

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉTUDE MULTIDIMENSIONNELLE SUR ARB2A (FAM172A) : EXPLORATION DE FACTEURS
MODULANT LA VARIABILITÉ PHÉNOTYPIQUE DU SYNDROME CHARGE, DU RÔLE D'ARB2A DANS
LE DÉVELOPPEMENT OCULAIRE ET DES MÉCANISMES COMPENSATOIRES LIÉS À SA PERTE

THÈSE

PRÉSENTÉE

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DOCTORAT EN BIOCHIMIE

PAR

ELIZABETH LEDUC

JUILLET 2026

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.12-2023). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Tout d’abord, mes remerciements à Nicolas Pilon et Malika Oubaha pour avoir cru en moi pour ce doctorat. Merci de m’avoir permis d’explorer et de m’impliquer, enrichissant par le fait même d’autant plus mon parcours aux cycles supérieurs. J’ai toujours pu trouver votre porte ouverte lorsque j’en avais besoin d’aide ou de conseils. Merci, Nicolas, d’avoir insisté pour que je poursuive au doctorat. Sans tes encouragements, il n’aurait pas eu lieu et je peux dire aujourd’hui que je suis très heureuse de l’avoir mené. Je remercie également les membres du jury, Philippe Campeau, François Dragon et Karine Dufresne d’avoir accepté d’évaluer cette thèse.

Sur le plan technique, je remercie Grégoire Bonnamour, pour s’être penché avec moi sur mes diverses idées expérimentales impliquant microscopie et cytométrie avec une grande patience ainsi que Farzaneh Rahmdani, Séphora Sallis et Baptiste Charrier pour leur aide avec les analyses bio-informatiques. Je remercie également le personnel technique des animaleries, en particulier Jacinthe Giguère et Geneviève Hamel pour les soins apportés à des lignées de souris présentant de multiples anomalies, incluant l’identification et le traitement de la malocclusion, ainsi que pour la gestion de certaines lignées. À Angèle Sansoucy et Normand Lapierre, pour l’aide qu’ils ont apportée à mes questionnements expérimentaux et en matière d’éthique animale. Une pensée également pour Catherine et Jeffrey. Travailler sur des projets impliquant aussi fortement des modèles animaux, c’est aussi passer un temps conséquent à l’animalerie, où on ressent l’impact d’une équipe accueillante et compétente.

Je remercie également nos différents collaborateurs, dont les laboratoires du Pr Claire Bénard et du Pr Mart Saarma ainsi que leurs employés et étudiants sur le projet, Lise Rivollet, Yann Chabi et Olesya Spironok. Ils ont fait preuve de grande gentillesse et générosité à notre égard et ce fut un plaisir et un enrichissement d’échanger avec eux sur nos projets communs.

Un merci également aux stagiaires ayant travaillé à mes côtés, Fadilata Poco Sawadogo, Manon Rémy et finalement Wicem Mallek, qui a effectué un travail de long terme sur le projet « compensation », en plus d’aides sporadiques sur les autres projets. À Dhananjaya également, qui a amorcé le projet « compensation ».

Pour avoir répondu à ma curiosité en m’initiant à de nouvelles techniques et modèles, merci à Normand Lapierre, Tatiana Cardinal, Claire Bénard et Grégoire Bonnamour. Pour les opportunités qu’ils m’ont offertes et pour m’avoir fait confiance dans le transfert de responsabilité, merci à Nicolas Pilon et Manon Saint-Germain. Mes remerciements vont également à Catherine Mounier pour sa confiance en mes capacités et pour son soutien pour ma période de rédaction. Un immense merci à François Dragon pour m’avoir fait confiance à répétition, me permettant de contribuer à un ensemble de cours avec beaucoup de plaisir.

Mes remerciements à ma famille et aux amis qui m’ont encouragé au fil de ces années, ainsi qu’aux amis et collègues que j’ai eu la chance de côtoyer lors de mon doctorat, notamment Marie Lefèvre, Georges Hraoui, Mohammad Reza, Sandrine Girard, Hermance Beaud, Alassane Gary, Ivan Valette, Khadija Rezki, Baptiste Charrier, Vina Banouvong, Sanna Tork, Sherin Ali et Nejia Lassoued. Un énorme merci à Séphora Sallis et Tatiana Cardinal, sources infinies de conseils, d’encouragements et d’amitié. Mes remerciements vont également à Rodolphe Soret pour ses conseils ainsi qu’à Ouliana Souchkova et Benoit Grondin, compères souris et ARB2A, pour leur aide et soutien.

Un immense merci également à Alexandre Légiot, qui s’occupe d’un million de choses pendant que je cours de tout côté, à son immense patience à gérer tout ça et la nervosité qui m’habite.

Une pensée pour ceux que j’aurais malgré tout pu oublier, vous êtes également dans mon cœur.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	xii
RÉSUMÉ	xv
ABSTRACT	xvii
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE	3
1.1 Les cellules de la crête neurale	3
1.1.1 Le développement des cellules de la crête neurale	3
1.1.2 Les types cellulaires dérivés de la crête neurale	4
1.1.3 Les neurocristopathies.....	6
1.2 Le syndrome CHARGE	6
1.2.1 L'incidence	6
1.2.2 Les perspectives historiques.....	6
1.2.3 Les critères diagnostiques.....	7
1.2.4 La présentation phénotypique.....	9
1.2.4.1 Les anomalies oculaires	9
1.2.4.2 Les défauts cardiaques	11
1.2.4.3 L'atrésie des choanes, la fente orofaciale et autres anomalies des voies aériennes supérieures.....	11
1.2.4.4 Le retard de croissance et de développement ainsi que les troubles du comportement.....	11
1.2.4.5 Les anomalies génitales	12
1.2.4.6 Les défauts aux oreilles.....	12
1.2.4.7 Les défauts du système nerveux central et les anomalies des nerfs crâniens	13
1.2.4.8 Le faciès caractéristique	13
1.2.4.9 Les anomalies musculo-squelettiques.....	14
1.2.4.10 La mortalité.....	14
1.2.5 La prise en charge médicale.....	14
1.2.6 L'étiologie du syndrome CHARGE	15
1.2.6.1 L'origine cellulaire.....	15
1.2.6.2 L'origine génétique	16
1.2.6.2.1 <i>CHD7</i>	16
1.2.6.2.2 Les autres gènes causatifs du syndrome CHARGE.....	17
1.2.6.3 L'origine moléculaire	18
1.2.6.3.1 L'épissage alternatif et la transcription	18
1.2.6.3.2 L'import nucléaire d'AGO2	19

1.2.6.3.3	Les autres hypothèses moléculaires.....	20
1.2.7	Les cas familiaux	20
1.2.8	Les corrélations génotype-phénotype	21
1.2.9	Les conditions associées	22
1.3	CHD7.....	25
1.3.1	La famille CHD	25
1.3.2	Le gène	26
1.3.3	La structure	26
1.3.4	L'expression	27
1.3.5	La localisation subcellulaire	28
1.3.6	La fonction	28
1.3.7	Les modèles murins	30
1.3.7.1	Les mutants perte de fonction.....	30
1.3.7.1.1	Le mutant <i>genetrap</i>	30
1.3.7.1.2	Les doubles hétérozygotes	34
1.4	AGO2	34
1.4.1	La famille AGO.....	34
1.4.2	Le gène	34
1.4.3	La structure	35
1.4.4	L'expression et la localisation subcellulaire.....	35
1.4.5	Les fonctions	35
1.5	ARB2A.....	37
1.5.1	La famille ARB2	37
1.5.2	Le gène	37
1.5.3	La structure	38
1.5.4	L'expression	39
1.5.5	La localisation subcellulaire	39
1.5.6	La fonction	40
1.5.7	Le modèle murin	40
1.5.7.1	Le modèle <i>Arb2a^{TP}</i>	40
1.5.7.1.1	La création et la caractérisation phénotypique.....	40
1.5.7.1.2	La caractérisation cellulaire et moléculaire.....	42
1.6	Les interactions entre ARB2A, CHD7 et AGO2	43
1.6.1	L'interaction ARB2A-CHD7-AGO2	43
1.6.2	L'interaction ARB2A-CHD7	43
1.6.3	L'interaction ARB2A-AGO2	43
1.6.3.1	La fonction du domaine NLS d'ARB2A	44
1.6.3.2	La fonction du domaine de phosphorylation d'ARB2A.....	44
1.6.3.3	La fonction du domaine d'homodimérisation d'ARB2A	44
1.6.3.4	Le rôle de l'interaction ARB2A-AGO2 dans le syndrome CHARGE	45
1.7	L'œil.....	45
1.7.1	La structure et la fonction.....	45
1.7.1.1	Le segment antérieur.....	45
1.7.1.2	Le segment postérieur	46
1.7.1.3	La rétine	48

1.7.2	Le développement de l'œil	49
1.7.3	Les différences entre l'œil humain et l'œil murin	53
1.7.4	Les CCN et le développement oculaire	54
1.8	Les voies de réponse au stress	55
1.8.1	La réponse ISR.....	56
1.8.2	La voie UPR	59
1.8.2.1	La branche IRE1.....	59
1.8.2.2	La branche PERK	61
1.8.2.3	La branche ATF6.....	61
1.9	La compensation génétique par l'adaptation transcriptionnelle	62
1.10	Problématique, hypothèses et objectifs	65
CHAPITRE 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES		67
2.1	Animaux	67
2.2	Génotypage et sexage	68
2.3	Colobome oculaire	68
2.4	Injection d'éthanol et d'acide rétinoïque	68
2.5	Observation des capacités respiratoires	69
2.6	Imagerie par résonance magnétique	69
2.7	Coloration du squelette	69
2.8	Coupe en paraffine et colorations H&E	69
2.9	Marquage immunohistochimique des neurofilaments	69
2.10	Marquage immunofluorescent	70
2.11	Immunobuvardage de type western.....	70
2.12	Cytométrie en flux et FACS	70
2.13	Culture cellulaire	71
2.14	Extraction de l'ARN	71
2.15	RT-qPCR.....	71
2.16	Analyse transcriptomique	71
2.17	Cut & Run	72
2.18	Analyse statistique	72
CHAPITRE 3 RÉSULTATS.....		73
3.1	Étude de l'influence de facteurs génétiques et non génétiques sur le développement phénotypique du syndrome CHARGE	73
3.1.1	Le fond génétique impacte les phénotypes associés aux CCN présentées par le modèle de souris <i>Arb2a^{TP}</i>	73

3.1.2	Le fond génétique module les anomalies associées au syndrome CHARGE chez le modèle de souris <i>Chd7^{Gt/+}</i>	76
3.1.3	Les modèles murins pour le syndrome CHARGE <i>Arb2a^{Tp/Tp}</i> et <i>Chd7^{Gt/+}</i> présentent des divergences phénotypiques	79
3.1.4	L'acide rétinolique et l'éthanol peuvent aggraver les phénotypes oculaires observés chez les modèles <i>Arb2a^{Tp/Tp}</i> et <i>Chd7^{Gt/+}</i>	82
3.2	Étude du rôle d'ARB2A dans le développement oculaire	85
3.2.1	Le modèle murin <i>B6Arb2a^{Tp/Tp}</i> présente de nombreuses anomalies oculaires	85
3.2.2	Chez <i>B6Arb2a^{Tp/Tp}</i> le spectre MAC présente un biais pour l'œil droit	89
3.2.3	Développement du spectre MAC chez les mutants <i>B6Arb2a^{Tp}</i>	91
3.2.4	Expression d'ARB2A au cours du développement oculaire	92
3.2.5	La diminution de l'expression d'ARB2A engendre l'aggravation des anomalies oculaires engendrées par la perte d'AGO2 dans les CCN	94
3.2.6	Plusieurs voies contribuant au développement oculaire sont dérégulées dans les CCN de <i>FVBArb2a^{Tp/Tp}</i>	94
3.2.7	L'acide rétinolique et l'éthanol aggravent de façon dose-dépendante les anomalies MAC chez <i>B6Arb2a^{Tp/Tp}</i>	96
3.2.8	L'expression de nombreux gènes du développement oculaire est à la hausse dans les cupules optiques droites des embryons <i>B6Arb2a^{Tp/Tp}</i>	97
3.3	Étude du mécanisme de compensation entourant la délétion d'ARB2A	101
3.3.1	Les mutants nuls d' <i>Arb2a</i> présentent des phénotypes beaucoup moins sévères que les mutants hypomorphes	101
3.3.2	La délocalisation d'AGO2 est conservée chez les mutants nuls <i>FVBArb2a^{GFP/GFP}</i>	104
3.3.3	Étude de l'implication de la voie ISR dans le mécanisme de compensation chez les mutants nuls <i>Arb2a^{GFP/GFP}</i>	105
3.3.4	Étude de l'implication de la voie UPR dans le mécanisme de compensation chez les mutants nuls <i>Arb2a^{GFP/GFP}</i>	107
CHAPITRE 4	DISCUSSION	111
4.1	Étude de l'influence de facteurs génétiques et non génétiques sur le développement phénotypique du syndrome CHARGE	111
4.1.1	Le fond génétique influence le développement phénotypique de modèles murins pour le syndrome CHARGE	111
4.1.1.1	Modificateurs des fonds génétiques B6 et FVB et interactions avec les allèles <i>Arb2a^{Tp}</i> et <i>Chd7^{Gt}</i>	112
4.1.1.2	Transposition du fond génétique chez l'humain	114
4.1.2	Les modèles murins du syndrome CHARGE <i>Arb2a^{Tp/Tp}</i> et <i>Chd7^{Gt/+}</i> présentent des dissimilarités phénotypiques	115
4.1.2.1	Des syndromes dans le syndrome... ..	115
4.1.2.2	...ou une unification sous un seul syndrome	117
4.1.2.3	Des anomalies aux canaux semi-circulaires caractéristiques comme signe phare d'une mutation de <i>Chd7</i>	117
4.1.2.4	ARB2A pourrait-il agir comme cofacteur de CHD7 dans la régulation de la transcription? ...	118
4.1.3	Des facteurs environnementaux pourraient influencer le développement <i>in utero</i> des anomalies associées au syndrome CHARGE	119

4.1.3.1 Interactions de l'éthanol et de l'acide rétinoïque avec les allèles <i>Arb2a^{Tp}</i> et <i>Chd7^{Gt}</i> ainsi qu'avec les différents fonds génétiques	119
4.1.3.2 Implications chez l'humain d'une susceptibilité développementale des fœtus CHARGE	120
4.1.4 Des facteurs encore inconnus influencent le développement phénotypique du syndrome CHARGE	121
4.2 Étude du rôle d'ARB2A dans le développement oculaire	122
4.2.1 ARB2A influence de nombreux aspects du développement oculaire	122
4.2.1.1 Réflexions sur l'hypopigmentation	122
4.2.1.2 Réflexions sur le glaucome et la perte des cellules ganglionnaires.....	124
4.2.2 Investigations des mécanismes sous-jacents au développement du spectre MAC chez le modèle <i>B6Arb2a^{Tp}</i>	125
4.2.2.1 Observations sur le spectre MAC.....	125
4.2.2.2 Les anomalies du spectre MAC présentées par le modèle <i>B6Arb2a^{Tp}</i> ont-elles pour origine une perturbation des CCN?	126
4.2.2.3 AGO2 est-il impliqué dans le développement du spectre MAC chez le modèle <i>Arb2a^{Tp}</i> ?	128
4.2.2.4 Importance relative de la dérégulation de l'expression et de l'épissage dans le développement des anomalies oculaires chez le modèle <i>Arb2a^{Tp}</i>	128
4.2.2.5 Pistes mécanistiques soulevées par le transcriptome des CCN d'embryons <i>FVBArb2a^{Tp/Tp}</i> au stade E10.5.....	129
4.2.2.6 Pistes mécanistiques soulevées par les injections intrapéritonéales d'AR et d'éthanol.....	131
4.2.2.7 Pistes mécanistiques soulevées par le transcriptome des cupules optiques d'embryons <i>B6Arb2a^{Tp/Tp}</i> au stade E11.5.....	132
4.2.3 Investigations des mécanismes responsables du biais droit chez le modèle <i>B6Arb2a^{Tp}</i>	133
4.2.3.1 Le biais droit observé chez <i>B6Arb2a^{Tp}</i> est-il associé à l'asymétrie viscérale?.....	134
4.3 Étude du mécanisme de compensation entourant la délétion d'ARB2A	135
4.3.1 Le mécanisme de compensation ne permet pas de corriger la délocalisation d'AGO2	135
4.3.2 La réponse ISR pourrait être impliquée dans la compensation observée chez <i>Arb2a^{GFP/GFP}</i>	136
4.3.3 La réponse UPR pourrait être impliquée dans la compensation observée chez <i>Arb2a^{GFP/GFP}</i>	137
4.3.3.1 ARB2A remplit une fonction au RE	137
4.3.3.2 La fonction d'ARB2A au RE est-elle associée à la voie UPR?	137
4.3.4 Réflexions sur le mode d'activation du mécanisme de compensation chez les mutants <i>Arb2a^{GFP/GFP}</i>	139
4.3.5 Est-ce que l'adaptation transcriptionnelle est à l'origine de la diminution des phénotypes observés chez <i>Arb2a^{GFP/GFP}</i> ?	140
4.3.6 Implication d'un mécanisme de compensation pour le syndrome CHARGE	142
4.4 Limites dans la transférabilité des résultats	142
CONCLUSION	144
ANNEXE A FIGURES SUPPLÉMENTAIRES	147
ANNEXE B TABLEAUX SUPPLÉMENTAIRES	154
APPENDICE A AUTRES CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES	163
RÉFÉRENCES	165

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Développement des cellules de la crête neurale.	5
Figure 1.2 : Prévalence des manifestations cliniques du syndrome CHARGE.....	9
Figure 1.3 : Variants pathologiques rapportés de <i>CHD7</i>	18
Figure 1.4 : Structure des protéines CHD7 chez l'humain et les organismes modèles.....	27
Figure 1.5 : Schéma des domaines fonctionnels d'AGO2.....	35
Figure 1.6 : Isoformes d'ARB2A chez l'humain.....	39
Figure 1.7 : Structure de l'œil et de la rétine.	47
Figure 1.8 : Développement de l'œil chez les mammifères.	50
Figure 1.9 : Développement vasculaire chez <i>Mus musculus</i>	53
Figure 1.10 : Contribution des CCN au développement et aux structures de l'œil.....	55
Figure 1.11 : Schéma de la réponse ISR.....	57
Figure 1.12 : Schéma de la réponse UPR.....	60
Figure 3.1 : Les phénotypes dérivés des CCN développés par le modèle murin <i>Arb2a^{Tp}</i> varient en fonction du fond génétique.	75
Figure 3.2 : Des différences phénotypiques sont identifiables entre <i>FVBChd7^{Gt/+}</i> et <i>B6Chd7^{Gt/+}</i>	78
Figure 3.3 : Dissimilarités phénotypiques entre les modèles pour le syndrome CHARGE <i>Arb2a^{Tp/Tp}</i> et <i>Chd7^{Gt/+}</i>	82
Figure 3.4 : Effets de l'éthanol sur les caractéristiques oculaires associées au syndrome CHARGE.....	85
Figure 3.5 : Effets de l'acide rétinoïque sur les caractéristiques oculaires associées au syndrome CHARGE.	87
Figure 3.6 : La lignée <i>B6Arb2a^{Tp}</i> présente de nombreuses anomalies oculaires.....	89
Figure 3.7 : Chez <i>B6Arb2a^{Tp}</i> , la M/A présente un fort biais pour l'œil droit.....	91
Figure 3.8 : Évolution du spectre MAC chez <i>B6Arb2a^{Tp}</i>	92
Figure 3.9 : ARB2A est exprimée de façon presque ubiquitaire lors du développement oculaire et dans l'œil adulte.....	94
Figure 3.10 : Interaction génétique entre <i>Ago2^{CKO}</i> et <i>Arb2a^{Tp}</i>	95

Figure 3.11 : L'acide rétinoïque et l'éthanol accentuent de façon dose-dépendante les anomalies oculaires observées chez la lignée <i>B6Arb2a^{TP}</i>	98
Figure 3.12 : De nombreux gènes connus du développement oculaire sont surexprimés dans les cupules optiques droites des embryons <i>B6Arb2a^{TP/TP}</i>	101
Figure 3.13 : Les mutants nuls <i>Arb2a^{GFP/GFP}</i> présentent des phénotypes moins pénétrants et moins sévères que les mutants hypomorphes <i>Arb2a^{TP/TP}</i>	104
Figure 3.14 : Le mécanisme de compensation chez <i>Arb2a^{GFP/GFP}</i> pourrait avoir pour origine l'activation de la réponse ISR via la surexpression d'ATF4.	107
Figure 3.15 : L'expression de plusieurs composantes de la réponse UPR semble dérégulée chez les mutants <i>Arb2a</i>	110
Figure S 1 : Séquence de l'ADN donneur monocaténaire employé pour générer le modèle <i>Arb2a^{GFP}</i>	147
Figure S 2 : Apparence des souriceaux <i>FVBChd7^{Gt/+}</i> atteints de mortalité néonatale (P0). Les souriceaux <i>FVBChd7^{Gt/+}</i> décédés présentent une coloration mauvâtre ainsi qu'une absence de tache de lait (flèche).	147
Figure S 3 : Expression et épissage différentiels chez <i>FVBArb2a^{TP/TP}</i> et <i>B6Arb2a^{TP/TP}</i>	148
Figure S 4 : Effet de l'acide rétinoïque et de l'éthanol sur le biais droit observé chez le modèle <i>Arb2a^{TP}</i>	149
Figure S 5 : Le modèle <i>B6Arb2a^{GFP/GFP}</i> présente des phénotypes de moindre pénétrance et sévérité que le modèle <i>B6Arb2a^{TP/TP}</i>	150
Figure S 6 : Régulation d'ATF4 par ARB2A.	151
Figure S 7 : Pigmentation des globes oculaires chez diverses lignées murines issues d'un même crible génétique par insertion d'un minigène de tyrosinase.	152
Figure S 8 : Voies de signalisation et facteurs de transcription régulant l'expression de <i>Mitf</i>	153

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Critères diagnostiques pour le syndrome CHARGE.	8
Tableau 1.2 : Recoupements phénotypiques et génotypiques entre le syndrome CHARGE et plusieurs diagnostiques connexes.	23
Tableau 1.3 : Modèles murins mutants de <i>Chd7</i>	31
Tableau 3.1 : Principales voies auxquelles appartiennent les gènes connus du développement oculaire dont l'expression est dérégulée dans les CCN d'embryons <i>FVBArb2a^{Tp/Tp}</i> au stade E10.5.	96
Tableau S 1 : Séquences des amorces utilisées pour le génotypage et le sexage.	154
Tableau S 2 : Programmes PCR employés pour le génotypage et le sexage.	155
Tableau S 3 : Liste des anticorps employés.	155
Tableau S 4 : Séquences des shARN employés.	156
Tableau S 5 : Séquences des amorces utilisées pour les expériences de qPCR.	156
Tableau S 6 : Évaluation des capacités respiratoires chez les lignées murines <i>Chd7^{Gt}</i>	157
Tableau S 7 : Types d'anomalies de l'oreille interne observées dans les modèles <i>Arb2a^{Tp/Tp}</i> et <i>Chd7^{Gt/+}</i>	157
Tableau S 8 : Gènes associés au développement de l'œil dont l'expression est dérégulée dans les CCN d'embryons <i>FVBArb2a^{Tp/Tp}</i> par rapport aux contrôles au stade E10.5.	158
Tableau S 9 : Gènes associés au développement de l'œil dont l'épissage est dérégulé dans les CCN d'embryons <i>FVBArb2a^{Tp/Tp}</i> par rapport aux contrôles au stade E10.5.	159
Tableau S 10 : Principales voies auxquelles appartiennent les gènes dont l'expression est dérégulée dans les cupules optiques d'embryons <i>B6Arb2a^{Tp/Tp}</i> à E11.5.	159
Tableau S 11 : Principales voies auxquelles appartiennent les gènes différentiellement exprimés entre les cupules optiques droites et gauches d'embryons <i>B6Arb2a^{Tp/Tp}</i> à E11.5.	160
Tableau S 12 : Caractéristiques de lignées mutantes pour l'orthologue d' <i>ARB2A</i> chez <i>C. elegans</i>	160
Tableau S 13 : Analyse d'ontologie génétique pour les gènes dont l'épissage est dérégulé dans les cupules optiques d'embryons <i>B6Arb2a^{Tp/Tp}</i> au stade E11.5 par rapport aux contrôles.	161
Tableau S 14 : Analyse d'ontologie génétique pour les gènes différentiellement épissés dans les cupules optiques droites et gauches d'embryons <i>B6Arb2a^{Tp/Tp}</i>	161
Tableau S 15 : Gènes présentant une similarité de séquence avec l'ARNm d' <i>Arb2a</i>	162

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

aa : Acide aminé

AGO : Argonaute

AR : Acide rétinoïque

Arb2 : *Argonaute binding protein-2*, protéine de liaison aux protéines argonaute 2

ARB2A : *ARB2 cotranscriptional regulator A*, régulateur cotranscriptionnel ARB2 A

B6 : C57Bl/6

BiFC : *Bimolecular fluorescence complementation*, complémentation de fluorescence bimoléculaire

CCN : Cellules de la crête neurale

C. elegans : *Caenorhabditis elegans*

CHD : Chromodomain-helicase-DNA-binding protein, protéine de liaison à l'ADN de type hélicase à domaine chromo

Co-IP : Co-immunoprécipitation

EX : Jour embryonnaire X

ENU : *N-ethyl-n-nitrosourea*, N-nitroso-n-éthylurée

EPR : Épithélium pigmentaire rétinien

EtOH : Éthanol

FACS : *Fluorescence-activated cell sorting*, tri cellulaire activé par la fluorescence

G4-RFP : Gata4p[5kb]-RFP

GFP : *Green fluorescent protein*, protéine fluorescente verte

Gt : *Genetrap*

GX : Jour de gestation X

H&E : Hématoxyline et éosine

HRP : *Horseradish peroxidase*, peroxydase du raifort

IRM : Imagerie par résonance magnétique

ISR : *Integrated stress response*, réponse intégrée au stress

M/A : Microphthalmie/anophtalmie

MAC : Microphthalmie, anophtalmie, colobome

MEFs : *Mouse embryonic fibroblasts*, fibroblastes embryonnaires de souris

MPO : Mésoenchyme périoculaire

N2a : Neuro2a

NLS : *Nuclear localisation signal*, signal de localisation nucléaire

NMD : *Nonsense-mediated decay*, dégradation des ARN messagers médiée par les codons stop prématurés

PX : Jour postnatal X

PBS : *Phosphate-buffered saline*, tampon phosphate salin

PFA : Paraformaldéhyde

PTC : *Premature termination codon*, codon de terminaison prématuré

qPCR : *Quantitative polymerase chain reaction*, réaction de polymérisation en chaîne quantitative

RE : Réticulum endoplasmique

RFP : *Red fluorescent protein*, protéine fluorescente rouge

shARN : *Short hairpin RNA*, petits ARN en épingle à cheveux

Tp : *Toupee*

UPR : *Unfolded protein response*, réponse aux protéines mal repliées

RÉSUMÉ

Le syndrome CHARGE est une maladie génétique rare caractérisée par des combinaisons très variables d'anomalies congénitales. Malgré plusieurs tentatives, seules quelques rares associations génotype-phénotype ont pu être identifiées avec succès. À ce jour, la grande variabilité phénotypique inter et intrafamiliale chez les patients CHARGE demeure donc largement inexpliquée. Dans cette thèse, l'étude comparative de deux modèles murins pour le syndrome CHARGE, *Arb2a*^{Tp/Tp} et *Chd7*^{Gt/+}, a été menée sur deux fonds génétiques distincts. Les résultats ont mis en évidence l'influence du fond génétique sur la présentation phénotypique des anomalies associées au syndrome CHARGE chez ces modèles. De plus, les dissemblances observées entre les deux modèles suggèrent que la nature du gène pathologique pourrait également prédisposer au développement de certaines caractéristiques au détriment d'autres. Finalement, l'administration d'éthanol et d'acide rétinoïque à des femelles gestantes a montré que des facteurs modulant l'environnement du fœtus peuvent influencer la sévérité de certaines anomalies associées au syndrome CHARGE.

Cette première étude a mis en lumière l'augmentation de la sévérité des anomalies oculaires chez le modèle *Arb2a*^{Tp/Tp} dans le fond génétique C57Bl/6. Ces souris présentent non seulement du colobome oculaire, critère majeur du syndrome CHARGE, mais également de la microphthalmie et de l'anophtalmie, et ce, avec un étonnant biais pour l'œil droit. Une caractérisation plus poussée a également permis d'identifier des anomalies additionnelles, soit de l'opacification de l'œil, de l'énophtalmie, de l'hypopigmentation et une déplétion de la couche des cellules ganglionnaires rétiniennes. Les mécanismes sous-jacents au développement de ces anomalies oculaires ne sont pas encore connus, mais les pistes identifiées comprennent l'implication du partenaire d'interaction d'ARB2A, AGO2, la perte des cellules de la crête neurale au mésenchyme périoculaire ainsi que des dérégulations spatiotemporelles, menant ultimement à la surexpression de gènes clés du développement oculaire dans la cupule optique droite des embryons *Arb2a*^{Tp/Tp}.

Suivant ces caractérisations du mutant hypomorphe *Arb2a*^{Tp/Tp}, un mutant nul, *Arb2a*^{GFP/GFP}, a été généré. Toutefois, alors qu'une aggravation des phénotypes associés au syndrome CHARGE était attendue chez ces mutants, ceux-ci se sont avérés au contraire très peu symptomatiques. L'observation d'un effet similaire chez *C. elegans* a mené à l'hypothèse qu'un mécanisme compensatoire pourrait être à l'œuvre chez les mutants nuls d'*Arb2a*, permettant à l'organisme de se développer normalement malgré l'absence

d'ARB2A. Les études réalisées ont soulevé l'hypothèse que, chez les mutants nuls, la levée de l'inhibition d'ARB2A sur ATF4 pourrait induire l'expression des gènes adaptatifs de la réponse intégrée au stress, permettant alors aux cellules de surmonter le stress induit par la perte d'ARB2A. Étant donné l'interaction d'ARB2A avec deux facteurs de la réponse aux protéines mal repliées, l'implication de cette dernière dans le mécanisme de compensation a également été soupçonnée. Les expériences réalisées n'ont pas permis de valider ou d'invalider ces hypothèses, mais appuient néanmoins une fonction alternative d'ARB2A au réticulum endoplasmique en lien avec la réponse aux protéines mal repliées.

Mots clés : ARB2A, CHD7, variabilité phénotypique, fond génétique, acide rétinoïque, éthanol, spectre MAC, biais droit, compensation, ISR, UPR

ABSTRACT

CHARGE syndrome is a rare genetic disorder characterized by highly variable combinations of congenital anomalies. Despite several attempts, only a few genotype-phenotype correlations have successfully been identified. Therefore, the high inter- and intra-familial phenotypic variability in CHARGE patients remains largely unexplained. In this thesis, a comparative study of two mouse models for CHARGE syndrome, *Arb2a*^{Tp/Tp} and *Chd7*^{Gt/+}, was conducted using two different genetic backgrounds. The results highlighted the influence of the genetic background on the phenotypic presentation of CHARGE-related abnormalities in these models. In addition, dissimilarities between the two models suggest that the causal gene may favor the development of certain features over others. Lastly, the administration of ethanol and retinoic acid to pregnant dams showed that factors modulating the fetus' environment can influence the severity of some CHARGE-associated anomalies.

This initial study highlighted the increased severity of ocular abnormalities for the *Arb2a*^{Tp/Tp} model in the C57Bl/6 genetic background. These mice do not only exhibit ocular coloboma, a major criterion of CHARGE syndrome, but also microphthalmia and anophthalmia, with a striking bias toward the right eye. Additional abnormalities included eye opacification, enophthalmos, hypopigmentation and depletion of the retinal ganglion cell layer. The mechanisms underlying these ocular abnormalities remain unknown. However, several hypotheses have emerged, including the involvement of the ARB2A-interacting protein AGO2, reduced neural crest cell contribution to the periocular mesenchyme, and spatiotemporal developmental dysregulation. These alterations may ultimately lead to the overexpression of key eye-development genes in the right optic cup of *Arb2a*^{Tp/Tp} embryos.

Following these characterizations of the hypomorphic mutant *Arb2a*^{Tp/Tp} a loss of function mutant, *Arb2a*^{GFP/GFP}, was created. However, while aggravation of the CHARGE syndrome associated phenotypes was expected in these mutants, they proved to be almost asymptomatic. The observation of a similar effect in *C. elegans* led to the hypothesis that a compensatory mechanism could be at work in *Arb2a* null mutants, allowing the organism to develop normally despite the lack of ARB2A. Studies have raised the hypothesis that, in null mutants, the removal of ARB2A's inhibition on ATF4 could induce the expression of integrated stress response adaptive genes, thereby allowing cells to overcome the stress induced by the loss of ARB2A. Given the interaction of ARB2A with two unfolded protein response factors, the involvement of the latter in the compensation mechanism has also been suspected. The experiments

carried out have not validated or invalidated these hypotheses but do support an alternative function of ARB2A at the endoplasmic reticulum in the context of the unfolded protein response.

Keywords : ARB2A, CHD7, phenotypic variability, genetic background, retinoic acid, ethanol, MAC spectrum, right bias, compensation, ISR, UPR

INTRODUCTION

Le syndrome CHARGE est une maladie génétique rare affectant environ 1 personne sur 10 000. L'acronyme CHARGE correspond aux principales caractéristiques initialement identifiées, ce syndrome ayant d'abord été décrit comme une association de colobome oculaire (Coloboma), de problèmes cardiaques (Hear problems), d'atrésie choanale (Atresia of the choanae), de retard de croissance et de développement (Retarded growth and development), d'anomalies génitales (Genital anomalies) et de défauts aux oreilles (Ear abnormalities). Toutefois, en raison de la forte variabilité phénotypique présentée par les patients CHARGE, les critères ont par la suite évolué à quelques reprises. Le syndrome CHARGE est majoritairement causé par une mutation de *CHD7*, mais des mutations de *EP300*, *KMT2D*, *PUF60*, *RERE*, *SEMA3E* et *ARB2A* peuvent également être en cause. La grande similarité génotypique et phénotypique entre le syndrome CHARGE et de nombreux autres syndromes peut rendre complexe le diagnostic de patients CHARGE, qui présentent des combinaisons hautement variables d'anomalies. Plusieurs études ont tenté de comprendre cette variabilité par des analyses de corrélation génotype-phénotype, mais elles ont rencontré peu de succès.

Dans un premier temps, une revue de littérature des sujets abordés dans cette thèse, parmi lesquels le syndrome CHARGE, le développement oculaire et les voies et réponse au stress, sera effectuée.

Par la suite, les résultats du premier objectif, identifier des facteurs qui influencent la présentation phénotypique du syndrome CHARGE, seront présentés. Ce volet s'attardera sur l'impact du fond génétique et du gène pathogène ainsi que sur l'effet de composés dérivés de l'alimentation.

Au cours du premier volet, de nombreuses anomalies oculaires ont été identifiées chez le modèle hypomorphe *B6Arb2a^{TP/TP}*, ce qui a mené à un second objectif : mieux comprendre le rôle d'ARB2A dans le développement oculaire. Le deuxième volet présente donc une caractérisation approfondie des phénotypes oculaires ainsi que les expériences entreprises pour éclairer les mécanismes sous-jacents aux anomalies observées chez *B6Arb2a^{TP/TP}*.

La nécessité d'un outil permettant de déterminer le patron d'expression d'ARB2A au cours du développement oculaire, de même que l'intérêt envers un mutant nul d'ARB2A, ont mené à la création du modèle *Arb2a^{GFP/GFP}*. Le dernier objectif de cette thèse porte donc sur l'étude de ce modèle. Au cours de

ce troisième volet, il sera caractérisé, puis des hypothèses mécanistiques expliquant l'absence de phénotype marqué seront investiguées.

Enfin, l'ensemble de ces résultats seront discutés. Les hypothèses en découlant, de même que les limites, implications chez l'humain et perspectives seront abordées.

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE

1.1 Les cellules de la crête neurale

1.1.1 Le développement des cellules de la crête neurale

Généralement étroitement associées avec l'évolution des vertébrés, les cellules de la crête neurale (CCN) sont connues pour leurs importantes capacités migratoires et de différenciation (Northcutt et Gans, 1983; Pauli, Bajpai et Borchers, 2017; Simoes-Costa et Bronner, 2015; York et McCauley, 2020).

Cette population a pour origine l'ectoderme. Au cours de la gastrulation, la plaque neurale (l'ectoderme neural), l'ectoderme épidermal (l'ectoderme non neural), et le mésoderme sous-jacent sécrètent des inducteurs de la crête neurale appartenant aux voies de signalisation BMP, WNT, FGF, NOTCH et de l'acide rétinoïque (AR) (Aybar et Mayor, 2002; Huang et Saint-Jeannet, 2004; Knecht et Bronner-Fraser, 2002; Pilon, 2021). Ces facteurs induisent l'expression de spécificateurs des bordures de la plaque neurale, PAX3/7, ZIC1, MSX1/2, DLX3/5, TFAP2 et PRDM1, qui définissent ladite bordure de la plaque neurale de part et d'autre de la plaque neurale, en contact avec l'ectoderme non-neural (Figure 1.1A) (Betancur, Bronner-Fraser et Sauka-Spengler, 2010; Hovland, Rothstein et Simoes-Costa, 2020; Martik et Bronner, 2017; Meulemans et Bronner-Fraser, 2004; Milet et Monsoro-Burq, 2012; O'Rahilly et Muller, 2007; Pilon, 2021; Pla et Monsoro-Burq, 2018; Rocha *et al.*, 2020; Rogers et Nie, 2018; Simoes-Costa et Bronner, 2015; Woda *et al.*, 2003; York et McCauley, 2020). Lors de la neurulation, la plaque neurale invagine (Figure 1.1B), puis se replie afin de former le tube neural (Figure 1.1C). Au cours de ce processus, sous l'action d'une nouvelle vague de signalisation BMP, WNT, FGF et de l'acide rétinoïque, les spécificateurs de la crête neurale, SOX5/9/10, FOXD3, ETS1, MYB, MYC, ID3, PAX3/7, TFAP2 et SNAIL1/2 sont induits. Ils spécifient l'identité des CCN désormais localisées à l'extrémité dorsale du tube neural (Figure 1.1C), leur permettent de maintenir leur multipotence, activent le programme de transition épithélio-mésenchymateuse, ce qui permet la délamination des CCN du neuroépithélium dorsal, et induisent un nouveau groupe de facteurs migratoires (Figure 1.1D). Le module de migration comprend ZEB2, HAND2, TWIST, SOX5/9/10, FOXD3, PAX3/7, TFAP2, SNAIL1/2, RHOB/U, CDH6/7/11, ID, MYB, Myc, RXRG et EBF1 (Hovland, Rothstein et Simoes-Costa, 2020; Kirby et Hutson, 2010; Martik et Bronner, 2017; Pilon, 2021; Rocha *et al.*, 2020; Rogers et Nie, 2018; Schussler *et al.*, 2021; Simoes-Costa et Bronner, 2015; York et McCauley, 2020). Sous l'action de ces facteurs, les CCN peuvent effectuer d'importantes migrations du segment dorsal du tube neural

jusqu'à leur tissu ou organe cible, guidées par divers signaux d'orientation de leur environnement (ex : chimioattractants, sémaphorines, éphrines, etc.) (Soto *et al.*, 2021; Theveneau *et al.*, 2010; Theveneau et Mayor, 2012). Lorsqu'elles atteignent leur destination finale, la plupart des CCN se différencient sous l'action de diverses voies de signalisation, facteurs de transcription et effecteurs spécifiques aux différents types cellulaires dérivés de la crête neurale, bien qu'une petite proportion de CCN souches/progéniteurs demeure dans certains organes (Pilon, 2021; Soto *et al.*, 2021).

Il est possible de définir cinq subdivisions de la crête neurale selon leur position le long de l'axe antéro-postérieur, soit la crête neurale crâniale, cardiaque, vagale, troncale et sacrale. Ces subdivisions sont caractérisées par des potentiels de différenciation (Figure 1.1E) et des patrons de migration régionaux variables (Le Douarin et Teillet, 1974; Pilon, 2021).

1.1.2 Les types cellulaires dérivés de la crête neurale

Les CCN sont parfois considérées comme un 4^e feuillet embryonnaire étant donné la vaste étendue des types cellulaires qui en sont dérivés (Figure 1.1E) (Hall, 2000). Les CCN crâniennes donnent naissance aux ostéocytes et chondrocytes de la majorité des os et cartilages du visage, aux odontoblastes et cémentoblastes des dents, aux ganglions sensoriels des nerfs crâniens V, VI, IX et X, aux adipocytes et fibroblastes dermaux et méningiens, aux cellules parafolliculaires de la glande thyroïde, aux cellules pigmentaires de la peau (mélanocytes, mélanophores, xanthophores et iridophores), au glomus carotidien, aux péricytes des méninges et à diverses structures de l'œil. Les CCN cardiaques, quant à elles, contribuent à différents types cellulaires et structures cardiaques, comme les péricytes et les cellules musculaires lisses cardiaques ainsi qu'à certaines portions du septum interventriculaire, tandis que les CCN vagales donnent lieu aux neurones et à la glie entériques, à des péricytes, des mélanocytes et des cellules mésenchymateuses. Les CCN troncales, pour leur part, contribuent également aux mélanocytes, mais aussi aux cellules chromaffines de la glande surrénale ainsi qu'aux neurones et aux cellules de Schwann du système nerveux périphérique. Finalement, les CCN sacrales peuvent se différencier en neurones et en glie entériques et parasymphatiques (Barlow, 2014; Brandon, Almeida et Powder, 2023; Huber, Kalcheim et Unsicker, 2009; Ji *et al.*, 2019; Lake et Heuckeroth, 2013; Lapedriza, Petratou et Kelsh, 2014; Mitsiadis et Graf, 2009; Newbern, 2015; Pilon, 2021; Prendergast et Raible, 2014; Rodrigues-Da-Silva *et al.*, 2022; Santagati et Rijli, 2003; Schilling et Le Pabic, 2014; Sommer, 2011).

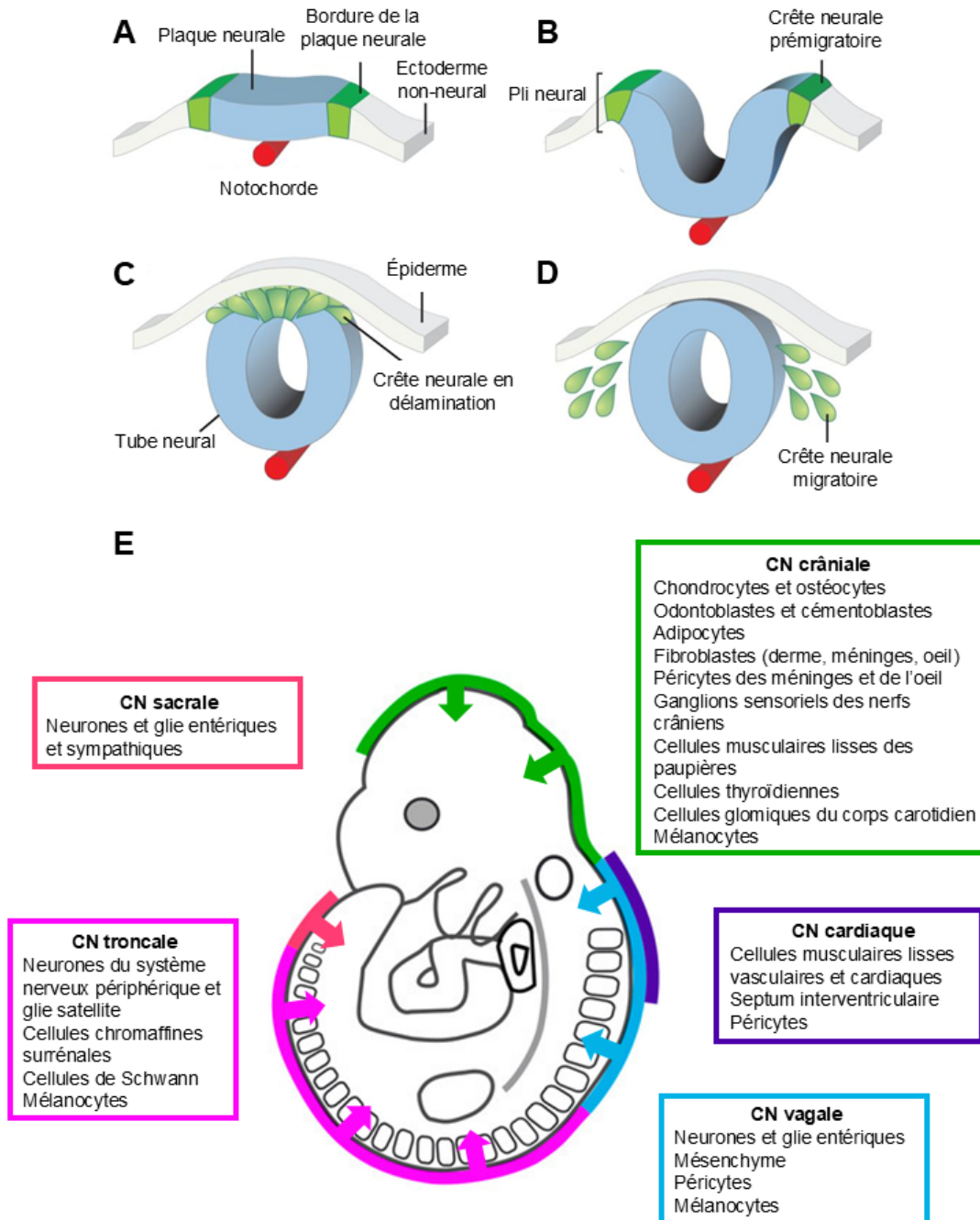


Figure 1.1 : Développement des cellules de la crête neurale.

(A) Au stade de gastrula, les bordures de la plaque neurale sont spécifiées à la jonction entre l'ectoderme non-neural et la plaque neurale. (B) Lors de l'invagination de la plaque neurale vers le tube neural, les progéniteurs de la crête neurale sont spécifiés sur la partie dorsale du pli neural. (C) Suivant formation du tube neural, les cellules de la crête neurale effectuent une transition épithélio-mésenchymateuse, puis délaminent et (D) migrent à partir du tube neural jusqu'à leur destination finale. (E) Schéma d'un embryon murin au stade E9.5. Suivant leur migration, les CCN se différencient en différents types cellulaires. Les principaux dérivés des CCN crânielles (vert), cardiaques (bleu foncé), vagales (bleu azur), troncals (violet) et sacrals (rose) sont listés dans les encadrés. Adaptée de (Ji *et al.*, 2019; Simoes-Costa et Bronner, 2015).

Les CCN contribuent ainsi directement au développement de certains tissus et organes (ex : peau, œil, oreille, cerveau, squelette crâniofacial, thymus, cœur, système nerveux périphériques, tractus gastro-intestinal et tractus urogénital) (Shyamala *et al.*, 2015). De plus, les CCN peuvent également avoir une contribution indirecte. Par exemple, la migration et la morphogenèse des structures sensorielles se fait conjointement à celles des CCN via une série d'interactions réciproques, lesquelles permettent notamment de diriger le comportement et la fonction des cellules non-CCN. (Pilon, 2021)

1.1.3 Les neurocristopathies

Le terme « neurocristopathies » regroupe les conditions induites par un défaut de développement, de migration, de survie, de division et/ou de différenciation des CCN. Étant donné la variété des tissus et systèmes auxquels contribuent les CCN, les neurocristopathies regroupent un large spectre de conditions, isolées ou syndromiques. La plupart des neurocristopathies, telles que le syndrome CHARGE, ont une origine génétique bien que des facteurs non génétiques puissent également être causatifs (ex : syndrome d'alcoolisme fœtal, déficience en vitamine A) (Bolande, 1974; Kanwar *et al.*, 2024).

