.
80. Macdonald, R., et al., *Midline signalling is required for Pax gene regulation and patterning of the eyes*. *Development*, 1995. **121**(10): p. 3267-3278.
81. Behesti, H., J.K. Holt, and J.C. Sowden, *The level of BMP4 signaling is critical for the regulation of distinct T-box gene expression domains and growth along the dorso-ventral axis of the optic cup*. *BMC Developmental Biology*, 2006. **6**(1): p. 62.
82. Yun, S., et al., *Lhx2 links the intrinsic and extrinsic factors that control optic cup formation*. *Development*, 2009. **136**(23): p. 3895-3906.
83. Westenskow, P., S. Piccolo, and S. Fuhrmann, *β -catenin controls differentiation of the retinal pigment epithelium in the mouse optic cup by regulating Mitf and Otx2 expression*. *Development*, 2009. **136**(15): p. 2505-2510.
84. Goding, C.R., *Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage*. *Genes Development*, 2000. **14**(14): p. 1712-1728.
85. Pittack, C., G. Grunwald, and T. Reh, *Fibroblast growth factors are necessary for neural retina but not pigmented epithelium differentiation in chick embryos*. *Development*, 1997. **124**(4): p. 805-816.
86. Liu, W., et al., *Neuroretina specification in mouse embryos requires Six3-mediated suppression of Wnt8b in the anterior neural plate*. *The Journal of Clinical Investigation*, 2010. **120**(10): p. 3568-3577.
87. Wyatt, A., et al., *Novel heterozygous OTX2 mutations and whole gene deletions in anophthalmia, microphthalmia and coloboma*. *Human Mutation*, 2008. **29**(11): p. E278-E283.
88. Schilter, K., et al., *OTX2 microphthalmia syndrome: four novel mutations and delineation of a phenotype*. *Clinical Genetics*, 2011. **79**(2): p. 158-168.
89. Bardakjian, T., A. Weiss, and A. Schneider, *Microphthalmia/anophthalmia/coloboma spectrum*, in *GeneReviews*. 2015, University of Washington, Seattle.
90. Ragge, N.K., et al., *Heterozygous mutations of OTX2 cause severe ocular malformations*. *The American Journal of Human Genetics*, 2005. **76**(6): p. 1008-1022.
91. Khan, A.O. and E.I. Traboulsi, *Microphthalmos, Anophthalmos, Coloboma, and Nanophthalmos (Includes CHARGE Association)*. Oxford University Press, 2016.
92. Ragge, N., I. Subak-Sharpe, and J. Collin, *A practical guide to the management of anophthalmia and microphthalmia*. *Eye*, 2007. **21**(10): p. 1290.