1.2 Le syndrome CHARGE

1.2.1 L'incidence

Le syndrome CHARGE affecte entre 1/8 500 à 1/17 000 individus, en fonction des références consultées, bien qu'il soit plus fréquemment fait mention de 1/10 000 à 15 000 (Blake et Hudson, 2017; Hsu *et al.*, 2014; Issekutz *et al.*, 2005; Janssen *et al.*, 2012; Kallen *et al.*, 1999; Zentner *et al.*, 2010b).

1.2.2 Les perspectives historiques

Le syndrome CHARGE (OMIM# 214800) a initialement été décrit comme une association non aléatoire de colobome oculaire, défauts cardiaques, atrésie choanale, microcéphalie, retard mental, déficit de croissance, hypogénitalisme, oreilles de taille réduite et micrognathie par Hall, en 1979 (Hall, 1979). Au cours de la même année et de façon indépendante, Hittner décrit un groupe de patients présentant une association de microphthalmie colobomateuse, défauts cardiaques, retard mental et anomalies aux oreilles externes avec perte de l'audition (Hittner *et al.*, 1979). C'est pour cette raison qu'en certaines occurrences, on y ait fait référence sous l'appellation syndrome de Hall-Hittner (Graham *et al.*, 2005).

En 1981, Pagon propose l'acronyme CHARGE pour décrire la co-occurrence de colobome oculaire (Coloboma), défauts cardiaques (Hear defects), atrésie des choanes (Atresia of the choanae), retard de croissance et de développement et/ou anomalies du système nerveux central (Retardation of growth and development), anomalies génitales (Genital abnormalities) et défauts aux oreilles et/ou surdité (Ear anomalies), bien qu'initialement on y réfère comme à une « association » (Pagon *et al.*, 1981). Ce terme restera pendant plusieurs années, jusqu'au passage vers l'appellation « syndrome » suivant la confirmation d'une cause génétique (Hsu *et al.*, 2014).

Une origine génétique au syndrome CHARGE a en effet été suspectée pendant de nombreuses années en raison de rares cas familiaux, de co-occurrence chez les jumeaux monozygotes (ce qui n'était pas le cas chez les jumeaux dizygotes), d'âge plus avancé du père à la conception et de l'observation de plusieurs altérations chromosomiques parmi les patients CHARGE (Tellier *et al.*, 1998). Ce n'est toutefois qu'en 2004 que des mutations du gène *CHD7* ont été identifiées pour la première fois chez des patients CHARGE (Visser *et al.*, 2004).

1.2.3 Les critères diagnostiques

Pendant de nombreuses années, le syndrome CHARGE a été un diagnostic strictement clinique. En raison de la grande variabilité phénotypique présentée par les patients CHARGE, les critères employés ont toutefois fait l'objet de nombreuses variations, lesquelles sont détaillées dans le Tableau 1.1 (Amiel *et al.*, 2001; Blake *et al.*, 1998; Blake et Prasad, 2006; Dhooze *et al.*, 1998; Hale *et al.*, 2016; Mitchell *et al.*, 1985; Pagon *et al.*, 1981; Tellier *et al.*, 1998; Verloes, 2005).

Actuellement, le diagnostic du syndrome CHARGE consiste en un diagnostic clinique, basé sur une combinaison des critères de Blake et de Verloes. Le diagnostic moléculaire joue toutefois un rôle important, particulièrement lorsque la présentation clinique est incomplète, atypique ou ne satisfait pas entièrement aux critères diagnostiques (Tableau 1.1) (Basson et van Ravenswaaij-Arts, 2015).

Tableau 1.1 : Critères diagnostiques pour le syndrome CHARGE.

Adapté de (Thomas *et al.*, 2022).

	Critères majeurs	Critères mineurs	Règles d'inclusion
Pagon <i>et al.</i> (1981)	Atrésie choanale Colobome oculaire	Malformation cardiaque Retard (de croissance ou de développement) Anomalies génitales Anomalies aux oreilles	4 critères, dont 1 majeur
Blake <i>et al.</i> (1998)	Colobome oculaire Atrésie ou sténose choanale Anomalies des nerfs crâniens Anomalies caractéristiques des oreilles	Facès caractéristique Malformations cardiovasculaires Fistule trachéo-œsophagienne Défauts de croissance Hypoplasie génitale Fente labiale ou palatine Retard de développement	4 critères majeurs Ou 3 critères majeurs + 3 critères mineurs
Verloes <i>et al.</i> (2005)	Colobome oculaire Atrésie des choanes Hypoplasie des canaux semi-circulaires	Dysfonctionnement du rhombencéphale Dysfonctionnement de l'hypothalamo-hypophyse Anomalies aux oreilles externes ou internes Malformation des organes médiastinaux Retard mental	CHARGE typique : 3 critères majeurs Ou 2 critères majeurs + 2 critères mineurs CHARGE partiel : 2 critères majeurs + 1 critère mineur CHARGE atypique : 2 critères majeurs Ou 1 critère majeur + 2 critères mineurs
Hale <i>et al.</i> (2016)	Colobome oculaire Atrésie des choanes ou fente palatine Anomalies des oreilles externes, moyennes ou internes Variant pathogène de <i>CHD7</i>	Dysfonctionnement des nerfs crâniens (incluant la perte d'audition) Dysphagie ou difficultés d'alimentation Anomalies structurelles du cerveau Retard de développement, déficience intellectuelle ou autisme Dysfonctionnement hypothalamo-hypophysaire, anomalies génitales Malformation du cœur ou de l'œsophage Anomalies rénales Anomalies du squelette ou des membres	2 critères majeurs + 1 critère mineur

1.2.4 La présentation phénotypique

Le syndrome CHARGE se présente comme un ensemble complexe et hautement variable de multiples anomalies congénitales. D'un patient à l'autre, les diverses anomalies peuvent être absentes ou présentes avec divers degrés de sévérité (Hale *et al.*, 2016). L'occurrence exacte de ces diverses anomalies est incertaine, de grandes variabilités dans la pénétrance étant recensées d'une étude à l'autre. Pour le présent document, les valeurs présentées seront préférentiellement celles issues de la méta-analyse menée par Thomas *et al.*, en 2022, rassemblant les données de 1675 patients issus de 42 études, lorsque disponibles (Figure 1.2) (Thomas *et al.*, 2022).

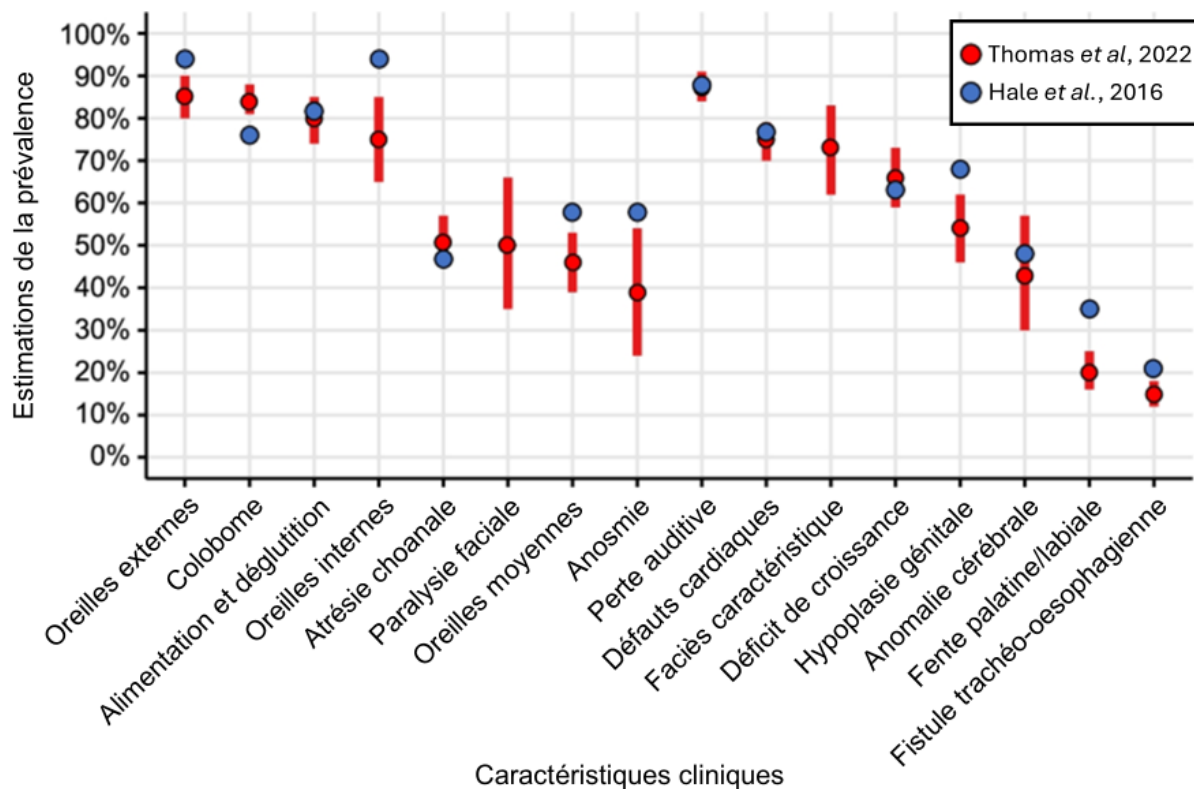


Figure 1.2 : Prévalence des manifestations cliniques du syndrome CHARGE.

Adaptée de (Thomas *et al.*, 2022).

1.2.4.1 Les anomalies oculaires

Le colobome oculaire correspond à la lettre C dans l'acronyme CHARGE (Pagon *et al.*, 1981). Malgré l'évolution des critères diagnostiques au fil du temps, le colobome demeure à ce jour parmi les critères

diagnostics majeurs du syndrome CHARGE (Legendre *et al.*, 2017). Il s'agit de l'anomalie oculaire la plus fréquemment observée dans ce syndrome (Kanwar *et al.*, 2024; Russell-Eggitt *et al.*, 1990).

Le colobome oculaire est une malformation congénitale résultant d'une fermeture incomplète de la fissure choroïdienne au cours du développement de l'œil. Il se caractérise par l'absence de tissu dans une ou plusieurs structures oculaires (l'iris, le corps ciliaire, la choroïde, la rétine, le nerf optique, etc.) (Kanwar *et al.*, 2024). Dans le contexte du syndrome CHARGE, le colobome est le plus souvent bilatéral (70–80 % des cas) et touche principalement le segment postérieur de l'œil. Il se présente majoritairement sous la forme d'un colobome chorio-rétinien (localisé au niveau de la choroïde et de la rétine) ou du nerf optique (57–83 %) (Aramaki *et al.*, 2006a; Dana *et al.*, 2023; Delahaye *et al.*, 2007; Issekutz *et al.*, 2005; Jongmans *et al.*, 2006; McMains *et al.*, 2008; Russell-Eggitt *et al.*, 1990; Sanlaville et Verloes, 2007; Sohn *et al.*, 2016; Tellier *et al.*, 1998). Plus rarement, le colobome affecte l'iris (0–26 %) (Aramaki *et al.*, 2006a; Jongmans *et al.*, 2006; McMains *et al.*, 2008; Russell-Eggitt *et al.*, 1990; Sohn *et al.*, 2016; Tellier *et al.*, 1998; Zentner *et al.*, 2010b).

Le colobome peut être sans effet sur la vision du patient ou, au contraire, lui porter atteinte s'il est localisé au niveau du nerf optique ou de la macula. Les colobomes chorio-rétinaux sont souvent la source de décollements rétiniens, phénomène induit par la faiblesse de la rétine en périphérie du colobome (Blake *et al.*, 1998; Lingam *et al.*, 2021; McMains *et al.*, 2008). De la microphthalmie (un œil de taille réduite) est également relativement fréquemment observée chez les patients CHARGE (11–43 %) conjointement au colobome oculaire, surtout en présence de colobomes chorio-rétinaux sévères (Bergman *et al.*, 2008; Blake *et al.*, 1998; Issekutz *et al.*, 2005; Jongmans *et al.*, 2006; Legendre *et al.*, 2017; McMains *et al.*, 2008; Russell-Eggitt *et al.*, 1990; Sohn *et al.*, 2016; Stromland *et al.*, 2005; Tellier *et al.*, 1998; Verloes, 2005).

Si le colobome correspond à l'anomalie oculaire prédominante du syndrome CHARGE, les patients peuvent également montrer d'autres types d'atteintes oculaires, telles que la microcornée (cornée de taille réduite), des anomalies réfractives de la vision (généralement la myopie), le nystagmus (mouvement saccadé et involontaire de l'œil) (18 %) et le strabisme (34–78 %) (Kanwar *et al.*, 2024; Nishina *et al.*, 2012; Tellier *et al.*, 1998; Zentner *et al.*, 2010b). Bien que moins fréquents, certains patients CHARGE présentant des cataractes (8–14 %) (Kanwar *et al.*, 2024; Russell-Eggitt *et al.*, 1990), du glaucome (Benson *et al.*, 2017; Kanwar *et al.*, 2024; Katai *et al.*, 1997), de la ptose congénitale (8 %) (Nishina *et al.*, 2012) ou de la photophobie (Blake *et al.*, 1998; Hsu *et al.*, 2014; Nishina *et al.*, 2012). Des anomalies palpébrales ont aussi

été identifiées. Elles incluent le colobome des paupières, l'ankyloblépharon (adhésion des paupières supérieures et inférieures) et l'hypoplasie des canaux lacrymaux (Russell-Eggitt *et al.*, 1990).

Les anomalies décrites ci-haut peuvent impacter la vision des patients CHARGE par une atteinte directe à l'œil (anomalies intraoculaires). La vision de ces patients peut également être affectée par une hypoplasie ou une paralysie du septième nerf crânial (CN VII) (8-89 %) (McMain *et al.*, 2008; Vissers *et al.*, 2004). Ainsi, d'un patient à l'autre, les capacités visuelles sont très variables, s'étendant d'une vision parfaitement saine à l'absence de détection de la lumière (Nishina *et al.*, 2012).

1.2.4.2 Les défauts cardiaques

Des défauts cardiaques congénitaux sont observés chez plus de la moitié des patients CHARGE (70-79 %) (Blake et Prasad, 2006; Sanlaville et Verloes, 2007; Thomas *et al.*, 2022). Les anomalies conotruncales (de la voie d'éjection du cœur), telle la tétralogie de Fallot, sont les plus fréquentes (Blake et Prasad, 2006; Sanlaville et Verloes, 2007).

1.2.4.3 L'atrésie des choanes, la fente orofaciale et autres anomalies des voies aériennes supérieures

L'atrésie des choanes affecte 45-57 % des patients CHARGE (Thomas *et al.*, 2022). Elle correspond à une obstruction des choanes, orifices localisés entre la cavité nasale et le nasopharynx. L'atrésie choanale se présente généralement de façon bilatérale avec une obstruction osseuse, mais peut également être unilatérale et/ou membraneuse (Blake et Prasad, 2006; Sanlaville et Verloes, 2007).

Le terme fente orofaciale réfère à la fente palatine et/ou à la fente labiale. Elles ont été identifiées chez 21-29 % des patients (Thomas *et al.*, 2022). Généralement, l'atrésie des choanes et la fente palatine ne sont pas co-occurentes (Blake et Prasad, 2006; Sanlaville et Verloes, 2007).

La présence d'une fistule trachéo-œsophagienne (connexion anormale entre l'œsophage et la trachée) affecte également une certaine proportion (14-20 %) des patients CHARGE (Thomas *et al.*, 2022)..

1.2.4.4 Le retard de croissance et de développement ainsi que les troubles du comportement

À la naissance, la plupart des patients CHARGE présentent un poids et une taille vers les faibles percentiles. Par la suite, un retard de croissance peut s'installer en raison des difficultés à s'alimenter, de problèmes

chirurgicaux et de dysfonctions de l'axe hypothalamo-hypophysaire (59-73 %) (Sanlaville et Verloes, 2007; Thomas *et al.*, 2022).

La plupart (77-91 %) des patients CHARGE montrent certains degrés de retard de développement qui peuvent être induit par les atteintes vestibulaires et visuelles. Les capacités cognitives varient grandement d'un individu à l'autre, allant d'un fonctionnement normal à une déficience intellectuelle sévère (54-75 %) (Blake et Prasad, 2006; Sanlaville et Verloes, 2007; Thomas *et al.*, 2022).

Les patients CHARGE peuvent développer des problèmes comportementaux, d'éducation et d'adaptation sociale. Ils sont fréquemment diagnostiqués avec des troubles obsessionnel-compulsif (14-57 %), un déficit d'attention avec hyperactivité, un syndrome de Tourette ou des troubles du spectre de l'autisme (16-41 %) (Blake et Prasad, 2006; Sanlaville et Verloes, 2007; Thomas *et al.*, 2022).

1.2.4.5 Les anomalies génitales

Des dysfonctions de l'axe hypothalamo-hypophysaire engendrent de l'hypogonadisme hypogonadotrope, de l'hypoplasie génitale (46-62 %) et des retards de puberté. L'hypoplasie génitale affecte plus fréquemment les mâles (80-90 %) que les femelles (15-25 %). Elle se présente sous la forme d'un micropénis et/ou de cryptorchidie. Chez les femelles, la principale caractéristique observée est l'hypoplasie des grandes lèvres. Dans les deux cas, la puberté peut être retardée, incomplète ou absente (Blake et Prasad, 2006; Hale *et al.*, 2016; Ragan *et al.*, 1999; Reynaert *et al.*, 2016; Sanlaville et Verloes, 2007; Thomas *et al.*, 2022).

1.2.4.6 Les défauts aux oreilles

Les patients CHARGE peuvent présenter des défauts des oreilles externes, moyennes et internes. Elles affectent respectivement 69-88 %, 35-66 % et 65-85 % des individus CHARGE (Thomas *et al.*, 2022). Pour les oreilles externes, le pavillon de l'oreille est souvent sujet à dysplasie. Les oreilles sont basses, asymétriques, antéversées, en forme de coupe et de taille réduite. Elles peuvent s'accompagner d'hypoplasie du conduit auditif (Blake et Prasad, 2006; Sanlaville et Verloes, 2007).

Les défauts pouvant affecter l'oreille moyenne consistent en l'absence du muscle de l'étrier, l'absence de la fenêtre ovale, l'hypoplasie de l'enclume ou de l'étrier ou la fixation de la chaîne ossiculaire (Blake et Prasad, 2006; Sanlaville et Verloes, 2007).

Pour l'oreille interne, les anomalies aux canaux semicirculaires sont extrêmement fréquentes chez les patients CHARGE, surtout chez ceux pour lesquels un variant pathologique de *CHD7* a été identifié. L'aplasie des canaux semicirculaires peut être combinée à la dysplasie de Mondini (malformation cochléaire) (Abadie *et al.*, 2000; Amiel *et al.*, 2001; Blake et Prasad, 2006; Verloes, 2005).

Les conséquences fonctionnelles de ces diverses problématiques sont la diminution ou la perte de l'audition (84-91 %), des infections/otites sévères et chroniques ainsi que des problèmes vestibulaires affectant l'équilibre et les capacités motrices (Blake et Prasad, 2006; Thomas *et al.*, 2022).

1.2.4.7 Les défauts du système nerveux central et les anomalies des nerfs crâniens

Les défauts du système nerveux central touchent 30-57 % des patients (Thomas *et al.*, 2022). Les plus communs sont l'arhinencéphalie et l'hypoplasie des bulbes olfactifs, cette dernière pouvant causer de l'anosmie (perte de l'odorat). De plus, environ 30 % des patients sont diagnostiqués avec de la microcéphalie (Chalouhi *et al.*, 2005; Legendre *et al.*, 2017; Pinto *et al.*, 2005; Sanlaville et Verloes, 2007).

La dysfonction des nerfs crâniens concerne la vaste majorité des patients CHARGE (94 %) (van Ravenswaaij-Arts et Martin, 2017). En fonction des nerfs affectés, les anomalies aux nerfs crâniens causent de l'anosmie (I), des difficultés à mastiquer (V), de la paralysie faciale (VII), de la surdité neurosensorielle (de perception) et des troubles de l'équilibre (VIII), de l'incoordination vélo-pharyngée (incapacité du voile du palais à effectuer la fermeture entre les cavités nasales et buccales) et de la dysphagie (difficulté à déglutir) (IX,X,XI). Les défauts aux nerfs crâniens contribuent ainsi aux risques d'aspiration, de reflux gastro-œsophagiens et aux bavements (IX, X, XI) ainsi qu'aux difficultés alimentaires (I, V, VII, IX, X, XI) (Blake *et al.*, 2008; Blake et Prasad, 2006; Byerly et Pauli, 1993; Lawand *et al.*, 2003; Lin, Siebert et Graham, 1990; Pagon *et al.*, 1981; White *et al.*, 2005).

1.2.4.8 Le faciès caractéristique

Les traits faciaux qui caractérisent les patients atteints du syndrome CHARGE (37-89 %) incluent un visage carré avec un front large et incliné, le centre du visage plat, l'arrête nasale haute avec la pointe nasale pleine et une proéminence de la columelle, une petite bouche avec la lèvre supérieure en forme de V inversé, de l'asymétrie faciale, des oreilles décollées, des sourcils arqués, de la ptose (affaissement des paupières dû à des anomalies du muscle releveur de paupières) et de la paralysie faciale, généralement unilatérale (Berube-Simard et Pilon, 2019; Blake *et al.*, 1998; Blake et Prasad, 2006; Davenport, Hefner et Mitchell, 1986; Granadillo *et al.*, 2021; Sanlaville et Verloes, 2007; Thomas *et al.*, 2022).

1.2.4.9 Les anomalies musculo-squelettiques

De la scoliose se développe chez plus de la moitié des patients CHARGE (19–36 %) (Doyle et Blake, 2005; Thomas *et al.*, 2022). Au niveau des dents, plusieurs anomalies ont été décrites, parmi lesquelles l'hypodontie ou agénésie ponctuelle (absence de 1 à 6 dents), l'oligodontie (absence de six dents ou plus) et le retard de l'éruption dentaire (Al, Cottrell et Hughes, 2002; Kanwar *et al.*, 2024; Sanlaville et Verloes, 2007).

1.2.4.10 La mortalité

La mortalité est fréquemment rencontrée chez les patients atteints du syndrome CHARGE. Elle survient principalement, mais non exclusivement, lors des premiers mois suivant la naissance (Blake *et al.*, 1990; Davenport, Hefner et Mitchell, 1986; Issekutz *et al.*, 2005; Oley, Baraitser et Grant, 1988). Ainsi, entre les 5 jours à 9 ans suivant la naissance, des études ont recensé de 13 % à 49 % de mortalité (Issekutz *et al.*, 2005; Tellier *et al.*, 1998). Il est estimé que 30 % des enfants atteints décèdent avant l'âge de cinq ans (Zentner *et al.*, 2010b). Une étude recense un biais mâle pour cette mortalité et suspecte également de la mortalité fœtale, mais ces éléments ne semblent pas avoir été relevés dans les études ultérieures (Tellier *et al.*, 1998).

Sans discrimination selon l'âge, les difficultés à s'alimenter, les malformations du système nerveux central, l'atrésie choanale bilatérale, la fente palatine et la fistule trachéo-oesophagienne représentent des causes majeures de mortalité (Bergstrom et Owens, 1984; Bosman *et al.*, 2005; Coniglio, Manzione et Hengerer, 1988; Issekutz *et al.*, 2005; Kaplan, 1985; Lin, Siebert et Graham, 1990; Tellier *et al.*, 1998). Plus précisément, la mortalité néonatale a été associée à des combinaisons de malformations ventriculaires majeures, d'atrésie choanale bilatérale, d'atrésie oesophagienne, de déficience sévère des cellules T et d'anomalies du système nerveux central. La mortalité postnatale, quant à elle, a été associée à des dysfonctions sévères des nerfs crâniens, engendrant entre autres des difficultés à avaler, des reflux gastro-oesophagiens et des problèmes respiratoires (Hudson, Trider et Blake, 2017). Finalement, de la fin de l'enfance à l'âge adulte, la mortalité est plus souvent induite par des étouffements ou de l'aspiration, des infections ou de l'apnée du sommeil centrale ou obstructive (Hefner et Fassi, 2017).

1.2.5 La prise en charge médicale

L'âge du diagnostic – et ainsi du début de la prise en charge médicale – est fortement lié à la survie, au bon développement et à la qualité de vie des patients, ces derniers pouvant nécessiter une prise en charge

médicale intensive ainsi que de nombreuses chirurgies (Basson et van Ravenswaaij-Arts, 2015; Bélanger *et al.*, 2018; Blake et Prasad, 2006; Hsu *et al.*, 2014; Stjernholm, 2003). Dans le syndrome CHARGE, la diversité des systèmes et organes affectés force le recours à une approche multidisciplinaire dans la prise en charge des patients (Blake et Prasad, 2006; Tellier *et al.*, 1998). Ainsi, les patients sont idéalement suivis très tôt par divers spécialistes tels un pédiatre généraliste, un cardiologue, un ophtalmologiste, un endocrinologiste, un généticien, un oto-rhino-laryngologiste, un immunologiste, entre autres (Hsu *et al.*, 2014).

Il n'existe actuellement pas de traitement curatif pour le syndrome CHARGE (van Ravenswaaij-Arts et Martin, 2017). Les techniques mises en place visent plutôt à corriger certaines anomalies spécifiquement et/ou améliorer la fonctionnalité (chirurgies cardiaques, tubes de gastrostomie, thérapies hormonales, etc.) (Blake *et al.*, 1998; Hsu *et al.*, 2014; van Ravenswaaij-Arts et Martin, 2017). De plus, plusieurs dispositifs peuvent être employés afin d'améliorer les capacités existantes, mais amoindries des patients (amplificateur auditif, dispositifs de communication, déambulateurs, etc.) (Hsu *et al.*, 2014; van Ravenswaaij-Arts et Martin, 2017). Chez plusieurs patients, des éducateurs et thérapeutes adaptés seront également mis à contribution afin d'agir sur les retards de développement, les anomalies du comportement et les difficultés à s'alimenter (Bernstein et Denno, 2005; Blake et Prasad, 2006).

En absence de traitement, l'idée générale est d'identifier rapidement et de corriger les enjeux pouvant mettre en danger la vie du patient et de leur apprendre à composer avec leurs handicaps pour en tirer un maximum de fonctionnalité (Blake *et al.*, 1998; Hsu *et al.*, 2014; van Ravenswaaij-Arts et Martin, 2017).

1.2.6 L'étiologie du syndrome CHARGE

1.2.6.1 L'origine cellulaire

Rapidement suite aux premières descriptions du syndrome CHARGE dans la littérature, la combinaison des différentes anomalies développées par les patients, lesquelles affectent majoritairement des tissus avec une contribution crête neurale, a été associée à des défauts aux CCN (Siebert, Graham et MacDonald, 1985; Tellier *et al.*, 1998; Wright *et al.*, 1986). Ce n'est toutefois que bien plus tard que l'implication des CCN dans la pathogenèse du syndrome CHARGE a été confirmée (Bajpai *et al.*, 2010). Les populations affectées sont principalement les CCN crânielles et cardiaques (Pauli, Bajpai et Borchers, 2017; Pilon, 2021).

Toutefois, l'hypothèse des CCN n'est pas supportée par tous. Certains argumentent que l'ensemble des défauts observés dans le syndrome CHARGE ne peut pas s'expliquer par une origine uniquement crête neurale (Corsten-Janssen *et al.*, 2013a; Williams, 2005). Par exemple, des anomalies rénales ou des malformations des membres sont observées chez certains patients, mais l'implication de la crête neurale lors du développement de ces structures n'est pas connue (Williams, 2005). Il en va de même pour certains défauts cardiaques, tels que les malformations septales atrioventriculaires ou le syndrome d'hypoplasie du cœur gauche (Corsten-Janssen *et al.*, 2013a). De plus, chez un modèle murin *Chd7^{xl/+}*, l'expression de CHD7 dans les CCN n'a pas permis la correction des défauts aux artères des arches pharyngiennes, contrairement à l'expression simultanée de CHD7 dans l'ectoderme pharyngien et les CCN (Randall *et al.*, 2009).

Une hypothèse antérieure portait sur la perte de l'interaction mésenchyme-épithélium (Allouche *et al.*, 1989; Kiernan *et al.*, 2002; Williams, 2005). Les interactions mésenchyme-épithélium sont requises pour le développement de la majorité des organes affectés dans le syndrome CHARGE, tels le palais et les choanes (Bosman *et al.*, 2005). L'expression de CHD7 est quant à elle élevée dans plusieurs types cellulaires épithéliaux (ex : épithéliums olfactif, pulmonaire et intestinal) et a été détectée à des niveaux moindres dans plusieurs types cellulaires mésenchymateux lors du développement fœtal (Bosman *et al.*, 2005).

La dernière hypothèse consiste en une combinaison des deux premières et propose que des perturbations des interactions entre le mésenchyme et la crête neurale sont potentiellement à l'origine des anomalies développées dans le cadre du syndrome CHARGE (Janssen *et al.*, 2012; Van Meter et Weaver, 1996; Williams, 2005).

1.2.6.2 L'origine génétique

1.2.6.2.1 CHD7

Chez la majorité des patients, le syndrome CHARGE est causé par une mutation hétérozygote du gène *CHD7*. Le pourcentage exact varie entre 30 % et 100 % selon les études, bien que des valeurs de 70 % et 90 % soient fréquemment rapportées (Aramaki *et al.*, 2006a; Aramaki *et al.*, 2006b; Asakura *et al.*, 2008; Felix *et al.*, 2006; Hale *et al.*, 2016; Hsu *et al.*, 2014; Jongmans *et al.*, 2006; Kanwar *et al.*, 2024; Lalani *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009; Sanlaville *et al.*, 2006; Vissers *et al.*, 2004; Vuorela *et al.*, 2007; Wessels *et al.*, 2010; Wincent *et al.*, 2008; Zentner *et al.*, 2010b). Des raisons qui expliquent ces divergences sont, dans un premier temps, les critères de sélections pour le recrutement des patients (diagnostic clinique vs

moléculaire, inclusion ou exclusion des patients CHARGE atypiques, etc.) et, dans un second temps, les techniques moléculaires employées ainsi que le type de mutations en jeu puisque des réarrangements, des mutations des régions régulatrices, des duplications ou des délétions complètes d'exons, par exemple, ne sont pas toujours recherchés ou détectables par les méthodes employées (Basson et van Ravenswaaij-Arts, 2015; Janssen *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2020).

La plupart des mutations de *CHD7* apparaissent *de novo*, bien qu'il existe certains cas familiaux (Bergman *et al.*, 2010a; Delahaye *et al.*, 2007; Jongmans *et al.*, 2006; Jongmans *et al.*, 2008; Kanwar *et al.*, 2024; Lalani *et al.*, 2006; Pauli *et al.*, 2009; Sanlaville et Verloes, 2007; Talkowski *et al.*, 2012; Vuorela *et al.*, 2007; Wincent *et al.*, 2008). La majorité des mutations de *CHD7* sont des mutations ponctuelles n'affectant qu'un seul nucléotide ou consistent en de courtes délétions (van Ravenswaaij-Arts et Martin, 2017). Les délétions d'exons ou du gène entier de même que les translocations engendrant une coupure de *CHD7* sont rares, peu de cas ont été recensés dans la littérature (Figure 1.3) (Basson et van Ravenswaaij-Arts, 2015; van Ravenswaaij-Arts et Martin, 2017; Wu *et al.*, 2022). Plus d'un millier de mutations pathologiques (ou présumées pathologiques) de *CHD7* ont été identifiées (Janssen *et al.*, 2012; Zentner *et al.*, 2010b). Selon la base de données CHD7.org, il est estimé que 78 % des mutations pathogéniques de *CHD7* engendrent des allèles nuls, consistant principalement en des mutations non-sens ou de type décalage du cadre de lecture (Figure 1.3)(Janssen *et al.*, 2012).

1.2.6.2.2 Les autres gènes causatifs du syndrome CHARGE

Bien qu'une mutation du gène *CHD7* demeure la principale cause du syndrome CHARGE, des mutations pathologiques dans de nouveaux gènes ont été identifiées au cours des dernières années. Ces gènes nouvellement associés au syndrome CHARGE sont *EP300*, *KMT2D*, *PUF60*, *RERE*, *SEMA3E* et *ARB2A*. *KDM6A* et *EFTUD2* ont également été évoqués, mais demeurent incertains. Les protéines encodées par ces gènes sont notamment des facteurs de la chromatine, des facteurs d'épissage et des facteurs de transcription (Bélanger *et al.*, 2018; Berube-Simard et Pilon, 2019; Lalani *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2019; Moccia *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2020).

Des délétions chromosomiques associées aux syndromes 22q11.2 et 5q11.2 ont également été décrites comme phénocopies du syndrome CHARGE, parmi d'autres mutations chromosomiques (Basson et van Ravenswaaij-Arts, 2015; Corsten-Janssen *et al.*, 2013b; Sanlaville et Verloes, 2007; Snijders Blok *et al.*, 2014).

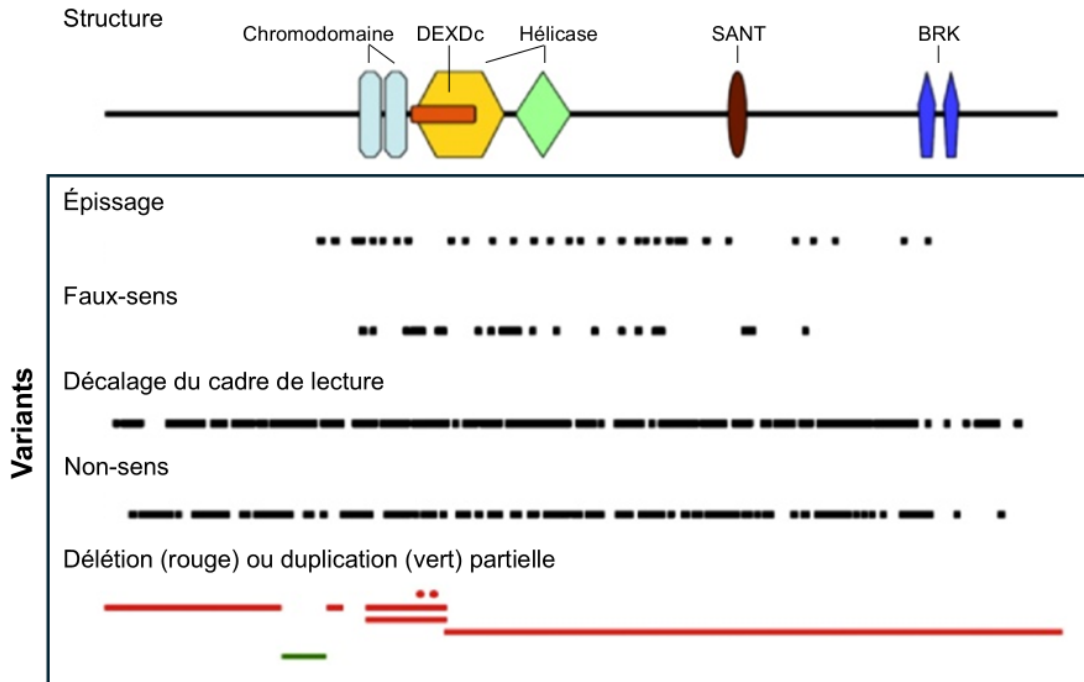


Figure 1.3 : Variants pathologiques rapportés de *CHD7*.

Adaptée de (Basson et van Ravenswaaij-Arts, 2015) et (Janssen *et al.*, 2012).

1.2.6.3 L'origine moléculaire

1.2.6.3.1 L'épissage alternatif et la transcription

Dans les CCN d'embryons *FVBArb2a^{Tp/Tp}*, un modèle murin pour le syndrome CHARGE, 1166 transcrits ont été identifiés comme étant différentiellement épissés par rapport aux embryons contrôles (Bélanger *et al.*, 2018). Dans les cellules progénitrices des neurones granulaires de souris *Atoh1-Cre::Chd7^{fl/+}* et *Atoh1-Cre::Chd7^{fl/fl}*, ce sont 208 et 226 gènes qui sont différentiellement épissés et 151 qui sont différentiellement exprimés (Feng *et al.*, 2017). Dans les deux modèles, les événements d'épissage alternatifs sont principalement caractérisés par l'excision d'exons ou la rétention d'introns. De plus, dans les têtes d'embryons E12.5 de modèles murins *Arb2a^{Tp/Tp}* et *Chd7^{Gt/+}*, une sous-expression des exons alternatifs de *Cd44*, *Mical2*, et *Ift74a* été identifiés. Plus intéressant encore, pour une cohorte de sept patients CHARGE incluant un patient portant une mutation de *CHD7* et deux patients apparentés (mère-enfant) portant respectivement une et deux mutations d'*ARB2A*, l'épissage de *Cd44*, *Mical2*, *Ift74* et *Col5a3* était sévèrement affecté dans les lignées lymphoblastoïdes dérivées (Bélanger *et al.*, 2018).

Dans les cellules Neuro2a (N2a), ARB2A a été localisé sur certaines régions transcrites de la chromatine contenant des sites d'épissage alternatif, comme cela avait été rapporté pour AGO2 (Ameyar-Zazoua *et al.*, 2012; Bélanger *et al.*, 2018). ARB2A et CHD7 ont également été localisés sur des régions similaires d'ARN pré-messagers. En conséquence, il a donc été proposé que l'épissage alternatif était un mécanisme pathogénique sous-jacent au développement des anomalies associées au syndrome CHARGE (Bélanger *et al.*, 2018; Bélanger *et al.*, 2022; Berube-Simard et Pilon, 2019).

Toutefois, en plus des 1166 transcrits présentant un épissage différentiel entre les CCN d'embryons contrôles et *FVBArb2a^{TP/TP}*, 3488 gènes sont également dérégulés au niveau de l'expression. Or, en lien direct avec une fonction connue de CHD7, la liaison à des régions amplificatrices (*enhancers*) et la régulation positive ou négative de la transcription selon les tissus, Schetz *et al.* proposent que la dérégulation de l'expression dépendante du contexte tissulaire est la cause sous-jacente au syndrome CHARGE. (Schnetz *et al.*, 2010). Dans l'article par Bélanger *et al.*, paru en 2018, il était d'ailleurs mentionné que la contribution relative des anomalies d'épissage et transcriptionnelle à la pathogenèse du syndrome CHARGE n'était pas connue. Toutefois, il y était également défendu que des défauts d'épissage sont suffisants pour engendrer les anomalies observées dans le cadre de neurocristopathies (Bélanger *et al.*, 2018).

1.2.6.3.2 L'import nucléaire d'AGO2

De récentes expériences mettant en évidence le rôle d'ARB2A dans la médiation du transport nucléaire d'AGO2 ont permis d'identifier que les défauts de prolifération et d'épissage alternatif présentés par les fibroblastes embryonnaires murins (MEFs, *mouse embryonic fibroblasts*) dérivés d'embryons *FVBArb2a^{TP/TP}* étaient corrigés en présence d'une version d'AGO2 contenant un signal de localisation nucléaire (NLS). Ces expériences ont donc suggéré que l'absence d'import d'AGO2 au noyau pouvait être une cause du syndrome CHARGE (Sallis *et al.*, 2023).

Chez la drosophile, Ago2 régule l'épissage alternatif de certains ARN pré-messagers précis et se lie à proximité des promoteurs de certains gènes dont il régule négativement l'expression (Taliaferro *et al.*, 2013). Dans les cellules de mammifères, AGO2 et AGO1 sont associés à des protéines de modification de la chromatine ainsi qu'à des facteurs d'épissage et leur recrutement à la chromatine engendre une augmentation de la méthylation H3K9 au site des exons variables. AGO1 et AGO2 facilitent le recrutement du spliceosome et agissent sur la vitesse d'élongation de la polymérase II, influençant ainsi l'épissage

alternatif (Ameyar-Zazoua *et al.*, 2012). Comme les fonctions nucléaires d'AGO2 sont ainsi associées à la régulation de l'expression génique et à l'épissage alternatif, il est donc possible que ces éléments soient liés en ce qui concerne la pathogenèse du syndrome CHARGE.

1.2.6.3.3 Les autres hypothèses moléculaires

Différentes hypothèses moléculaires ont également été proposées par d'autres équipes. Batsukh *et al.* ont démontré l'interaction directe et indirecte entre CHD7 et CHD8 (Batsukh *et al.*, 2010). Comme pour d'autres maladies, telles que la paraplégie spastique héréditaire et le syndrome de Cornelia de Lange, les partenaires d'interaction sont impliqués dans la pathogenèse, il a donc été proposé que la perte de l'interaction entre CHD7 et CHD8 au sein d'un complexe donné pourrait être un mécanisme sous-jacent au syndrome CHARGE (Melicharek *et al.*, 2010).

Finalement, suite à la découverte de la localisation de CHD7 au niveau des nucléoles, de sa liaison à l'ADNr et de la perte de l'expression des gènes codant pour les ARNr chez les mutants *Chd7*, l'équipe de Zentner *et al.* a quant à elle proposé que CHD7 est un régulateur positif de la biogenèse des ARNr. Comme le syndrome de Treacher-Collin, présentant de nombreuses similarités avec le syndrome CHARGE, est induit par des problèmes de synthèse des ARNr, ils ont donc proposé que la perte de la biogenèse ribosomale pourrait également être à l'origine du syndrome CHARGE (van Ravenswaaij-Arts et Martin, 2017).

1.2.7 Les cas familiaux

Les cas familiaux du syndrome CHARGE ont été rapportés, mais sont relativement rares, la majorité des mutations causatives du syndrome CHARGE consistant en des mutations *de novo*. Les cas familiaux présentent une étonnante variabilité phénotypique, et ce malgré le partage d'un même variant pathologique. Les jumeaux monozygotes (jumeaux identiques) n'y font pas défaut, présentant des combinaisons variables d'anomalies. Généralement, dans les cas familiaux parent-enfant présentant le même variant, l'enfant est plus fortement atteint alors que le parent ne présente que peu – ou pas du tout – d'anomalies (Bélanger *et al.*, 2018; Bergman *et al.*, 2011; Delahaye *et al.*, 2007; Jongmans *et al.*, 2008; Lalani *et al.*, 2006).

Le type de mutation le plus fréquemment observé chez les jumeaux monozygotes ou dans les fratries issues de parents non affectés (causé par du mosaïsme dans la lignée germinale du parent donneur) est une mutation non-sens. Pour les cas familiaux parent-enfant, les mutations faux-sens et les variants

d'épissage sont plus communs, possiblement en raison de la tendance des variants faux-sens à engendrer des phénotypes moins sévères (Bergman *et al.*, 2012)

1.2.8 Les corrélations génotype-phénotype

Les études réalisées jusqu'à présent ont éprouvé beaucoup de difficultés à identifier des corrélations phénotype-génotype pour le syndrome CHARGE (Bergman *et al.*, 2012; Dana *et al.*, 2023; Jongmans *et al.*, 2006; Jongmans *et al.*, 2008; Kanwar *et al.*, 2024; Lalani *et al.*, 2006; Legendre *et al.*, 2017; Legendre *et al.*, 2018; Sohn *et al.*, 2016; Thomas *et al.*, 2022; Zentner *et al.*, 2010b). De façon générale, des variants pathologiques de *CHD7* sont identifiés chez une proportion plus importante de patients CHARGE typiques que de patients CHARGE atypiques (83 % vs 58 %), bien que de nombreuses mutations délétères de *CHD7* soient également identifiées chez ces derniers (Bergman *et al.*, 2011; Lalani *et al.*, 2006; Legendre *et al.*, 2017; Sanlaville et Verloes, 2007). Certaines études ont identifié que les patients portant une mutation de *CHD7* présentent plus fréquemment des anomalies aux canaux semi-circulaires, des problèmes cardiaques, de la paralysie et/ou asymétrie faciale et des colobomes que les patients *CHD7* négatifs et qu'ils étaient moins prompts à développer un retard de croissance et/ou de développement (Lalani *et al.*, 2006; Zentner *et al.*, 2010b).

Concernant plus précisément les différents variants de *CHD7*, il a été rapporté que les mutations distales donnent lieu à des phénotypes plus légers que les mutations localisées en début ou en milieu de gène. De même, les variants non tronquants de *CHD7*, tels les variants faux-sens sont associés à des phénotypes moins sévères, avec une plus faible occurrence d'atrésie choanale, de fente orofaciale ou d'anomalies cardiaques que les variants tronquants (Bergman *et al.*, 2012; Dana *et al.*, 2023; Jongmans *et al.*, 2006; Legendre *et al.*, 2017). À l'inverse, les variants induisant le clivage du domaine SANT (*SWI3*, *ADA2*, *N-COR*, and *TFIIIB*) sont associés à des phénotypes oculaires plus sévères (Nishina *et al.*, 2012). Cependant, aucune corrélation plus précise n'a été identifiée (Bergman *et al.*, 2011; Delahaye *et al.*, 2007; Janssen *et al.*, 2012; Jongmans *et al.*, 2006; Jongmans *et al.*, 2008; Kanwar *et al.*, 2024; Lalani *et al.*, 2006; Tellier *et al.*, 1998; Wincent *et al.*, 2008). Des études de corrélations génotype-phénotype ne sont pas disponibles pour les autres gènes associés au syndrome CHARGE. Par conséquent, la grande diversité des présentations cliniques des patients atteints du syndrome CHARGE reste en grande partie inexpiquée.

1.2.9 Les conditions associées

Le syndrome CHARGE présente une similarité phénotypique avec de nombreux autres syndromes : Kallmann, Kabuki, DiGeorge (de délétion 22q11.2, vélocardiofacial ou de Cayler), VACTERL (association de VACTERL) Alagille, Pallister-Hall, Treacher Collins (dystose mandibulo-faciale), Feingold, Mowat-Wilson, rein-colobome, Goldenhar (oculo-auriculo-vertébral) et d'anophtalmie liée à *SOX2* (Tableau 1.2). Les embryopathies induites par des tératogènes (ex : acide rétinoïque, alcool ou diabète maternel) peuvent également engendrer des signes cliniques similaires à ceux du syndrome CHARGE (Blake *et al.*, 1998; de Lonlay-Debeney *et al.*, 1997; Dixon, Trainor et Dixon, 2007; Hsu *et al.*, 2014; Janssen *et al.*, 2012; Jongmans *et al.*, 2009; Kaplan et Hudgins, 2008; Kim *et al.*, 2008; Lettieri *et al.*, 2021; Moccia *et al.*, 2018; Ogata *et al.*, 2006; Sullivan, 2008; Sun *et al.*, 2022).

Parmi les gènes récemment associés au syndrome CHARGE, plusieurs sont également mutés dans d'autres troubles congénitaux, tels que les syndromes de Rubinstein-Taybi (*EP300*), de Kabuki (*KMT2D* et *KDM6A*), de Verheij (*PUF60*), de Kallman (*SEMA3A*) et de Nager (dystose acrofaciale de type 1) (*EFTUD2*), les troubles du développement associés à *RERE* (*RERE*) et la dystose mandibulofaciale de type Guion-Almeida (*EFTUD2*) (Tableau 1.2) (Berube-Simard et Pilon, 2019; Cariboni *et al.*, 2015; Moccia *et al.*, 2018; Scott et Sherr, 2019). Par ailleurs, des mutations de *CHD7* ont été identifiées chez des patients atteints des syndromes de DiGeorge et de Kallmann (Bergman *et al.*, 2011; Jongmans *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2008; Ogata *et al.*, 2006; Sanka *et al.*, 2007). Pour ce dernier, en raison du chevauchement important entre les anomalies présentées par ce syndrome et le syndrome CHARGE ainsi qu'en raison de l'implication de mêmes gènes pathologiques, parfois des exacts mêmes variants pathologiques, il a été évoqué que le syndrome de Kallmann pourrait consister en une forme légère du syndrome CHARGE (Bergman *et al.*, 2011; Janssen *et al.*, 2012; Jongmans *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2008; Ogata *et al.*, 2006; Sanlaville et Verloes, 2007).

Tableau 1.2 : Recoupements phénotypiques et génotypiques entre le syndrome CHARGE et plusieurs diagnostics connexes.

Adapté de (Berube-Simard et Pilon, 2019), additionné de (Hoogenboom *et al.*, 2024; Scott et Sherr, 2019; Van Gils *et al.*, 2021).

Pathologie	Caractéristiques cliniques*	Gène(s) en cause
Syndrome CHARGE (OMIM #214800)	Cardiaque (ex : malformations septales, persistance du canal artériel, tétralogie de Fallot) Cerveau (ex : agénésie du corps calleux, hypoplasie du bulbe olfactif, microcéphalie) Crâniofaciale (ex : visage carré, milieu du visage plat, asymétrie faciale, fentes palpébrales descendantes) Génito-urinaire (ex : cryptorchidie, hypogonadisme hypogonadotrope, agénésie de l'utérus, hypoplasie rénale) Immunologique (ex : hypoplasie du thymus, immunodéficience) Laryngopharyngée (ex : fistule trachéo-œsophagienne, hypoplasie des parathyroïdes) Nerfs crâniens (ex : paralysie faciale, troubles de la déglutition) Neurosensorielle (ex : anosmie, perte d'audition) Oreilles (ex : oreilles externes petites et en forme de coupe, canaux semi-circulaires hypoplasiques) Oronasale (ex : atrésie des choanes, fente palatine ou labiale) Retard de croissance et déficience intellectuelle Squelette (ex : scoliose, anomalies des membres et des mains) Yeux (ex : colobome, microphthalmie, strabisme, ptosis)	<u>Facteurs de la chromatine</u> <i>CHD7</i> (principal), <i>EP300</i>, <i>KMT2D</i>, <i>KDM6A</i> (incertain) <u>Interface chromatine-spliceosome</u> <i>ARB2A</i> <u>Facteurs d'épissage</u> <i>PUF60</i>, <i>EFTUD2</i> (incertain) <u>Facteurs de transcription</u> <i>RERE</i> <u>Autres</u> <i>SEMA3E</i>
Syndrome de délétion 22q11.2 / DiGeorge / vélocardiofacial (OMIM #188400)	Cardiaque (ex : malformations septales, persistance du canal artériel, tétralogie de Fallot) Crâniofaciale (ex : télécanthus, fissure palpébrale courte, micrognathie, pointe nasale carrée) Immunologique (ex : hypoplasie du thymus) Laryngopharyngée (hypoplasie des parathyroïdes) Neurosensorielle (perte d'audition) Oreilles (ex : oreille externe basse et anormalement pliée) Oronasale (ex : petite bouche, fente palatine) Retard de croissance et déficience intellectuelle	<u>Facteurs de la chromatine</u> <i>CHD7</i> <u>Facteurs de transcription</u> <i>TBX1</i> (principal)
Syndrome de Nager / Dystose acrofaciale de type 1 (OMIM #154400)	Crâniofaciale (ex : micrognathie, hypoplasie malaire, fissures palpébrales descendantes, rétrusion du milieu du visage) Oreilles (ex : oreille externe petite et anormalement pliée) Oronasale (ex : fente palatine/labiale) Sensorielle (perte d'audition)	<u>Facteurs d'épissage</u> <i>SF3B4</i> (principal), <i>EFTUD2</i> (incertain)

	Squelette (par exemple, anomalies des membres et des mains) Yeux (ex : colobome des paupières)	
Syndrome Kabuki (OMIM #147920, 300867)	Cardiaque (ex : malformations septales, persistance du canal artériel, tétralogie de Fallot) Cerveau (ex : microcéphalie) Crâniofaciale (ex : fissures palpébrales longues, sourcils arqués, pointe nasale large et déprimée, agénésie dentaire) Génito-urinaire (ex : puberté précoce) Immunologique (ex : déficit immunitaire) Oreilles (ex : oreilles externes grandes et anormalement pliées) Oronasale (ex : fente palatine) Retard de croissance et déficience intellectuelle Squelette (ex : scoliose, anomalies des membres et des mains) Yeux (ex : strabisme)	<u>Facteurs de la chromatine</u> <i>KMT2D</i> (principal), <i>KDM6A</i>
Syndrome de Kallmann (OMIM #308700, 147950)	Cerveau (ex : hypoplasie du bulbe olfactif) Crâniofaciale (ex : agénésie dentaire) Génito-urinaire (ex : cryptorchidie, hypogonadisme hypogonadotrope, agénésie rénale) Neurosensorielle (anosmie, perte auditive) Oronasale (ex : fente palatine/labiale) Retard de croissance et déficience intellectuelle	<u>Facteurs de la chromatine</u> <i>CHD7</i> <u>Autres</u> <i>FGFR1</i> (principal), <i>FGF8, KAL1, PROKR2, GNRH</i>
Dystose mandibulofaciale de type Guion-Almeida (OMIM #610536)	Cardiaque (ex : malformations septales, persistance du canal artériel) Cerveau (ex : microcéphalie) Crâniofaciale (hypoplasie de la face moyenne et des malaires, micrognathie, fissure palpébrale oblique) Laryngopharyngée (ex : fistule trachéo-œsophagienne) Oreilles (ex : oreilles externes basses et anormalement pliées, étiquettes préauriculaires, malformations de l'oreille interne, surdité de transmission) Oronasale (ex : atrésie des choanes, fente palatine) Retard de croissance et déficience intellectuelle	<u>Facteurs d'épissage</u> <i>EFTUD2</i>
Syndrome de Rubinstein-Taybi (OMIM #613684, 180849)	Cerveau (ex : microcéphalie, dysmorphie du corps calleux, hypoplasie du bulbe olfactif) Cardiaque (ex : malformations septales, persistance du canal artériel) Crâniofaciale (ex : fentes palpébrales descendantes) Cutanée (ex : hémangiome capillaire) Développement tumoral Génito-urinaire (ex : cryptorchidie, agénésie rénale)	<u>Facteurs de la chromatine</u> <i>EP300, CREBBP</i> (principal) <u>Co-activateurs de la transcription</u> <i>CREBBP</i> (principal)

	Immunologique (ex : immunodéficiences) Neurosensorielle (perte auditive) Oreilles (ex : oreilles externes basses et tournées vers l'arrière) Squelette (ex : anomalie des mains et des pieds, scoliose) Retard de croissance et déficience intellectuelle Yeux (ex : strabisme, ptosis, colobome)	
Syndrome de microdélétion 8q24.3 / Verheij (OMIM #615583)	Cardiaque (ex : malformations septales, coarctation aortique) Cerveau (microcéphalie) Crâniofaciale (ex : sourcils et cils proéminents, lèvre supérieure fine, nez retroussé) Génito-urinaire (ex : cryptorchidie, hypoplasie génitale, agénésie/hypoplasie rénale) Laryngopharyngée (laryngites récurrentes) Oreilles (ex : oreilles externes basses, perte auditive de transmission) Retard de croissance et déficience intellectuelle Squelette (ex : anomalies vertébrales, scoliose, laxité articulaire, anomalies des mains et des pieds) Yeux (ex : strabisme, colobome)	<u>Facteurs d'épissage</u> <i>PUF60</i>
Trouble du développement associé à RERE (OMIM #616975)	Cardiaque (ex : malformations septales) Cerveau (ex : dysmorphie du corps calleux) Génito-urinaire (ex : cryptorchidie, agénésie/hypoplasie rénale) Neurosensorielle (perte d'audition) Retard de croissance et déficience intellectuelle Squelette (ex : anomalies costales et vertébrales, scoliose) Yeux (ex : colobome, microphthalmie, strabisme, anomalies réfractives)	<u>Facteurs de transcription</u> <i>RERE</i>

Remarque : Toutes ces caractéristiques ne sont généralement pas présentes simultanément chez un même patient.

1.3 CHD7

1.3.1 La famille CHD

Chez les mammifères, CHD7 appartient à une famille de neuf protéines de liaison à l'ADN de type hélicase à domaine chromo (*Chromodomain-helicase-DNA-binding protein*) ayant en commun deux chromodomaines (domaines modificateurs de l'organisation de la chromatine), un domaine central ATPase hélicase Snf-like et un domaine de liaison à l'ADN (Hall et Georgel, 2007; Marfella et Imbalzano, 2007; Woodage *et al.*, 1997).

Les protéines CHD, via leur domaine ATPase, sont en mesure d'utiliser l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP afin de remodeler la structure de la chromatine, influençant par le fait même l'expression des gènes (Bouazoune et Kingston, 2012; Flaus et Owen-Hughes, 2001; Manning et Yusufzai, 2017). En effet, l'état condensé de la chromatine (hétérochromatine) réprime l'expression des gènes, les sites de liaisons à l'ADN étant difficiles d'accès pour les facteurs de transcription et la machinerie transcriptionnelle. À l'inverse, l'état relâché de la chromatine (euchromatine) permet l'accès à l'ADN aux facteurs de transcription et à la machinerie transcriptionnelle, favorisant ainsi la transcription. Les protéines CHD peuvent ainsi plier l'ADN, déplacer des nucléosomes ou les retirer afin de favoriser l'accès à l'ADN ou encore échanger des histones au cœur des nucléosomes afin de moduler les capacités d'interaction des nucléosomes avec l'ADN (Becker et Workman, 2013). Bien que leurs fonctions soient similaires, chaque membre de la famille CHD remplit une fonction spécifique unique qui ne peut pas être entièrement reprise par les autres protéines de cette famille (Bouazoune et Kingston, 2012; Flaus et Owen-Hughes, 2001; Manning et Yusufzai, 2017).

Les protéines CHD se divisent en trois sous-groupes, selon leur structure et leur séquence (Hall et Georgel, 2007; Marfella et Imbalzano, 2007). CHD7 appartient au sous-groupe III, avec CHD6, CHD8 et CHD9 (Batsukh *et al.*, 2010; Rodriguez-Paredes *et al.*, 2009).

1.3.2 Le gène

CHD7 est un gène hautement conservé. Des orthologues ont ainsi été identifiés chez la grenouille, le poisson-zèbre, la souris et le poulet notamment, mais non exclusivement (Aramaki *et al.*, 2007; Bajpai *et al.*, 2010; Bosman *et al.*, 2005).

Chez l'humain, le gène *CHD7* (OMIM# 608892) est localisé sur le chromosome 8 (8q12) avec une taille de 188 kb (Schnetz *et al.*, 2009). Chez la souris, *Chd7* est localisé sur le chromosome 4 et a une taille de 177 kb. La similarité de séquence entre l'humain et la souris est de 97 % (Bosman *et al.*, 2005). Tous deux possèdent 38 exons, le premier étant non-codant, avec une structure similaire au niveau des exons et introns (Bosman *et al.*, 2005; Layman, Hurd et Martin, 2010; Schnetz *et al.*, 2009).

1.3.3 La structure

Chez l'humain, le gène *CHD7* code pour une protéine de 2997 acides aminés, CHD7 (*chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7*), tandis que chez la souris il s'agit plutôt de 2985 acides aminés. Les

protéines présentent 96 % d'identité de séquence (Figure 1.4) (Bosman *et al.*, 2005; Layman, Hurd et Martin, 2010).

En son centre sont localisés un domaine ATPase/hélicase de type SNF2, associé au remodelage de la chromatine, et un domaine SANT, permettant la liaison aux queues des histones. Deux domaines BRK sont localisés à son extrémité C-terminale, mais leur fonction demeure méconnue (Figure 1.4) (Bosman *et al.*, 2005; Hall et Georgel, 2007; Hu *et al.*, 2025; Marfella et Imbalzano, 2007; Sanlaville et Verloes, 2007). Chez la souris, quatre domaines de localisation nucléaires (NLS, *nuclear localisation signal*) sont également répartis sur l'ensemble de la protéine (Bosman *et al.*, 2005).

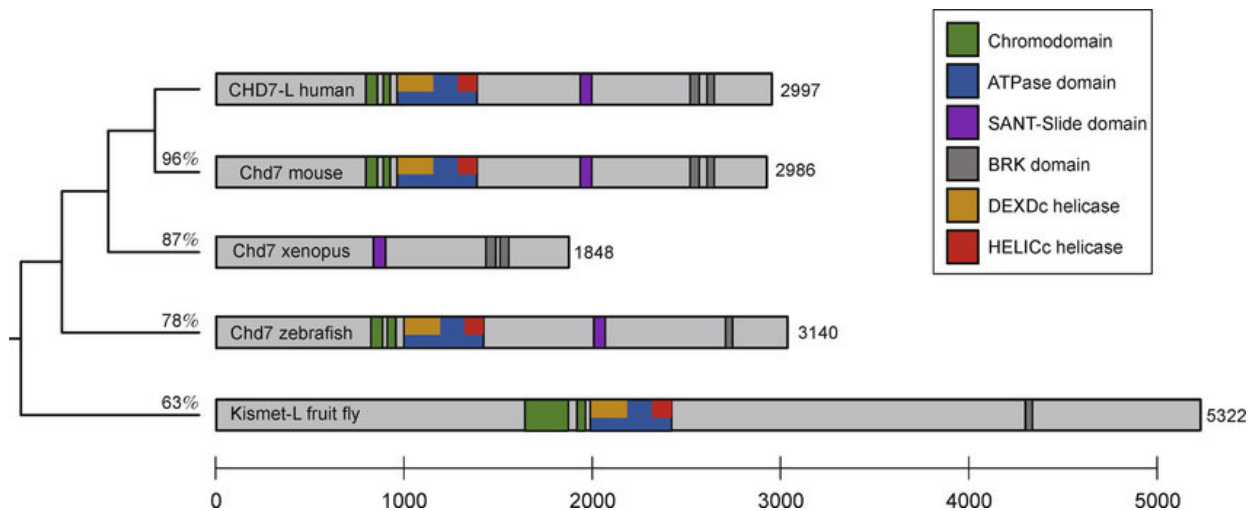


Figure 1.4 : Structure des protéines CHD7 chez l'humain et les organismes modèles.

Le pourcentage représente la proportion d'homologie avec la protéine CHD7 chez l'humain. Tirée de (Latcheva, Ghosh et Marena, 2016).

1.3.4 L'expression

L'expression de CHD7 varie en fonction des tissus et du stade embryonnaire. Ainsi, au stade embryonnaire, son expression est ubiquitaire chez l'humain et est distribuée chez la souris avec une forte intensité dans les tissus épithéliaux, les ganglions et diverses régions du cerveau et une expression plus réduite dans les tissus mésenchymateux. Par la suite, l'expression de CHD7 se restreint progressivement aux tissus affectés dans le syndrome CHARGE (Aramaki *et al.*, 2007; Bajpai *et al.*, 2010; Bosman *et al.*, 2005; Hurd *et al.*, 2007; Lalani *et al.*, 2006; Sanlaville *et al.*, 2006; Zentner *et al.*, 2010b). L'expression de CHD7 a ainsi été identifiée

dans le cerveau, (prosencephale, rhombencephale, hypophyse, bulbes olfactifs, ganglions des nerfs crâniens), la vésicule otique, l'oreille interne en développement, les canaux semi-circulaires, la vésicule optique, la neurorétine, la gaine du nerf optique, l'épithélium nasal, oral, stomacal, intestinal et pulmonaire, le système vasculaire du sac vitellin, les vaisseaux sanguins, les arches pharyngiennes et brachiales, les voies d'éjection du cœur, les neurones entériques, et les reins (Aramaki *et al.*, 2007; Bergman *et al.*, 2010b; Bosman *et al.*, 2005; Hurd *et al.*, 2007; Kosaki, 2011; Lalani *et al.*, 2006; Layman *et al.*, 2009; Sanlaville *et al.*, 2006; Sanlaville et Verloes, 2007; Vissers *et al.*, 2004).

1.3.5 La localisation subcellulaire

CHD7 est une protéine nucléaire (Machado *et al.*, 2019; Zentner *et al.*, 2010a). Elle se retrouve dans le nucléoplasme et si certaines études la localisent également dans les nucléoles, ce n'est pas systématique (Ahmad *et al.*, 2009; Brajadenta, Kitzis et Thoreau, 2019).

Dans un très grand nombre de types cellulaires, CHD7 lie des milliers de régions de la chromatine, lesquelles sont principalement associées à des gènes dont l'expression est spécifique à certains types cellulaires. La plupart des sites de liaison de CHD7 sur la chromatine sont distaux des sites d'initiation de la transcription et présentent des caractéristiques associées aux régions amplificatrices, telles que la marque H3K4me1 et la colocalisation de p300, une protéine de liaison aux séquences activatrices avérée (Melicharek *et al.*, 2010; Pauli, Bajpai et Borchers, 2017; Schnetz *et al.*, 2010; Zentner *et al.*, 2010a). CHD7 peut également lier les régions enrichies en résidus H3K4me au niveau des promoteurs (Melicharek *et al.*, 2010; van Ravenswaaij-Arts et Martin, 2017).

1.3.6 La fonction

La protéine CHD7 joue un rôle clé lors du développement embryonnaire. Au sein des cellules souches et autres types cellulaires, elle agit comme régulateur transcriptionnel via le remodelage de la chromatine. Grâce à son domaine ATPase, CHD7 peut utiliser l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP afin de réorganiser le positionnement des histones et/ou les éjecter, régulant ainsi l'accès de la machinerie transcriptionnelle à la chromatine et modulant conséquemment l'expression génique (Bajpai *et al.*, 2010; Bouazoune et Kingston, 2012; Pauli, Bajpai et Borchers, 2017; Schnetz *et al.*, 2009; Schnetz *et al.*, 2010). Cette régulation peut être positive ou négative. (Schnetz *et al.*, 2010).

L'activité de CHD7 dépend du type cellulaire et du stade de développement. (Schnetz *et al.*, 2010). Elle est médiée notamment par son interaction avec divers partenaires et elle cible de nombreux gènes codant pour des facteurs de transcription impliqués dans des voies développementales (Bouazoune et Kingston, 2012; Ogier *et al.*, 2014). Il a ainsi été proposé que CHD7 interagisse avec SOX10 pour réguler les gènes associés au développement des oligodendrocytes (He *et al.*, 2016) et avec PBAF pour la régulation des gènes promouvant le développement des CCN (ex : *SOX9*, *TWIST1*, *SNAI1*) (Bajpai *et al.*, 2010; Bélanger *et al.*, 2018; Janssen *et al.*, 2012). CHD7 est ainsi essentiel pour la formation de la crête neurale multipotente migratoire (Bajpai *et al.*, 2010). Son interaction avec PBAF serait également requise pour le développement des grands vaisseaux sanguins (Randall *et al.*, 2009). Dans les cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse, CHD7 s'associe à NLK, SETDB1 et PPAR γ au sein d'un complexe qui favorise la différenciation ostéoblastique (Takada *et al.*, 2007). En coopérant avec SOX2, CHD7 régule l'expression des gènes d'effecteurs des voies Shh (*Gli2*, *Gli3*, *Mycn* et *Tulp3*) et Notch (*Jag1*, *Rbpj* et *Hes5*) (Engelen *et al.*, 2011; Puc et Rosenfeld, 2011). Les voies Bmp et Fgf se retrouvent également parmi ses cibles (Layman, Hurd et Martin, 2011). Finalement, CHD7 régule le développement des cellules granulaires cérébelleuses en activant l'expression de la reeline ainsi que la neurogenèse et la morphogenèse de l'oreille interne en activant les gènes neurogéniques et morphogéniques (*Ngn1*, *Itx2* et *Fgf10*) (Hurd *et al.*, 2010; van Ravenswaaij-Arts et Martin, 2017). Globalement, l'ensemble précis des voies et gènes ciblés par l'action de CHD7 sont toutefois encore assez méconnues et émergent tranquillement (Chohra *et al.*, 2023; Hu *et al.*, 2025; Huang *et al.*, 2025; Janssen *et al.*, 2012; Krueger et Morris, 2022; Ogier *et al.*, 2014).

Si la régulation de l'expression génique par le remodelage de la chromatine est la principale fonction connue de CHD7, une étude chez la drosophile a pu démontrer que l'orthologue de CHD7, Kismet, agit également sur la transcription. CHD7 promeut le recrutement des méthyltransférases des histones ASH1 et TRX à la chromatine, ce qui permet de contrer l'inhibition par les protéines polycomb et favorise l'élongation par l'ARN polymérase II (Srinivasan *et al.*, 2005). CHD7 agit également dans certains tissus spécifiques comme régulateur positif de la biogenèse des ARNr (Zentner *et al.*, 2010a). Enfin, il a également été proposé que CHD7 participe à la régulation de l'épissage alternatif dans différents contextes spatiotemporels en impactant la vitesse d'élongation de l'ARN polymérase II et/ou en participant au recrutement de facteurs d'épissage (Allemand *et al.*, 2016; Bélanger *et al.*, 2018). Parmi ses partenaires d'interaction se trouve PARP1, également proposé pour jouer un rôle dans l'épissage alternatif via interaction avec des protéines de la chromatine, des ARN pré-messagers et des facteurs d'épissages (Matveeva *et al.*, 2016).

1.3.7 Les modèles murins

1.3.7.1 Les mutants perte de fonction

De nombreux modèles de souris portant une mutation dans le gène *Chd7* ont été générés au fil des années. La majorité dérivent de cribles utilisant l'ENU comme agent mutagène et consistent en des mutants perte de fonction supposés ou avérés (van Ravenswaaij-Arts et Martin, 2017). Ces lignées sont répertoriées dans le Tableau 1.3. Le modèle *Chd7^{Gt}*, utilisé lors de la présente étude, sera toutefois détaillé plus en détail ci-dessous.

De façon globale, les souris avec une mutation homozygote de *Chd7* meurent *in utero* tandis que les hétérozygotes présentent un taux de survie réduit avec de la mortalité précédant l'âge du sevrage (Tableau 1.3) (Bosman *et al.*, 2005; Hurd *et al.*, 2007; van Ravenswaaij-Arts et Martin, 2017). Pour tous les modèles répertoriés, les hétérozygotes présentent une perturbation de l'équilibre en raison de défauts aux canaux semicirculaires (Adams *et al.*, 2007; Bosman *et al.*, 2005; Hurd *et al.*, 2007; Randall *et al.*, 2009). La majorité d'entre eux présentent également un faible poids corporel postnatal ou une croissance réduite (Tableau 1.3) (Bosman *et al.*, 2005; Hurd *et al.*, 2007).

1.3.7.1.1 Le mutant *genetrap*

Le modèle *Gt(ROSAFARY)1Dmm* est caractérisé par une perte de fonction de *Chd7* induite via la technologie *genetrap* par l'introduction d'un vecteur d'expression pour la beta-galactosidase entre les exons 1 et 2, lequel peut agir comme rapporteur (Hurd *et al.*, 2007).

Les souris homozygotes *Chd7^{Gt/Gt}* meurent autour du jour embryonnaire E10.5, possiblement en raison de défauts cardiovasculaires (Tableau 1.3) (Hurd *et al.*, 2007). Les animaux hétérozygotes *Chd7^{Gt/+}* présentent une taille réduite, des anomalies génitales (retard de la puberté, cycles œstraux erratiques, diminution des niveaux de LH et FSH) ainsi qu'un nombre réduit de neurones GnRH dans l'hypothalamus (Layman, Hurd et Martin, 2011). Ces souris sont aussi marquées par des dysfonctions olfactives et de l'hypoplasie du bulbe olfactif (Layman *et al.*, 2009). Dans ce modèle, des comportements de *circling* et d'*head-bobbing* sévères témoignent de défauts vestibulaires importants. Les défauts recensés incluent le troncage ou l'aplasie des canaux semi-circulaires latéraux et postérieurs (Adams *et al.*, 2007; Hurd *et al.*, 2007). Bien qu'ils soient initialement viables, les souris *Chd7^{Gt/+}* montrent une réduction des effectifs à l'âge du sevrage, suggérant de la mortalité postnatale (Tableau 1.3) (Hurd *et al.*, 2007).

Tableau 1.3 : Modèles murins mutants de *Chd7*.

Maj, majoritaire; min, minoritaire; PTC, premature terminaison codon, codon de terminaison prématuré ¹ (Alavizadeh *et al.*, 2001; Bosman *et al.*, 2005; Nolan *et al.*, 1995; Pickard *et al.*, 1995; van Ravenswaaij-Arts et Martin, 2017) ² (Bosman *et al.*, 2005; Hawker *et al.*, 2005; Kiernan *et al.*, 2002) (van Ravenswaaij-Arts et Martin, 2017) ³ (Hawker *et al.*, 2005) (Hrabe de Angelis *et al.*, 2000) (Bosman *et al.*, 2005; Pau *et al.*, 2004; van Ravenswaaij-Arts et Martin, 2017) ⁴ (Bergman *et al.*, 2010b; Bosman *et al.*, 2005) ⁵ (Ogier *et al.*, 2018) ⁶ (Ogier *et al.*, 2014) ⁷ (Tian *et al.*, 2012) ⁸ (Jiang *et al.*, 2012) ⁹ (Lenz *et al.*, 2010) ¹⁰ (Adams *et al.*, 2007; Hurd *et al.*, 2007; Layman, Hurd et Martin, 2011) ¹¹ (Randall *et al.*, 2009; Skarnes *et al.*, 2004).

Modèle	Méthode	Fond génétique	Mutation	Homozygotie	Hétérozygotie
<i>Wheels</i> ¹	ENU	Mixte, C57Bl/6J (maj) Variable selon les anomalies étudiées	<i>Chd7</i> suspecté	Létal entre E10.5 et E11.5 Anomalies du prosencéphale et rhombencéphale Anomalies vasculaires	Mortalité avant le sevrage <i>Circling</i> Hyperactivité Défauts vestibulaires (troncage du canal latéral + réduction de l'ampoule, atteinte variable du canal + ampoule postérieurs) Cycle circadien étendu Réponse anormale à la lumière Microphthalmie
<i>Cyclone</i> <i>Dizzy</i> <i>Eddy</i> <i>Leda</i> <i>Metis</i> <i>Orbitor</i> <i>Tornado</i> ²	ENU	BALB/c (min) x C3H/HeN (maj)	Y263X (exon 2) Q1455X (exon 19) Q103X (exon 2) Y1066X (exon 13) IVS22-2A–G, site accepteur d'épissage, V1688X (exon 23) Y1315X (exon 16) IVS3+2T–C, site donneur d'épissage, H549X (exon 3)	Létal	<i>Circling</i> <i>Head-bobbing</i> Hyperactivité Défauts vestibulaires (troncage du canal latéral, atteinte variable du canal + ampoule postérieurs) * atteinte plus important chez Cyclone, Eddy et Tornado Pli dans la queue Cataractes Variables selon le modèle : Retard de croissance Atrésie des choanes Fente palatine Anomalies génitales Déficience olfactive Malformations cardiaques
<i>Carousel</i> <i>Flouncer</i> ³	ENU	C3HeB/FeJ	Non identifié IVS27+2T–C, site donneur d'épissage, S1864X (exon 28)		Mortalité avant le sevrage <i>Circling</i> <i>Head-bobbing</i> Hyperactivité Défauts vestibulaires (troncage du canal latéral, atteinte variable du canal + ampoule postérieurs) Anomalies génitales Kératoconjonctivite

					Variables : Retard de croissance Atrésie des choanes Fente palatine Déficience olfactive Malformations cardiaques
<i>Whirligig</i> ⁴	ENU	C3HeB/FeJ	W973X (exon 11)	Létal	Mortalité avant le sevrage <i>Circling</i> <i>Head-bobbing</i> Hyperactivité Défauts vestibulaires (troncage du canal latéral) Anomalies génitales Malformations cardiaques Fente palatine Atrésie des choanes Taille réduite Déficience olfactives sévères, hypoplasie du bulbe olfactif Diminution du gras corporel Kératoconjonctivite majoritairement dans l'œil droit
<i>Trooper</i> ⁵	ENU	BALB/c	c.3219-18T>A, site accepteur d'épissage, saut de l'exon 10 ou PTC (exon 10)	Létal embryonnaire	<i>Circling</i> (peu pénétrant) <i>Head-bobbing</i> Retard de croissance Anomalies vestibulaires (troncage du canal latéral, hypoplasie des canaux antérieurs et postérieurs) Déficience auditive Malformations de l'étrier <i>Décrit comme modèle CHARGE atypique</i>
<i>Looper</i> ⁶	ENU	BALB/c	S1897X (exon 29)		Mortalité avant le sevrage <i>Circling</i> Hyperactivité Retard de croissance Anomalies vestibulaires (troncage du canal latéral, hypoplasie des canaux antérieurs et postérieurs) Déficience auditive Malformations de l'étrier Asymétrie faciale Fente palpébrale étroite avec irritation (probable blépharoconjonctivite)
<i>Ome</i> ⁷	Spontanée	BALB/cByJ	Délétion des exons 2 et 3, PTC prédit (exons 2-3)		<i>Circling</i> <i>Head-bobbing</i> Taille réduite

					Déficiences auditives Défauts d'équilibre Otitis moyenne avec effusion Légère déformation crâniofaciale Légère diminution de la fertilité Conjonctivite sèche
<i>Coa1</i> (circling and ocular anomalies) ⁸	ENU	C57BL/6J	K719X (exon 4)	Létal à E10.5	Mortalité embryonnaire et post-natale <i>Circling</i> Hyperactivité Déficiences auditives Taille réduite Diminution de la fertilité Anomalies oculaires (non spécifiées)
<i>Volchok</i> ⁹	ENU	C3HeB/FeJ	Y1459X (exon 19)	Létal embryonnaire suspecté	<i>Circling</i> <i>Head-bobbing</i> Défauts vestibulaires (troncage du canal latéral et réduction de l'ampoule, anomalies des canaux antérieurs et postérieurs) Perte auditive modérée Incapacité à nager
<i>Gt(ROSAFARY)1Dmm</i> ¹⁰	Genetrap	C57BL6/J, 129S1/SvImJ	Insertion dans l'intron 1 (intron 1)	Létal à E10.5 Défauts cardiovasculaires possibles	Mortalité avant le sevrage <i>Circling</i> <i>Head-bobbing</i> Taille réduite Défauts vestibulaires (troncage ou aplasie des canaux latéral et postérieur) Déficiente olfactive Anomalies génitales Hypoplasie du bulbe olfactif
<i>Rrr134</i> ¹¹	Genetrap	C57BL/6	Insertion dans l'intron 4 (intron 4)	Létal par E11.5	<i>Circling</i> Défauts vestibulaires (troncage du canal latéral, atteinte variable du canal + ampoule postérieurs) Anomalies cardiovasculaires (défauts de l'artère du 4 ^e arc pharyngien)
<i>Xk403</i> ¹¹	Genetrap	C57BL/6	Insertion dans l'intron 36 (intron 36)	Létal par E11.5	Mortalité embryonnaire suspectée <i>Circling</i> Défauts vestibulaires (troncage du canal latéral, atteinte variable du canal + ampoule postérieurs) Anomalies cardiovasculaires (défauts de l'artère du 4 ^e arc pharyngien) Glande du thymus ectopique ou réduite

1.3.7.1.2 Les doubles hétérozygotes

Dans le cadre d'études sur le syndrome de Kallman et le syndrome de délétion 22q11.2, des mutants doubles hétérozygotes ont été réalisés à partir des mutants *Chd7 Whirligig (Whi)* ou *Xk403 (xk)* et des mutants pour les principaux gènes mutés dans ces syndrome, *Fgfr1* et *Tbx1* (Bergman *et al.*, 2010b; Randall *et al.*, 2009). Les souris *Chd7^{Whi/+} :: Fgfr1^{Hspy/+}* développent les mêmes anomalies que les simples hétérozygotes *Chd7^{Whi/+}*, mais avec une réduction de la survie (Bergman *et al.*, 2010b). Chez les souris *Chd7^{+/xk} :: Tbx1^{+/-}*, les anomalies cardiaques, aux oreilles internes et au thymus ont une pénétrance et/ou sévérité accrue et le taux de survie est réduit, tandis que pour les souris *Chd7^{Whi/+} :: Tbx1^{+/-}*, la sévérité des anomalies aux oreilles internes est encore une fois accrue. Ces résultats témoignent d'une synergie entre des allèles mutants de *Chd7* et des allèles mutants de gènes impliqués dans les syndromes de Kallman et de délétion 22q11.2 (Bergman *et al.*, 2010b; Randall *et al.*, 2009).

1.4 AGO2

1.4.1 La famille AGO

Chez l'humain et la souris, on recense huit protéines argonaute qui se divisent en trois sous-familles, AGO-like, PIWI-like (*P-element Induced Wimpy testis*) et WAGO (*Worm-specific Argonaute*) (Cerutti, Mian et Bateman, 2000; Sasaki *et al.*, 2003; Vaucheret, 2008; Yigit *et al.*, 2006). Chez les mammifères, il existe quatre protéines dans la sous-famille AGO. AGO2 est la protéine la plus abondante de cette famille, suivie par AGO1, puis AGO3 et AGO4 (Petri *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012). AGO2 est aussi la principale protéine AGO possédant une activité catalytique lui permettant de cliver les ARN cibles, bien qu'une activité catalytique ait également été identifiée en présence de certains miARN en particulier chez AGO3 (Liu *et al.*, 2004; Meister *et al.*, 2004; Muller, Fazi et Ciaudo, 2019; Nakanishi, 2022). Parmi ces paralogues, AGO2 est également le seul à être essentiel (Nakanishi, 2022).

1.4.2 Le gène

Le gène humain AGO2 (OMIM# 606229) est positionné sur le chromosome 8 (8q24.3) et fait une taille de 115 kb. Chez la souris, *Ago2*, d'une longueur de 83 kb, est localisé sur le chromosome 15 (15qD3) (Base de données UCSC).

1.4.3 La structure

Les domaines PAZ et MID d'AGO2 lui permettent respectivement de lier les extrémités 3' et 5' de petits ARN (Figure 1.5). Le domaine N, en N-terminal, est requis pour l'activité endonucléolytique d'AGO2 et permet de séparer les duplex formés par les petits ARN. Le domaine PIWI, en C-terminal, contient la tétrade de résidus catalytiques (DEDH) de l'activité endonucléase d'AGO2. Ces différents domaines sont reliés entre eux par des domaines L (linker), des domaines charnières (Figure 1.5) (Nakanishi, 2022; Schraivogel *et al.*, 2015).

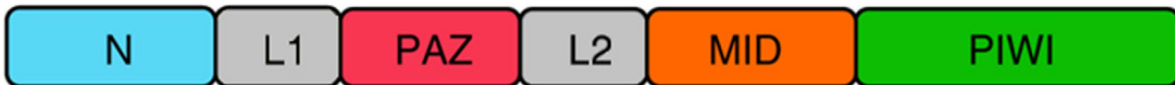


Figure 1.5 : Schéma des domaines fonctionnels d'AGO2.

Adaptée de (Lisitskaya, Aravin et Kulbachinskiy, 2018).

1.4.4 L'expression et la localisation subcellulaire

Les protéines AGO sont exprimées de façon ubiquitaire (Schraivogel *et al.*, 2015). Dans les cellules de mammifères, AGO2 alterne entre le cytoplasme, où elle peut accomplir sa fonction canonique au sein de la voie des ARNi (Hutvagner et Simard, 2008; Liu *et al.*, 2004), et le noyau, où elle remplit certaines fonctions non canoniques (Castel et Martienssen, 2013; Kalantari, Chiang et Corey, 2016; Nazer, Gomez Acuna et Kornblihtt, 2022; Rudel *et al.*, 2008; Schraivogel et Meister, 2014). AGO2 aurait également été identifié au RE avec une présence prédominante à la membrane (Li *et al.*, 2020). Sa distribution relative entre les compartiments varie en fonction du type cellulaire et des conditions de culture (Sarshad *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2016). AGO2 tend ainsi à s'enrichir au noyau au cours des processus de différenciation et de sénescence, de même que suite à l'exposition de la cellule à différents stress (Benhamed *et al.*, 2012; Castanotto *et al.*, 2018; Rentschler *et al.*, 2018; Sarshad *et al.*, 2018).

1.4.5 Les fonctions

AGO2 est une protéine capable de lier les petits ARN. Sa fonction canonique est d'agir comme composante catalytique du complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*), qui médie la répression génique post-transcriptionnelle. Deux types de petits ARN, les siARN (*small interfering RNAs*, petits ARN interférents) et les miARN (microARN) peuvent participer à cette régulation. Généralement, les miARN sont synthétisés

sous la forme de transcrits primaires (pri-miR), puis subissent un premier clivage en transcrits précurseurs (pré-miR) par Drosha. Suite à leur export au cytoplasme, les pré-miR et les siARN sont ensuite clivés par DICER au cours d'une seconde étape de maturation, générant alors des duplex. Ceux-ci sont chargés par une protéine AGO au sein du complexe RISC. Les brins du duplex sont séparés par la protéine AGO, ne conservant que le brin d'ARN guide qui permet l'appariement avec l'ARNm cible par complémentarité de séquence. Une complémentarité parfaite (siARN) ainsi qu'un complexe RISC incluant AGO2 entraîne le clivage de l'ARNm cible par l'activité endonucléase d'AGO2 tandis qu'une complémentarité imparfaite (miARN) mène à une répression de la traduction ou à une dégradation de l'ARNm par des facteurs externes au complexe. AGO2 participe ainsi au silençage (*silencing*) génique post-transcriptionnel (Muller, Fazi et Ciaudo, 2019; Ottens, Efstathiou et Hoppe, 2024; Wu *et al.*, 2020).

Toutefois, AGO2 remplit également des fonctions moins connues au noyau. Il y a d'ailleurs été identifié au sein d'un complexe RISC hautement similaire à celui caractérisé au cytoplasme, ciblant un bassin d'ARNm semblables et médiant le silençage de façon analogue. AGO2 nucléaire serait vraisemblablement également capable d'activité endonucléase, bien que cela ait peu été étudié. Les auteurs ont supposé que la fonction principale des protéines AGO au noyau était la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique, mais ils n'ont pas complètement rejeté un effet possible du chargement cotranscriptionnel d'AGO2 sur le transcrit naissant (Sala, Chandrasekhar et Vidigal, 2020; Sarshad *et al.*, 2018).

Si ces rôles impliquent le silençage post-transcriptionnel des gènes, certaines évidences indiquent qu'AGO2 peut également médier le silençage transcriptionnel des gènes, avec des effets à plus longs termes pouvant même être transmis aux cellules filles, par des mécanismes impliquant des agARN (small interfering antigen RNA) ainsi que des modifications de la chromatine, des protéines d'échafaudage et le complexe SWI-SNF (Li *et al.*, 2020; Taliaferro *et al.*, 2013). À l'inverse, des saARN (small activating RNAs) peuvent activer la transcription des gènes en ciblant leur promoteur. AGO2 se retrouve aux sites transcriptionnellement actifs de liaison de ces saARN, en contact avec le promoteur (Li *et al.*, 2020).

Des études ont également identifié une association entre AGO1 et AGO2 et des facteurs d'épissage. AGO1 et AGO2 facilitent le recrutement du splicéosome et agissent sur la vitesse d'élongation de la polymérase II, modulant ainsi l'épissage alternatif (Ameyar-Zazoua *et al.*, 2012). Chez la drosophile, Ago-2 régule d'ailleurs l'épissage alternatif de certains ARN prémessagers en particulier (Taliaferro *et al.*, 2013). AGO2

serait aussi un acteur essentiel de la communication entre le silençage génique par les miARN et la polyadénylation alternative, selon laquelle des sites de polyadénylation différentiels peuvent être employés, résultats en des ARNm de tailles variables (Li *et al.*, 2020).

AGO2 est impliqué dans le remodelage de la chromatine par différents mécanismes impliquant ou non des ARN guide. AGO2 participe ainsi à la méthylation de l'ADN, à la modification des histones (ex : H3K27me3, H3K9me3, H3K4me3, H4K16ac, etc.) et au remodelage topologique de la chromatine (Ameyar-Zazoua *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2020).

AGO2 se retrouve au sein de complexes au niveau de la *midzone* (zone médiane du fuseau mitotique). L'activité catalytique d'AGO2, en dehors de la voie des miARN, est essentielle lors de la cytokinèse pour permettre le bon fonctionnement du centromère et une ségrégation adéquate des chromosomes, assurant ainsi le maintien de l'intégrité lors de la division cellulaire (Pantazopoulou *et al.*, 2021; Sala, Chandrasekhar et Vidigal, 2020). Chez *Arabidopsis*, AGO2 recrute de petits ARN et, conjointement, ils contribuent à la résolution par recombinaison homologue des cassures double brins de l'ADN (Li *et al.*, 2020; Wei *et al.*, 2012).

Finalement, via des mécanismes impliquant diverses classes de petits ARN, AGO2 remplit une fonction cruciale dans la défense contre les infections virales basée sur l'ARN (Iki, Kawaguchi et Kai, 2023; Wu *et al.*, 2020), participe au contrôle des éléments transposables (Li *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2020) et contribue au bon déroulement de la spermatogenèse tardive (Iki, Kawaguchi et Kai, 2023).

1.5 ARB2A

1.5.1 La famille ARB2

La famille *ARB2* ne contient que deux membres, *ARB2A* et *ARB2BP*. Si *ARB2A* est codant, *ARB2BP* est classé comme un pseudogène, soit un gène inactif qui ne coderait pas pour une protéine (Base de données Ensembl).

1.5.2 Le gène

Chez l'humain, le gène *ARB2A* (*ARB2 cotranscriptional regulator A*) (OMIM# 621249), anciennement *FAM172A* (*Family With Sequence Similarity 172 Member A*), occupe la position Chr.5q15 et a une taille de 494 kb. Il partage 93 % d'homologie avec l'orthologue murin, localisé sur le chromosome 13 (13qC1), d'une

longueur de 458 kb (Base de données UCSC) (Bélanger *et al.*, 2018). Les ARNm sont transcrits à partir d'une région contenant 11 exons, le premier étant non codant (base de données Ensembl).

1.5.3 La structure

ARB2A code pour une protéine comprenant trois isoformes, respectivement nommées les isoformes courte (307 aa), moyenne (371 aa) et longue (417 aa) (Figure 1.6). Chez la souris, ces isoformes ont une longueur de 306, 370 et 416 acides aminés et partagent une homologie de séquence de 93 % à 94 % avec l'humain (Base de données Ensembl).

Les analyses bio-informatiques ont prédit de nombreux domaines fonctionnels. L'isoforme longue est la seule à posséder un peptide signal présomptif. Par contre, les trois isoformes ont en commun un signal de rétention au réticulum endoplasmique (RE) prédit (Figure 1.6). La séquence de ce signal (HEEL) ne correspond pas à un signal de rétention connu, comme KDEL ou HDEL, mais il a été reporté que cette séquence, lorsqu'additionnée à la GFP (GFP-HEEL), permettait sa rétention au RE (Capitani et Sallese, 2009; Derkx et Madrid, 2001; Lewis et Pelham, 1990; Munro et Pelham, 1987).

Toutes les isoformes possèdent également un grand domaine central Arb2, identifié selon son homologie avec la protéine Arb2 (Argonaute-binding protein 2) chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* (Figure 1.6) (Bélanger *et al.*, 2018; Buker *et al.*, 2007). Au sein de ce domaine sont localisés le domaine de dimérisation, le site de phosphorylation par CK2, le domaine de localisation nucléaire bipartite (NLS, *nuclear localization signal*) et le domaine sérine hydrolase de type estérase. Le segment du domaine Arb2 contenant le domaine de dimérisation est toutefois absent de l'isoforme courte (Figure 1.6). Si la fonctionnalité du domaine sérine-hydrolase a été validée par la sonde tétraméthylrhodamine (TAMRA)-fluorophosphonate et le résidu catalytique identifié (S294), le(s) substrat(s) de l'activité sérine-hydrolase d'ARB2A demeure(nt) inconnu(s) (Bélanger *et al.*, 2018).

La majorité de ces domaines sont fortement conservés entre les espèces, seul le domaine de rétention au RE, présent chez l'humain et la souris, fait défaut dans les espèces évolutivement plus anciennes tels le poisson-zèbre, la lamproie et le ver *C. elegans* (Bélanger *et al.*, 2018).

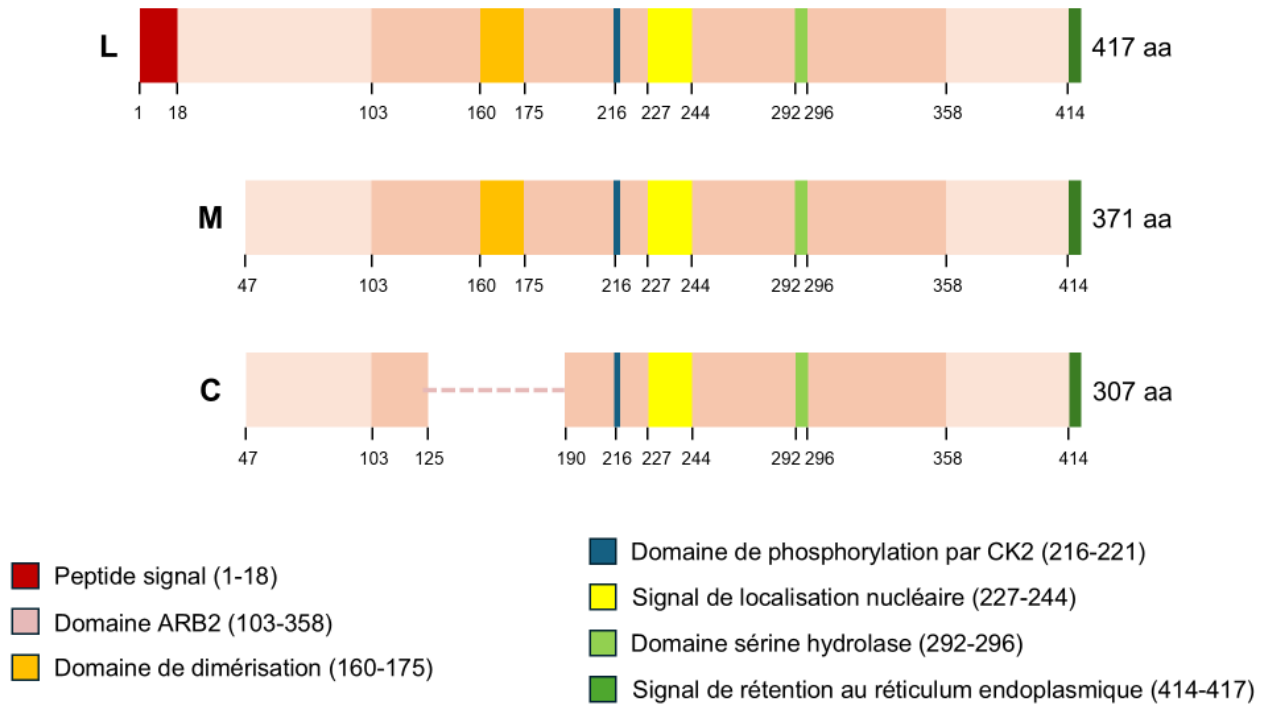


Figure 1.6 : Isoformes d'ARB2A chez l'humain.

L, longue ; M, moyenne; C, courte. Adaptée de (Sallis *et al.*, 2023).