93. You, T., et al., *Novel OTX2 mutation associated with congenital anophthalmia and microphthalmia in a Han Chinese family*. *Acta Ophthalmologica*, 2012. **90**(6): p. e501-e502.
94. Dateki, S., et al., *Heterozygous orthodenticle homeobox 2 mutations are associated with variable pituitary phenotype*. *The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, 2010. **95**(2): p. 756-764.
95. Slavotinek, A.M., *Eye development genes and known syndromes*. *Molecular Genetics Metabolism*, 2011. **104**(4): p. 448-456.
96. Moore, B.A., et al., *Identification of genes required for eye development by high-throughput screening of mouse knockouts*. *Communications Biology*, 2018. **1**(1): p. 236.
97. Gould, D.B. and S.W. John, *Anterior segment dysgenesis and the developmental glaucomas are complex traits*. *Human Molecular Genetics*, 2002. **11**(10): p. 1185-1193.
98. Pierro, L.J. and J. Spiggle, *Congenital eye defects in the mouse. I. Corneal opacity in C57black mice*. *Journal of Experimental Zoology*, 1967. **166**(1): p. 25-37.
99. Mehalow, A.K., et al., *CRB1 is essential for external limiting membrane integrity and photoreceptor morphogenesis in the mammalian retina*. *Human Molecular Genetics*, 2003. **12**(17): p. 2179-2189.
100. Chang, B., et al., *Retinal degeneration mutants in the mouse*. *Vision Research*, 2002. **42**(4): p. 517-525.
101. Sanchez-Ferraz, O., et al., *A direct role for murine Cdx proteins in the trunk neural crest-gene regulatory network*. *Development*, 2016: p. dev.132159.
102. Allan, D., et al., *RAR γ and Cdx1 Interactions in Vertebral Patterning*. *Developmental Biology*, 2001. **240**(1): p. 46-60.
103. Graw, J., *Eye development*, in *Current Topics in Developmental Biology*. 2010, Elsevier. p. 343-386.
104. Furuta, Y. and B.L. Hogan, *BMP4 is essential for lens induction in the mouse embryo*. *Genes Development*, 1998. **12**(23): p. 3764-3775.
105. Zagozewski, J.L., et al., *The role of homeobox genes in retinal development and disease*. *Developmental Biology*, 2014. **393**(2): p. 195-208.
106. Amengual, J., et al., *STRA6 is critical for cellular vitamin A uptake and homeostasis*. *Human Molecular Genetics*, 2014. **23**(20): p. 5402-5417.
107. Ng, D., et al., *Oculofaciocardiodental and Lenz microphthalmia syndromes result from distinct classes of mutations in BCOR*. *Nature Genetics*, 2004. **36**(4): p. 411.
108. Turgeon, B. and S. Meloche, *Interpreting neonatal lethal phenotypes in mouse mutants: insights into gene function and human diseases*. *Physiological Reviews*, 2009. **89**(1): p. 1-26.
109. Marchese-Ragona, R., et al., *Evaluation of swallowing disorders in multiple sclerosis*. *Neurological Sciences*, 2006. **27**(4): p. s335-s337.
110. Mattapallil, M.J., et al., *The Rd8 mutation of the Crb1 gene is present in vendor lines of C57BL/6N mice and embryonic stem cells, and confounds ocular induced mutant phenotypes*. *Investigative ophthalmology visual science*, 2012. **53**(6): p. 2921-2927.
111. Moore, B.A., et al., *A population study of common ocular abnormalities in C57BL/6N Rd8 Mice*. *Investigative ophthalmology visual science*, 2018. **59**(6): p. 2252-2261.
112. Smith, R.S., T.H. Roderick, and J.P. Sundberg, *Microphthalmia and associated abnormalities in inbred black mice*. *Laboratory Animal Science*, 1994. **44**(6): p. 551-560.

113. Lu, M.-F., et al., *Function of Rieger syndrome gene in left–right asymmetry and craniofacial development*. *Nature*, 1999. **401**(6750): p. 276.
114. Nogi, T., et al., *Eye regeneration assay reveals an invariant functional left-right asymmetry in the early bilaterian, *Dugesia japonica**. *Laterality: Asymmetries of Body, Brain Cognition*, 2005. **10**(2): p. 193-205.
115. Forrest, C.R., *Secondary management of posttraumatic craniofacial deformities*, in *Plastic Surgery Secrets Plus*. 2010, Elsevier. p. 330-339.
116. Kolk, A., et al., *Secondary post-traumatic enophthalmos: high-resolution magnetic resonance imaging compared with multislice computed tomography in postoperative orbital volume measurement*. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, 2007. **65**(10): p. 1926-1934.
117. Aggarwal, M., et al., *Magnetic resonance imaging and micro-computed tomography combined atlas of developing and adult mouse brains for stereotaxic surgery*. *Neuroscience*, 2009. **162**(4): p. 1339-1350.
118. Morcillo, J., et al., *Proper patterning of the optic fissure requires the sequential activity of *BMP7* and *SHH**. *Development*, 2006. **133**(16): p. 3179-3190.
119. Wawersik, S., et al., *BMP7 acts in murine lens placode development*. *Developmental Biology*, 1999. **207**(1): p. 176-188.
120. Ludwig, P.E. and C.N. Czyz, *Embryology, Eye Malformations*, in *StatPearls [Internet]*. 2019, StatPearls Publishing.
121. Levy, C., M. Khaled, and D.E. Fisher, *MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene*. *Trends in Molecular Medicine*, 2006. **12**(9): p. 406-414.
122. Kondoh, H., M. Uchikawa, and Y. Ishii, *Multiple Roles for *SOX2* in Eye Development*, in *Sox2, Biology and Role in Development and Disease*. 2016, Academic Press. p. 217-233.
123. Kelly, M. and J. von Lintig, *STRA6: role in cellular retinol uptake and efflux*. *Hepatobiliary Surgery Nutrition*, 2015. **4**(4): p. 229.
124. Singh, S., M. Hasanreisoglu, and R. Pointdujour, *Stunning Visualization of Fetal Hyaloid Artery*. *Retina Today*, 2015: p. 44-46.
125. Huang, W., et al., *Critical endothelial regulation by *LRP5* during retinal vascular development*. *PloS One*, 2016. **11**(3): p. e0152833.
126. Vega-Lopez, G.A., et al., *Neurocristopathies: New insights 150 years after the neural crest discovery*. *Developmental Biology*, 2018. **444**: p. S110-S143.
127. Greenberg, A.M. and R. Schmelzeisen, *Craniomaxillofacial reconstructive and corrective bone surgery*. 2018: Springer.
128. Bartzela, T.N., C. Carels, and J.C. Maltha, *Update on 13 Syndromes Affecting Craniofacial and Dental Structures*. *Frontiers in Physiology*, 2017. **8**: p. 1038.
129. Friedel, R.H., et al., *Generating conditional knockout mice*, in *Transgenic Mouse Methods and Protocols*. 2011, Springer. p. 205-231.
130. Hägglund, A.-C., I. Jones, and L. Carlsson, *A novel mouse model of anterior segment dysgenesis (ASD): conditional deletion of *Tsc1* disrupts ciliary body and iris development*. *Disease Models Mechanisms*, 2017. **10**(3): p. 245-257.
131. Gollomp, K., et al., *Generation of Cre Transgenic Mice With Rpe-Specific and Photoreceptor-Specific Expression for Conditional Knockouts Using the Cre-loxp System*. *Investigative Ophthalmology Visual Science*, 2006. **47**(13): p. 4160-4160.