1.5.4 L'expression

L'expression d'ARB2A semble presque ubiquitaire lors du développement embryonnaire. Des expériences d'immunobuvardage de type Western confirment l'expression des isoformes moyenne (majoritaire) et longue (minoritaire) dans la tête et le corps d'embryons murins entre E9.5 et E15.5 de même que dans des lignées cellulaires murines de neuroblastes (N2a), de fibroblastes (NIH 3T3) et de cellules souches embryonnaires (R1). Sans discrimination pour l'isoforme, des expériences de qPCR corroborent également l'expression d'ARB2A dans le corps et la tête d'embryons murins aux stades E10.5, E13.5 et E15.5 tandis que des marquages immunofluorescents montrent une expression distribuée dans l'embryon entier entre E9.5 et E12.5 (Bélanger *et al.*, 2018; Sallis *et al.*, 2023).

1.5.5 La localisation subcellulaire

Généralement, ARB2A est enrichie au noyau mais est également présent au cytoplasme. Cette localisation majoritairement nucléaire est induite par la présence du NLS, des mutations de celui-ci engendrant une localisation principalement cytoplasmique. Occasionnellement, un enrichissement est également observé

au niveau du RE, une localisation compatible avec la présence d'un peptide signal sur l'isoforme longue et d'un signal de rétention au RE sur l'ensemble des isoformes (Bélanger *et al.*, 2018; Sallis *et al.*, 2023).

1.5.6 La fonction

ARB2A peut lier l'ADN et l'ARN, bien qu'aucun domaine de liaison aux acides nucléiques connu n'ait été identifié dans sa structure, suggérant une liaison indirecte via un partenaire d'interaction (Bélanger *et al.*, 2018; Bélanger *et al.*, 2022). Des expériences de co-immunoprécipitation (co-IP) ont identifié de nombreuses protéines de la chromatine et facteurs d'épissage parmi les partenaires d'interaction d'ARB2A. Il a d'ailleurs été proposé qu'ARB2A forme un complexe avec CHD7 et AGO2 à l'interface entre la chromatine et le spliceosome. Chez le modèle *FVBArb2A^{Tp/Tp}*, la diminution de l'expression d'ARB2A engendre la dérégulation de l'expression d'environ trois mille gènes et de l'épissage alternatif d'un millier de transcrits suggérant qu'ARB2A participe à la régulation de la transcription et/ou de l'épissage alternatif cotranscriptionnel (Bélanger *et al.*, 2018; Bélanger *et al.*, 2022). Conjointement, ces éléments ont mené à l'établissement d'un modèle selon lequel le complexe auquel appartiennent ARB2A, CHD7 et AGO2 agit comme stabilisateur de l'interface entre la chromatine et le spliceosome lors de la transcription (Bélanger *et al.*, 2018).

Plus récemment, un rôle majeur d'ARB2A dans la régulation de l'import nucléaire d'AGO2 a été identifié (Sallis *et al.*, 2023), lequel sera décrit plus en détail dans la section 1.6.3..

1.5.7 Le modèle murin

1.5.7.1 Le modèle *Arb2a^{Tp}*

1.5.7.1.1 La création et la caractérisation phénotypique

Le modèle murin *Toupee* (*Arb2a^{Tp}*, anciennement nommé *Toupee^{Tg}* ou *Fam172a^{Tp}*) a été généré lors d'un crible génétique visant à identifier des gènes associés aux neurocristopathies (Bélanger *et al.*, 2018; Bélanger *et al.*, 2022; Pilon, 2016; Sallis, 2024). Selon une approche de génétique directe, un minigène de tyrosinase a été inséré dans le pronoyau de zygotes FVB/N, une lignée murine dépourvue de pigmentation en raison d'une mutation du gène de la tyrosinase (c.308C>G ; p.C103S), enzyme clé de la synthèse de la mélanine (Bélanger *et al.*, 2018; Pilon, 2016). L'insertion du minigène permet de rétablir la pigmentation dans la lignée FVB, tandis que son insertion dans un gène important au développement des CCN engendre un patron de pigmentation non uniforme en raison d'une atteinte aux mélanocytes, dérivés des CCN. Six

lignées présentant des anomalies de développement des CCN ont ainsi été identifiées sur la base de leur patron de pigmentation, dont la lignée *Arb2a^{Tp}* (Bélanger *et al.*, 2018; Pilon, 2016).

Chez la lignée *Arb2a^{Tp}*, l'insertion du minigène de tyrosinase est localisée dans le dernier intron d'ARB2A, engendrant un allèle hypomorphe. Chez les embryons *FVBArb2a^{Tp/Tp}*, une expression résiduelle de seulement 15 % est ainsi détectée (Bélanger *et al.*, 2018).

Lors du criblage, la lignée *Arb2a^{Tp}* a été identifiée en raison du pelage gris-brun orné d'une tache blanche sur la tête - rappelant un toupet - arboré par les souris hétérozygotes *FVBArb2a^{Tp/+}*. Hormis cette anomalie de pigmentation, les souris *FVBArb2a^{Tp/+}* ne présentent généralement pas d'anomalies supplémentaires (Bélanger *et al.*, 2018).

Le croisement de sujets *FVBArb2a^{Tp/+}* par *FVBArb2a^{Tp/+}* a subséquemment permis l'obtention de souris homozygotes, *FVBArb2a^{Tp/Tp}*. Ces derniers présentent une dépigmentation accrue, avec un pelage blanc, des oreilles grises ainsi que des yeux noirs. Ce modèle phénotype le syndrome CHARGE. Les souris *FVBArb2a^{Tp/Tp}* présentent les critères majeurs et mineurs associées à ce syndrome selon des combinaisons et des degrés de sévérité variables (Bélanger *et al.*, 2018).

Les souris *FVBArb2a^{Tp/Tp}* sont ainsi atteintes, avec une pénétrance incomplète, de colobome oculaire, de fente palatine et d'hypoplasie des canaux semicirculaires, qui s'inscrivent parmi les critères majeurs. Des comportements de *circling* ont également été observés parmi ces animaux, lesquels pourraient être la conséquence des défauts aux canaux semicirculaires (Bélanger *et al.*, 2018).

Parmi les critères mineurs, plus de 50 % des sujets *FVBArb2a^{Tp/Tp}* montrent un retard de croissance, des anomalies génitales (sous-fertilité, cryptorchidie, hypoplasie des vésicules séminifères, du pénis et des cornes utérines, retard de l'ouverture de la cavité vaginale, réversion sexuelle), des malformations cardiaques et des défauts des nerfs crâniens (germination/embranchement surnuméraires du nerf facial (VII) et enchevêtrement important des nerfs glossopharyngien (IX) et vagal (X)). Occasionnellement, des cas d'hypoplasie du thymus, d'hypoplasie des bulbes olfactifs accompagnée d'une diminution de l'odorat, de malformation crâniofaciale, d'atrésie partielle de l'oropharynx et de délais de fermeture des fontanelles ont été identifiés. Finalement, de très rares cas d'hypoplasie des reins, de malformation des oreilles externes, d'exencéphalie et d'hydrocéphalie ont aussi été recensés chez les souris *FVBArb2a^{Tp/Tp}* (Bélanger *et al.*, 2018).

Environ 20 % des souris $FVBArb2a^{Tp/Tp}$ décèdent entre la naissance et le jour postnatal 25 (P25). Chez la majorité des souriceaux décédés, la présence de bulles a été détectée dans le tractus gastro-intestinal. Conjugué à l'occurrence de défauts de l'oropharynx et des nerfs crâniens ainsi qu'au retard de croissance, cette observation suggère que plusieurs souris $FVBArb2a^{Tp/Tp}$ éprouvent des difficultés à s'alimenter (Bélanger *et al.*, 2018).

1.5.7.1.2 La caractérisation cellulaire et moléculaire

Chez le modèle $FVBArb2a^{Tp/Tp}$, étudié au stade E10.5, les CCN sont touchées par une diminution de la prolifération, une augmentation de l'apoptose, une diminution de la vitesse de migration et une perturbation de la directionnalité de celle-ci. La colonisation de l'intestin postérieur par les CCN vagues est ainsi retardée chez les embryons $FVBArb2a^{Tp/Tp}$ au stade E13.5, mais non au stade E15.5, suggérant que certains des défauts initiaux de migration sont ultérieurement compensés (Bélanger *et al.*, 2018).

Dans ces CCN d'embryons $FVBArb2a^{Tp/Tp}$ à E10.5, 3488 gènes sont dérégulés d'au moins 1.5 fois, soit 2151 à la hausse et 1337 à la baisse. Par analyse d'ontologie génétique, ces gènes ont été associés à des processus métaboliques, à la différenciation cellulaire et à la morphogenèse, à la signalisation cellulaire, à la motilité cellulaire et au transport, au contrôle de la population cellulaire, à l'expression génique et au développement du système nerveux. En axant l'analyse sur le réseau de gènes régulateur des CCN, 106 gènes dérégulés, majoritairement (91 %) à la baisse, ont été identifiés, couvrant l'entièreté des aspects développementaux associés aux CCN, de l'induction à la formation de structures (squelette crâniofacial, système nerveux entérique), en passant par le *patterning* antéropostérieur, la délamination, la migration et la différenciation (neurones périphériques et cellules gliales, mélanocytes) (Bélanger *et al.*, 2018).

Pour les CCN, 1166 transcrits présentant des variations de l'épissage ont également été identifiés. Ces anomalies d'épissage se déclinent principalement en des exons exclus (52.4 %) et des introns conservés (31.5 %), mais incluent également des sites d'épissage 3' (7.8 %) et 5' (5.9 %) alternatifs ainsi que des exons mutuellement exclusifs (2.3 %). L'analyse d'ontologie génétique pour ces événements d'épissage alternatifs met en évidence six des sept catégories précédemment identifiées pour les gènes différentiellement exprimés, soit les processus métaboliques, la mobilité cellulaire et le transport, l'expression génique, le contrôle de la population cellulaire et la différenciation cellulaire et morphogenèse (Bélanger *et al.*, 2018).

Par comparaison croisée, un chevauchement de 350 transcrits appartenant à 259 gènes différents a été recensé entre les deux types de dérégulations. Cela représente 30 % des transcrits épissés de façon erronée et 7.4 % des gènes dont l'expression est dérégulée (Bélanger *et al.*, 2018).

1.6 Les interactions entre ARB2A, CHD7 et AGO2

1.6.1 L'interaction ARB2A-CHD7-AGO2

Il a été démontré par co-IP que CHD7 peut se lier à ARB2A et AGO2 dans des conditions de faible stringence. En fait, la présence exogène de _{Myc}ARB2A semble favoriser l'interaction entre CHD7 et AGO2 (Bélanger *et al.*, 2018).

1.6.2 L'interaction ARB2A-CHD7

Chez la souris, il a été démontré que l'allèle *Arb2a^{Tp}* interagit génétiquement avec l'allèle *Chd7^{Gt}* dans un fond génétique mixte (Bélanger *et al.*, 2018). Ainsi, en comparaison avec les souris simples hétérozygotes *Arb2a^{Tp/+}* ou *Chd7^{Gt/+}*, les souris double hétérozygotes *Arb2a^{Tp/+} :: Chd7^{Gt/+}* présentent une taille réduite, une pénétrance plus élevée de *circling* et de réversion sexuelle, une aggravation du colobome oculaire, de la mortalité néonatale accrue et une potentielle mortalité *in utero* (Bélanger *et al.*, 2018).

1.6.3 L'interaction ARB2A-AGO2

Antérieurement, la colocalisation d'ARB2A et d'AGO2 et la présence d'ARB2A et d'AGO2 au sein de complexes nucléaires communs ont été démontrés pour plusieurs types cellulaires et tissus, suggérant une interaction entre ARB2A et AGO2 via le domaine Arb2 d'ARB2A. En concordance avec cette localisation nucléaire du complexe, des expériences utilisant le rapporteur luciférase psi-CHECK2-let-7 × 8 n'ont pas rapporté d'impact de la diminution de l'expression d'ARB2A sur le silençage post-transcriptionnel des gènes, soit la fonction cytoplasmique canonique d'AGO2. Il a également été montré que la mutation E229Q d'ARB2A, observée chez les patients atteints du syndrome CHARGE, abroge l'interaction entre ARB2A et AGO2 et que l'efficacité de la formation du complexe dépend de la présence d'acides nucléiques (Bélanger *et al.*, 2018).

La reprise d'expériences de co-IP utilisant des versions purifiées d'ARB2A (contrôle et mutant E229Q) et d'AGO2 recombinants, combinées à des expériences de BiFC (*Bimolecular Fluorescence Complementation*, complémentation de fluorescence bimoléculaire) ont permis de valider que l'interaction entre AGO2 et

ARB2A est directe et qu'elle implique le résidu E229 d'ARB2A. Des co-IP ont également démontré que le segment N-terminal (aa 1-480) d'AGO2 est essentiel pour l'interaction, mais sans exclure une certaine contribution du segment C-terminal (aa 478-860) (Sallis *et al.*, 2023).

1.6.3.1 La fonction du domaine NLS d'ARB2A

Différentes expériences de BiFC conjuguées à de l'imagerie en temps réel ont mené à l'hypothèse que l'initiation de l'interaction entre ARB2A et AGO2 se produit au cytoplasme, puis que les partenaires transloquent au noyau par la route des importines α/β grâce au NLS ((K/R-K/R-X₁₀₋₁₂-K/R_{3/5}) d'ARB2A (Figure 1.6). En effet, avec le mutant NLS, le signal BiFC au noyau est diminué, tout comme la localisation nucléaire d'AGO2 (Sallis *et al.*, 2023).

1.6.3.2 La fonction du domaine de phosphorylation d'ARB2A

ARB2A contient deux séquences consensus (S/T-X-X-D/E) pour la phosphorylation par la caséine kinase II (CK2) juxtaposées (aa 215-218) à proximité du signal NLS (aa 227-244) (Figure 1.6) (Sallis *et al.*, 2023). Or, la sous-unité catalytique alpha de la CK2 a été identifiée dans l'interactome d'ARB2A dans les cellules N2a (Bélanger *et al.*, 2018). Chez la souris, les résidus préférentiellement phosphorylés sont la sérine 217 (S217, 87 %, 5 % de double phosphorylation) et la sérine 218 (S218, 100 %) (Sallis *et al.*, 2023).

L'utilisation d'un inhibiteur de CK2 ainsi que de versions phosphomimétique (P+) et *phosphodead* (P-) d'ARB2A ont mis en évidence que la phosphorylation par CK2 stimule l'entrée d'ARB2A au noyau, bien qu'elle ne soit pas essentielle (Sallis *et al.*, 2023).

Suite à la mise en lumière de la régulation de l'import nucléaire du complexe AGO2 via la phosphorylation d'ARB2A par la CK2, il a été proposé que ce mécanisme puisse être impliqué dans la réponse à différents stress cellulaires. En effet, l'activité de la CK2 est augmentée lors de différents stress cellulaires (Ampofo *et al.*, 2013; Sayed *et al.*, 2000; Watabe et Nakaki, 2011), tout comme cela a été observé pour la translocation nucléaire d'AGO2 (Castanotto *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2016).

1.6.3.3 La fonction du domaine d'homodimérisation d'ARB2A

ARB2A possède un domaine de dimérisation (aa 160-175) localisé dans le domaine Arb2 (Figure 1.6). La fonctionnalité de ce domaine a été validée par co-IP et BiFC. Les expériences BiFC suggèrent aussi que le

dimère se forme dans le cytoplasme, puis transloque subséquemment au noyau avec une cinétique similaire à celle démontrée pour l'hétérodimère ARB2A-AGO2.

Une des problématiques rencontrées dans l'établissement d'un modèle pour l'import nucléaire d'AGO2 par ARB2A était la superposition au sein d'une même boucle (CK2-NLS) des domaines de liaison à AGO2 et du domaine NLS, prévenant l'interaction simultanée à AGO2 et à une importine. Toutefois, le domaine de dimérisation étant distant de cette boucle CK2-NLS, l'homodimère permet de proposer une intéressante théorie où une des sous-unités ARB2A interagit avec les importines via sa boucle CK2-NLS tandis que la seconde permet la liaison à AGO2 via sa propre boucle CK2-NLS (Sallis *et al.*, 2023).

1.6.3.4 Le rôle de l'interaction ARB2A-AGO2 dans le syndrome CHARGE

Chez les MEFs d'embryons *Arb2a^{Trp/Trp}*, marqués par une expression réduite d'ARB2A, les capacités de prolifération sont réduites. La transfection de ces MEFs avec la forme sauvage d'ARB2A permet le sauvetage de la prolifération, ce que ne permettent pas les mutants NLS et E229Q. La transfection avec AGO2, quant à elle, permet un sauvetage partiel, lequel devient un sauvetage complet avec une forme modifiée NLS-AGO2. Lorsque des analyses qPCR de l'épissage des exons 8/9 de *Cd44* sont réalisés, des effets similaires sont observés, la transfection d'ARB2A ou de NLS-AGO2 permettant de ramener les niveaux d'épissage dérégulés à la normale. Ces données suggèrent donc que l'import nucléaire d'AGO2 par ARB2A est requis pour le bon fonctionnement de la cellule et que l'absence d'AGO2 au noyau peut être une des causes sous-jacentes au syndrome CHARGE (Sallis *et al.*, 2023).

1.7 L'œil

1.7.1 La structure et la fonction

L'œil est situé dans l'orbite. Il occupe environ le tiers de celui-ci, la portion restante étant occupée par du gras, des muscles, des nerfs et de la vascularisation.

1.7.1.1 Le segment antérieur

Le segment le plus antérieur de l'œil correspond à la cornée, une couche avasculaire, résistante et transparente (Figure 1.7A). Elle sert de barrière protectrice, mais est également la surface la plus réfractive de l'œil. Derrière la cornée, l'iris, un diaphragme contractile pigmenté, permet de réguler la quantité de lumière entrant dans l'œil par la pupille (Figure 1.7A). Le corps ciliaire produit l'humeur aqueuse, laquelle

nourrit la cornée et le cristallin avasculaires, permet d'éliminer les déchets et fournit une pression intraoculaire permettant de conserver la forme de l'œil. L'humeur aqueuse est drainée par les voies d'écoulement composées du réseau trabéculaire, du canal de Schlemm, de vaisseaux d'écoulement spécialisés du limbe, et du muscle ciliaire (Casper et Sparrow, 2019; Joukal, 2017; Malhotra *et al.*, 2011; Pearing *et al.*, 2013; van Zyl *et al.*, 2022; Zeiss *et al.*, 2018).

Le cristallin, structure biconvexe cristalline, est localisé à la jonction des segments antérieur et postérieur de l'œil (Figure 1.7A). Il est en suspension entre l'humeur aqueuse et l'humeur vitrée grâce aux fibres zonulaires, un réseau ligamentaire élastique fin qui relie la capsule du cristallin et le corps ciliaire. Le cristallin constitue le second pouvoir réfractif de l'œil. Sous l'action des muscles ciliaires, les fibres zonulaires peuvent se relâcher ou se contracter et ainsi modifier la forme du cristallin. Cela permet l'accommodation, laquelle consiste à faire dévier plus fortement les rayons lumineux lorsqu'on observe un objet de près afin qu'ils soient perçus par la rétine (Casper et Sparrow, 2019; Joukal, 2017; Malhotra *et al.*, 2011; Pearing *et al.*, 2013; van Zyl *et al.*, 2022; Zeiss *et al.*, 2018).

Ces structures antérieures de l'œil ont pour fonction globale d'assurer la transmission des faisceaux lumineux et leur focalisation sur la rétine (Spadea *et al.*, 2016; van Zyl *et al.*, 2022).

1.7.1.2 Le segment postérieur

Le segment postérieur est majoritairement rempli de l'humeur vitrée, une substance gélatineuse claire composée principalement d'eau, de fibres de collagène et de protéines solubles (Figure 1.7A). La sclère, couche fibreuse externe de l'œil, assure une fonction de protection, maintient la pression intraoculaire et sert de site d'attachement pour les six muscles extraoculaires qui contrôlent les mouvements et la position de l'œil. La seconde couche la plus externe est la choroïde (Figure 1.7A). Elle assure des fonctions vasculaires pour les photorécepteurs de la rétine (Figure 1.7B) (Casper et Sparrow, 2019; De La Hoz Polo *et al.*, 2016; Joukal, 2017; Malhotra *et al.*, 2011; Pearing *et al.*, 2013; van Zyl *et al.*, 2022; Zeiss *et al.*, 2018).

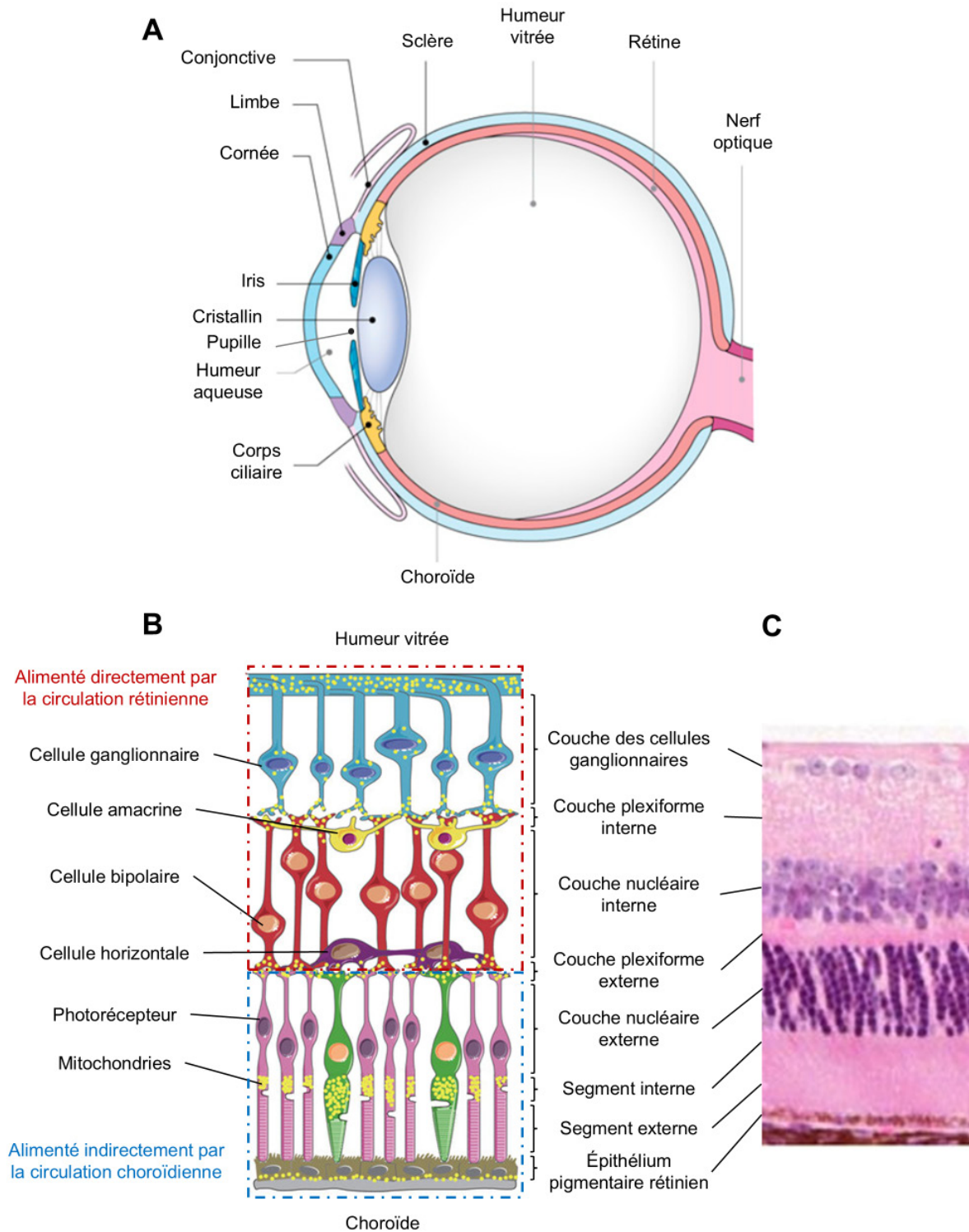


Figure 1.7 : Structure de l'œil et de la rétine.

(A) Schéma des principales structures du globe oculaire. (B) Schéma des différentes couches de la rétine. (C) Segment d'une coupe histologique de rétine murine avec coloration hématoxyline-éosine. Adaptée de (Lorber, Hsiao et Martin, 2016; Tao, Zhou et Zhu, 2019; Zeng *et al.*, 2016).

1.7.1.3 La rétine

La rétine est la couche tissulaire la plus interne du segment postérieur (Figure 1.7A). Il s'agit de la région neurale, sensorielle de l'œil. Elle est constituée de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) et de la neurorétine (Figure 1.7B, C). L'EPR est une monocouche de cellules pigmentées cubiques dont les fonctions sont la phagocytose des segments externes des photorécepteurs, la régénération du rétinol photoactif, la formation de la barrière externe sang-rétine, l'absorption de la lumière, la formation de la matrice interphotoréceptrice et le transport des ions, des nutriments et de l'eau hors de l'espace sous-rétinien (Casper et Sparrow, 2019; De La Hoz Polo *et al.*, 2016; Joukal, 2017; Malhotra *et al.*, 2011; Pearing *et al.*, 2013; van Zyl *et al.*, 2022; Zeiss *et al.*, 2018).

Chez l'humain, la neurorétine est non uniforme. La macula est une région excentrée de la rétine, du côté temporal de l'œil, enrichie en cônes. En son centre est localisée la fovéa, la zone la plus mince de la rétine et qui permet la vision la plus pointue. Afin de permettre cette acuité visuelle, la fovéa est plus mince et avasculaire, permettant un accès plus direct de la lumière aux photorécepteurs. Le réseau vasculaire rétinien, formé de trois couches de capillaires (les plexus vasculaires superficiel, intermédiaire et profond) s'étend toutefois au reste de la rétine afin d'approvisionner en sang les 2/3 supérieurs des neurones rétiniens (Figure 1.7B) (Casper et Sparrow, 2019; De La Hoz Polo *et al.*, 2016; Joukal, 2017; Malhotra *et al.*, 2011; Pearing *et al.*, 2013; van Zyl *et al.*, 2022; Zeiss *et al.*, 2018).

La neurorétine est divisée en plusieurs strates (Figure 1.7B, C). Les couches externes sont les couches des segments externes et internes des photorécepteurs ainsi que la couche nucléaire externe. La couche nucléaire externe comprend les noyaux et corps cellulaires d'environ 130 millions de bâtonnets, responsables de la vision scotopique (lorsque la lumière est faible), et de sept millions de cônes, responsables de la vision photopique (lorsque la lumière est abondante) et de la perception des formes et des couleurs. Le segment interne accueille les organites métaboliques nécessaires à la synthèse des composantes du segment externe, des disques remplis de photopigments (Figure 1.7B, C). La détection de la lumière est possible grâce à ces photopigments. Le photopigment des bâtonnets est la rhodopsine, composée d'une opsine et de rétinol. Pour les cônes, trois types d'opsines permettent la détection selon trois longueurs d'onde différentes. Les cellules photoréceptrices convertissent le signal lumineux en potentiel membranaire (Casper et Sparrow, 2019; De La Hoz Polo *et al.*, 2016; Joukal, 2017; Malhotra *et al.*, 2011; Pearing *et al.*, 2013; van Zyl *et al.*, 2022; Zeiss *et al.*, 2018).

Ce signal est par la suite transmis aux cellules bipolaires. Les dendrites des cellules bipolaires sont en contact avec les photorécepteurs au niveau de la couche plexiforme externe, tandis que les corps cellulaires des cellules bipolaires sont localisés dans la couche nucléaire interne (Figure 1.7B, C). La couche nucléaire interne comprend les corps des cellules amacrine, bipolaires et horizontales, selon un arrangement qui peut comprendre 6 à 9 corps cellulaires en épaisseur. Les cellules horizontales, présentant un allongement horizontal à proximité de la couche plexiforme externe, sont connectés à plusieurs photorécepteurs, sur lesquelles elles effectuent une rétroaction inhibitrice afin d'atténuer les signaux lumineux de très forte intensité (Figure 1.7B, C). À l'opposé de la couche nucléaire interne, à proximité de la couche plexiforme interne, se situent les cellules amacrine, en contact avec les axones des cellules bipolaires et les dendrites des cellules ganglionnaires rétiniennes. Elles modulent le signal visuel lors de son passage dans les cellules bipolaires, puis ganglionnaires afin d'accentuer les contrastes et d'améliorer la détection du mouvement, notamment. La couche des cellules ganglionnaires rétiniennes est une monocouche, hormis au niveau de la macula, où plusieurs couches de cellules ganglionnaires se superposent (Figure 1.7C). Les axones d'environ un million de cellules ganglionnaires rétiniennes se regroupent au disque optique où ils forment le nerf optique (nerf crânien II), permettant de transmettre l'information visuelle au cerveau. Les axones de l'hémirétine nasale se croisent au chiasma optique tandis que les axones de l'hémirétine temporale ne se croisent pas. La première analyse de l'information visuelle s'effectue dans le lobe occipital, puis les analyses subséquentes ont lieu dans les aires visuelles extrastriées des lobes occipital, pariétal et temporal (Casper et Sparrow, 2019; De La Hoz Polo *et al.*, 2016; Joukal, 2017; Malhotra *et al.*, 2011; Pearing *et al.*, 2013; van Zyl *et al.*, 2022; Zeiss *et al.*, 2018).

1.7.2 Le développement de l'œil

Chez les mammifères, le développement oculaire requiert l'interaction orchestrée de l'ectoderme neural, l'ectoderme de surface et le mésenchyme périoculaire (MPO) (Zeiss *et al.*, 2018). Le développement de l'œil s'amorce dès la neurulation avec la spécification du champ optique au niveau de la plaque neurale antérieure par les facteurs de transcription du champ oculaire RX, LHX2, PAX6, SIX3 et OTX2, couplés aux voies de signalisation WNT, TGF- β et FGF. La signalisation Eph/Ephrin permet de promouvoir la ségrégation du champ optique des tissus environnants. Par la suite, le champ optique est divisé en deux primordia sous l'action des voies de signalisation TGF- β , SHH, FGF, BMP et WNT non canonique, qui assurent la spécification et la structuration de la ligne médiane (Casey, Lusk et Kwan, 2023; Williams et Bohnsack, 2020; Zilova *et al.*, 2021).

L'œil dérive initialement du rhombencéphale, plus précisément du diencéphale, qui évagine vers l'ectoderme de surface afin de former les vésicules optiques (E8-9.5 chez la souris), notamment sous l'action du facteur de transcription RX (Figure 1.8). À ce stade, les domaines ventraux et dorsaux sont spécifiés par l'expression de gènes spécifiques de la rétine et par l'expression d'OTX2, marquant respectivement la rétine et l'épithélium pigmentaire prospectifs (Casey, Lusk et Kwan, 2023; Joukal, 2017; Williams et Bohnsack, 2020; Zeiss *et al.*, 2018; Zilova *et al.*, 2021).

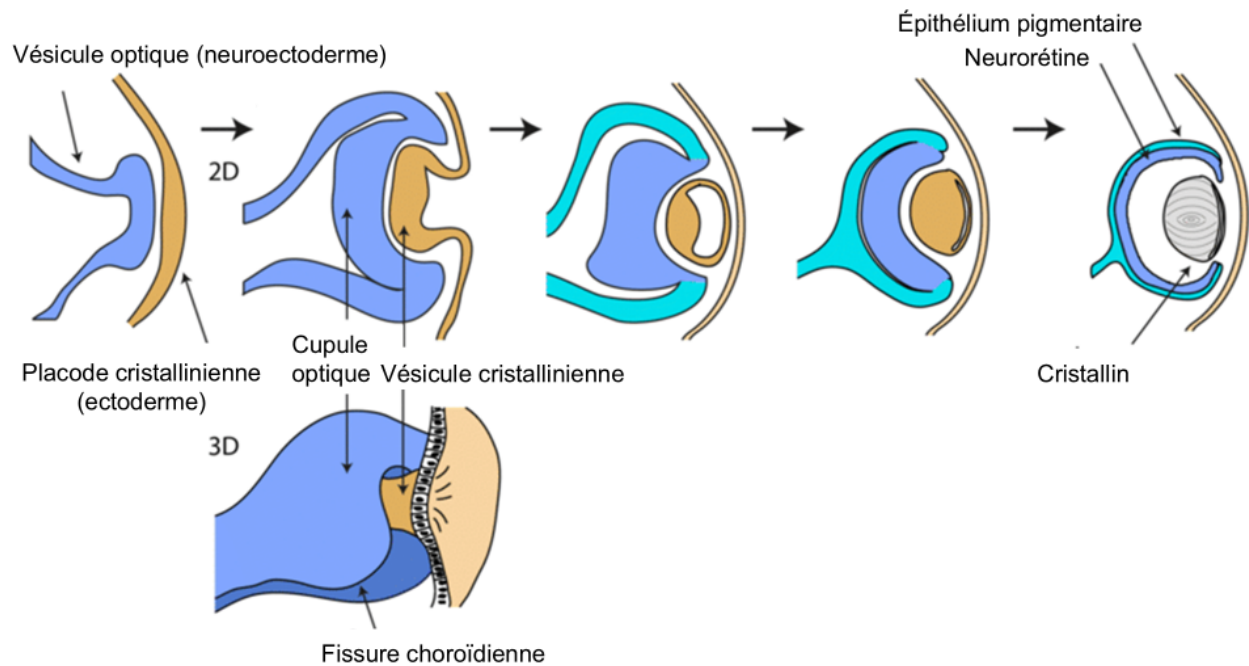


Figure 1.8 : Développement de l'œil chez les mammifères.

Adaptée de (Gaspar *et al.*, 2019).

Suite à leur contact avec l'ectoderme de surface, les vésicules optiques invaginent en leur centre, formant les cupules optiques, composées d'une neurorétine enveloppée par l'EPR (E10-11) (Figure 1.8). Elles demeurent reliées au cerveau en développement par la tige optique, qui deviendra ultérieurement le nerf optique. Au cours de ce processus, les cellules de la neurorétine subissent de la compaction, de l'élongation et de la constriction basale tandis que les cellules de l'EPR s'aplatissent et s'étirent afin d'être en mesure, tout en conservant un volume constant, d'enrober la neurorétine. Ce mouvement en bordure de la cupule optique serait impacté par la signalisation Bmp, Fgf et potentiellement Wnt (Casey, Lusk et Kwan, 2023; Joukal, 2017; Zeiss *et al.*, 2018). La signalisation Bmp agit également sur la régionalisation

dorso-ventrale de la cupule optique (de même que la signalisation de l'acide rétinoïque) ainsi que sur la morphogenèse de la rétine et de l'EPR. La régionalisation assurée par la signalisation FGF est variable selon les espèces (naso-temporale chez le poisson-zèbre). Cette signalisation est particulièrement importante pour assurer la frontière entre la neurorétine et l'EPR. La signalisation Wnt, abondamment produite par l'ectoderme, est importante pour le développement de l'EPR, tout comme la signalisation Hippo, médiée par YAP et TAZ. Responsable de la survie et de la prolifération, cette signalisation est particulièrement importante pour l'EPR (Casey, Lusk et Kwan, 2023; Zeiss *et al.*, 2018).

Suivant le contact avec les vésicules optiques, l'ectoderme de surface, quant à lui, s'épaissit en placode cristallinienne, puis invagine parallèlement à la vésicule optique, formant alors la vésicule cristallinienne (Figure 1.8). Ce remodelage implique des processus de constriction apicale et de contractions coordonnées par des câbles d'actomyosine supracellulaires. Au niveau signalétique, PAX6 et les voies de signalisation Bmp, Fgf et Wnt sont requis pour le bon déroulement de cette étape. Par la suite, les fibres de la vésicule cristallinienne se développent (Casey, Lusk et Kwan, 2023; Joukal, 2017; Williams et Bohnsack, 2020; Zeiss *et al.*, 2018; Zilova *et al.*, 2021).

Simultanément, une invagination supplémentaire se produit du côté inféronasal de la vésicule optique afin de former la fissure choroïdienne (ou fissure optique), permettant la sortie des axones des cellules ganglionnaires et l'entrée de la vascularisation hyaloïde (Figure 1.9). Précurseur du réseau vasculaire rétinien, le réseau vasculaire hyaloïde, formée à partir des cellules endothéliales du MPO, approvisionne en sang le cristallin et la rétine en développement (E11.5) (Casey, Lusk et Kwan, 2023; Joukal, 2017; Williams et Bohnsack, 2020; Zeiss *et al.*, 2018; Zilova *et al.*, 2021). Concernant l'apparition de la fissure choroïdienne, plusieurs aspects demeurent toutefois inconnus. En revanche, il a été identifié que les marges de la fissure ont pour origine deux populations cellulaires adjacentes qui sont parmi les dernières à entrer dans la cupule optique au cours du processus d'invagination. Les cellules de la marge de la fissure optique se déplacent le long d'une trajectoire commune, les cellules de la marge temporale d'abord, suivies par les cellules de la marge nasale. L'implication du MPO est suspectée. La signalisation menant à la formation de la fissure est également peu connue, mais pourrait impliquer PTCH (Casey, Lusk et Kwan, 2023).

La fissure choroïdienne est une structure transitoire. Suivant le passage des axones ganglionnaires et de la vascularisation hyaloïde, la fissure amorce sa fermeture. La première étape de la fermeture de la fissure

choroïdienne consiste à positionner les deux marges à proximité. Ensuite, la membrane basale délimitant chaque marge est dégradée, potentiellement via une intervention de cellules phagocytaires et/ou d'enzymes de dégradation (ex : MMP2, ADAMTS16), puis la polarité, l'adhésion et la morphologie des cellules de la marge sont remaniées. Une contribution importante du MPO au cours de ce processus est suspectée, des défauts de fermeture de la fissure étant détectés en présence d'une diminution du MPO, mais comment le MPO contribue au démantèlement de la membrane basale demeure nébuleux. Des CCN du MPO sont en contact avec la fissure, passant de manière transitoire par celle-ci, mais elles ne font toutefois pas contact avec les régions de démantèlement actif de la membrane basale. Des cellules endothéliales du MPO se retrouvent aussi dans la fissure où elles sont maintenues afin de former le réseau vasculaire hyaloïde. À l'opposé, ces dernières sont localisées aux sites où la membrane basale est dégradée. Sans être essentielles, il est donc suspecté qu'elles contribuent à accélérer le retrait de la membrane basale (Casey, Lusk et Kwan, 2023). Les voies de signalisation TGF- β , BMP et de l'acide rétinoïque sont impliquées dans la fermeture de la fissure optique. Pour la première, il a été identifié que les ligands TGFB2 et TGFB3 sont exprimés par le MPO et le cristallin avec les récepteurs TGFBR2 localisés au sein de la fissure choroïdienne. Pour la voie de l'AR, seule une régulation positive de l'expression de PITX2 au MPO est connue, tandis que les détails du fonctionnement de la voie BMP sur la fermeture de la fissure demeurent totalement ignorés. La dérégulation de facteurs impliqués dans ces voies peut engendrer la persistance de la fissure choroïdienne, résultant en un colobome oculaire (Casey, Lusk et Kwan, 2023; James *et al.*, 2016).

Suite à la formation de la cupule optique, le développement rétinien se produit selon deux vagues (Figure 1.8). Dans un premier temps, les progéniteurs rétiniens donnent naissance aux cellules ganglionnaires, aux cellules horizontales, aux cônes et à une portion des cellules amacrines (E11-18). Ensuite, dans une deuxième vague de rétino-genèse, postnatale chez la souris, les bâtonnets, les cellules bipolaires et les cellules de Müller se développent, donnant naissance aux couches nucléaires internes et externes (Zeiss *et al.*, 2018).

Suivant la naissance, le réseau vasculaire rétinien se développe, simultanément à la régression du réseau vasculaire hyaloïde (P4-P21) (Figure 1.9) (Stahl *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2019). Le plexus vasculaire superficiel s'établit lors de la première semaine (P0-P7), puis s'ensuivent les plexus profond (P7-P12) et intermédiaire (P12-P15). À la fin de la troisième semaine de vie (P21), les réseaux sont pleinement matures et connectés (Figure 1.9) (Stahl *et al.*, 2010).

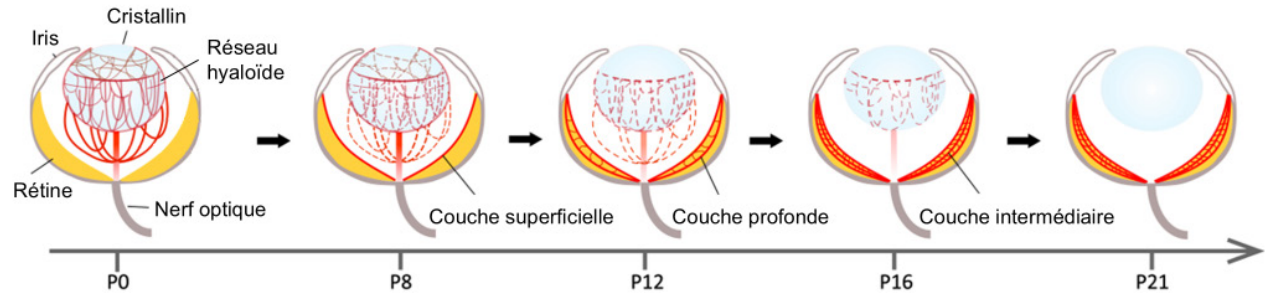


Figure 1.9 : Développement vasculaire chez *Mus musculus*.

Pendant les trois semaines suivant la naissance, le réseau vasculaire hyaloïde régresse, remplacé par le réseau vasculaire rétinien composé des couches superficielle, profonde, puis intermédiaire. Adaptée de (Wang *et al.*, 2019).

1.7.3 Les différences entre l'œil humain et l'œil murin

Au niveau structurel, l'œil humain et l'œil murin sont très semblables. Les principales différences sont associées à la taille. La taille du globe oculaire murin est évidemment plus petite que celle du globe oculaire humain, mais proportionnellement, la cornée est plus étendue et le cristallin est beaucoup plus imposant (Zeiss *et al.*, 2018). Au niveau de la rétine, des différences importantes chez la souris consistent en l'absence de fovéa, avec une seule monocouche de cellules ganglionnaires sur l'ensemble de la rétine, et en une vision dichromatique plutôt que trichromatique en raison de la présence de deux types de cônes en lieu de trois. L'épaisseur de la sclère est variable. Chez la souris, elle est plus fine vers l'avant de l'œil et plus épaisse vers l'arrière. S'y rattachent sept muscles oculaires, soit un muscle de plus que chez l'humain. La choroïde aussi est globalement plus mince chez les rongeurs. De plus, le nerf optique est centré chez la souris, mais positionné du côté nasal chez l'humain (Zeiss *et al.*, 2018).

Les souris possèdent aussi une membrane nictitante, une membrane fine, transparente et mobile située dans le coin interne de l'œil, qui glisse horizontalement sur celui-ci afin de le protéger, le lubrifier et le nettoyer. Cette troisième paupière n'est présente chez l'humain que sous la forme d'un vestige, replié sous la conjonctive. Unique aux rongeurs est également la glande de Harder, localisée profondément dans l'orbite (Zeiss *et al.*, 2018).

Pour ce qui est du développement, il est relativement similaire entre l'humain et la souris. La différence principale est que le développement postnatal (principalement rétinien et de la vascularisation rétinienne) est plus important chez la souris, alors que chez les humains, les yeux sont déjà plus développés à la

naissance. De plus, la migration des CCN du MPO aux structures antérieures de l'œil s'effectue en deux vagues uniquement chez la souris, mais en trois vagues chez l'humain (Miesfeld et Brown, 2019; Williams et Bohnsack, 2015; Williams et Bohnsack, 2020; Zeiss *et al.*, 2018).

Au final, le haut degré de similarité entre la structure de l'œil et son développement chez l'humain et chez les rongeurs font en sorte que ceux-ci sont des organismes modèles fréquemment employés lors de ce type d'études (Zeiss *et al.*, 2018).

1.7.4 Les CCN et le développement oculaire

Au cours de la formation de la cupule optique, une population de CCN crâniennes issues du diencephale, du mésencéphale et du métencéphale effectuent leur transition épithélio-mésenchymateuse, puis migrent selon deux vagues, sous l'action non-exclusive de CHOKH/RX3 et PDGF, du tube neural jusqu'à la périphérie dorsale et ventrale de la cupule optique (Figure 1.10). Certaines s'y établissent tandis que d'autres poursuivent leur migration (Jasrapuria-Agrawal et Lwigale, 2014; Williams et Bohnsack, 2020).

Ces CCN périoculaires, additionnées de cellules mésodermes, composent le MPO (Figure 1.10). Ce dernier remplit plusieurs fonctions critiques au cours du développement de l'œil. Il agit comme centre de signalisation pour la morphogenèse de la tige et de la cupule optiques via la signalisation cellulaire et des signaux mécaniques qui guident le comportement des cellules non CN. Les CCN du MPO produisent du nidogène, lequel réticule avec les laminines et le collagène de la matrice extracellulaire pour l'assemblage des membranes basales. En l'absence de membrane basale, l'invagination de la vésicule en cupule optique est compromise. Par la suite, la perte des CCN engendre des défauts de formation de la fissure choroïdienne, bien que cela peut relever d'un effet indirect. La signalisation entre le MPO et la cupule optique est aussi requise pour la fermeture de la fissure choroïdienne et la formation de l'épithélium pigmentaire rétinien (Casey, Lusk et Kwan, 2023; Jasrapuria-Agrawal et Lwigale, 2014; Pilon, 2021; Williams et Bohnsack, 2020).

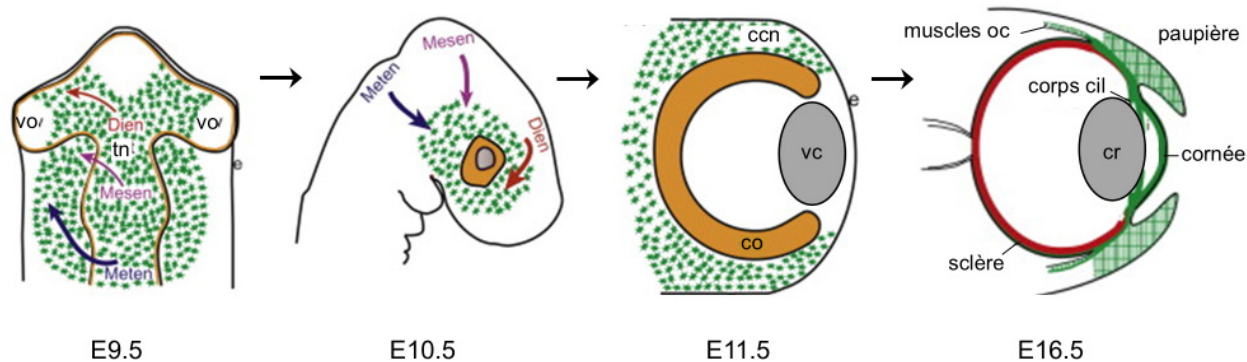


Figure 1.10 : Contribution des CCN au développement et aux structures de l'œil.

ccn, cellules de la crête neurale; co, cupule optique; corps cil, corps ciliaire ; cr, cristallin ; Dien, diencéphale; e, ectoderme; i, iris ; Mesen, mésencéphale; Meten, métencéphale; muscles oc, muscles oculaires ; tn, tube neural; vc, vésicule cristallinienne; vo, vésicule optique. Adaptée de (Jasrapuria-Agrawal et Lwigale, 2014).

Par la suite, une petite portion des CCN crâniennes du MPO demeurent dans la fissure choroïdienne afin de générer le réseau vasculaire hyaloïde (Hartsock *et al.*, 2014), tandis que les autres effectuent une migration en deux vagues chez la souris et en trois vagues chez l'humain jusqu'au segment antérieur de l'œil sous l'action de PITX2 et de hauts niveaux d'AR. Dans le segment antérieur, les CCN contribuent directement aux mélanocytes conjonctivaux et uvéaux, aux fibroblastes de l'iris, de la cornée et du corps ciliaire, aux péricytes choroïdaux et rétiniens ainsi qu'aux cellules musculaires lisses des paupières (Figure 1.10). On retrouve également des CCN dans le réseau trabéculaire, le canal de Schlemm, les muscles extraoculaires et la sclère. Les CCN contribuent ainsi à la plupart des tissus de l'œil, hormis le cristallin et la rétine (Bohnsack et Kahana, 2013; Jasrapuria-Agrawal et Lwigale, 2014; Miesfeld et Brown, 2019; Pilon, 2021; Williams et Bohnsack, 2015; Williams et Bohnsack, 2020; Zeiss *et al.*, 2018)

Finalement, les cellules souches de la crête neurale contribuent au maintien de l'œil chez l'adulte. (Green, Simoes-Costa et Bronner, 2015; Jinno *et al.*, 2010; Martik et Bronner, 2017)

1.8 Les voies de réponse au stress

Au cours de leur existence, les cellules peuvent faire face à divers stress tels le stress oxydatif, le stress génotoxique, le choc thermique, la privation de nutriments, l'hypoxie, l'exposition à des toxiques, l'exposition à des pathogènes, le stress mécanique et le vieillissement (Bissa *et al.*, 2025). Pour y survivre, les cellules disposent de plusieurs voies de réponse telles que la réponse aux dommages à l'ADN (DDR,

DNA damage response), la réponse au choc thermique (HSR, *heat shock response*), la réponse au stress oxydatif (OSR, *oxydative stress response*), l'autophagie, la réponse aux protéines mal repliées (UPR, *unfolded protein response*) et la voie de réponse intégrée au stress (ISR, *integrated stress response*) (Bissa *et al.*, 2025). Les sections suivantes ne s'intéresseront toutefois pas à l'ensemble de ces réponses, mais plutôt uniquement aux deux dernières, les réponses ISR et UPR, investiguées au cours de cette thèse.

1.8.1 La réponse ISR

La réponse ISR consiste en un programme de traduction adaptative régulé par quatre sérine/thréonine kinases (PERK, GCN2, PKR et HRI). Ces kinases sont activées par divers stress intra et extracellulaires. PERK est activé par un stress du RE (accumulation de protéines mal repliées, carence en calcium, déséquilibre redox) ou une carence en glucose, GCN2 par une déficience en acides aminés ou des rayons UV, PKR par une infection virale et HRI par une déficience en hème (Figure 1.11) (Pakos-Zebrucka *et al.*, 2016).

L'activation de PERK en présence de protéines non repliées, induite par la dissociation de BiP, sera décrite plus en détail sous la branche PERK de la réponse UPR (section 1.8.2.2.). Lors d'une carence en glucose, ce sont la diminution des niveaux d'ATP et l'inhibition consécutive de la pompe ATPase Ca²⁺ sarcoplasmique qui déclenchent l'activation de PERK. GCN2 détecte la carence en acide aminés par sa liaison à des ARNt non chargés. Pour les rayons UV, deux hypothèses sont proposées, lesquelles impliquent la liaison des ARNt à GCN2 par les UV ou la déplétion rapide de l'arginine dû à l'activation par les UV de l'oxyde nitrique synthase. L'activation de PKR est principalement induite lors d'une infection virale via la détection d'ARN double brin. Toutefois, PKR peut également être activé indépendamment de la présence d'ARN double brin en présence d'autres stress, tels une infection bactérienne, un stress oxydatif, une carence en facteurs de croissance, la présence de cytokines, un stress ribotoxique, des granules de stress, une accumulation d'héparine et une activité caspase lors des stades précoces de l'apoptose. Finalement, contrairement aux autres kinases, HRI est principalement restreinte aux érythrocytes. La régulation d'HRI dépend de sa liaison par l'hème, laquelle entraîne la formation de liens disulfites entre les monomères d'HRI, les maintenant dans un état inactif. Selon un mécanisme hème-indépendant, HRI peut aussi être activée par un stress oxydatif induit par l'arsénite, un choc thermique, un stress osmotique, l'inhibition du protéasome 26S et la présence d'acide nitrique. Ces différents signaux induisent l'activation des quatre kinases par dimérisation, puis l'autophosphorylation (Pakos-Zebrucka *et al.*, 2016).

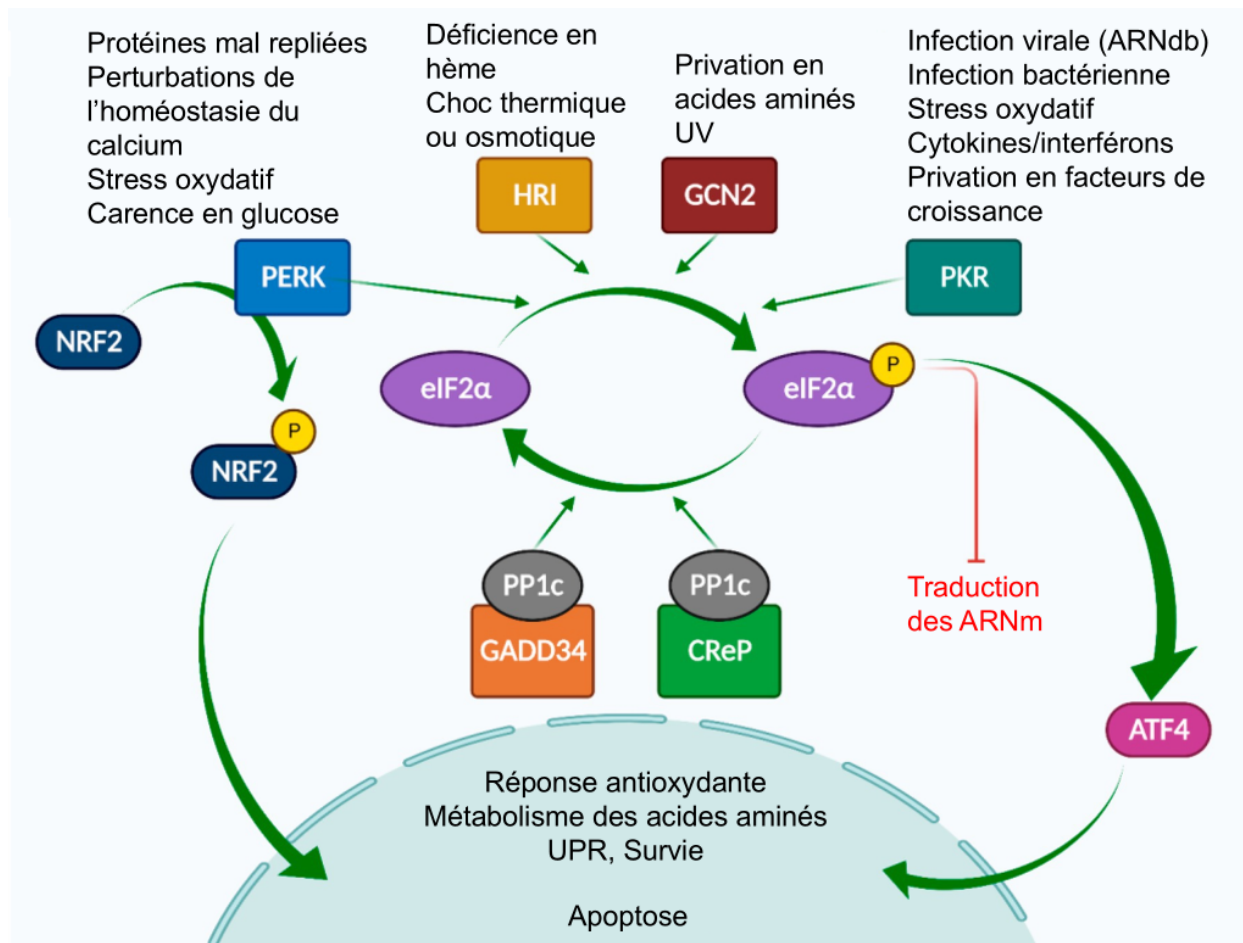


Figure 1.11 : Schéma de la réponse ISR.

Adaptée de (Carvajal *et al.*, 2023)

Sous l'action de ces kinases, les signaux de stress convergent vers la phosphorylation de la sérine 51 de la sous-unité α d'eIF2 (Figure 1.11). eIF2 est important pour l'initiation de la traduction. Il forme un complexe ternaire avec le GTP et l'ARNt initiateur de la méthionine, puis ceux-ci s'associent avec la sous-unité 40S du ribosome, eIF1 et eIF1A afin de former le complexe de pré-initiation 43S. Lorsque l'étape d'initiation de la traduction est complétée, le complexe se dissocie et le GTP est hydrolysé en GDP. eIF2B, un facteur d'échange de nucléotides guanine, procède au remplacement du GDP par du GTP, permettant à eIF2 de recouvrer sa forme active. Or, la phosphorylation d'eIF2 α a pour effet d'inhiber la recharge d'eIF2 α en GTP par eIF2B, inhibant ainsi la formation de nouveaux complexes de pré-initiation 43S et donc la traduction dépendante de la coiffe. Les conséquences sont une inhibition globale de la traduction (Figure 1.11). Dans le contexte d'un stress du RE, l'inhibition de la traduction allège la pression sur le RE et permet à la cellule

de corriger l'abondance de protéines mal repliées. Cela permet aussi à la cellule de limiter ses dépenses énergétiques, la synthèse protéique étant hautement énergivore, et de rediriger cette énergie vers le soutien des fonctions nécessaires à la survie (Anderson et Haynes, 2020; Bravo-Jimenez, Sharma et Karimi-Abdolrezaee, 2025; Carvajal *et al.*, 2023; Pakos-Zebrucka *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2022).

Simultanément à l'inhibition globale de la traduction, la traduction sélective d'ARNm permettant l'adaptation de la cellule au stress encouru est effectuée. Ces ARNm sont caractérisés par la présence d'un ou plusieurs cadres ouverts de lecture en amont (uORF, *upstream open reading frame*) dans la région 5'-UTR, prévenant la traduction des séquences codantes localisées en aval en conditions normales. La traduction de ces ARNm est indépendante de la coiffe et s'effectue plutôt via un mécanisme de re-initiation ou le recrutement direct du ribosome à un site IRES (*internal ribosome entry site*). Les protéines ainsi encodées, parmi lesquelles ATF4, remplissent des fonctions essentielles pour favoriser le retour à l'homéostasie et la survie de la cellule (Figure 1.11) (Anderson et Haynes, 2020; Bravo-Jimenez, Sharma et Karimi-Abdolrezaee, 2025; Carvajal *et al.*, 2023; Pakos-Zebrucka *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2022).

ATF4 est un facteur de transcription clé de la réponse ISR. En plus de promouvoir l'expression de nombreux gènes adaptatifs en fonction du contexte et de l'intensité du stress (Figure 1.11), entre autres via ses capacités à dimériser avec d'autres facteurs de transcription, ATF4 promeut l'expression de GADD34. GADD34 agit comme sous-unité régulatrice et forme un complexe avec PP1c, une phosphatase agissant comme sous-unité catalytique. Le complexe GADD34-PP1c agit sur phospho-eIF2 α dans une boucle de rétroaction négative afin de mettre fin à la réponse ISR et de restaurer la synthèse protéique (Figure 1.11). La terminaison de la réponse ISR par la déphosphorylation d'eIF2 α peut aussi être médiée par le complexe CREP-PP1c, CREP étant exprimé de façon ubiquitaire (Figure 1.11) (Anderson et Haynes, 2020; Bravo-Jimenez, Sharma et Karimi-Abdolrezaee, 2025; Carvajal *et al.*, 2023; Pakos-Zebrucka *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2022).

En présence d'un stress trop important ou chronique non résolu par la réponse ISR, la cellule est toutefois dirigée vers l'apoptose (Figure 1.11). L'apoptose associée à la voie ISR peut être médiée par ATF4, par une de ces cibles transcriptionnelles, le facteur de transcription CHOP (avec lequel il peut également former un hétérodimère), l'expression de miARN, la dégradation de l'inhibiteur de caspases XIAP ou l'activation de mTORC1, à titre d'exemples (Anderson et Haynes, 2020; Bravo-Jimenez, Sharma et Karimi-Abdolrezaee, 2025; Carvajal *et al.*, 2023; Pakos-Zebrucka *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2022).

1.8.2 La voie UPR

Le réticulum endoplasmique a pour fonctions la biosynthèse des lipides, l'homéostasie du calcium ainsi que l'assemblage et la modification post-traductionnelle des protéines destinées aux organites et à la surface cellulaire. Ces protéines de la voie sécrétoire représentent environ 30 % du protéome de la plupart des cellules eucaryotes (Hetz, 2012).

En présence d'une quantité importante de protéines non ou mal repliées au RE, la réponse UPR est activée. Les modules de signalisation de la réponse UPR ont également été associés avec le métabolisme des lipides et du cholestérol, l'homéostasie énergétique, l'immunité innée et la différenciation cellulaire. L'activation de la voie UPR entraîne une augmentation de la biosynthèse de membranes du RE, une diminution de la synthèse protéique générale, une diminution de l'influx de protéines au RE et, en contrepartie, une augmentation de l'expression de protéines impliquées dans le repliement et le contrôle qualité des protéines (ex : chaperonnes) afin de restaurer l'homéostasie. Toutefois, un stress important et/ou de longue durée, excédant les capacités de régulation par la voie UPR, active la mort cellulaire par apoptose (Hetz, 2012; Kovaleva *et al.*, 2023; Walter et Ron, 2011; Xiao *et al.*, 2021).

La réponse UPR comprend trois voies de signalisation, sous le contrôle de trois senseurs transmembranaires, IRE1 α , PERK et ATF6, possédant une sensibilité variable à divers stress. Ainsi, IRE1 α et PERK sont tous deux rapidement stimulés en réponse à des débalancements de l'homéostasie du calcium, mais IRE1 α répond d'autant plus rapidement à la présence d'agents réducteurs. À l'inverse, ATF6 est plutôt activé par la charge protéique à la membrane du RE, une réduction de la glycosylation ou une perturbation du métabolisme rédox (Hetz, 2012).

1.8.2.1 La branche IRE1

La branche IRE1 est la plus conservée d'un point de vue évolutif et donc conséquemment également la plus étudiée (Cox, Shamu et Walter, 1993; Hetz, 2012). IRE1 α est un récepteur transmembranaire possédant une activité sérine-thréonine kinase ainsi qu'une activité endoribonucléase. En conditions normales, BiP (Grp78), une chaperonne du RE lie IRE1 α (Figure 1.12). Lors d'un stress du RE, BiP se dissocie d'IRE1 α pour se lier aux protéines mal repliées. Cela entraîne la dimérisation des domaines luminaux d'IRE1 α , laquelle permet la trans-autophosphorylation des domaines cytoplasmiques. Cela a pour conséquence l'augmentation de l'activité endoribonucléase d'IRE1 α et l'épissage non-conventionnel de

l'ARNm de XBP1 (Figure 1.12). Un intron de 26 nucléotides est épissé, engendrant un décalage du cadre de lecture. Le facteur de transcription qui en résulte est appelé XBP1-s (*spliced XBP1*). XBP1-s entraîne l'expression de diverses protéines impliquées dans la voie ERAD (*ER-associated degradation*) l'entrée de protéines au RE, le repliement des protéines et la synthèse des lipides (Figure 1.12) (Hetz, 2012; Kovaleva *et al.*, 2023). La voie ERAD permet de corriger l'accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du RE via leur rétro-translocation au cytoplasme et leur ubiquitination, afin de permettre leur dégradation par le protéasome (Ottens, Efstathiou et Hoppe, 2024). En plus d'engendrer l'épissage différentiel de XBP1, l'activité endonucléase d'IRE1α engendre également la dégradation de nombreux ARNm codant pour des protéines impliquées dans le repliement et la régulation du stress du RE par un mécanisme appelé RIDD (*regulated IRE1-dependent decay*) (Hetz, 2012; Li *et al.*, 2020).

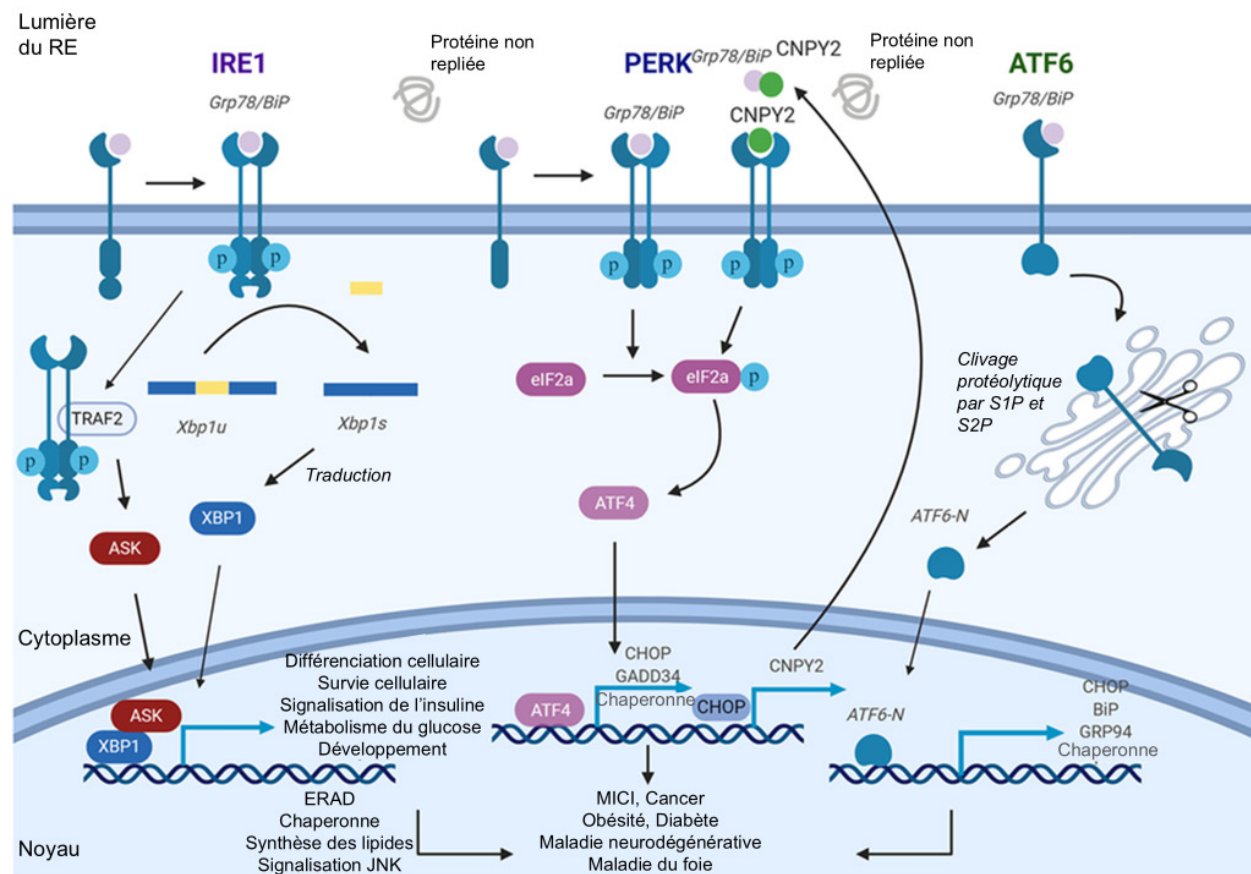


Figure 1.12 : Schéma de la réponse UPR.

Adaptée de (Li *et al.*, 2019).

MANF est un facteur neurotrophique non conventionnel qui peut à la fois être localisé au RE ou sécrété. L'activation de la voie UPR engendre une inhibition générale de la synthèse protéique et, à l'inverse, la surexpression de MANF, notamment induite par XBP1-s. MANF interagit avec BiP et d'autres chaperonnes. Il a la capacité de prolonger la liaison de BiP à ses partenaires mal repliés, agissant ainsi sur l'homéostasie protéique. Tout comme BiP, MANF peut lier IRE1 α , mais seulement en absence de ce premier. Il agit alors comme régulateur négatif de la voie IRE1 α en inhibant son activité (Kovaleva *et al.*, 2023).

1.8.2.2 La branche PERK

La branche PERK connecte la réponse UPR à la réponse ISR. PERK détecte les protéines mal repliées via son domaine senseur luminal. À l'image d'IRE1 α , son activation est initiée par la dissociation de BiP, résultant en son oligomérisation et autoactivation (Figure 1.12). Toutefois, son activation peut aussi être déclenchée par une liaison directe à CNPY2 et certaines études suggèrent qu'elle pourrait également être médiée par une interaction directe avec des protéines non ou mal repliées. L'activation de PERK mène à la phosphorylation d'eIF2 α , une composante centrale de la réponse ISR, tel que précédemment décrit (section 1.8.2.1.) (Figure 1.12). En conséquence, la synthèse protéique s'en retrouve globalement diminuée, limitant ainsi la quantité de protéines qui entrent au RE et laissant au RE l'opportunité de dégrader ou replier les protéines problématiques. Simultanément, ATF4 est surexprimé et promeut à son tour l'expression de plusieurs protéines adaptatives, telles des chaperonnes (Figure 1.12) (Anderson et Haynes, 2020; Bravo-Jimenez, Sharma et Karimi-Abdolrezaee, 2025; Hetz, 2012; Li *et al.*, 2019; Pakos-Zebrucka *et al.*, 2016).

1.8.2.3 La branche ATF6

ATF6 est simultanément un facteur de transcription et une protéine transmembranaire du RE de type II. Il est constitué d'ATF6 α et ATF6 β , dont les fonctions se chevauchent ou se compensent. Lors d'une accumulation de protéines mal repliées au RE, BiP se dissocie d'ATF6, libérant le signal de localisation au golgi de celui-ci. En conséquence, ATF6 est transloqué au golgi par le complexe COPII (Figure 1.12). À l'inverse, la calréticuline agit comme régulateur négatif de l'import d'ATF6 au RE. Toutefois, en conditions de stress au RE, la sous-glycosylation d'ATF6 ne permet plus l'interaction avec la calréticuline, favorisant alors l'import d'ATF6 au golgi. Au golgi, sous l'action des protéases de site 1 et de site 2, les domaines luminal (du RE) et transmembranaire (du golgi) sont clivés (Figure 1.12). Ces clivages relâchent un fragment cytosolique, ATF6f, qui agit comme facteur de transcription pour activer l'expression de XBP1 et des gènes de la voie ERAD (Figure 1.12) (Hetz, 2012; Hong *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2019; Shen *et al.*, 2002).

1.9 La compensation génétique par l'adaptation transcriptionnelle

La robustesse génétique correspond à la capacité d'un organisme à maintenir sa santé et à assurer sa survie malgré une mutation délétère (El-Brolosy et Stainier, 2017; Mather, 1953; Peng, 2019; Salanga et Salanga, 2021). Trois mécanismes ont été proposés pour expliquer la robustesse génétique et l'absence de phénotypes chez des mutants *knockout*, soit (i) la redondance de certains gènes (ii) le recours à des voies biochimiques alternatives et/ou étroitement régulées et (iii) des mutations adaptatives (Deflandre *et al.*, 2020; El-Brolosy et Stainier, 2017; Rouf *et al.*, 2023; Salanga et Salanga, 2021). Une autre alternative, identifiée au cours des dernières années, est la compensation génétique, un mécanisme déclenché en amont de la fonction protéique et qui fait intervenir de l'adaptation transcriptionnelle (Deflandre *et al.*, 2020; El-Brolosy et Stainier, 2017).

En effet, certaines études réalisées par génétique inverse se sont heurtées à d'étonnants mutants *knockouts* ne présentant pas – ou peu – de phénotypes, et ce autant pour des organismes procaryotes que pour des organismes eucaryotes (Dooley *et al.*, 2019; El-Brolosy et Stainier, 2017; Gieffing-Kroll *et al.*, 2011; González-Gutiérrez *et al.*, 2018; Gonzalez et Collier, 2015; Haas *et al.*, 2001; Iida *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2019; Peng, 2019; Putty *et al.*, 2013; Rossi *et al.*, 2015; Tangthirasunun *et al.*, 2017; Tong *et al.*, 2001; Wong et Roth, 2005; Yoo *et al.*, 2014). Plusieurs études ont ainsi rapporté des mutants *knockout* présentant des phénotypes de moindre gravité que les mutants *knockdown* du même gène, parmi lesquels les morphants pour le poisson-zèbre (El-Brolosy et Stainier, 2017; Kok *et al.*, 2015).

Dans le cas des *knockdowns* du poisson-zèbre induits par des morpholinos, des effets non ciblés (*off-target*) ou toxiques des morpholinos ont souvent été évoqués pour expliquer ce phénomène, parfois avec raison, mais pas toujours (Kok *et al.*, 2015; Rossi *et al.*, 2015). Une autre possibilité pour expliquer cette divergence entre les phénotypes des mutants *knockout* et *knockdown* est la compensation génétique (Rossi *et al.*, 2015). Le terme «compensation génétique» a été défini par El-Brolosy et Stainier comme correspondant à des modulations des niveaux d'ARN ou de protéines permettant de compenser fonctionnellement pour la perte d'un autre gène (El-Brolosy et Stainier, 2017).

Un premier mécanisme de compensation génétique ayant été élucidé, l'adaptation transcriptionnelle, consiste, en présence d'une mutation délétère dans un gène donné, à réguler à la hausse un gène appartenant à la même famille et possédant une séquence homologue (ex : un gène paralogue), le gène dit « compensatoire » (El-Brolosy *et al.*, 2019; El-Brolosy et Stainier, 2017; Ma *et al.*, 2019; Rossi *et al.*,

2015; Salanga et Salanga, 2021). Deux équipes indépendantes ont d'ailleurs confirmé que la similarité de séquence entre le transcrit compensé et le gène compensatoire est requise afin de permettre l'adaptation transcriptionnelle (El-Brolosy *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2019; Rouf *et al.*, 2023). Les mutants sans promoteur ou présentant une délétion complète du gène et donc incapables de produire un ARNm ne sont ainsi pas en mesure d'activer l'adaptation transcriptionnelle (El-Brolosy *et al.*, 2019).

La voie de dégradation des ARNm non-sens (NMD, *nonsense-mediated mRNA decay*) a pour fonction de vérifier la qualité des transcrits d'ARNm. Cette voie permet de réduire l'expression de protéines anormales, notamment par la dégradation des transcrits contenant un codon de terminaison prématuré (PTC, *premature stop codon*) (Baker et Parker, 2004). En effet, ces transcrits aberrants peuvent être traduits en protéines tronquées conservant plus ou moins de fonction, mais contiennent le risque de présenter une activité gain de fonction ou dominant négatif qui serait alors délétère pour l'organisme. Chez le poisson-zèbre, plusieurs équipes ont démontré le rôle de cette voie dans la compensation génétique (El-Brolosy *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2019).

Dans un premier temps, El-Brolosy *et al.* ont démontré chez le poisson-zèbre et dans des cellules murines l'implication de la voie NMD dans la compensation génétique. La mutation d'*Upf1*, composant majeur de la voie NMD, et l'inhibition pharmacologique de la voie NMD ont conséquemment engendré la perte de l'adaptation transcriptionnelle et le retour des phénotypes attendus. Les travaux réalisés par Ma *et al.* ont également montré l'implication de la voie NMD. Toutefois, si lors de leur étude, la diminution d'UPF1 était sans effet (contrairement aux résultats observés par El-Brolosy *et al.*), c'est plutôt la diminution d'UPF3a qui a permis d'inhiber la compensation génétique (El-Brolosy et Stainier, 2017; Ma *et al.*, 2019; Rouf *et al.*, 2023).

Ensuite, en ayant recours à des ARNm modifiés, El-Brolosy *et al.* ont démontré que la dégradation du transcrit compensé était nécessaire afin d'activer l'adaptation transcriptionnelle (El-Brolosy *et al.*, 2019). Par la suite, Ma *et al.* ont montré, via l'étude de mutants pour les différents exons d'un même gène, qu'un PTC non localisé dans le dernier exon de l'ARNm du gène muté est requis pour déclencher l'adaptation transcriptionnelle. À l'inverse d'El-Brolosy *et al.*, leurs expériences utilisant des transcrits sans coiffe afin d'engendrer leur dégradation n'ont pas permis d'enclencher l'adaptation transcriptionnelle. Selon leurs résultats, c'est donc plutôt la transcription d'un ARNm possédant un PTC que la dégradation du transcrit qui déclenche la compensation génétique (Ma *et al.*, 2019).

Un crible par siARN a identifié que la diminution de WDR5, membre du complexe COMPASS qui appose la marque H3K4me3, inhibe la réponse adaptative. WDR5 et la marque H3K4me3 ont d'ailleurs été identifiés au site de démarrage de la transcription des gènes compensatoires, suggérant que suivant la dégradation de l'ARNm et/ou l'identification d'un PTC, des facteurs de dégradation et/ou autres composantes de la voie NMD (ex : UPF3A) recrutent des modificateurs d'histones et/ou des remodeleurs de la chromatine et/ou le complexe COMPASS (ex : WDR5, SETD1A, ASH2 et RBBP5) au promoteur du gène compensatoire pour en favoriser la transcription (El-Brolosy *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2019; Rouf *et al.*, 2023).

Enfin, via un crible par ARNi chez *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), Serobyán *et al.* ont identifié que SMG-2 (UPF1), SMG-4 (UPF3) et SMG-6 (SMG6), des facteurs de la voie NMD, sont requis pour l'adaptation transcriptionnelle de gènes spécifiques, ce qui avait précédemment été observé chez la souris (El-Brolosy *et al.*, 2019; Serobyán *et al.*, 2020). Ils ont aussi validé l'implication de l'exonucléase XRN-1, de son partenaire PAXT-1, de la protéine d'épissage RSP-6 et de SPK-1, une kinase régulant les facteurs d'épissage riches en sérines/arginines comme RPS-6. Les des facteurs impliqués dans la maturation et le transport des ARN, tels les protéines argonautes ERGO-1 et NRDE-3, la polymérase dépendante de l'ARN RRF-3, ainsi que la ribonucléase DCR-1 réguleraient l'adaptation transcriptionnelle en aval de la dégradation de l'ARNm (Serobyán *et al.*, 2020).

Si le modèle d'adaptation transcriptionnelle découvert ces dernières années semble ainsi étroitement lié à la voie NMD, puis à l'appositions de la marque H3K4me3 par le complexe COMPASS, les hypothèses précédentes ne s'y limitaient pas. Ces hypothèses impliquaient le remodelage de la chromatine autour du gène compensatoire afin d'en favoriser l'expression par l'augmentation des marques histones de l'euchromatine ou la diminution les marques d'histones de l'hétérochromatine, des interactions interchromosomiques, la stabilisation de l'ARNm compensatoire par la pseudouridylation ou la méthylation en N6, la surexpression de gènes adaptatifs spécifiques (uORF caractéristiques) suite à l'activation de la voie ISR, l'intervention de diARN guidant les facteurs de transcription au site du gène compensatoire et la transmission de la capacité à compenser par la transmission d'une empreinte génomique induite par des modifications des histones (El-Bro, 2017). Il a aussi été proposé que l'ARNm du gène compensé pourrait agir tel un ARNnc et stimuler l'activation du gène compensatoire en recrutant des facteurs de transcription et des remodeleurs de la chromatine ou que la formation d'un duplexe d'ARN double-brin entre l'ARNm et un transcrit antisens du gène compensatoire pourrait déclencher sa surexpression. La stabilisation et conséquemment l'expression accrue de l'ARNm compensatoire par

l'augmentation de la disponibilité d'un bassin commun de protéines de liaison à l'ARN a aussi été évoqué, de même que l'augmentation de la transcription ou traduction de l'ARNm compensatoire par des miARN suivant la perte de leur cible, l'ARNm compensé (El-Brolosy et Stainier, 2017).

1.10 Problématique, hypothèses et objectifs

ARB2A est un gène dont les fonctions demeurent à éclaircir, malgré les efforts de recherche des dernières années. Ce gène a été associé à la pathologie du syndrome CHARGE, une maladie génétique rare. L'une des principales caractéristiques de ce syndrome est sa très grande variabilité phénotypique. Si celle-ci peut créer de la confusion lors de l'établissement d'un diagnostic, surtout en présence de nombreux syndromes phénotypiquement et génotypiquement similaires. Cela rend également plus complexe la prise en charge des patients, de nombreux examens médicaux étant requis afin d'identifier les signes cliniques présentés par un patient – dont plusieurs impactent la survie et la qualité de vie – parmi la multitude associée à ce syndrome. Bien que plusieurs études aient tenté d'effectuer des corrélations génotype-phénotype chez l'humain afin de démystifier cette variabilité, les conclusions demeurent très légères. À ce jour, les différentes déclinaisons du syndrome CHARGE demeurent donc plutôt incomprises.

1 - Afin d'étudier les causes de la variabilité phénotypique du syndrome CHARGE, les modèles animaux peuvent être avantageux en raison de la possibilité de générer des cohortes génétiquement identiques hébergées dans un environnement contrôlé, réduisant le nombre de facteurs pouvant influencer sur le développement du syndrome. Des lignées murines isogéniques mutantes pour *Arb2a* (*Arb2a^{TP}*) et *Chd7* (*Chd7^{Gt}*), causatifs du syndrome CHARGE, ont été étudiées afin de déterminer l'impact du fond génétique, du gène pathologique et de molécules modulant l'environnement intra utérin du fœtus en développement sur la présentation phénotypique du syndrome CHARGE.

Une des particularités soulignées par cette étude est l'aggravation des anomalies oculaires associées au syndrome CHARGE chez les mutants *Arb2a^{TP}* dans le fond génétique B6. La principale anomalie oculaire du syndrome CHARGE, laquelle correspond également à un critère majeur, est le colobome oculaire, précédemment observé chez les mutants *Arb2a^{TP}* dans le fond génétique FVB. Par contre, dans le fond génétique B6, en plus du colobome oculaire, plusieurs sujets présentent de la microphthalmie et quelques sujets présentent de l'anophtalmie. Devant cette atteinte oculaire majeure, un nouveau volet expérimental s'est donc ouvert avec les mutants *B6Arb2a^{TP}*, **2 - identifier le rôle d'*Arb2a* dans le développement oculaire.**

Cette étude a rapidement rencontré un obstacle, soit la difficulté d'établir le patron d'expression d'ARB2A avec l'anticorps commercial disponible. Simultanément, puisque la lignée mutante hypomorphe *Arb2a^{TP}* présentait les caractéristiques associées au syndrome CHARGE, nous avons souhaité observer les conséquences de la perte complète d'ARB2A avec un mutant nul. Conséquemment, une lignée rapportrice et nulle pour *Arb2a* a été générée par insertion de la GFP en place du troisième exon d'*Arb2a*. Il est couramment attendu des mutants nuls qu'ils présentent une atteinte plus importante que les mutants hypomorphes. Or, les mutants nuls d'*Arb2a* ne présentent, à l'inverse, que très peu de phénotypes. L'hypothèse qu'un mécanisme de compensation pourrait être en jeu chez les mutants nuls, permettant à l'organisme de s'adapter en présence d'une mutation qui serait, autrement, hautement dommageable a alors été émise. **3 - L'étude du mécanisme de compensation prévenant de développement du syndrome CHARGE chez les mutants nuls d'*Arb2a*** s'est donc posée, les recherches nous amenant au cours du processus à nous pencher sur le rôle possible d'ARB2A au sein de diverses voies de réponses au stress.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Animaux

Les procédures impliquant des animaux ont été approuvées par le Comité Institutionnel de Protection des Animaux de l'Université du Québec à Montréal (CIPA, protocoles #650 et #009), accrédité par le Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA).

Les souris *Chd7*^{Gt(ROSAFARY)1Dmm} (*Chd7*^{Gt/+}), initialement dans le fond génétique C57BL/6J-129S1/SvImJ, ont été gracieusement fournies par le laboratoire du Dr Donna Martin (Hurd *et al.*, 2007) et rétrocroisées avec des souris FVB/N sur cinq générations pour obtenir la lignée *FVBChd7*^{Gt}. La lignée de souris *FVBArb2a*^{Tp} a été générée par injection d'un minigène de tyrosinase au pronoyau de zygotes FVB/N (Bélanger *et al.*, 2018; Pilon, 2016). La lignée *FVBGata4p[5kb]-RFP* (*G4-RFP*) a été créée par injection au pronoyau de zygotes FVB/N du transgène *Gata4p[5kb]-RFP* (Pilon *et al.*, 2008). La lignée *FVBArb2a*^{KO(KI-GFP)} (*FVBArb2a*^{GFP}) a été générée par la méthode Easi-CRISPR (Quadros *et al.*, 2017) par la plateforme de Génération et phénotypage de modèles murins du CERMO-FC. Des zygotes FVB/N ont été injectés au pronoyau avec 0.6µM d'ARN guide (5'-GAAGACTATGATACTGGAGG-3' et 5'-CCACGCAAATGAAAGTATCA-3'), 10 ng/ul d'ADN simple brin donneur (Figure S 1) et 50 ng/µl de Cas9, puis réimplantés dans l'oviducte de mères porteuses. Les souris *B6Ago2*^{CKO} ont été obtenus par croisement des lignées *Wnt1-Cre2*^{Tg} et *Ago2*^{Flox}, achetées du Jackson Laboratory (stocks #016520 et #022501).

Le transfert des lignées du fond génétique FVB vers le fond génétique B6 a été réalisé par cinq rétrocroisements successifs avec des souris B6, hormis pour les souris *Chd7*^{Gt/+}. En raison de la mortalité néonatale observée, les souris *B6Chd7*^{Gt/+} ont été maintenues dans un fond 75 % B6 - 25 % FVB (G2) à 87,5 % B6 - 12,5 % FVB (G3). Sauf indication contraire, pour cette lignée, les expériences ont été réalisées sur des souris 87,5 % B6 - 12,5 % FVB (G3) et 93,8 % B6 - 6,2 % FVB (G4).

Les souris ont été hébergées selon un horaire lumière-obscurité de 12 h/12 h (7 à 19 h), avec un accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture (Charles River Rodent Diet #5075, Cargill Animal Nutrition). Les embryons ont été générés par accouplement naturel, le jour embryonnaire 0,5 (E0,5) correspondant à midi du jour de la détection du bouchon vaginal. Les animaux contrôles et mutants ont été obtenus de mêmes portées et traités en parallèle. Des animaux des deux sexes ont été utilisés et leurs données ont été analysées

conjointement. Les souris ont été sacrifiées par une anesthésie à l'isoflurane suivie d'une euthanasie à l'aide d'une concentration croissante de CO₂.

Les malocclusions ont été identifiées par le personnel technique du service des animaleries de l'Université du Québec à Montréal.

2.2 Génotypage et sexage

Le génotypage des lignées *Arb2a^{Tp}* a été effectué en fonction de la pigmentation des animaux. Le génotypage des autres lignées transgéniques et des embryons ainsi que le sexage chromosomique ont été effectués par PCR suivant digestion de poinçons d'oreilles, sacs vitellins ou tissus embryonnaires par la protéinase K (0,5 mg/ml) pendant 1-2 h à 55 °C. L'état homozygotes ou hétérozygote des mutants *G4-RFP*, lorsque pertinent, a été établi par croisement test (*test-cross*). Les amorces et programmes employés sont listés dans les Tableau S 1 et Tableau S 2.

2.3 Colobome oculaire

Pour les lignées *Arb2a^{Tp}* et *B6Chd7^{Gt}*, le colobome oculaire a été identifié sous microscope (Leica M205 FA) par la fermeture incomplète de la fissure choroïdienne chez les embryons de stade E13.5. Pour la lignée *FVBChd7^{Gt}*, les observations ont été réalisées sur la lignée double transgénique pigmentée *FVBChd7^{Gt}::G4-RFP* ou sur des coupes sagittales en paraffine avec coloration H&E. Pour les expériences avec le modèle *Ago2^{CKO}*, la présence d'un colobome a été identifié à E12.5 par la présence d'une fissure choroïdienne de plus de 20 µm.

2.4 Injection d'éthanol et d'acide rétinoïque

Des femelles ont reçu par voie intrapéritonéale au jour gestationnel 7.5 (G7.5) deux injections à quatre heures d'intervalle de 15 à 20 µl/g d'EtOH 25 % (v/v) dans du PBS ou une injection unique de 1,5 à 3 mg/kg d'acide rétinoïque. Les injections d'acide rétinoïque ont été réalisées avec des solutions fraîchement préparées de 0,5 mg/ml obtenues par dilution dans du PBS de stocks de 20 mg/ml dans du DMSO. Les contrôles ont été injectés avec un volume équivalent de PBS ou de DMSO dilué dans du PBS. Les embryons ont été prélevés à E13.5 et examinés pour la présence de malformations oculaires.

2.5 Observation des capacités respiratoires

Pour tester les capacités respiratoires des souriceaux à la naissance, des embryons E18.5 tardifs ont été rapidement extraits de l'utérus maternel, placés sur une plaque chauffante à 37 °C et observés pendant une heure. Les souriceaux ont été stimulés de façon constante pendant les 15 premières minutes afin de favoriser leur respiration, puis de façon sporadique.

2.6 Imagerie par résonance magnétique

Les acquisitions ont été effectuées par l'unité d'IRM pré-clinique du centre d'imagerie du cerveau McConnel de l'université McGill suivant perfusion au paraformaldéhyde (PFA) 4 %.

2.7 Coloration du squelette

Les crânes d'embryons E18.5 et de souris adultes ainsi que les oreilles internes ont été colorés au rouge d'alizarine et au bleu alcian selon des protocoles préexistants (Allan *et al.*, 2001). Après fixation dans l'éthanol à 95 %, les tissus ont été colorés avec du bleu d'alcian 0,03 % dans de l'éthanol/acide acétique (4:1), digérés dans du KOH 2 %, colorés avec de l'alizarine rouge 0,1 % et lavés dans une solution de KOH 1 % et de glycérol 20 %.

2.8 Coupe en paraffine et colorations H&E

Les colorations H&E ont été réalisées tel que décrit précédemment (Bélanger *et al.*, 2018). Brièvement, les tissus ont été fixés dans du PFA 4 %, déshydratés dans des gradients d'éthanol et de xylène et enrobés dans de la paraffine. Des sections de 8 à 20 µm ont été déparaffinées au xylène, réhydratées, colorées à l'H&E, déshydratées à nouveau et scellées sous lamelle dans du milieu de montage Permount (Electron Microscope Sciences).

2.9 Marquage immunohistochimique des neurofilaments

Les neurofilaments ont été marqués selon un protocole préexistant (Sanchez-Ferras *et al.*, 2016). Après fixation au paraformaldéhyde (PFA) 4 %, les embryons ont été déshydratés au méthanol, transférés dans du méthanol/DMSO/H₂O₂ (4:1:1) pendant 5 h, réhydratés et lavés dans du tampon phosphate salin (PBS) contenant 2 % de lait et 0.5 % de triton X-100 (PBSMT). Les embryons ont été incubés à 4 °C pendant 16 h avec l'anticorps anti-2H3 dans le PBSMT, lavés, puis incubés à 4 °C pendant 16 h avec l'anticorps secondaire

anti-IgG de souris conjugué à la HRP dans le PBSMT. Les neurofilaments ont été révélés par l'ajout pendant 5 minutes de 3,3'-diaminobenzidine tétrahydrochloride.

2.10 Marquage immunofluorescent

Les montages à plat rétinien ont été fixés pendant 20 minutes au PFA 4 %, puis perméabilisés et bloqués (3 % BSA, 0.2 % triton, 0.05 % tween). Les échantillons ont par la suite été incubés pendant 16 h à 4 °C avec l'anticorps primaire (Tableau S 3) dilué dans la solution de blocage. Les échantillons ont été incubés avec l'anticorps secondaire (Tableau S 3) dilué dans la solution de blocage pendant 1 h à température pièce, puis les noyaux ont été colorés au DAPI (5 µg/ml) pendant 10 minutes à température pièce avant montage entre lame et lamelle dans du glycérol. Les images ont été acquises avec le microscope confocal Nikon A1 et l'objectif Plan Apo λ 60 × 1.40, puis analysées par ImageJ. Pour les marquages immunofluorescents sur cellules, les cultures ont été effectuées sur lamelles et fixées pendant 15 minutes sur glace avec du PFA 4 %, puis les échantillons ont été traités de façon similaire avec une solution de blocage composée de 10 % FBS et 0.1 % triton dans du PBS.

2.11 Immunobuvardage de type western

Les extraits protéiques ont été réalisés par sonication des tissus dans 15 volumes de tampon Laemmli, puis les échantillons ont été migrés sur mini-gels SDS-PAGE 10 % acrylamide avec le système Mini-PROTEAN (Bio-Rad). Suivant transfert sur membrane de PVDF, les membranes ont été bloquées à température pièce pendant 1h avec du TBST-M (1 % tween-20, 5 % lait dans du tampon salin Tris). Les membranes ont été incubées pendant 16 h à 4 °C avec l'anticorps primaire (Tableau S 3) dans du TBST-M, lavées puis incubées pendant 1-2 h à température pièce avec l'anticorps secondaire conjugué à la HRP (Tableau S 3). Les membranes ont été révélées par chimioluminescence utilisant le système Immobilon Western HRP (MilliporeSigma), les images acquises par Fusion FX (Vilber) et les quantifications réalisées avec ImageJ.

2.12 Cytométrie en flux et FACS

Les tissus ont été dissociés pendant 15 à 30 minutes à 37 °C avec 1.3 mg/ml de dispase II (Life Technologies), 0.4 mg/ml de collagénase (Sigma-Aldrich) et 0.1 mg/ml de DNase I (Sigma-Aldrich) dans du milieu EMEM sans sérum. Les analyses de cytométrie et de tri cellulaire ont été réalisées avec le BD FACSaria Fusion. Pour les analyses par cytométrie en flux, un minimum de 8 000 événements par échantillons ont été enregistrés. Les CCN ont été triées à partir d'embryons *G4-RFP* sur la base de l'émission d'un signal

fluorescent RFP (G4-RFP+). Les cellules triées ont été conservées à -80 °C dans du tampon RLT (Quiagen) additionné de 40 mM de dithiothreitol (DTT) jusqu'à l'extraction de l'ARN.

2.13 Culture cellulaire

Les cellules N2a et MEFs (originaire de tête d'embryons E11.5 obtenues par la méthode de dissociation de tissus précédemment décrite dans la section 2.12) ont été cultivées dans du milieu EMEM (10 % FBS, 1 % pénicilline/ streptomycine, Wisent) à 37 °C et sous 5 % CO₂.

Des shARN dirigés contre *Arb2a* dans le vecteur TRC2 pLKO.5-puro (Millipore Sigma, Tableau S 4) ont été employés pour transfection de cellules HEK293T à des fins de production lentivirale. Des lignées cellulaires stables ont été générées par incubation de N2a avec des quantités variables de lentivirus et sélection en présence de puromycine 1.25 µg/ml tel que précédemment décrit (Ajala *et al.*, 2025). Les lignées stables ont été maintenues par ajout de 2 µg/ml de puromycine au milieu de culture.

2.14 Extraction de l'ARN

L'extraction de l'ARN des cupules optiques (6 à 8 cupules par échantillon), des MEFs et des CCN triées par FACS (un embryon par échantillon) a été effectuée selon les instructions du fabricant avec la trousse RNeasy Micro (Qiagen).