132. Nolan, P.M., et al., *Heterozygosity mapping of partially congenic lines: mapping of a semidominant neurological mutation, Wheels (Whl), on mouse chromosome 4*. *Genetics*, 1995. **140**(1): p. 245-254.
133. Bahrami, A., et al., *Genetic background of Hirschsprung disease: a bridge between basic science and clinical application*. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2018. **119**(1): p. 28-33.
134. Walters, L.C., et al., *Genetic background impacts developmental potential of enteric neural crest-derived progenitors in the Sox10 Dom model of Hirschsprung disease*. 2010. **19**(22): p. 4353-4372.
135. Hou, J., et al., *Complex modifier landscape underlying genetic background effects*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2019. **116**(11): p. 5045-5054.
136. Koturbash, I., et al., *Epigenetic mechanisms of mouse interstrain variability in genotoxicity of the environmental toxicant 1, 3-butadiene*. *Toxicological Sciences*, 2011. **122**(2): p. 448-456.
137. Oey, H., et al., *Genetic and epigenetic variation among inbred mouse littermates: identification of inter-individual differentially methylated regions*. *Epigenetics Chromatin*, 2015. **8**(1): p. 54.
138. Watkins-Chow, D.E. and W.J. Pavan, *Genomic copy number and expression variation within the C57BL/6J inbred mouse strain*. *Genome Research*, 2008. **18**(1): p. 60-66.
139. Seung, Y.K. and A.N. Imama, *Neuroanatomy, Cranial Nerve 12 (Hypoglossal)*. 2018, StatPearls.
140. *Diseases of the Nervous System*, in *Veterinary Medicine (Eleventh Edition)*, P.D. Constable, et al., Editors. 2017, W.B. Saunders. p. 1155-1370.
141. Hudson, A., C.-L. Trider, and K. Blake, *CHARGE Syndrome*. *Pediatrics in Review*, 2017. **38**(56).

Annexes

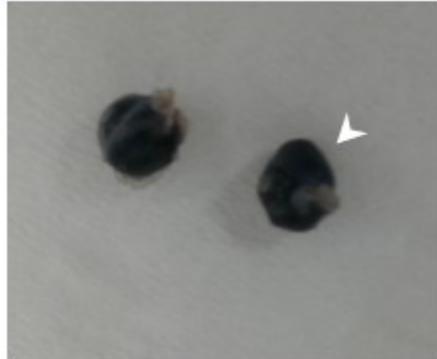


Figure 23 : Globes oculaires pour une microphthalmie apparente présentant une déformation du globe oculaire (tête de flèche).

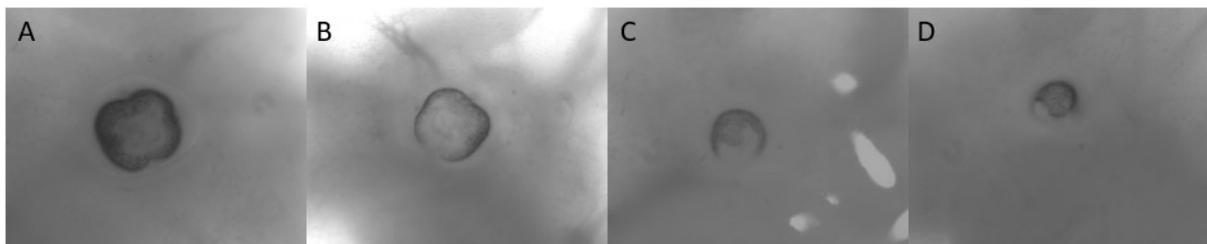


Figure 24 : Phénotypes oculaires chez *B6Toupee* à E12.5. (A) Œil sain (B) Colobome (C et D) Microphthalmie.