2.15 RT-qPCR

Les réactions de rétrotranscription ont été réalisées avec la transcriptase inverse Superscript III (Thermo Fisher Scientific) à partir de 225-750 ng d'ARN total, puis les analyses qPCR ont été effectuées avec le mélange réactionnel universel pour qPCR Luna (New England Biolabs) et le thermocycleur C1000 Touch (Biorad) en accord avec les protocoles du fabricant. La normalisation a été effectuée avec le gène *Psmb2*. Les séquences des amorces sont présentées en Annexes (Tableau S 5).

2.16 Analyse transcriptomique

Les bibliothèques appauvries en ARN ribosomiques et séquençages ARN ont été réalisées par Génome Québec. Trois (cupules optiques) à quatre (MEFs) répliques biologiques ont été séquençées. Les échantillons présentant une trop faible profondeur de séquençage (< 25% nombre de lectures moyen des autres

échantillons) et dont la distribution en analyse en composantes principales (*PCA plot*) se distinguaient de ceux des autres réplicas biologiques ont été exclus des analyses. Un minimum de deux réplicas biologiques ont été conservés. La technologie NovaSeq (Illumina) a été employée, avec des séquences paired-end de 100 pb et 25 millions de lectures. Les séquences ont été alignées sur le génome de référence *Mus musculus* mm10. Pour les cupules optiques, les analyses différentielles des niveaux d'expression ont été effectuées avec le package Deseq2. Les analyses différentielles de l'épissage alternatif ont été effectuées avec le package Rmats par la plateforme de Bioinformatique du CERMO-FC. Pour les MEFs, les analyses différentielles des niveaux d'expression ont été effectuées avec le package edgeR. Les analyses d'ontologie génétique ont été effectuées avec le programme ToppFun de la suite ToppGene.

2.17 Cut & Run

Suivant dissociation et tri par FACS d'embryons *G4-RFP* au stade E10.5 tel que décrit à la section 2.12., les noyaux des CCN ont été isolés, puis les analyses Cut & Run ont été réalisées avec la trousse Cutana ChIC/Cut & Run de Epicypher en accord avec les protocoles du fabricant. Les bibliothèques ont été générées avec la trousse NEBNext Ultra DNA library Prep de NEB et ont été séquencées avec la technologie NovaSeq (Illumina) pour des séquences paired-end de 100 pb et 10 millions de lectures au CHU de l'Université Laval (Sallis, 2024).

2.18 Analyse statistique

Les données graphiques sont présentées sous forme de moyenne $\pm$ SD. Les réplicas biologiques (n) sont indiqués dans les figures ou légendes. Les tests statistiques sélectionnés sont spécifiés dans les légendes. Les tests exacts de Fisher et les tests du chi-carré ont été calculés avec R 4.4.3. Les tests de Student ont été réalisés avec GraphPad Prism v9.5.1. Le seuil pour la valeur P a été fixé à 0,05.

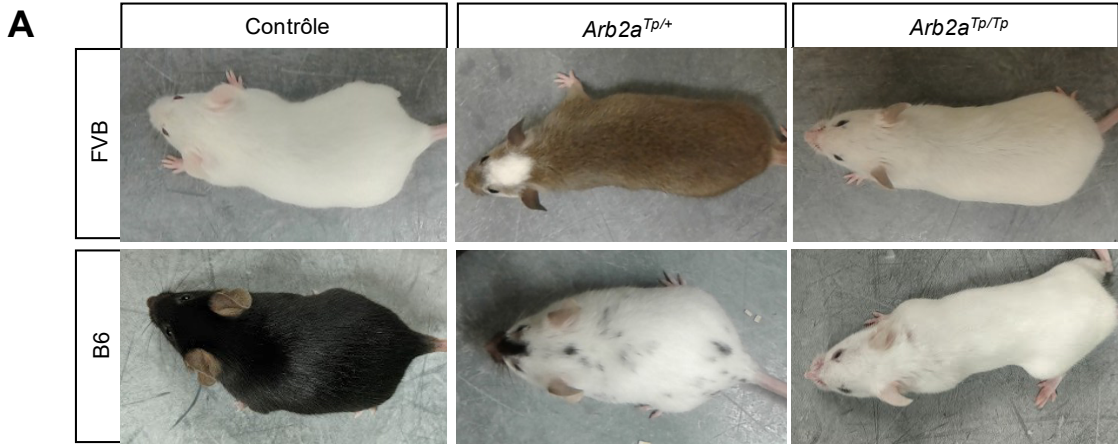
CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 Étude de l'influence de facteurs génétiques et non génétiques sur le développement phénotypique du syndrome CHARGE

3.1.1 Le fond génétique impacte les phénotypes associés aux CCN présentées par le modèle de souris *Arb2a^{Tp}*

De précédentes études ont démontré que le fond génétique peut avoir une forte incidence sur les modèles murins de neurocristopathies (Dixon et Dixon, 2004; Soret *et al.*, 2021; Takeuchi *et al.*, 1999). Par conséquent, la lignée murine *Arb2a^{Tp}* (*Toupee*), une lignée hypomorphe pour *Arb2a* précédemment caractérisée dans le fond génétique FVB/N (*FVBArb2a^{Tp}*) comme modèle pour le syndrome CHARGE (Bélanger *et al.*, 2018), a été transférée dans le fond génétique C57Bl/6N (B6) (*B6Arb2a^{Tp}*) afin d'étudier la présentation phénotypique du syndrome dans ce fond génétique. Suite à ce transfert, des différences ont rapidement été observées entre les mutants *Arb2a* issus des deux fonds génétiques, la première évidence frappante étant la variation des motifs de pigmentation (Figure 3.1A). Pour la lignée *Arb2a^{Tp}* – comme pour les lignées issues du même crible génétique – l'insertion d'un minigène de tyrosinase dans un gène lié aux CCN, desquelles dérivent les mélanocytes, permet le sauvetage de la pigmentation chez les souris albinos, tout en générant simultanément des anomalies de pigmentation (Pilon, 2016). Bien que ces défauts de pigmentation soient conservés dans les lignées *Arb2a^{Tp}* des deux fonds génétiques, ils se présentent de manières différentes (Figure 3.1A). De base, les souris FVB sont complètement dépigmentées avec des yeux rouges (albinos), tandis que les souris B6 sont noires avec des yeux noirs (Figure 3.1A, gauche). Avec une copie du transgène tyrosinase, les souris *FVBArb2a^{Tp/+}* récupèrent une grande partie de leur pigmentation, présentant un pelage gris-brun avec une dépigmentation blanche sur le front (le toupet) et sur le ventre (Bélanger *et al.*, 2018). À l'inverse, les souris *B6Arb2a^{Tp/+}* perdent la majeure partie de leur pigmentation et sont presque totalement dépigmentées, avec un pelage blanc, quelques taches noires dispersées et une crête nasale noire (Figure 3.1A, centre). Avec deux copies du transgène, les souris homozygotes sont presque entièrement dépigmentées. Les souris *FVBArb2a^{Tp/Tp}* conservent uniquement la pigmentation des oreilles et des yeux, tandis que les *B6Arb2a^{Tp/Tp}* ne gardent que la pigmentation des yeux (Figure 3.1A, droite). Globalement, la dépigmentation est donc plus importante chez la lignée *Arb2a^{Tp}* dans le fond génétique B6.



□ FVB *Arb2a^{Tp/Tp}* ■ B6 *Arb2a^{Tp/Tp}*

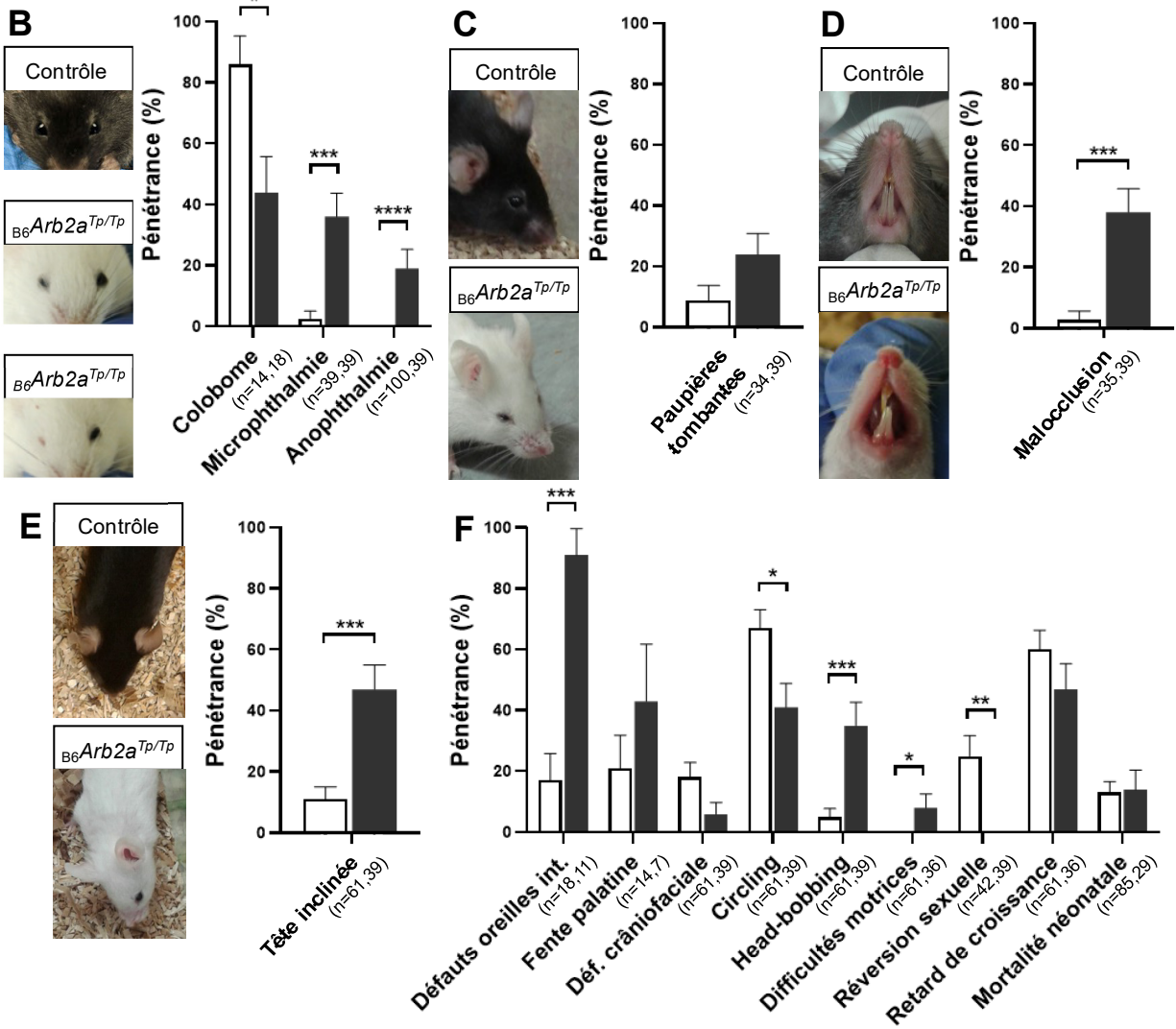


Figure 3.1 : Les phénotypes dérivés des CCN développés par le modèle murin *Arb2a^{Tp}* varient en fonction du fond génétique.

(A) La lignée *Arb2a^{Tp}* présente des défauts de pigmentation plus importants dans le fond C57Bl/6N que dans le fond FVB (n > 60). *B6Arb2a^{Tp/Tp}* présente également (B) de la microphthalmie (centre) et de l'anophtalmie (bas) qui sont très rares et inexistantes dans le fond FVB, ainsi qu'une augmentation de l'occurrence (C) de paupières tombantes, (D) de malocclusion et (E) d'inclinaison de la tête. (F) Une caractérisation détaillée présente des changements dans la fréquence des anomalies de l'oreille interne, du *circling*, du *head-bobbing*, des difficultés motrices et de la réversion sexuelle entre les fonds génétiques. Défauts oreilles int., Défauts aux oreilles internes, Déf. Crâniofaciale, déformation crâniofaciale. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 (test exact de Fisher).

La caractérisation de la lignée *B6Arb2a^{Tp}* a permis d'identifier qu'une autre conséquence majeure liée au transfert du fond FVB vers le fond B6 est une sévérité accrue des anomalies oculaires (Figure 3.1B). En effet, les souris *FVBArb2a^{Tp/Tp}* sont caractérisées par une forte pénétrance du colobome oculaire (86 %), anomalie majeure et emblématique du syndrome CHARGE, tandis que les souris *B6Arb2a^{Tp/Tp}* présentent ce phénotype dans une proportion plus faible (44 %), mais montrent également une incidence importante de microphthalmie (œil de taille réduite, 36 %) (Figure 3.1B, centre) et quelques cas d'anophtalmie (absence d'œil, 19 %) (Figure 3.1B, bas). De nombreuses souris présentant un phénotype s'apparentant à des « paupières tombantes », un signe clinique associé à de la ptose chez les patients CHARGE (Herman et Siegel, 1998), ont également été identifiés dans la lignée *B6Arb2a^{Tp/Tp}* (24 %), alors que ce phénotype est rare (9 %) dans la lignée *FVBArb2a^{Tp/Tp}* (Figure 3.1C).

Nous avons également observé de la malocclusion chez presque la moitié (38 %) des souris *B6Arb2a^{Tp/Tp}*, représentant l'une des principales causes de mortalité post-sevrage si non traitée, alors que cette anomalie est presque absente (3 %) chez les souris *FVBArb2a^{Tp/Tp}* (Figure 3.1D). De même, le phénotype de tête inclinée, les anomalies aux oreilles internes, la fente palatine et l'*head-bobbing*, qui sont occasionnels chez les sujets *FVBArb2a^{Tp/Tp}*, affectent une proportion beaucoup plus importante de sujets *B6Arb2a^{Tp/Tp}*, avec une augmentation minimale d'un facteur de deux jusqu'à une pénétrance presque complète pour les anomalies de l'oreille interne (91 %) (Fig. 1E-F). Nous avons aussi noté des difficultés motrices occasionnelles chez des souris *B6Arb2a^{Tp/Tp}* récemment sevrées (8 %), alors que ce n'est pas le cas pour les souris *FVBArb2a^{Tp/Tp}* (Figure 3.1F).

En revanche, certaines anomalies sont moins fréquentes dans le fond génétique B6. Le comportement de *circling* est légèrement moins présent chez *B6Arb2a^{Tp/Tp}* que *FVBArb2a^{Tp/Tp}* (67 % contre 41 %) et perd son caractère hyperactif (Figure 3.1F). La réversion sexuelle, précédemment identifiée chez 25 % des souris

*FVB**Arb2a*^{Tp/Tp} XY, n'a encore été observée chez aucune des souris *B6**Arb2a*^{Tp/Tp} (Figure 3.1F). Finalement, le retard de croissance, les déformations crâniofaciales et la mortalité néonatale ne sont pas significativement affectés par le transfert de fond génétique (Figure 3.1F). Dans l'ensemble, parmi les quinze anomalies étudiées, dix ont ainsi montré un changement significatif de pénétrance en fonction du fond génétique (Figure 3.1F). Le fond génétique semble donc prédisposer au développement de certaines anomalies au détriment d'autres, donnant ainsi lieu à deux lignées *Arb2a*^{Tp} présentant des tendances phénotypiques différentes.

3.1.2 Le fond génétique module les anomalies associées au syndrome CHARGE chez le modèle de souris *Chd7*^{Gt/+}

Afin de déterminer si ce changement important de la présentation phénotypique en fonction du fond génétique est propre au modèle *Arb2a*^{Tp} ou si ce phénomène constitue une caractéristique générale du syndrome CHARGE, la même comparaison entre les fonds génétiques FVB et B6 a été effectuée avec le modèle *Chd7*^{Gt/+}, un modèle bien établi porteur d'un allèle nul pour le principal gène causatif du syndrome, *Chd7* (Hurd *et al.*, 2007). La lignée *FVB**Chd7*^{Gt/+} préexistante a ainsi été transférée dans le fond génétique B6, révélant déjà une incidence marquée du fond génétique au cours du processus. La première étape du transfert consistait en un croisement *FVB**Chd7*^{Gt/+} x B6. Ce premier croisement a permis d'obtenir une génération G1 (50 % FVB – 50 % B6) qui présentait un taux de survie de 100 % au sevrage (Figure 3.2A). Les croisements successifs avec des souris B6, augmentant graduellement la proportion en fond génétique B6, ont progressivement diminué le taux de survie des sujets *Chd7*^{Gt/+}, à un point tel qu'aucune souris *Chd7*^{Gt/+} viable n'a pu être obtenue dans un fond génétique B6 « pur » (G5+). En comparaison, dans le fond FVB, le taux de mortalité des souris *FVB**Chd7*^{Gt/+} est estimé à 76 % (Figure 3.2A). Le fond génétique semble donc avoir un impact considérable sur la viabilité des animaux *Chd7*^{Gt/+}.

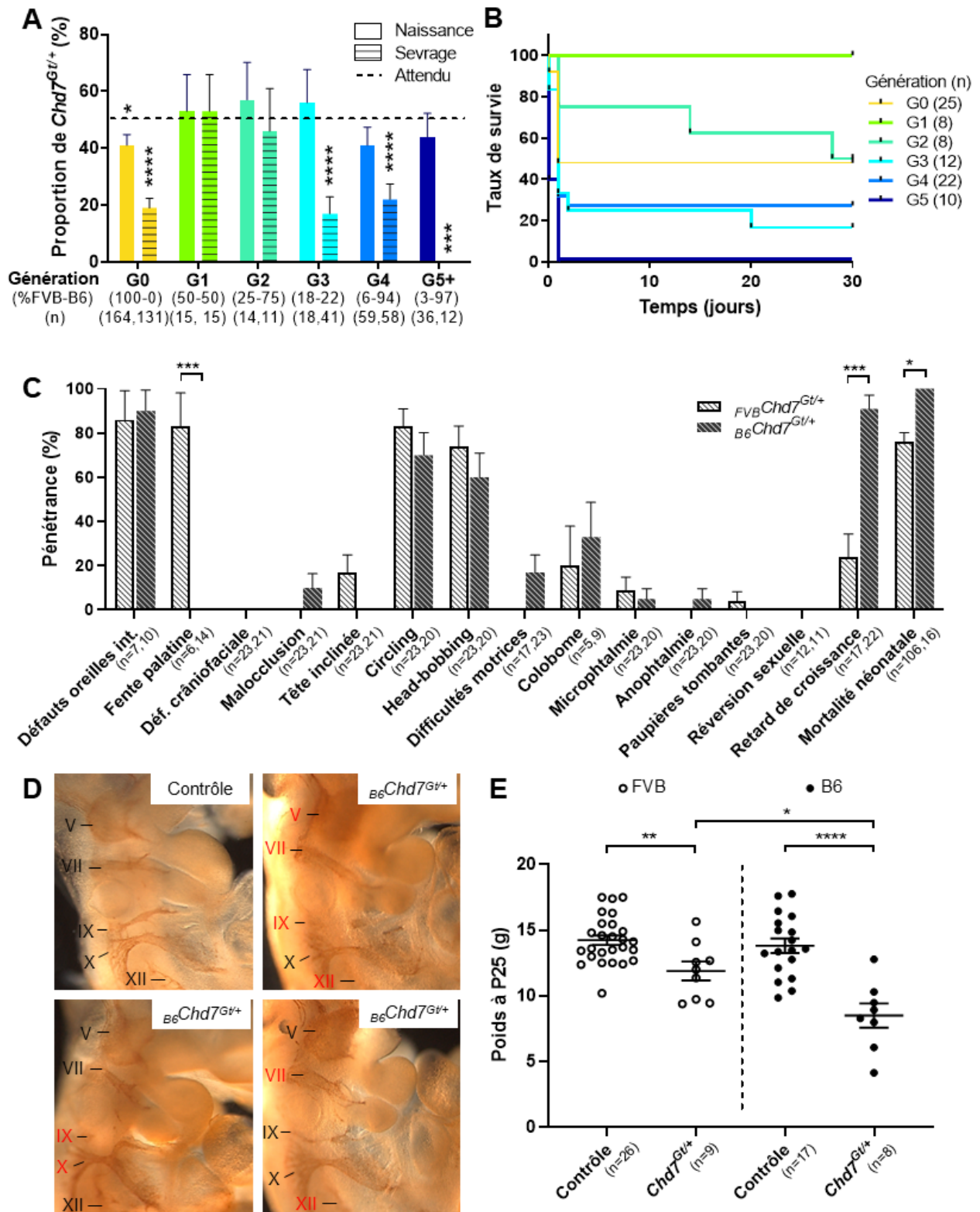


Figure 3.2 : Des différences phénotypiques sont identifiables entre *FVBChd7^{Gt/+}* et *B6Chd7^{Gt/+}*.

(A) Les ratios génotypiques observés au sevrage par rapport aux ratios attendus suggèrent de la mortalité chez les souris *Chd7^{Gt/+}*, laquelle varie en fonction de la composition du fond génétique. (B) La courbe de survie sur 30 jours montre une forte mortalité des souriceaux *Chd7^{Gt/+}* au cours des premiers 48 h de vie. (C) La caractérisation du modèle dans les fonds génétiques FVB et B6 révèle peu de différences de pénétrance pour les anomalies caractérisées. (D) Le marquage immunohistochimique des neurofilaments (2H3) au stade E10.5 montre une dysplasie des nerfs crâniens chez les embryons *B6Chd7^{Gt/+}*. Les nerfs affectés sont indiqués en rouge (n = 15 Ctrl, n = 5 *B6Chd7^{Gt/+}*). (E) Le poids à P25 montre un retard plus important pour *B6Chd7^{Gt/+}* que pour *FVBChd7^{Gt/+}*. La caractérisation de *B6Chd7^{Gt/+}* a été réalisée sur des sujets G3-G4. La mortalité néonatale présente les statistiques de la G5. Déf. Crâniofaciale, déformation crâniofaciale. Défauts oreilles int., Défauts aux oreilles internes. *P ≤ 0,05, **P ≤ 0,01, ***P ≤ 0,001, ****p < 0,001 (A, test du chi carré par rapport à la proportion mendélienne attendue de 50 %) (C, test exact de Fisher) (E, test de Student).

Les causes de la mortalité décrite ci-haut ont été investiguées. Un suivi quotidien a permis d'établir que la majorité des décès surviennent au cours des 48 premières heures de vie, aussi bien pour les souris *Chd7^{Gt/+}* FVB que B6 (Figure 3.2B). Chez les patients atteints du syndrome CHARGE, les problèmes respiratoires et alimentaires peuvent être la cause de décès néonataux (Blake et al., 1998 ; Hudson, Trider & Blake, 2017 ; Issekutz et al., 2005 ; Sporik, Dinwiddie & Wallis, 1997). Les capacités respiratoires ont donc été investiguées chez des embryons E18.5 tardifs. Ces observations n'ont révélé aucune différence entre les sujets contrôles et *Chd7^{Gt/+}*, les embryons des différents génotypes étant répartis de manière équivalente entre les groupes respirant normalement, respirant difficilement et décédés (Tableau S 6). Cependant, lors de la caractérisation du modèle *Chd7^{Gt/+}* dans les fonds génétiques FVB et B6, une occurrence importante de la fente palatine a été identifiée chez les embryons *FVBChd7^{Gt/+}* (Figure 3.2C). La fente palatine a donc été associée à la mortalité néonatale élevée pour *FVBChd7^{Gt/+}*, puisqu'elle empêche l'ingestion de lait par les souriceaux en raison de l'impossibilité de fermer le passage nasal et de créer la pression négative nécessaire à la succion (Blake et Hudson, 2017; Turgeon et Meloche, 2009). Cette observation est renforcée par l'absence visible de tache de lait dans l'estomac des nouveau-nés *Chd7^{Gt/+}* décédés (Figure S 2). À l'inverse, les embryons *B6Chd7^{Gt/+}* ne présentent étonnamment aucun signe de fente palatine, même parmi les souriceaux décédés, écartant ainsi cette cause potentielle de décès (Figure 3.2C). Les anomalies des neurofilaments crâniens ont alors été étudiées, ce critère majeur du syndrome CHARGE étant associé à des difficultés de déglutition (Dobbelsteyn et al., 2008; Lawand et al., 2003). L'observation des neurofilaments crâniens a révélé une troncature unilatérale ou bilatérale du nerf glossopharyngien (IX) chez tous les embryons *B6Chd7^{Gt/+}* (Figure 3.2D). La majorité présentent également un nerf hypoglosse sous-développé. D'autres anomalies occasionnelles incluent la jonction distale des nerfs glossopharyngien et vague, des ramifications surnuméraires ou des déviations du nerf facial (VII), et un nerf trijumeau (V)

sous-développé (Figure 3.2D). À titre comparatif, chez les *FVBChd7^{Gt/+}*, seules de rares et mineures anomalies au nerf facial ont été détectées (non montré). Les dysfonctionnements des nerfs crâniens sont donc proposés comme la principale cause de décès des souris *B6Chd7^{Gt/+}*. En somme, des causes de mortalité divergentes constituent une différence additionnelle entre les modèles *FVBChd7^{Gt/+}* et les *B6Chd7^{Gt/+}*.

En dehors de ces différences majeures, le modèle *Chd7^{Gt/+}* a toutefois montré une cohérence surprenante dans la pénétrance phénotypique. En effet, seulement trois des quinze anomalies caractérisées montrent un changement de pénétrance en fonction du fond génétique (Figure 3.2C). Outre la fente palatine et la mortalité néonatale décrites précédemment, seul le retard de croissance a montré des variations notables en fonction du fond génétique. Les souris *B6Chd7^{Gt/+}* présentent davantage de cas de retard de croissance (91 % contre 24 %) et le retard est également plus marqué que chez les souris *FVBChd7^{Gt/+}* (Figure 3.2E). Il est intéressant de noter qu'aucune de ces trois anomalies n'a montré de variations de pénétrance pour le modèle *Arb2a^{Tp}*. Notons également que si la pénétrance des anomalies aux oreilles interne est similaire entre les deux fonds génétiques, la sévérité semble accrue dans le fond B6. En effet, chez les souris *FVBChd7^{Gt/+}*, seuls les canaux semi-circulaires latéraux sont atteints tandis que chez les souris *B6Chd7^{Gt/+}*, les défauts aux canaux latéraux sont marqués par un basculement de la dysplasie vers l'aplasie et s'accompagnent de défauts aux canaux postérieurs (Tableau S 7). En résumé, si le fond génétique influence la présentation phénotypique d'un grand nombre d'anomalies dans le modèle *Arb2a^{Tp}*, il en affecte un nombre beaucoup plus restreint dans le modèle *Chd7^{Gt/+}*, bien que l'impact sur ces anomalies puisse être conséquent.

3.1.3 Les modèles murins pour le syndrome CHARGE *Arb2a^{Tp/Tp}* et *Chd7^{Gt/+}* présentent des divergences phénotypiques

Les différences observées entre les réponses des modèles *Arb2a^{Tp/Tp}* et *Chd7^{Gt/+}* à un changement de fond génétique (Figure 3.1 et Figure 3.2) ont soulevé la question d'une divergence entre ces deux modèles. Un autre élément important soulevant ce questionnement est que pour la lignée *Chd7^{Gt}*, ce sont les souris hétérozygotes qui présentent les phénotypes associés au syndrome CHARGE (les homozygotes *Chd7^{Gt/Gt}* étant létaux à E10.5), tandis que pour la lignée *Arb2a^{Tp}*, ce sont les homozygotes (Bélanger *et al.*, 2018; Hurd *et al.*, 2007). Chez l'humain, des mutations hétérozygotes de *CHD7* et *ARB2A* causent toutes deux le syndrome CHARGE (Bélanger *et al.*, 2018; Lalani *et al.*, 2006; Vissers *et al.*, 2004).

Les caractérisations précédemment réalisées ont donc été exploitées afin de comparer cette fois la présentation phénotypique des deux modèles pour un même fond génétique (Figure 3.3A, B). La mortalité néonatale affecte davantage les souriceaux *Chd7^{Gt/+}* que les souriceaux *Arb2a^{Tp/Tp}*, tous fonds confondus. La fente palatine est plus pénétrante chez le modèle *Chd7^{Gt/+}* que chez le modèle *Arb2a^{Tp/Tp}* dans le fond génétique FVB, mais moins pénétrante dans le fond B6. L'observation inverse est faite pour le retard de croissance (Figure 3.3A, B). L'*head-bobbing* et les anomalies de l'oreille interne sont également plus fréquents chez les souris *Chd7^{Gt/+}* que chez les souris *Arb2a^{Tp/Tp}* dans le fond génétique FVB, contrairement aux déformations crâniocfaciales et au colobome. Dans le fond B6, la tête inclinée, la malocclusion, la microphthalmie et les paupières tombantes sont présentes chez les sujets *Chd7^{Gt/+}*, mais dans une moindre mesure que chez les sujets *Arb2a^{Tp/Tp}* (Figure 3.3A, B). La pénétrance du *circling*, de l'anophtalmie, de la réversion sexuelle et des difficultés motrices ne varie pas significativement entre les deux modèles. Dans l'ensemble, onze des quinze anomalies ont montré des différences significatives de pénétrance entre les modèles *Chd7^{Gt/+}* et *Arb2a^{Tp/Tp}* dans au moins un fond génétique (Figure 3.3A, B).

Parallèlement aux variations dans la pénétrance, il a été observé que, bien que certaines anomalies soient identifiées dans les deux modèles, elles ne se manifestent pas toujours de la même façon (Fig. 3C-D). La fente palatine en est l'exemple le plus représentatif. Si la pénétrance varie déjà entre *Arb2a^{Tp/Tp}* et *Chd7^{Gt/+}* dans les deux fonds génétiques étudiés (Figure 3.3A, B), l'os affecté n'est pas non plus le même (Figure 3.3C). Les souris *Chd7^{Gt/+}* ont une fente palatine classique, caractérisée par une fermeture incomplète des processus palatins et maxillaires. Les souris *Arb2a^{Tp/Tp}* sont plutôt marquées par une aplasie de l'os présphénoïde, une anomalie peu décrite dans la littérature (Figure 3.3C). De plus, les anomalies de l'oreille interne chez les souris *Chd7^{Gt/+}* consistent généralement en des canaux semi-circulaires latéraux tronqués, hypercoudés ou absents et en des canaux postérieurs hypercoudés ou absents, tandis que les oreilles internes affectées des *Arb2a^{Tp/Tp}* apparaissent partiellement ou totalement gonflées (Figure 3.3D, Tableau S 7). Avec de telles différences dans la pénétrance des anomalies associées au CHARGE et dans la nature même des fentes palatines et des anomalies de l'oreille interne, les modèles *Arb2a^{Tp/Tp}* et *Chd7^{Gt/+}* pourraient donc être plus dissemblables qu'initialement suggéré.

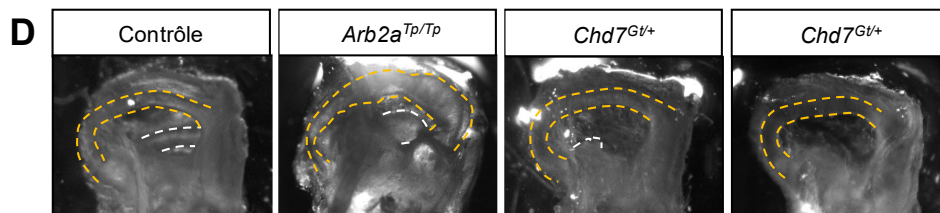
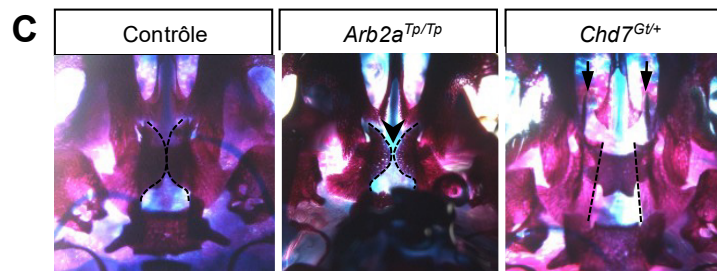
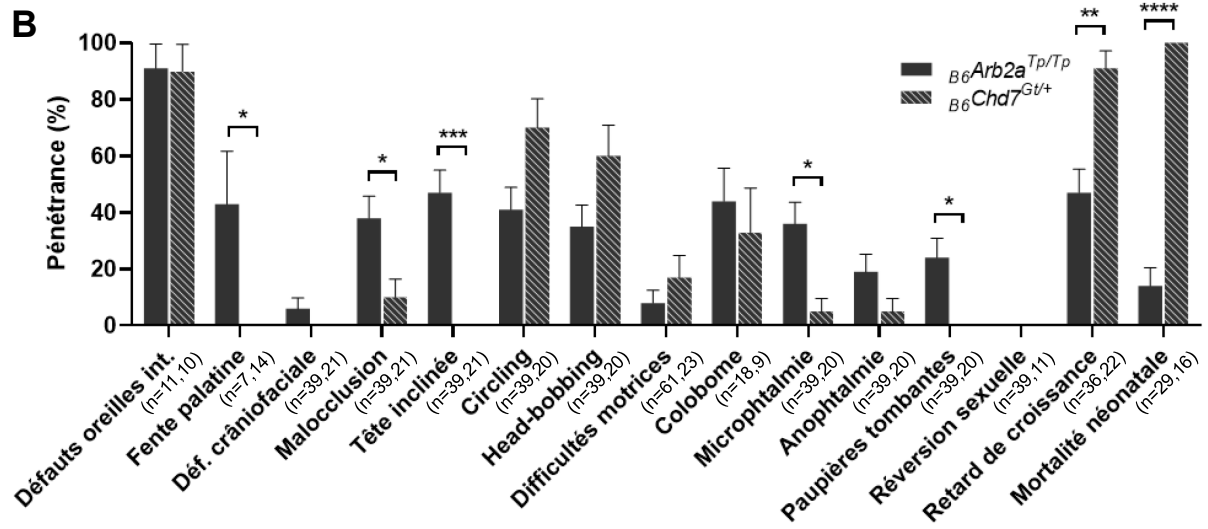
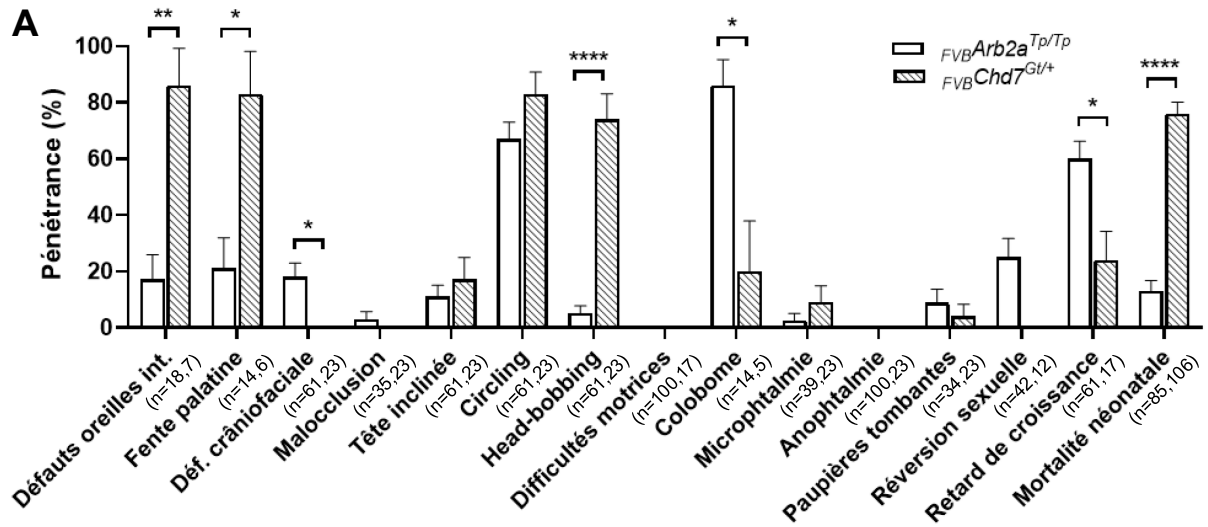


Figure 3.3 : Dissimilarités phénotypiques entre les modèles pour le syndrome CHARGE *Arb2a^{Tp/Tp}* et *Chd7^{Gt/+}*.

La caractérisation des modèles *Arb2a^{Tp/Tp}* et *Chd7^{Gt/+}* dans les fonds génétiques (A) FVB et (B) B6 montre une variabilité significative de la pénétrance de la majorité des anomalies. (C) Vue de la région palatine de crânes d'embryons E18.5 colorés à l'alizarine rouge et au bleu alcian, montrant l'absence de l'os présphénoïde (tête de flèche) dans le modèle *Arb2a^{Tp/Tp}* et une fente complète des os palatins (ligne pointillée noire) et maxillaires (flèches) dans le modèle *Chd7^{Gt/+}* (n = 19 Ctrl, n = 14 *FVBArb2a^{Tp/Tp}*, n = 7 *B6Arb2a^{Tp/Tp}*, n = 6 *FVBChd7^{Gt/+}*, n = 14 *B6Chd7^{Gt/+}*). (D) Oreilles internes colorées à l'alizarine rouge avec vue sur les canaux semi-circulaires antérieurs (ligne pointillée jaune) et latéraux (ligne pointillée blanche). Le modèle *Arb2a^{Tp/Tp}* présente des canaux boursoufflés, tandis que les anomalies de l'oreille les plus fréquentes pour le modèle *Chd7^{Gt/+}* sont la troncation (gauche) ou l'absence (droite) du canal semi-circulaire latéral (n = 9 Ctrl, n = 18 *FVBArb2a^{Tp/Tp}*, n = 11 *B6Arb2a^{Tp/Tp}*, n = 7 *FVBChd7^{Gt/+}*, n = 10 *B6Chd7^{Gt/+}*). *P ≤ 0,05, **P ≤ 0,01, ***P ≤ 0,001, ****p < 0,001 (test exact de Fisher).

3.1.4 L'acide rétinoïque et l'éthanol peuvent aggraver les phénotypes oculaires observés chez les modèles *Arb2a^{Tp/Tp}* et *Chd7^{Gt/+}*

Afin d'élargir notre recherche sur les facteurs pouvant influencer la présentation phénotypique du syndrome CHARGE, des facteurs non génétiques ont été investigués. Ainsi, l'éthanol et l'acide rétinoïque (AR), des substances pouvant être obtenues par l'alimentation maternelle et connues pour affecter les cellules de la crête neurale, ont été administrés par voie intrapéritonéale à des femelles gestantes, puis les embryons ont été analysés à E13.5 (Ahlgren, Thakur et Bronner-Fraser, 2002; Williams et Bohnsack, 2019). Pour faciliter les analyses, nous avons concentré nos observations sur une caractéristique majeure du syndrome CHARGE présentant une pénétrance incomplète dans tous nos modèles, le colobome – et autres anomalies oculaires associées.

La consommation d'alcool pendant la grossesse est connue pour causer le syndrome d'alcoolisme fœtal, qui englobe un large éventail de déficiences physiques, comportementales et cognitives, dont certaines chevauchent le syndrome CHARGE, comme les anomalies crâniofaciales et le retard mental et de développement (Popova *et al.*, 2017). Suite à deux injections intrapéritonéales d'éthanol à des femelles au jour de gestation 7.5 (G7.5), les phénotypes oculaires présentés par les embryons au stade E13.5 ont révélé une sensibilité importante des lignées *FVBArb2a^{Tp}* et *B6Arb2a^{Tp}* à l'éthanol. Les anomalies oculaires augmentent en pénétrance chez les embryons mutants des deux lignées ainsi qu'en sévérité pour les embryons mutants du fond génétique B6 (Figure 3.4A, B, C). Bien que pour la lignée *B6Arb2a^{Tp}* les embryons contrôles marquent également une augmentation de la pénétrance des anomalies oculaires suivant administration d'éthanol, cette augmentation est moins marquée que chez les embryons mutants. Surprenamment, les embryons *B6Arb2a^{Tp/+}* semblent également répondre dans une certaine mesure aux injections de véhicule (PBS) (Figure 3.4C). À l'inverse, les mutants *Chd7* paraissent plus résistants à

l'éthanol (Figure 3.4D, E). Suivant l'administration d'éthanol à des femelles contrôles gestantes (G7.5) de mâles *Chd7^{Gt/+}*, aucun effet significatif n'a été détecté chez les embryons contrôles ou *FVBChd7^{Gt/+}* dans le fond génétique FVB (Figure 3.4D) et les embryons *B6Chd7^{Gt/+}* n'ont montré qu'une légère aggravation des anomalies oculaires après injection d'éthanol, bien que l'impact ait été difficile à distinguer en raison de défauts déjà assez marqués (Figure 3.4E). Une dose légèrement inférieure d'éthanol a été utilisée pour cette lignée en raison d'une certaine sensibilité des embryons sauvages, même à cette dose réduite. Dans l'ensemble, ces expériences illustrent que l'éthanol peut aggraver les anomalies oculaires développées par ces deux modèles CHARGE, avec une sensibilité nettement plus élevée des lignées *Arb2a^{Tp}*.

L'acide rétinoïque est un facteur crucial du développement de l'œil (Engfer & Palczewski, 2025) et ses modulations ont déjà été associées à la prévention des défauts des canaux semi-circulaires dans le modèle *Chd7^{Gt/+}* (Micucci et al., 2014). Nous avons donc investigué simultanément l'impact d'un composé issu de l'alimentation et les potentielles propriétés thérapeutiques de l'acide rétinoïque sur les anomalies oculaires chez les modèles CHARGE. Malheureusement, les résultats indiquent qu'une administration de 1,5 à 3 mg/kg d'acide rétinoïque accentue la pénétrance et la sévérité des défauts oculaires chez tous les modèles (Figure 3.5A-E). Dans le fond génétique B6, un effet négatif de l'acide rétinoïque sur le développement oculaire semble s'additionner à des anomalies déjà importantes, puisque des augmentations relativement similaires de la pénétrance sont observées chez les embryons mutants et sauvages (Figure 3.5C, E). Une fois encore, les embryons *B6Arb2a^{Tp/+}* semblent également répondre modérément à l'administration de véhicule (Figure 3.5C). Dans le fond génétique FVB, une dose plus élevée a été requise afin d'induire une aggravation des défauts oculaires. À cette dose, il semble y avoir un effet synergique de l'acide rétinoïque avec les modèles *FVBArb2a^{Tp/Tp}* et *FVBChd7^{Gt/+}*, l'impact étant plus important chez les embryons mutants que chez les contrôles, en particulier pour la lignée *FVBArb2a^{Tp}* (Figure 3.5). Ainsi, pour les quatre modèles CHARGE de la présente étude, l'injection intrapéritonéale d'acide rétinoïque à des femelles gestantes a aggravé les anomalies oculaires développées par les embryons mutants, en particulier dans le fond génétique FVB.

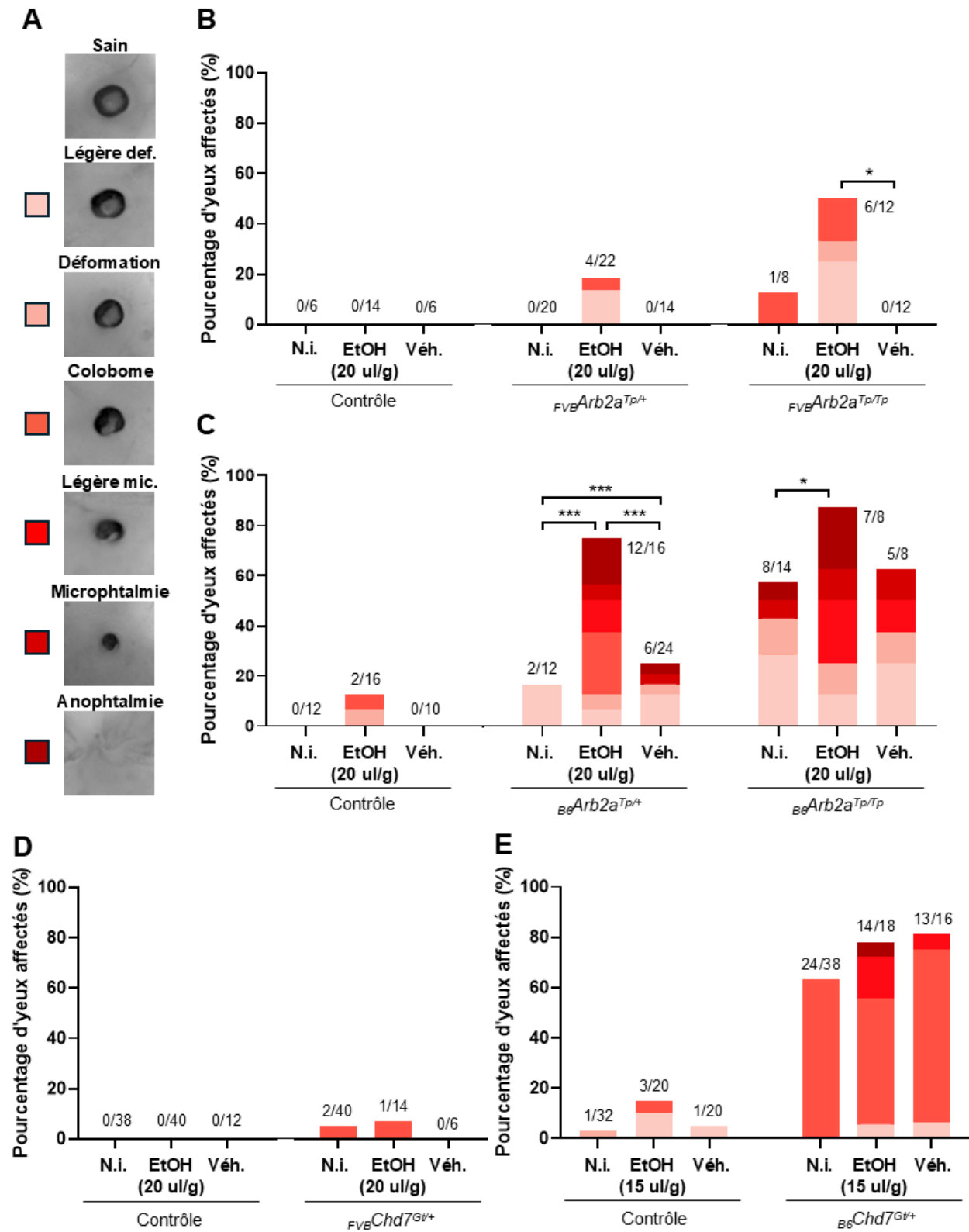


Figure 3.4 : Effets de l'éthanol sur les caractéristiques oculaires associées au syndrome CHARGE.

(A) Légende employée pour la gradation des anomalies oculaires. (B) Impact de l'EtOH sur le développement des anomalies oculaires présentées par les lignées *FVBArb2a^{Tp}* (C) *B6Arb2a^{Tp}* (D) *FVBChd7^{Gt}* et (E) *B6Chd7^{Gt}*. Des femelles gestantes ont reçu deux injections intrapéritonéales à 4h d'intervalle de 15 à 20 µl/g d'EtOH 25 % dans du PBS au jour G7.5, et les embryons ont été prélevés au jour E13.5. Les animaux témoins ont reçu deux injections d'un volume équivalent de PBS. Le nombre d'yeux affectés par rapport au nombre total d'yeux analysés (n) est présenté sur les graphiques. EtOH, éthanol; Légère def., Légère déformation; Légère mic., Légère microphthalmie; N.i., non injecté; Véh., véhicule. *p < 0,05, ***p < 0,001 (test de Student).

En résumé, des facteurs environnementaux comme l'éthanol et l'acide rétinoïque peuvent moduler les phénotypes oculaires développés *in utero* chez les modèles murins du syndrome CHARGE *Arb2a^{Tp/Tp}* et *Chd7^{Gt/+}*, soit par effets additifs, soit par des effets synergiques, augmentant la pénétrance des anomalies ainsi que leur sévérité, bien que tous les fonds génétiques et tous les modèles CHARGE ne présentent pas la même sensibilité à ces facteurs.

3.2 Étude du rôle d'ARB2A dans le développement oculaire

3.2.1 Le modèle murin *B6Arb2a^{Tp/Tp}* présente de nombreuses anomalies oculaires

Le transfert de la mutation *Arb2a^{Tp}* du fond FVB au fond B6 effectuée lors du volet précédent a mis en évidence l'aggravation des anomalies oculaires associées au syndrome CHARGE (Figure 3.1B). En effet, au colobome oculaire observé chez les souris *FVBArb2a^{Tp/Tp}* se sont ajoutés la microphthalmie et l'anophtalmie (M/A), complétant ainsi le spectre MAC (microphthalmie-anophtalmie-colobome) (Figure 3.6A). Étonnamment, ces anomalies ont également été identifiées chez 15 % des souris hétérozygotes *B6Arb2a^{Tp/+}* (Figure 3.6A), qui ne présentent généralement pas d'autres anomalies associées au syndrome CHARGE.

Plusieurs cas d'opacification oculaire ont été identifiés, à la fois chez les souris *B6Arb2a^{Tp/Tp}* et chez les souris *B6Arb2a^{Tp/+}* (Figure 3.6B, haut). Ces cas d'opacification apparaissent généralement dans les quelques semaines suivant le sevrage des souriceaux. Ils ont fréquemment été observés en présence d'une microphthalmie modérée, particulièrement chez *B6Arb2a^{Tp/+}*, mais pas exclusivement. Sur coupes histologiques avec coloration hématoxyline-éosine (H&E), la majorité des yeux opacifiés présentent une fermeture de l'angle irido-cornéen (Figure 3.6). Cette association a conduit à poser l'hypothèse d'un glaucome par fermeture de l'angle comme cause possible de l'opacification.

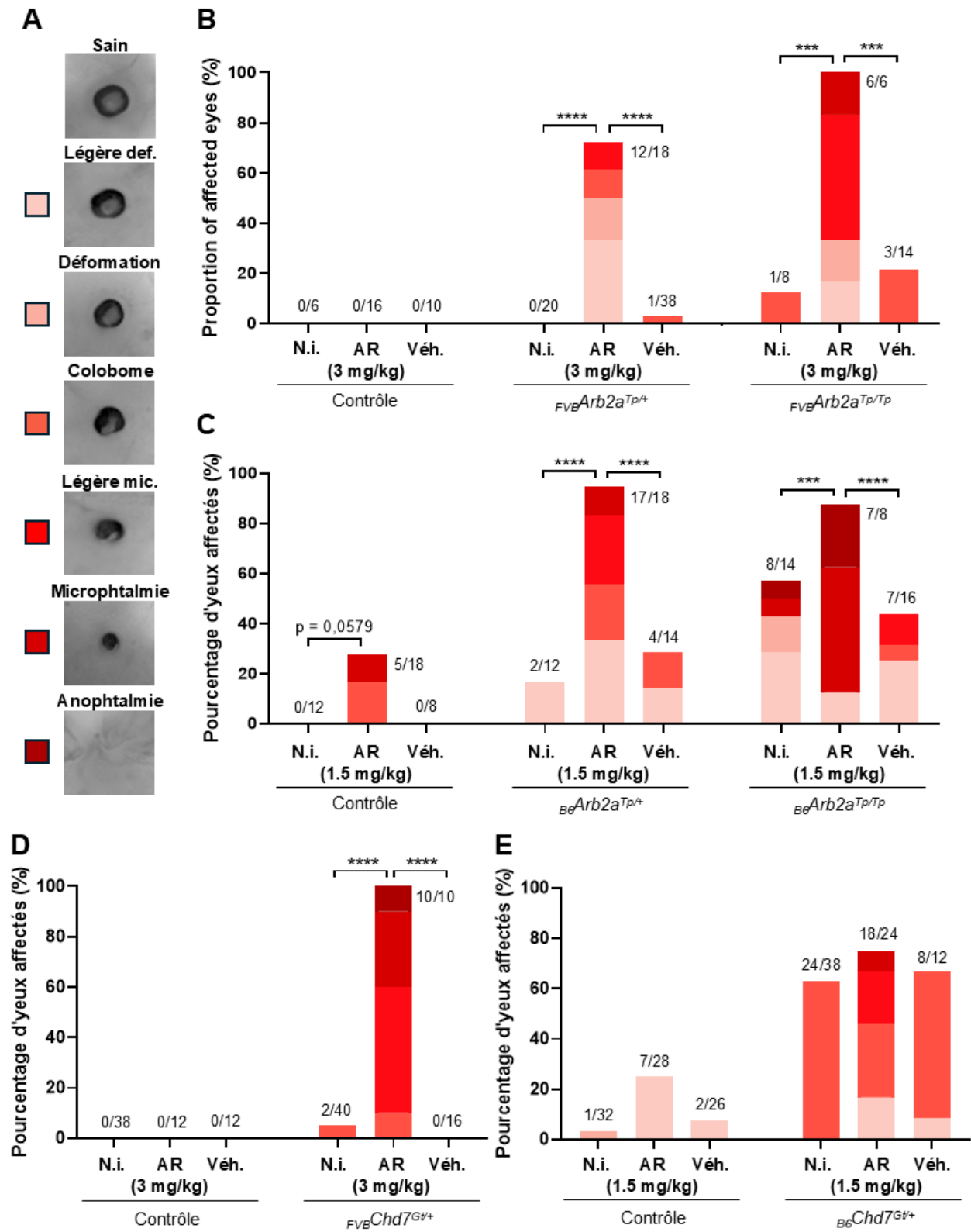


Figure 3.5 : Effets de l'acide rétinoïque sur les caractéristiques oculaires associées au syndrome CHARGE.

(A) Légende employée pour la gradation des anomalies oculaires. (B) Impact de l'AR sur le développement des anomalies oculaires présentées par les lignées *FVBArb2a^{Tp}* (C) *B6Arb2a^{Tp}* (D) *FVBChd7^{Gt}* et (E) *B6Chd7^{Gt}*. Des femelles gestantes ont reçu une injection intrapéritonéale de 1,5 à 3 mg/kg d'AR à 0,5 mg/ml au jour G7.5 et les embryons ont été prélevés au jour E13.5. Les animaux témoins ont reçu une injection d'un volume équivalent de DMSO dilué 1:40 dans du PBS. Le nombre d'yeux affectés par rapport au nombre total d'yeux analysés (n) est présenté sur les graphiques. AR, acide rétinoïque; Légère def., Légère déformation; Légère mic., Légère microphthalmie; N.i., non injecté; Véh., véhicule. ***p < 0,001, ****p < 0,0001 (test de Student).

Plusieurs sujets *B6Arb2a^{Tp/Tp}* (24 %) semblent également présenter une fermeture des paupières (Figure 3.6C, gauche). Les souris *B6Arb2a^{Tp/Tp}* étant affectées par de nombreuses anomalies associées au syndrome CHARGE, de la douleur résultant de leur condition ou de la ptose des paupières, répertoriée chez les patients CHARGE (Herman et Siegel, 1998), ont été envisagées pour expliquer ce phénomène. Toutefois, les analyses d'imagerie par résonance magnétique (IRM) réalisées montrent un enfoncement de l'œil dans la cavité orbitaire, suggérant de l'énophtalmie (Figure 3.6C, centre, droite). Cette dernière peut expliquer l'apparente fermeture des paupières, le recul de l'œil entraînant une perte du soutien normalement exercé sur celles-ci. Il s'agit par conséquent de l'hypothèse actuellement privilégiée.

L'ensemble des souris *B6Arb2a^{Tp/Tp}* étudiés montrent une hypopigmentation du segment postérieur de l'œil (Figure 3.6D, gauche). Chez ces homozygotes, l'EPR et la choroïde paraissent plus faiblement pigmentés et la choroïde paraît plus mince (Figure 3.6D, centre, droite).

Finalement, des marquages immunofluorescents réalisés sur les rétines des souris *B6Arb2a^{Tp/Tp}* ont révélé une déplétion des cellules de la couche des cellules ganglionnaires rétinienne, identifiée par un marquage anti-Brn3a (Figure 3.6E). Cette déplétion a été observée à 7 mois, mais non à 2 mois (Figure 3.6E), suggérant qu'il ne s'agit pas d'une anomalie congénitale, mais plutôt d'un problème de maintien de cette population cellulaire.

L'observation de ces multiples anomalies oculaires chez les souris *B6Arb2a^{Tp/Tp}* (et *B6Arb2a^{Tp/+}* dans une certaine mesure) suggère un rôle important et jusqu'alors inconnu d'ARB2A dans le développement de l'œil. Le spectre MAC correspondant à un ensemble d'anomalies congénitales sévères associées avec le syndrome CHARGE, les analyses subséquentes se concentreront sur celui-ci.

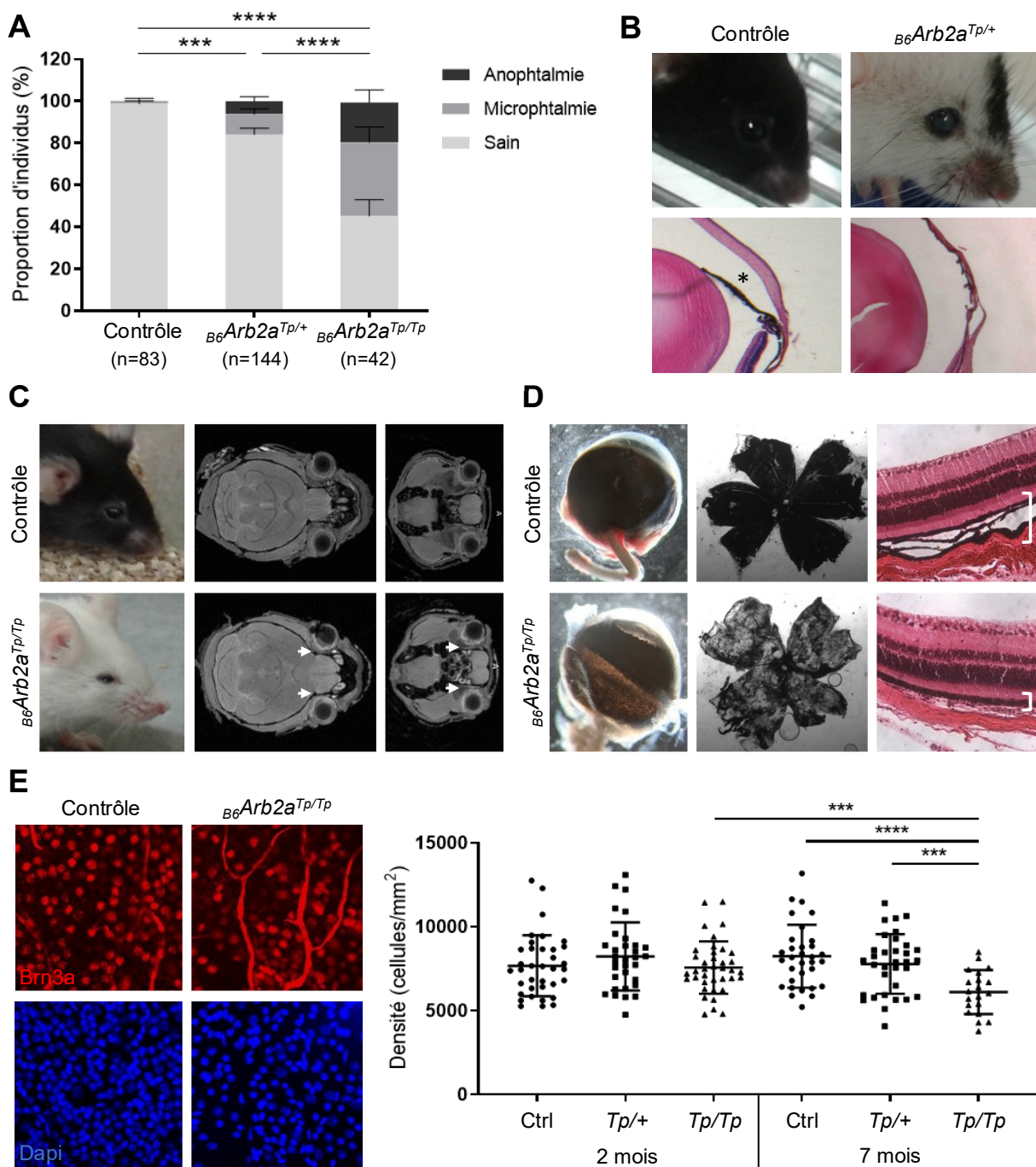


Figure 3.6 : La lignée *B6Arb2a^{Tp}* présente de nombreuses anomalies oculaires.

(A) Pénétrance de la M/A chez la lignée *B6Arb2a^{Tp}*. (B) Opacification oculaire (haut) coïncidant avec la fermeture de l'angle irido-cornéen (astérisque) sur coupes sagittales en paraffine de l'œil avec coloration H&E chez certaines souris *B6Arb2a^{Tp/+}* et *B6Arb2a^{Tp/Tp}* (n = 5-10). (C) Plusieurs souris *B6Arb2a^{Tp/Tp}* présentent une fermeture partielle des paupières (gauche) (n = 25-39 observations). Cette dernière a été observée conjointement au recul du globe dans la cavité oculaire (flèche) selon les vues transverses (centre) et frontales (droite) du crâne en IRM (n = 1). (D) Toutes les souris *B6Arb2a^{Tp/Tp}* montrent une hypopigmentation du segment postérieur de l'œil (gauche) (n = 12) corrélée avec une hypopigmentation des montages à plat de la sclère, la choroïde et l'EPR (centre) compatible avec une diminution de l'épaisseur et de la pigmentation de la choroïde et de l'EPR (crochet) sur coupes en paraffine de l'œil avec coloration H&E (droite) (n = 3). (E) Les marquages immunofluorescents sur montages à plat rétinien (gauche) montrent une diminution de la densité cellulaire de la couche des cellules ganglionnaires rétiniennes chez les souris *B6Arb2a^{Tp/Tp}* âgées de 7 mois (droite) (n = 6, 3 champs par œil). ***p < 0,001, ****p < 0,0001 (A, test exact de Fisher)(E, test de Student).

3.2.2 Chez *B6Arb2a^{Tp/Tp}* le spectre MAC présente un biais pour l'œil droit

De façon notable, la M/A précédemment décrite chez *B6Arb2a^{Tp/+}* et *B6Arb2a^{Tp/Tp}* (Figure 3.6A) se présente majoritairement sous forme unilatérale, avec une nette prédominance pour l'œil droit (Figure 3.7A). Au stade embryonnaire E13.5, le colobome ainsi que des défauts de déformation de la cupule optique semblent également affecter plus fortement la cupule droite (Figure 3.7B).

Parmi les autres anomalies oculaires répertoriées, l'opacification, associée à plusieurs cas de microphthalmie, semble également affecter principalement l'œil droit, mais l'énophtalmie, l'hypopigmentation et la déplétion des cellules ganglionnaires sont des affections bilatérales (Figure 3.7C, D).

Afin de déterminer si ce biais droit est spécifique à l'œil, d'autres anomalies crâniofaciales ont été investiguées. Les défauts aux oreilles internes, la déformation crâniofaciale et le phénotype de tête inclinée ne présentent toutefois pas de biais latéral (Figure 3.7E). Le biais droit observé chez le modèle *B6Arb2a^{Tp}* semble donc spécifique au spectre MAC et, dans une certaine mesure, à l'opacification oculaire.

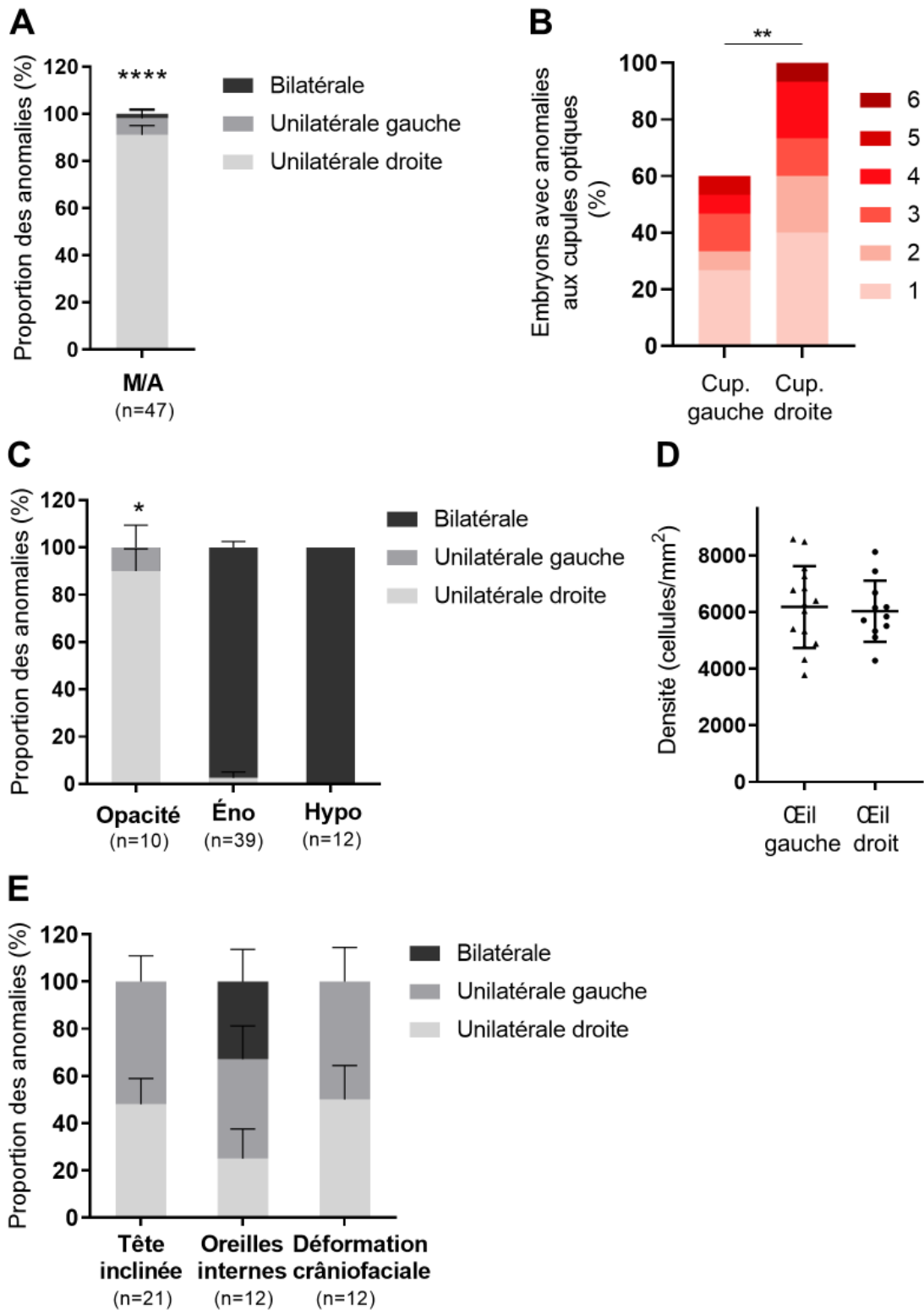


Figure 3.7 : Chez *B6Arb2a^{TP}*, la M/A présente un fort biais pour l'œil droit.

(A) Répartition gauche-droite de la M/A, (B) des anomalies de développement de la cupule optique à E13.5 (n = 15), (C) de l'opacification, de l'énophtalmie et de l'hypopigmentation, (D) de la densité des cellules ganglionnaires rétiniennes à 7 mois (n = 5, 3 champs par œil) et (E) de la tête inclinée, des défauts aux oreilles internes et de la déformation crâniofaciale chez *B6Arb2a^{TP}*. 1, légère déformation; 2, déformation; 3, colobome; 4, légère microphthalmie; 5, microphthalmie; 6, anophtalmie. Cup., cupule optique; Éno, Énophtalmie/paupières tombantes; Hypo, Hypopigmentation. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,0001 (A, C, E, tests du chi carré)(B, test de Student apparié)(D, test de Student).

3.2.3 Développement du spectre MAC chez les mutants *B6Arb2a^{TP}*

Afin de comprendre l'origine de la M/A chez le modèle *Arb2a^{TP}*, des coupes histologiques ont été réalisées à différents stades du développement oculaire embryonnaire et post-natal (Figure 3.8A). Les premiers signes visibles de microphthalmie ont été observés à partir de E11.5. De façon curieuse, il est possible d'observer conjointement une rotation de la cupule optique (Figure 3.8A). Les premiers signes d'anophtalmie ont quant à eux été observés à partir de E15.5 (Figure 3.8A).

Le suivi postnatal du développement de la M/A a permis d'identifier que certains souriceaux qui semblaient non affectés à la naissance développent de légères microphthalmies (Figure 3.8A). Toutefois, la majorité des cas de microphthalmie identifiés chez des souris matures avaient précédemment été identifiés chez les souriceaux à la naissance. Parmi l'ensemble des cas de microphthalmie identifiés chez l'adulte, certains cas semblent consister en une microphthalmie apparente uniquement, où l'œil s'avère de taille régulière et de constitution normale (Figure 3.8A). Dans la majorité des cas, l'œil s'avère toutefois réellement microphthalmie, avec une réduction proportionnelle des différentes structures de l'œil. Des souriceaux présentant une microphthalmie ont également donné lieu à des souris adultes avec une apparence d'anophtalmie (anophtalmie clinique) (Figure 3.8A). Chez ces adultes, certains globes sont atteints de microphthalmie sévère, avec une réduction très marquée de la taille et une atteinte structurelle partielle, tandis que dans les cas les plus extrêmes, seuls quelques tissus désorganisés sont retrouvés au fond de la cavité orbitaire. Finalement, de très rares cas de réelle anophtalmie sont également identifiables, ces souris ne développant jamais de structures oculaires (Figure 3.8A).

Fait également notable, pour la microphthalmie, les observations menées chez l'embryon (E13.5) et l'adulte ont révélé systématiquement la coïncidence de colobome oculaire (Figure 3.8B).

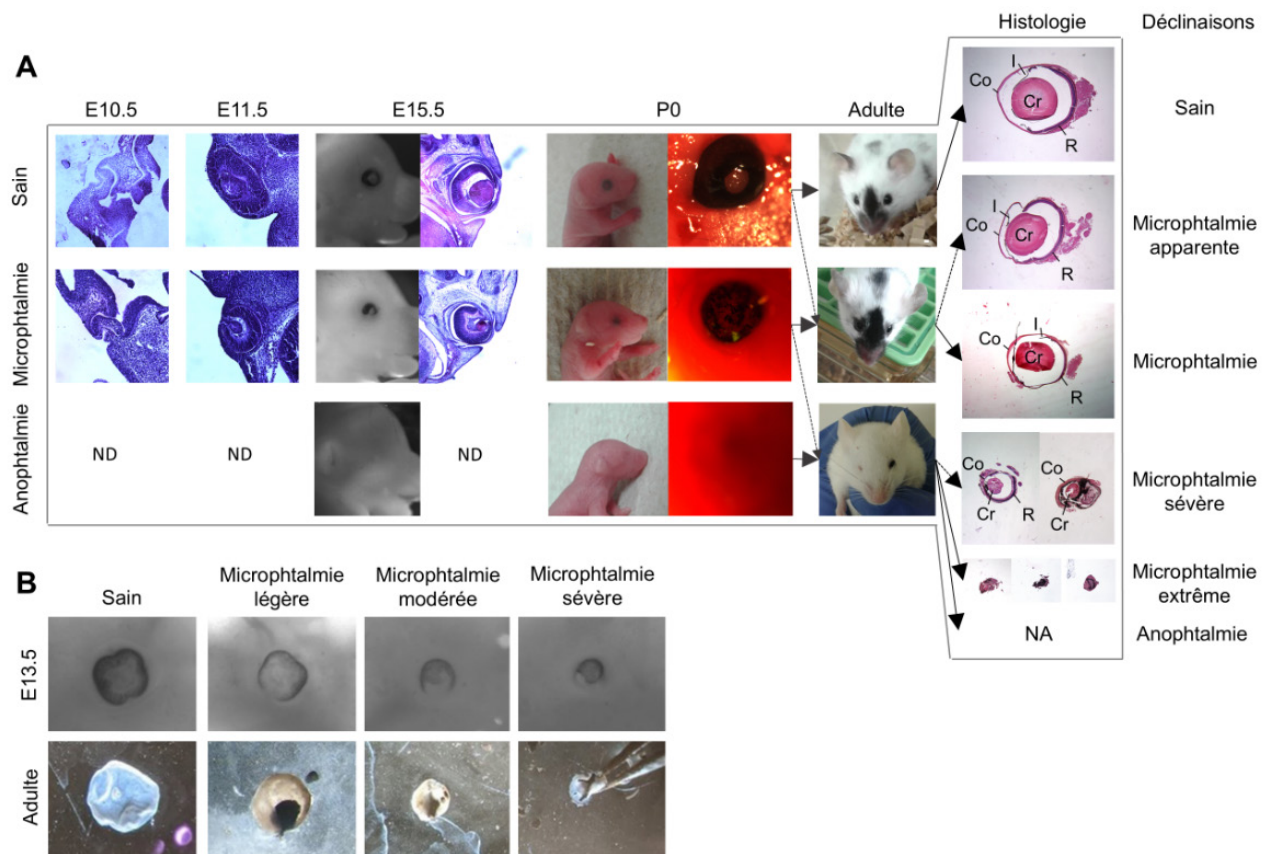


Figure 3.8 : Évolution du spectre MAC chez *B6Arb2a^{TP}*.

(A) Développement de la M/A. Imagerie directe et colorations H&E sur coupes frontales d'embryons ou coupes sagittales de globes oculaires adultes ($n = 3-23$). (B) Microscopie sur fond clair de cupules optiques à E13.5 et de rétines adultes montrant la co-occurrence de microphthalmie et de colobome oculaire ($n = 2-5$). Les sujets adultes sont âgés de plus de 2 mois. Co, cornée; Cr, cristallin; I, iris; NA, non applicable; ND, non disponible; R, rétine.

3.2.4 Expression d'ARB2A au cours du développement oculaire

Afin de déterminer le patron d'expression d'ARB2A au cours du développement oculaire, plusieurs essais ont été réalisés avec un anticorps commercial (ab121364), sans succès (non montré). Les échecs rencontrés avec cet anticorps, parmi d'autres raisons, ont mené à la création du modèle *FVBArb2a^{GFP}* (décrit plus amplement au chapitre 3.3) chez lequel l'expression de la GFP est substituée à celle d'ARB2A. Ce modèle rapporteur a permis de valider par microscopie à fluorescence que chez les embryons E10.5, ARB2A est normalement exprimé dans l'ensemble de l'embryon, incluant la cupule optique (Figure 3.9A). Plus précisément, les expériences de cytométrie en flux indiquent que la GFP est exprimée dans la presque totalité des cellules, incluant les CCN (G4-RFP+) (Figure 3.9A). Cette expression presque ubiquitaire est conservée lors des stades subséquents du développement oculaire, à E11.5 et E15.5, ainsi que chez

l'adulte (Figure 3.9B, C, D). ARB2A semble donc exprimé presque ubiquitairement tout au long du développement oculaire et jusqu'à l'âge adulte.

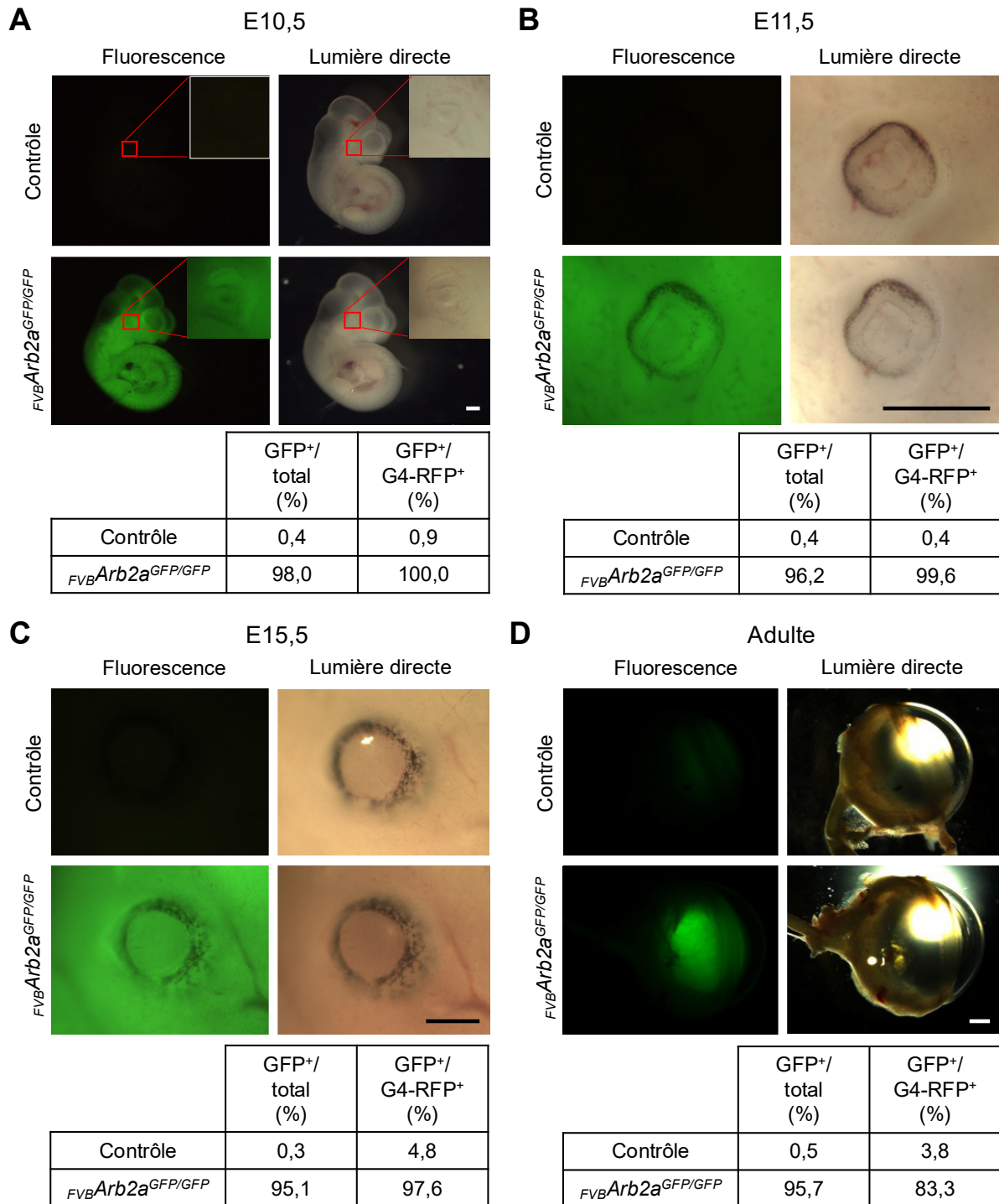


Figure 3.9 : ARB2A est exprimée de façon presque ubiquitaire lors du développement oculaire et dans l'œil adulte.

(A) Cupules optiques d'embryons à E10.5, (B) E11.5, (C) E15.5 et (D) globes oculaires de souris adultes (> 2 mois) (haut). La fluorescence émise par la GFP chez le modèle rapporteur *FVBArb2a^{GFP/GFP}* permet d'identifier par microscopie à fluorescence les tissus qui expriment ARB2A. Les embryons entiers (A) et globes oculaires (B, C, D) - suivant retrait de la cornée et du cristallin - de souris de la lignée double transgénique *Arb2a^{GFP}; G4-RFP* ont été dissociés, puis analysés par cytométrie en flux afin de quantifier la proportion de cellules totales et de CCN (G4-RFP+) exprimant la GFP (bas) (n = 6-9). Barre d'échelle : 500 µm.

3.2.5 La diminution de l'expression d'ARB2A engendre l'aggravation des anomalies oculaires engendrées par la perte d'AGO2 dans les CCN

Suite à l'identification de l'interaction directe entre ARB2A et AGO2, des doubles mutants murins ont été générés afin d'étudier l'interaction génétique entre *Arb2a* et *Ago2*. Des souris avec une délétion conditionnelle d'*Ago2* dans les CCN ont été obtenues par croisement de souris porteuses d'un allèle floxé d'*Ago2* avec des souris porteuses du transgène *Wnt1-Cre2* (*Wnt1-Cre2^{Tg/+}::Ago2^{Flox}*, nommées *Ago2^{CKO}*). Les souris *Ago2^{CKO/+}* et *Ago2^{CKO/CKO}* présentent respectivement 22 % de colobome oculaire et 50 % de colobome oculaire accompagné de 9 % de microphthalmie (Figure 3.10). Lorsque ces mutants sont combinés à un allèle *Arb2a^{Tp}*, qui seul n'engendre pas d'anomalies oculaires dans le fond génétique mixte utilisé, la pénétrance du colobome augmente à 31 % et 62 % tandis que la microphthalmie augmente à 28 % (Figure 3.10), suggérant une interaction génétique entre les allèles dans le contexte précis du développement oculaire.

3.2.6 Plusieurs voies contribuant au développement oculaire sont dérégulées dans les CCN de *FVBArb2a^{Tp/Tp}*

Afin de déterminer les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'apparition d'anomalies associées au spectre MAC dans le modèle *Arb2a^{Tp}*, une première analyse a été réalisée à partir du séquençage ARN des CCN issues d'embryons contrôles et *FVBARB2A^{Tp/Tp}* au stade E10.5 (Bélanger *et al.*, 2018). Parmi les 3488 gènes différentiellement exprimés (2151 à la hausse et 1337 à la baisse) et les 907 gènes (1166 transcrits) différentiellement épissés initialement identifiés lors de cette analyse transcriptomique (Bélanger *et al.*, 2018), 52 (8 à la hausse et 44 à la baisse) et 5 respectivement ont pu être associées à des voies de régulation du développement oculaire (Figure S 3A, B, Tableau S 8, Tableau S 9). Ces gènes sont notamment associés aux voies de signalisation Wnt/ β -caténine/Mitf, Notch, Hedgehog, TGF- β /BMP, Hippo et de l'acide rétinoïque (Tableau 3.1) (Bélanger *et al.*, 2018; Kanehisa *et al.*, 2025; Nedelec, Rozet et Fares Taie, 2019; Strain, 2015; Subramanian *et al.*, 2005; Weiss *et al.*, 2012).

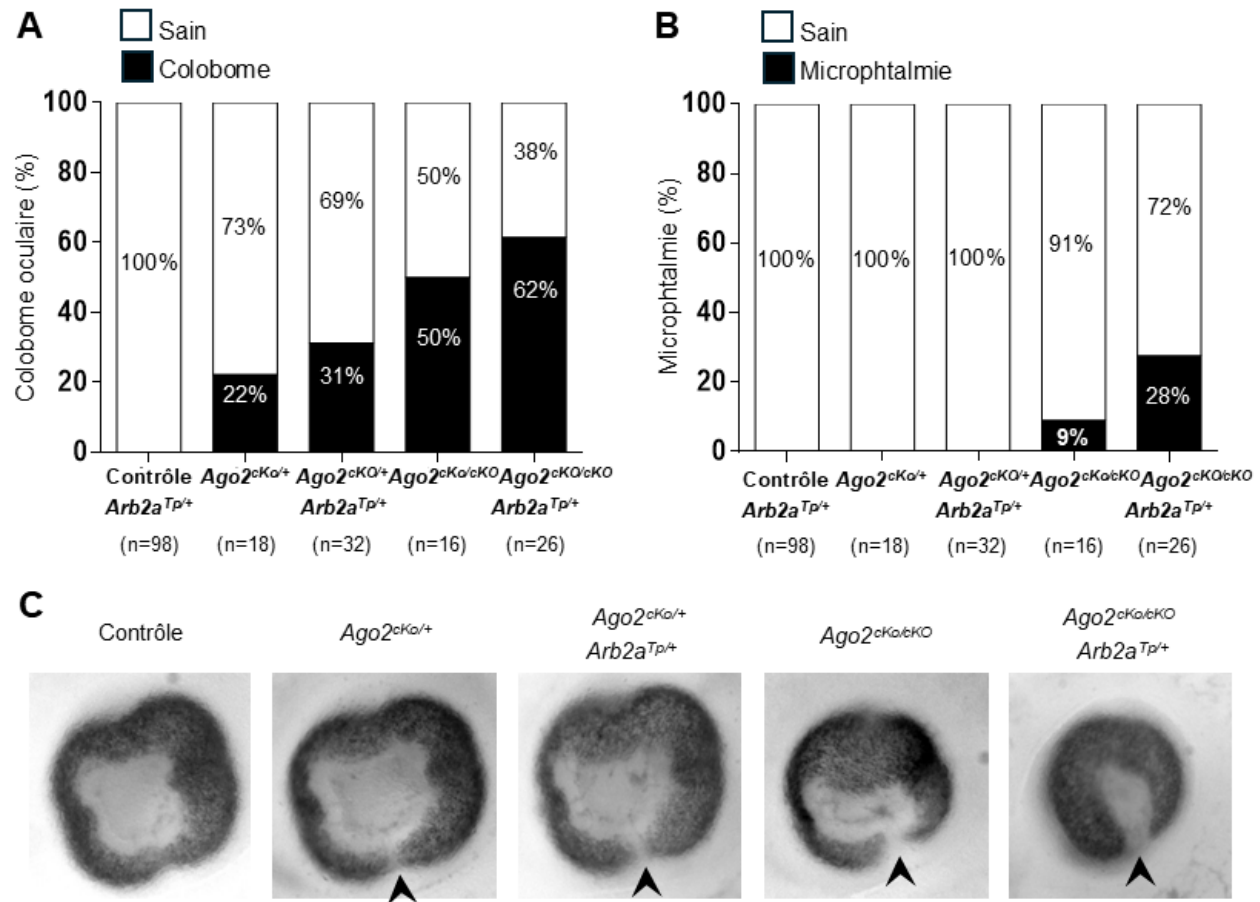


Figure 3.10 : Interaction génétique entre *Ago2^{cKO}* et *Arb2a^{TP}*.

(A) Proportions de colobome (B) et de microphthalmie à E12.5. (C) Images représentatives présentant l'occurrence de colobome oculaire (flèche) et de microphthalmie au sein des mutants simples et doubles transgéniques. *Ago2^{cKO}*, *Wnt1-Cre^{Tg/+} :: Ago2^{Flox}*. (Expériences et mise en forme initiale par F.A. Bérubé-Simard).

Tableau 3.1 : Principales voies auxquelles appartiennent les gènes connus du développement oculaire dont l'expression est dérégulée dans les CCN d'embryons *FVBArb2a^{Tp/Tp}* au stade E10.5.

Analyse réalisée à partir des données de (Bélanger *et al.*, 2018). *Gènes qui n'appartiennent pas à la voie de signalisation, mais qui sont régulés par ou interagissent avec cette dernière (Bélanger *et al.*, 2018; Kanehisa *et al.*, 2025; Nedelec, Rozet et Fares Taie, 2019; Strain, 2015; Subramanian *et al.*, 2005; Weiss *et al.*, 2012).

Voie de signalisation	Gènes dérégulés
Wnt/ β -caténine/Mitf	Hausse : <i>Fzd5</i> Baisse : <i>Ctnnb1, Lef1, Lrp5, Lrp6, Mitf, Pax3, Porcn, Sox10, Tyr</i>
Notch (et développement hyaloïde)	Hausse : <i>Jag2, Lmo2</i> Baisse : <i>Hes5, Jag1, Notch1, Nrp1</i> (+ de la voie de signalisation Wnt : <i>Fzd5, Ctnnb1, Lef1, Lrp5 et Lrp6</i>)
Hedgehog	Baisse : <i>Cdon, Gli2, Kif7, Smo</i>
TGF- β /BMP	Hausse : <i>Crim1</i> Baisse : <i>Bmp7, Bmpr1a, Tgfb2</i>
Hippo	Baisse : <i>Fat1, *Sox2, Yap1</i> Épissage : <i>Fgfr2</i> (+ voies de signalisation Wnt, TGF- β et BMP)
Acide rétinoïque	Baisse : <i>Rara, Rarb, Rbp1, Stra6</i>

3.2.7 L'acide rétinoïque et l'éthanol aggravent de façon dose-dépendante les anomalies MAC chez *B6Arb2a^{Tp/Tp}*

Les analyses transcriptomiques ont démontré une diminution de l'expression de plusieurs gènes de la voie de l'acide rétinoïque dans les CCN d'embryons *FVBArb2a^{Tp/Tp}* (Tableau 3.1). Des mutations de la voie de l'acide rétinoïque ou des gènes régulés par celle-ci pouvant mener au développement de la M/A (Duester, 2022), le potentiel thérapeutique de l'acide rétinoïque a par conséquent été évalué sur la lignée *B6Arb2a^{Tp}*. Les expériences ont été réalisées telles que précédemment (3.1.4), mais en concentrant cette fois l'analyse sur la lignée *B6Arb2a^{Tp}* uniquement et en évaluant la réponse à plusieurs doses. Brièvement, 0.5 à 1.5 mg/kg d'acide rétinoïque ont été administrés par injection intrapéritonéale à des femelles gestantes au jour G7.5, puis les embryons ont été prélevés au jour E13.5 pour observation des cupules optiques. Malheureusement, inversement à l'effet thérapeutique espéré, les injections d'acide rétinoïque ont plutôt engendré une aggravation dose-dépendante de la pénétrance et de la sévérité des anomalies oculaires

observées chez les embryons $B6Arb2a^{Tp/Tp}$ et $B6Arb2a^{Tp/+}$, mais également à fortes doses chez les embryons contrôles (Figure 3.11A). La comparaison des résultats obtenus pour les différents génotypes semble montrer des effets additifs de l'acide rétinoïque sur la propension naturelle des embryons $B6Arb2a^{Tp}$ à développer des anomalies oculaires (Figure 3.11A).

L'éthanol étant la cause du syndrome d'alcoolisme fœtal, qui engendre le développement congénital de nombreuses anomalies crâniofaciales à l'image du syndrome CHARGE (Popova *et al.*, 2017), son impact sur les anomalies du spectre MAC présentées par la lignée $B6Arb2a^{Tp}$ a également été évalué. La même méthodologie a été appliquée avec deux injections intrapéritonéales de 9 à 20 μ l/g d'éthanol 25 %. Ces injections ont engendré une aggravation dose-dépendante de la sévérité ou de la pénétrance des anomalies oculaires associées au spectre MAC chez les embryons $B6Arb2a^{Tp/+}$, ainsi que dans une faible mesure chez les embryons contrôles à de fortes doses (Figure 3.11B). Contrairement aux effets observés en présence d'acide rétinoïque, les effets observés avec l'éthanol ne semblent pas seulement additifs, mais synergiques, l'aggravation des phénotypes oculaires étant plus marquée chez les embryons $B6Arb2a^{Tp/+}$ que chez les embryons contrôles (Figure 3.11B).

Fait également notable, l'acide rétinoïque et l'éthanol tendent tous deux à conserver le biais droit observé pour les anomalies MAC chez $B6Arb2a^{Tp}$ (Figure S 4).

3.2.8 L'expression de nombreux gènes du développement oculaire est à la hausse dans les cupules optiques droites des embryons $B6Arb2a^{Tp/Tp}$

L'analyse transcriptomique réalisée sur les CCN d'embryons $FVBArb2a^{Tp/Tp}$ de stade E10.5 a révélé des pistes intéressantes pour expliquer l'apparition d'anomalies oculaires. Toutefois, les CCN n'étant ni restreintes à la région péri-oculaire ni la seule composante essentielle au bon développement de l'œil, une analyse transcriptomique ciblée a par la suite été réalisée sur les cupules optiques et le MPO d'embryons contrôles et $Arb2a^{Tp/Tp}$. Cette analyse a été réalisée dans le fond génétique B6, dans lequel les anomalies oculaires sont plus importantes et au stade E11.5, stade d'apparition des premiers signes d'anomalies développementales. Les cupules optiques droites et gauches ont été traitées séparément afin d'explorer les bases possibles du biais droit.

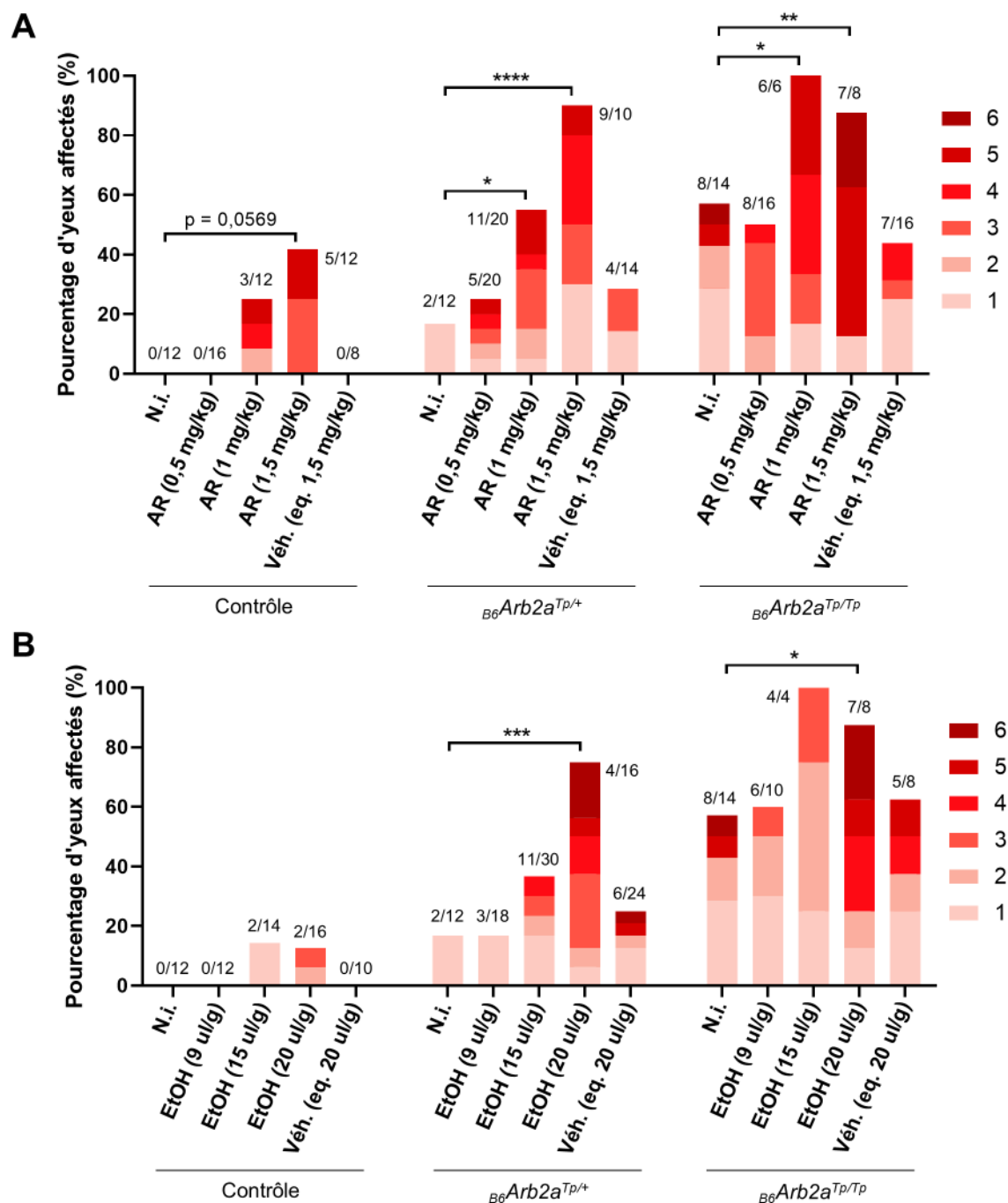


Figure 3.11 : L'acide rétinoïque et l'éthanol accentuent de façon dose-dépendante les anomalies oculaires observées chez la lignée *B6Arb2a^{Tp}*.