Figure 25 : Aspect des nouveau-nés pour une portée FVB comptant trois individus sans tache de lait (flèches). Trois décès génotypés *Chd7^{Gt/+}* ont été recensés dans les 24h suivantes.

Tableau 10 : Liste exhaustive des gènes recherchés dans le transcriptome des CCN à E10.5 (*FVBWT;G4-RFP* vs *FVB*Toupee*Tg/Tg;G4-RFP*). X, non significatif; O, dérégulation significative, p-value<0,05.

Gène	Expression	Épissage	<i>FVB<i>Toupee</i>^{Tg/Tg}</i> /Contrôle	Gène	Expression	Épissage	<i>FVB<i>Toupee</i>^{Tg/Tg}</i> /Contrôle
<i>Atoh7</i>	x	x	x	<i>Pax2</i>	x	x	x
<i>Bcor</i>	x	O	1,133	<i>Pax6</i>	x	x	x
<i>Blimp1</i>	x	x	x	<i>Optx2</i>	x	x	x
<i>Bmp4</i>	x	x	x	<i>Otx2</i>	x	x	x
<i>Bmp7</i>	O	x	0,52	<i>Pax2</i>	x	x	x
<i>Brn3b</i>	x	x	x	<i>Pax6</i>	x	x	x
<i>Calb1</i>	x	x	x	<i>Pitx2</i>	x	x	x
<i>Chx10</i>	x	x	x	<i>Pou4f1</i>	x	x	x
<i>Crx</i>	x	x	x	<i>Prox1</i>	x	x	x
<i>Dlx1</i>	O	x	0,52	<i>Ptf1a</i>	x	x	x
<i>Dlx2</i>	x	x	x	<i>Qnr71</i>	x	x	x
<i>Fgf1/2</i>	x	x	x	<i>Rax</i>	x	x	x
<i>FoxE3</i>	x	x	x	<i>Rbp4</i>	x	x	x
<i>Foxn4</i>	x	x	x	<i>RorB</i>	O	x	0,33
<i>Gdf6</i>	x	x	x	<i>Shh</i>	x	x	x
<i>Hccs</i>	x	x	x	<i>Six3</i>	x	x	x
<i>Hes1</i>	x	x	x	<i>Six6</i>	x	x	x
<i>Hes5</i>	O	x	0,45	<i>Smoc1</i>	x	x	x
<i>Lhx2</i>	O	x	0,55	<i>Sox2</i>	O	x	0,54
<i>Mash1</i>	x	x	x	<i>Sox8</i>	O	x	0,4
<i>Math3</i>	x	x	x	<i>Sox9</i>	O	x	0,57
<i>Meis1</i>	x	O	0,97	<i>Stra6</i>	O	x	0,57
<i>Mitf</i>	O	x	0,26	<i>Tbx3</i>	O	x	0,46
<i>NeuroD</i>	x	x	x	<i>TBx5</i>	x	x	x
<i>Notch1</i>	O	x	0,43	<i>Tlx</i>	x	x	x
<i>Nrl</i>	x	x	x	<i>TrB2</i>	x	x	x
<i>Oct1/2</i>	x	x	x	<i>Trp1/2</i>	x	x	x
<i>Onecut1</i>	O	x	0,44	<i>Tyr</i>	O	x	0,35
<i>Optx2</i>	x	x	x	<i>Vax1/2</i>	x	x	x
<i>Otx2</i>	x	x	x	<i>Vsx2</i>	x	x	x

Tableau 11 : Répartition des anomalies oculaires en fonction du sexe des individus affectés

Femelles (%)	Mâles (%)	Nombre d'individus (n)
46	54	41

Tableau 12 : Répartition des individus *FVBChd7^{Gt/+}* selon le sexe phénotypique

Femelles (%)	Mâles (%)	Nombre d'individus (n)
74	26	23

Tableau 13 : Sexage chromosomique des femelles *FVBChd7^{Gt/+}*

XX (%)	XY (%)	Nombre d'individus (n)
100	0	12