Impact de (A) l'AR et (B) de l'EtOH sur le développement des anomalies oculaires présentées par la lignée *B6Arb2a^{Tp}*. Des femelles gestantes ont reçu (A) une injection intrapéritonéale de 0,5 à 1,5 mg/kg d'AR (0,5 mg/ml) ou (B) deux injections intrapéritonéales à 4 h d'intervalle de 9 à 20 µl/g d'EtOH (25 %) au jour G7.5 et les embryons ont été prélevés au jour E13.5. Les animaux témoins ont reçu (A) une injection d'un volume équivalent de DMSO dilué 1:40 dans du PBS ou (B) deux injections d'un volume équivalent de PBS. Le nombre d'yeux affectés par rapport au nombre total d'yeux analysés (n) est présenté sur les graphiques. AR, acide rétinoïque, EtOH, éthanol, eq., équivalent; Légère déformation; Légère mic., Légère microphthalmie; N.i., non injecté; Véh., véhicule. *p < 0,05, ***p < 0,001 (test de Student).

Chez les embryons *B6Arb2a^{TP/TP}*, l'expression de 211 gènes est dérégulée par rapport aux contrôles (119 à la hausse et 92 à la baisse, $p < 0.05$, $FC > |1.5|$) et 347 gènes sont différentiellement épissés ($p < 0.05$, variation du niveau d'inclusion ≥ 0.1) (Figure 3.12A). Chez les embryons contrôles, aucun gène n'est différentiellement exprimé entre les cupules droites et gauches, bien que 459 gènes (505 événements) soient différentiellement épissés (Figure 3.12B). Chez les embryons *B6Arb2a^{TP/TP}*, on observe l'expression différentielle de 74 gènes (52 à la hausse et 22 à la baisse) dans l'œil droit par rapport à l'œil gauche, ainsi que l'épissage différentiel de 508 gènes (581 événements) (Figure 3.12C). Pour l'ensemble des comparaisons effectuées, la répartition des anomalies d'épissage est similaire à celle précédemment observée dans les CCN d'embryons *FVBArb2a^{TP/TP}*, soit une majorité ($> 50\%$) d'exons retirés, un nombre modéré d'introns conservés et un nombre plus restreint d'épissages 3' et 5' différentiels ou d'exons mutuellement exclusifs (Figure S 3B, C, D). Les gènes qui sont communément différentiellement exprimés entre les cupules optiques d'embryons *B6Arb2a^{TP/TP}* et entre les cupules droites et gauches chez ces derniers sont au nombre de deux, tandis que pour l'épissage alternatif, ils sont plus de 30 pour chaque paire de comparaison, avec 14 gènes communs à l'ensemble (Figure S 3F, G).

Les gènes dont l'expression est dérégulée dans les cupules optiques d'embryons *B6Arb2a^{TP/TP}* appartiennent à plusieurs voies développementales précédemment identifiées lors de l'analyse transcriptomique des CCN d'embryons *FVBArb2a^{TP/TP}*. La voie majoritairement affectée est la voie Wnt/ β -caténine, avec neuf gènes dérégulés, mais les voies Notch (ou autres composantes du développement hyaloïde), Hedgehog et TGF- β /BMP contiennent également quelques événements de dérégulation (Tableau S 10). La voie Hippo n'est représentée qu'avec un seul gène et, si on retrouve certains gènes dérégulés en lien avec la voie de l'acide rétinoïque, ils n'appartiennent pas directement à cette voie, mais correspondent plutôt à des gènes qui sont régulés par celle-ci (Tableau S 10).

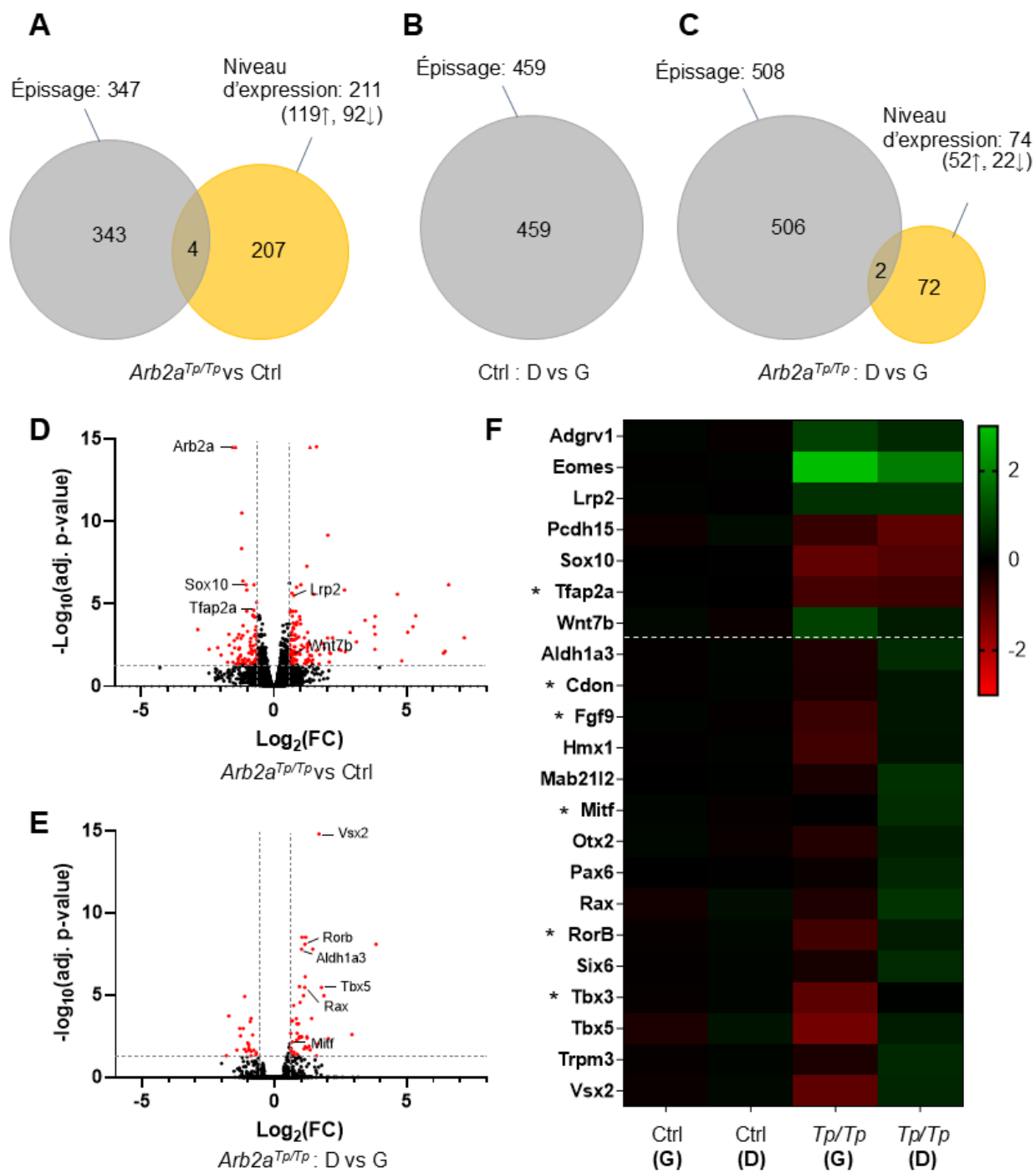


Figure 3.12 : De nombreux gènes connus du développement oculaire sont surexprimés dans les cupules optiques droites des embryons *B6Arb2a^{TP/TP}*.

(A) Diagramme de Venn représentant le nombre de gènes différentiellement exprimés ($p < 0.05$; $FC > |1.5|$) ou épissés ($p < 0.05$; variation du niveau d'inclusion ≥ 0.1) entre les cupules optiques d'embryons *B6Arb2a^{TP/TP}* et contrôles, (B) entre les cupules optiques droites et gauches d'embryons contrôles (C) et entre les cupules optiques droites et gauches d'embryons *B6Arb2a^{TP/TP}*. (D) Volcano plot des gènes différentiellement exprimés entre les cupules d'embryons *B6Arb2a^{TP/TP}* et contrôles (E) ainsi qu'entre les cupules optiques droites et gauches d'embryons *B6Arb2a^{TP/TP}*. (F) Heatmap des gènes connus du développement oculaire dont l'expression est significativement dérégulée entre les cupules optiques d'embryons *B6Arb2a^{TP/TP}* et contrôles (haut) ainsi qu'entre les cupules optiques droites et gauches d'embryons *B6Arb2a^{TP/TP}* (bas) ($n = 2$). D, droite; G, gauche. *, gènes dont ARB2A lie le promoteur en Cut&Run. (Analyses informatiques et Cut&Run par S.Sallis).

Lorsqu'on observe plutôt les gènes dérégulés entre les cupules optiques droites et gauches des embryons *B6Arb2a^{TP/TP}*, la voie Wnt/ β -caténine est beaucoup moins fortement représentée, tandis que la représentation des voies Notch, Hedgehog, TGF- β /BMP et de l'acide rétinoïque demeure relativement similaire (Tableau S 11). Fait étonnant, pour cette analyse, les gènes associés à la voie de l'acide rétinoïque contiennent une majorité de gènes centraux de la voie et une minorité de gènes régulés par cette voie, alors que ceux-ci sont cette fois beaucoup plus présents pour les voies Wnt/ β -caténine, Hedgehog et TGF- β /BMP (Tableau S 11).

Si on s'intéresse plutôt aux gènes connus pour leur fonction dans le développement oculaire, sept sont différentiellement exprimés chez les embryons *B6Arb2a^{TP/TP}* par rapport aux contrôles, certains à la hausse et d'autres à la baisse (Figure 3.12F, haut). Entre les cupules droites et gauches des embryons *B6Arb2a^{TP/TP}*, on observe deux fois plus de gènes connus du développement oculaire, parmi lesquels des acteurs majeurs tels *Pax6*, *Otx2*, *Rax* et *Vsx2* (Figure 3.12F, bas). De façon très intrigante, ces gènes sont majoritairement exprimés à la baisse dans les cupules gauches, généralement saines, et exprimés à la hausse dans les cupules droites, préférentiellement affectées par les anomalies. Parmi ces gènes, certains, tels *Rax* et *Tbx5*, semblent déjà présenter un tel biais chez les embryons contrôles, lequel se retrouve accentué chez les embryons *B6Arb2a^{TP/TP}* (Figure 3.12F, bas).

3.3 Étude du mécanisme de compensation entourant la délétion d'ARB2A

3.3.1 Les mutants nuls d'*Arb2a* présentent des phénotypes beaucoup moins sévères que les mutants hypomorphes

Les mutants hypomorphes *Arb2a^{TP/TP}*, tel que précédemment caractérisés, phénotopient le syndrome CHARGE (Bélanger *et al.*, 2018). Leur caractérisation a soulevé un intérêt pour l'étude de mutants nuls d'*Arb2a*. Conjointement, une problématique rencontrée par plusieurs membres du laboratoire, dont au

cours du volet 3.2 de cette thèse, était la difficulté de résoudre le patron d'expression d'ARB2A sur tissu ou coupe avec l'anticorps commercial disponible.

Afin de répondre à ces deux problématiques, le système CRISPR/Cas9 a été employé pour déléter, chez des souris FVB, l'exon 3 d'*Arb2a*, commun à l'ensemble des isoformes et comprenant le site d'initiation de la traduction des isoformes moyenne et courte, et le remplacer par la séquence codante de la GFP (Figure 3.13A). Le modèle *Arb2a*^{KO(KI-GFP)}, abrégé *Arb2a*^{GFP}, présente ainsi une abolition de l'expression d'ARB2A, à laquelle est substituée l'expression de la GFP (Figure 3.13B). Chez les embryons *Arb2a*^{GFP/+} et *Arb2a*^{GFP/GFP}, la GFP est exprimée dans tout l'organisme tel qu'attendu, de précédentes analyses par marquage immunofluorescent ayant montré une distribution similaire d'ARB2A (Figure 3.13C) (Bélanger *et al.*, 2018).

Toutefois, contrairement aux attentes, les mutants nuls *Arb2a*^{GFP/GFP} ne présentent pas une aggravation des anomalies associées au syndrome CHARGE par rapport aux mutants hypomorphes *Arb2a*^{Tp/Tp}. Au contraire, ils ne montrent pas de signes externes d'anomalies (Figure 3.13D). Ainsi, on ne relève pas de traces de déformation crâniofaciale, de malocclusion, de tête inclinée, de *circling*, d'*head-bobbing*, de microphthalmie, d'anophtalmie ou d'énophtalmie chez les souris *Arb2a*^{GFP/GFP}, contrairement à ce qui est observé chez les souris *Arb2a*^{Tp/Tp}. Les études menées au cours du volet 3.1 de cette thèse ayant montré l'aggravation de plusieurs phénotypes dans le fond génétique B6 chez les mutants *Arb2a*^{Tp}, la mutation *Arb2a*^{GFP} a à son tour été transférée dans le fond génétique B6. Toutefois, à l'image des souris *FVBArb2a*^{GFP/GFP}, les souris *B6Arb2a*^{GFP/GFP} ne montrent pas de signes visibles d'anomalies, hormis un très léger retard de croissance (Figure S 5A).

L'étude approfondie des mutants *Arb2a*^{GFP/GFP} n'a révélé qu'une légère réduction du poids à P25 (Figure 3.13D, E, Figure S 5A, B), une légère diminution de la fertilité (Figure 3.13F) et une légère diminution de la proportion de sujets *Arb2a*^{GFP/GFP} au sevrage suggérant une faible mortalité néonatale (Figure 3.13G, Figure S 5C). Ces anomalies sont de sévérité moindre ou égale à celle répertoriée chez *Arb2a*^{Tp/Tp} (Figure 3.13). Dans le fond génétique B6, prédisposant au développement d'anomalies oculaires, quelques embryons *B6Arb2a*^{GFP/GFP} présentent de légères déformations de la cupule optique, mais sans plus (Figure 3.13H).

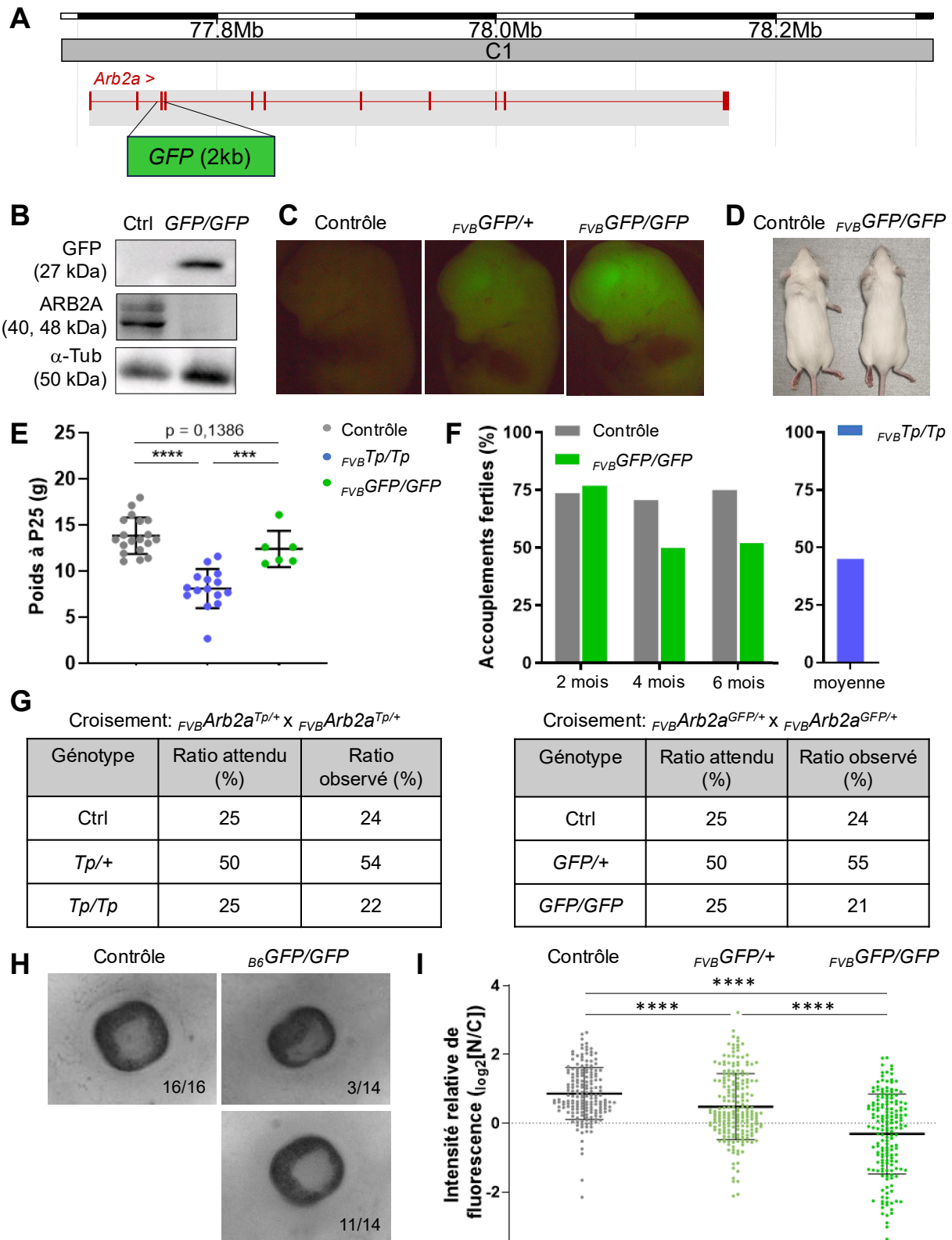


Figure 3.13 : Les mutants nuls *Arb2a*^{GFP/GFP} présentent des phénotypes moins pénétrants et moins sévères que les mutants hypomorphes *Arb2a*^{Tp/Tp}.

(A) La substitution de l'exon 3 d'*Arb2a* par la séquence codante de la GFP engendre (B) l'expression de la GFP en remplacement de l'expression d'ARB2A, telle que révélée par immunobuvardage de type Western sur extraits de cerveau de souris adultes (> 2 mois) (n = 2). L' α -tubuline a été utilisée comme contrôle de charge. (D.Dhananjaya) (C) La microscopie à fluorescence confirme une expression soutenue et globale de la GFP chez les embryons mutants *Arb2a*^{GFP} à E13.5 (n = 1 ctrl, n = 6 *FVBArb2a*^{GFP/+}, n = 3 *FVBArb2a*^{GFP/GFP}). (D.Dhananjaya) (D) Les souris *FVBArb2a*^{GFP/GFP} paraissent saines, sans phénotypes externes notables (n > 30). (E) La mesure du poids à P25 ne montre pas de retard de croissance significatif chez les mutants *FVBArb2a*^{GFP/GFP}, contrairement aux mutants *FVBArb2a*^{Tp/Tp} (n = 19 ctrl, n = 15 *FVBArb2a*^{GFP/+}, n = 6 *FVBArb2a*^{GFP/GFP}). (F) Une diminution du pourcentage d'accouplements fertiles est identifiée chez les femelles *FVBArb2a*^{GFP/GFP} et *Arb2a*^{Tp/Tp} (n = 21, 36, 32 ctrl, n = 6, 16, 23 *FVBArb2a*^{GFP/GFP}, expériences par O.Souchkova) (n = 9 *FVBArb2a*^{Tp/Tp}, données tirées de (Bélanger *et al.*, 2018)). (G) Des ratios mendéliens légèrement faibles au sevrage ont été recensés chez les mutants *FVBArb2a*^{GFP/GFP} et *FVBArb2a*^{Tp/Tp} (n = 25 ctrl, n = 57 *FVBArb2a*^{GFP/+}, n = 22 *FVBArb2a*^{GFP/GFP}) (n = 96 ctrl, n = 221 *FVBArb2a*^{Tp/+}, n = 85 *FVBArb2a*^{Tp/Tp}, données tirées de (Bélanger *et al.*, 2018)). (H) L'imagerie sur fond clair à E13.5 montre de légères déformations de la cupule optique chez certains embryons *B6Arb2a*^{GFP/GFP}. (I) Dans les MEFs dérivés d'embryons mutants *Arb2a*^{GFP} à E11.5 cultivés à faible densité (40,000 cellules/cm²), les marquages immunofluorescents révèlent qu'AGO2 est délocalisée du noyau vers le cytoplasme (n = 3, quantification de 50 cellules par n). α -Tub, α -Tubuline. ***p < 0,001, ****p < 0,0001 (tests de Student).

Des observations similaires ont été réalisées chez *C. elegans* par nos collaborateurs du laboratoire de la Pre Claire Bénard. Parmi sept lignées portant des mutations ponctuelles de Y75B8A.31, l'orthologue d'*Arb2a*, quatre présentent une augmentation de la mortalité embryonnaire, une diminution de la fertilité et/ou des anomalies de locomotion, des phénotypes rappelant ceux associés au syndrome CHARGE. Toutefois, le mutant nul ne présente pas de différences significatives par rapport à la lignée contrôle (Tableau S 12).

En somme, chez deux organismes modèles, des anomalies associées au syndrome CHARGE ont été identifiées chez des mutants hypomorphes/ponctuels, alors que des phénotypes sains ou de moindre gravité ont été identifiés chez les mutants nuls. Ces observations ont donc mené à l'hypothèse qu'un mécanisme de compensation est enclenché chez les mutants nuls afin de prévenir l'apparition d'anomalies multisystémiques mettant en danger la survie de l'organisme.

3.3.2 La délocalisation d'AGO2 est conservée chez les mutants nuls *FVBArb2a*^{GFP/GFP}

Dans un premier temps, un mécanisme de compensation exploitant la surexpression d'une protéine similaire à ARB2A et capable d'en reprendre les fonctions a été envisagé. Via ses domaines Arb2 et NLS, ARB2A est en mesure d'acheminer AGO2 au noyau, où sa présence est conséquemment fortement réduite dans les MEFs d'embryons *FVBArb2a*^{Tp/Tp} (Sallis *et al.*, 2023). La localisation d'AGO2 a donc été étudiée chez les MEFs d'embryons *FVBArb2a*^{GFP/GFP}. Les marquages immunofluorescents montrent qu'AGO2 a une

localisation principalement nucléaire chez les contrôles, tel que précédemment observé, mais qu'elle est délocalisée vers le cytoplasme dans les MEFs d'embryons *FVBArb2a^{GFP/GFP}*, chaque allèle *Arb2a^{GFP}* accroissant la délocalisation (Figure 3.13I). Cela suggère que le mécanisme de compensation chez *Arb2a^{GFP/GFP}* ne passe probablement pas par l'expression d'une protéine qui récapitule les fonctions d'ARB2A, du moins pas la fonction d'import nucléaire d'AGO2.

3.3.3 Étude de l'implication de la voie ISR dans le mécanisme de compensation chez les mutants nuls *Arb2a^{GFP/GFP}*

Afin d'identifier d'autres pistes mécanistiques à la compensation, un séquençage de l'ARN a été réalisé sur des MEFs dérivés d'embryons contrôles, *FVBArb2a^{Tp/Tp}* et *FVBArb2a^{GFP/GFP}*. Les MEFs ont été isolés de la tête des embryons, plusieurs phénotypes crâniofaciaux ayant été identifiés chez *Arb2a^{Tp/Tp}* (Figure 3.1A) (Bélanger *et al.*, 2018). Les analyses transcriptomiques ont permis d'identifier la dérégulation de plusieurs centaines de gènes entre les différents génotypes ($p < 0.05$, $FC > |1.5|$) (Figure 3.14B). Lorsqu'on s'attarde aux gènes différentiellement exprimés entre *FVBArb2a^{Tp/Tp}* et *FVBArb2a^{GFP/GFP}*, l'analyse d'ontologie génétique révèle la surexpression chez *FVBArb2a^{GFP/GFP}* de nombreux gènes associés à des processus adaptatifs, à des enzymes métaboliques et à des enzymes impliquées dans la balance rédox (Figure 3.14C). Ces catégories présentent des similitudes avec la réponse adaptative enclenchée lors de l'activation de la réponse ISR, une voie de signalisation permettant à la cellule de s'adapter en réponse à différents stress cellulaires (Figure S 6A) (Carvajal *et al.*, 2023; Kalinin, Zubkova et Menshikov, 2023; Pakos-Zebrucka *et al.*, 2016). De plus, selon les analyses Cut & Run, ARB2A lie le promoteur d'*Atf4*, qui code pour un facteur de transcription agissant comme médiateur de la réponse ISR et induisant l'expression de nombreux gènes adaptatifs. Or, l'expression d'*Atf4* est régulée à la hausse dans les CCN d'embryons *FVBArb2a^{Tp/Tp}* (Figure 3.14D). Cela suggère qu'ARB2A pourrait être un inhibiteur transcriptionnel d'*Atf4* (Figure S 6A). Il a donc été proposé que chez les souris *FVBArb2a^{GFP/GFP}*, en absence complète d'ARB2A et d'inhibition sur *Atf4*, les niveaux d'expression d'ATF4 pourraient être fortement augmentés, permettant l'expression des gènes adaptatifs de la réponse ISR et la survie cellulaire.

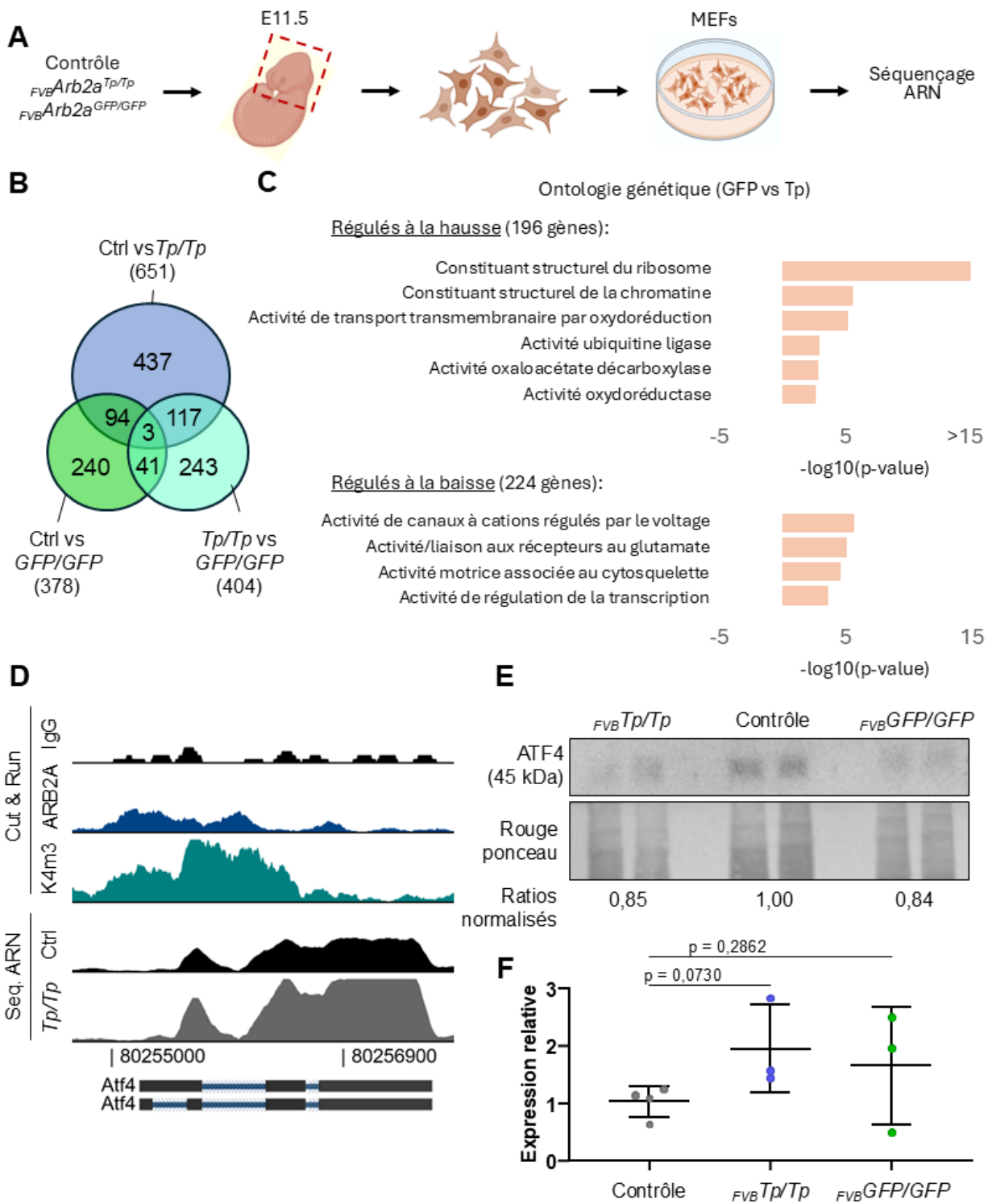


Figure 3.14 : Le mécanisme de compensation chez *Arb2a^{GFP/GFP}* pourrait avoir pour origine l'activation de la réponse ISR via la surexpression d'ATF4.

(A) Schéma de la méthode expérimentale. Des têtes d'embryons E11.5 ont été dissociées puis mises en culture pendant 24 h afin d'obtenir des MEFs pour extraction et séquençage de l'ARN. (B) Diagrammes de Venn du nombre de gènes différentiellement exprimés entre les différents génotypes ($p < 0.05$, $FC > |1.5|$) ($n = 4$ contrôles, $n = 4$ *FVBArb2a^{TP/TP}*, $n = 3$ *FVBArb2a^{GFP/GFP}*). (Analyses informatiques par B.Charrier) (C) Les analyses d'ontologie génétique sur les gènes différentiellement exprimés entre *FVBArb2a^{GFP/GFP}* et *FVBArb2a^{TP/TP}* révèlent une signature s'apparentant à celle de la réponse ISR. (D) Les analyses de Cut&Run réalisées sur des embryons contrôles révèlent la présence d'ARB2A au promoteur d'*Atf4* (expériences et mise en forme initiale par S.Sallis), lequel est dérégulé à la hausse dans les CCN d'embryons *FVBArb2a^{TP/TP}* ($n = 2$, données tirées de (Bélanger *et al.*, 2018)). (E) Les analyses d'immunobuvardage de type Western sur embryons E10.5 entiers montrent une légère diminution des niveaux d'ATF4 chez *FVBArb2a^{GFP/GFP}* et *FVBArb2a^{TP/TP}* ($n = 4$). Les ratios ont été normalisés avec la coloration rouge ponceau et exprimés relativement au groupe contrôle. (F) Selon les expériences de qPCR réalisées sur les CCN (G4-RFP+) isolées par FACS d'embryons *G4-RFP* à E10.5, l'expression d'*Atf4* tend à être augmentée chez les mutants ($n = 4$ contrôles, $n = 3$ *FVBArb2a^{TP/TP}*, $n = 3$ *FVBArb2a^{GFP/GFP}*). L'expression relative a été calculée après normalisation au gène de référence *Psmb2* et exprimée relativement au groupe contrôle. (test de Student).

Afin de valider cette hypothèse, des immunobuvardages de type Western ont été réalisés sur des embryons entiers au stade E10.5. Toutefois, en opposition avec l'hypothèse proposée, les résultats montrent une légère diminution des niveaux d'ATF4 chez les embryons *FVBArb2a^{TP/TP}* et *FVBArb2a^{GFP/GFP}* (Figure 3.14E). Afin de cibler plus précisément la principale population cellulaire affectée dans le syndrome CHARGE, les lignées *FVBArb2a^{TP/TP} :: G4-RFP* et *FVBArb2a^{GFP/GFP} :: G4-RFP* ont été employées pour isoler les CCN (G4-RFP+) par FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*, tri cellulaire activé par la fluorescence). Les résultats de qPCR sur les CCN d'embryons E10.5 montrent que l'expression d'*Atf4* tend à être régulée à la hausse chez *FVBArb2a^{TP/TP}* et *FVBArb2a^{GFP/GFP}* dans ce type cellulaire (Figure 3.14F). Par conséquent, bien que ces résultats ne permettent pas de valider que la levée de l'inhibition d'*Atf4* par ARB2A et l'activation consécutive de la voie ISR correspond au mécanisme compensatoire en jeu chez *Arb2a^{GFP/GFP}*, cela demeure une éventualité plausible.

3.3.4 Étude de l'implication de la voie UPR dans le mécanisme de compensation chez les mutants nuls *Arb2a^{GFP/GFP}*

La branche PERK connecte la réponse ISR à la réponse UPR, dont la fonction est de répondre à un stress du RE induit par des protéines non repliées (Hetz, 2012; Li *et al.*, 2019; Pakos-Zebrucka *et al.*, 2016). Or, l'isoforme longue d'ARB2A possède un peptide signal ainsi qu'un signal de rétention au RE suggérant une fonction au RE (Figure 1.6). Soutenant cette hypothèse, de précédentes études ont pu identifier la présence d'ARB2A au cytoplasme et, plus particulièrement, au RE (Bélanger *et al.*, 2018; Sallis *et al.*, 2023). De plus, des expériences de BioID menées par notre laboratoire ont identifié BiP et MANF comme interacteurs potentiels d'ARB2A (non montré). Or, BiP est une protéine chaperonne qui agit comme un

régulateur central de la réponse UPR, tandis que MANF exerce un effet cytoprotecteur lors d'une activation prolongée de l'UPR en atténuant la signalisation de la branche IRE1 α (Hetz, 2012; Kovaleva *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2019; Pakos-Zebrucka *et al.*, 2016). Ces différents éléments nous ont donc poussés à nous intéresser également à l'implication de la voie UPR dans la compensation effectuée par le modèle *Arb2a*^{GFP/GFP}.

Pour la branche IRE1 de la réponse UPR, laquelle est régulée négativement par MANF, la détection de protéines mal repliées par BiP entraîne sa dissociation d'IRE1, qui se phosphoryle (pIRE1 α) et s'active. pIRE1 α est alors en mesure d'effectuer l'épissage de *Xbp-u* en *Xbp-s*, puis XBP-s induit l'expression de protéines médiatrices de la réponse UPR (Hetz, 2012; Kovaleva *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2020). Des analyses préliminaires de l'expression de BiP, IRE1 α et XBP ont donc été effectuées chez *FVBArb2a*^{Tp/Tp} et *FVBArb2a*^{GFP/GFP}. Dans un premier temps, l'expression de BiP et de pIRE1 α a été étudiée sur des extraits d'embryons entiers au stade E10.5 par immunobuvardage de type Western. Les analyses montrent une diminution d'environ 50 % des niveaux de BiP chez les embryons mutants *FVBArb2a*^{Tp/Tp} et *FVBArb2a*^{GFP/GFP} par rapport aux contrôles (Figure 3.15A). En contrepartie, les niveaux de pIRE1 α sont moins fortement diminués, mais la diminution semble corrélée avec le génotype, les embryons hypomorphes *FVBArb2a*^{Tp/Tp} étant marqués par une diminution de 13 % et les mutants nuls *FVBArb2a*^{GFP/GFP} étant marqués par une diminution de 30 % (Figure 3.15B). L'expression de BiP a par la suite été étudiée par des marquages immunofluorescents sur des cellules N2a transfectées de façon stable avec des shARN (*short hairpin RNA*, petits ARN en épingle à cheveux) dirigés contre *Arb2a* (Figure S 6B). À l'inverse des résultats observés sur embryons entiers, la diminution de l'expression d'ARB2A dans les cellules N2a engendre une augmentation significative de l'expression de BiP (Figure 3.15C, D). Cette augmentation est légèrement plus importante pour la lignée sh4, mimant *Arb2a*^{Tp/Tp}, que pour la lignée sh1, mimant *Arb2a*^{GFP/GFP} (Figure 3.15C, D, Figure S 6B). Lorsque les niveaux d'*Ire1a* sont analysés par qPCR sur les CCN, les observations sont plus cohérentes avec les précédentes analyses sur embryons entiers. Par rapport aux contrôles, les niveaux d'*Ire1a* montrent une légère diminution chez *FVBArb2a*^{Tp/Tp} et une diminution plus importante, soit d'environ 40 %, chez *FVBArb2a*^{GFP/GFP} (Figure 3.15E). Étonnement, pour *Xbp*, les niveaux de transcrits épissés, *Xbp-s*, sont constants entre les trois génotypes tandis que les niveaux de transcrits non épissés, *Xbp-u*, sont dramatiquement plus faibles chez *FVBArb2a*^{GFP/GFP}, ce qui en fait une piste intéressante pour expliquer un mécanisme compensatoire spécifique à ce mutant (Figure 3.15F, G). Sans pouvoir conclure à ce stade sur un mécanisme compensatoire, ces analyses préliminaires semblent montrer que la diminution et la perte d'expression d'ARB2A engendrent des dérégulations de plusieurs composantes de la réponse UPR.

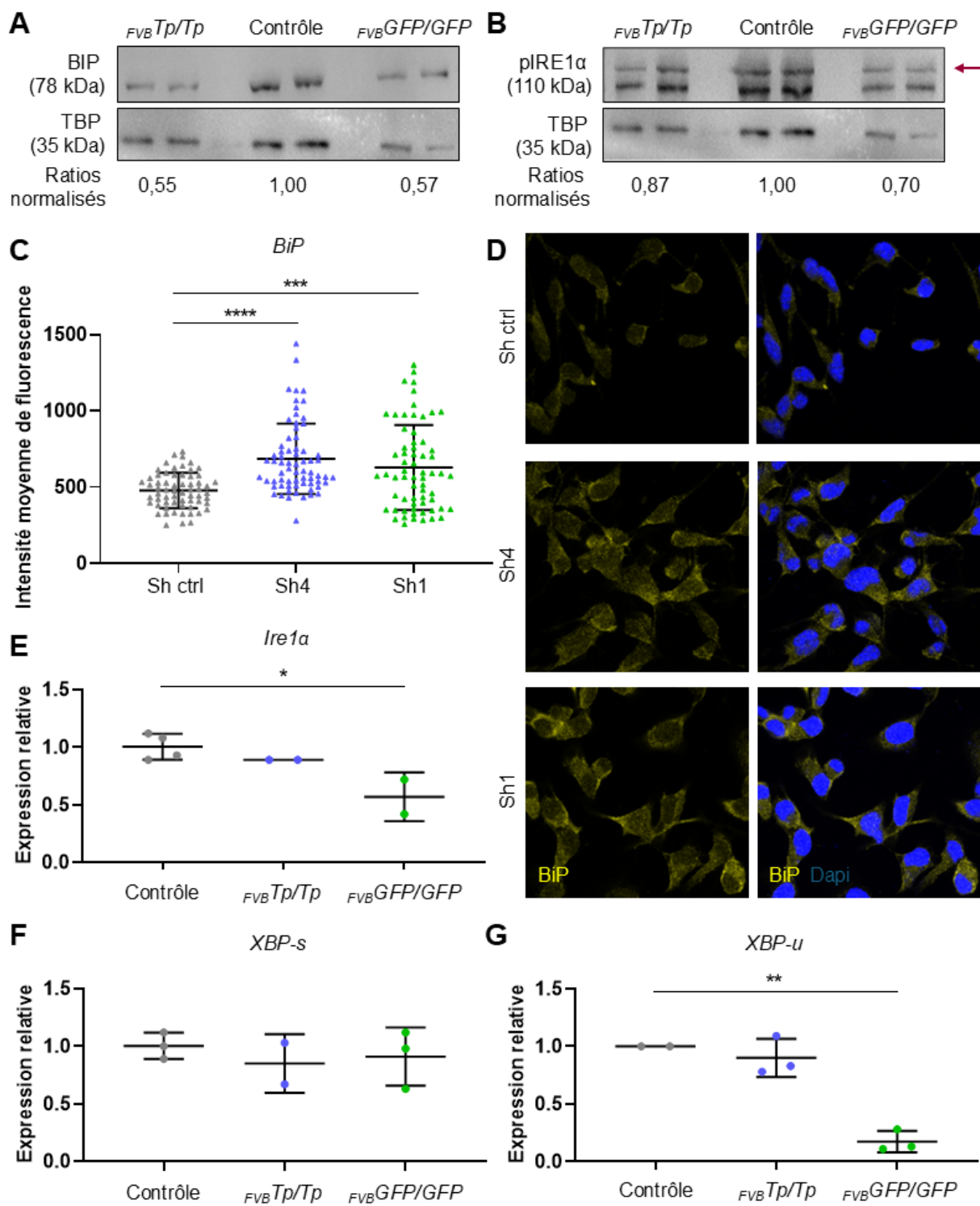


Figure 3.15 : L'expression de plusieurs composantes de la réponse UPR semble dérégulée chez les mutants *Arb2a*.

(A) Immunobuvardage de type Western sur extrait d'embryons complets à E10.5 comparant les niveaux de BiP (n = 2) (B) et de *ple1α* entre les différents génotypes (n = 3). Les ratios ont été normalisés avec TBP et exprimés relativement au groupe contrôle. (C-D) Marquages immunofluorescents anti-BiP sur les lignées cellulaires N2a-Sh ctrl (contrôle), N2a-Sh4 (proxy pour *Arb2a^{TP/TP}*) et N2a-Sh1 (proxy pour *Arb2a^{GFP/GFP}*) (n = 2, quantification de 30 cellules par n). (E) qPCR réalisées sur les CCN (G4-RFP+) isolées par FACS d'embryons *G4-RFP* au stade E10.5 pour *Ire1α*, (F) *XBP-s* (G) et *XBP-u* (n = 2-4 contrôles, n = 2-3 *FVBArb2a^{TP/TP}*, n = 2-3 *FVBArb2a^{GFP/GFP}*). L'expression relative a été calculée après normalisation au gène de référence *Psmb2* et exprimée relativement au groupe contrôle. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001 (tests de Student).

CHAPITRE 4

DISCUSSION

4.1 Étude de l'influence de facteurs génétiques et non génétiques sur le développement phénotypique du syndrome CHARGE

4.1.1 Le fond génétique influence le développement phénotypique de modèles murins pour le syndrome CHARGE

Le fond génétique ayant montré une grande influence sur divers modèles de neurocristopathies, le modèle murin pour le syndrome CHARGE, *Arb2a^{Tp/Tp}*, a été transféré du fond génétique FVB dans lequel il avait précédemment été caractérisé au fond génétique B6 (Bélanger *et al.*, 2018; Dixon et Dixon, 2004; Soret *et al.*, 2021; Takeuchi *et al.*, 1999).

Le transfert du modèle murin *Arb2a^{Tp/Tp}* du fond génétique FVB au fond B6 a permis d'observer une modification importante du patron de dépigmentation présenté par la lignée ainsi qu'une variation de la pénétrance de dix des quinze anomalies étudiées chez ce modèle pour le syndrome CHARGE (Figure 3.1). Ces observations ont ainsi mis en évidence l'impact important du fond génétique sur la présentation phénotypique du modèle *Arb2a^{Tp/Tp}*.

Afin de déterminer si cette susceptibilité au fond génétique est caractéristique des modèles CHARGE, les mêmes anomalies ont été étudiées chez la lignée murine *Chd7^{Gt}* dans les fonds génétiques FVB et B6. Pour ce modèle, le fond génétique influence fortement la survie des animaux *Chd7^{Gt/+}*, à un point tel qu'il s'est avéré impossible de compléter le transfert complet du modèle vers le fond B6 (Figure 3.2A, B). Sur quinze, ce ne sont ainsi que trois anomalies qui varient significativement pour le modèle *Chd7^{Gt/+}*, quoique l'impact sur certaines soit majeur (Figure 3.2C).

Le fond génétique semble donc dans une mesure plus ou moins importante influencer le développement phénotypique de deux modèles pour le syndrome CHARGE utilisés dans la présente étude. Des observations similaires ont d'ailleurs été rapportées dans la littérature. Chez le modèle *Chd7^{Looper/+}*, les seuils de réponse auditive du tronc cérébral sont beaucoup plus élevés dans le fond génétique BALB/c que dans le fond mixte BALB/c.B6 (Ogier *et al.*, 2014). De plus, lors de la caractérisation de *Wheels*, un mutant *Chd7* présumé, il a été noté que le fond génétique C57BL/6J était le seul parmi plusieurs (C3H/HeJ, BALB/cJ et CAST/Ei) à permettre la rétention complète du phénotype de *circling* des souris *Wheels* (Alavizadeh *et*

al., 2001). Ainsi, dans un fond mixte, seules 25 % des souris *Wheels* présentaient du *circling* et de l'*head-bobbing*, contre 100 % dans un fond C57Bl/6J (Hurd *et al.*, 2007; Nolan *et al.*, 1995). Pour le modèle *Chd7^{Gt/+}* explicitement, il avait précédemment été identifié que, en comparaison avec les souris de fond mixte, les souris *Chd7^{Gt/+}* C57Bl/6J arboraient des défauts aux oreilles plus sévères tandis que les souris *Chd7^{Gt/+}* 129S1/Sv1mJ arboraient, elles, des phénotypes olfactifs plus sévères (Zentner *et al.*, 2010b). L'ensemble de ces observations suggèrent qu'effectivement, des modificateurs (*modifiers*) propres aux différents fonds génétiques influencent le développement phénotypique de divers modèles murins du syndrome CHARGE (Ogier *et al.*, 2014).

L'évocation de l'influence potentielle du fond génétique sur la présentation phénotypique du syndrome CHARGE est donc présente dans la littérature depuis de nombreuses années (Bosman *et al.*, 2005; Ogier *et al.*, 2014; Zentner *et al.*, 2010b). En 2010, Zentner *et al.* ont même suggéré de propager une mutation de *Chd7* dans différents fonds génétiques, puis de répertorier la pénétrance et l'expressivité des anomalies CHARGE afin de traiter la question (Zentner, 2010). Toutefois, la présente étude est la première depuis lors à s'être penchée plus extensivement sur le sujet afin de confirmer cette hypothèse.

4.1.1.1 Modificateurs des fonds génétiques B6 et FVB et interactions avec les allèles *Arb2a^{Tp}* et *Chd7^{Gt}*

Dans le cadre de modèles murins pour le syndrome CHARGE, la présente étude démontre une aggravation globale des phénotypes observés dans le fond génétique B6 par rapport au fond génétique FVB. Cette particularité n'est toutefois pas commune à l'ensemble des neurocristopathies. Par exemple, le modèle murin *Holstein*, pour la maladie d'Hirschsprung, présente au contraire des défauts du système nerveux entériques moins sévères dans le fond génétique B6 (Soret *et al.*, 2021). Ces éléments suggèrent donc une interaction spécifique de certains modificateurs du fond génétique B6 avec les gènes associés au syndrome CHARGE, la combinaison des deux facteurs au sein du même animal provoquant une incidence accrue de certaines anomalies.

Chez le modèle *Chd7^{Gt/+}*, le fond B6 n'accroît pas de façon significative le développement du colobome, mais une certaine tendance à la hausse peut tout de même être observée (Figure 3.2C). Dans le fond génétique B6, le modèle *Arb2a^{Tp}* montre quant à lui une augmentation marquée de la pénétrance des phénotypes oculaires, la microphthalmie et l'anophtalmie étant détectées chez les mutants *B6Arb2a^{Tp/Tp}*, mais également chez les hétérozygotes *B6Arb2a^{Tp/+}*, en plus du colobome oculaire précédemment identifié chez *FVBArb2a^{Tp/Tp}* (Figure 3.1B). Ces anomalies sont d'ailleurs naturellement observées dans une faible

proportion de souris B6 de type sauvage (Richard et Smith, 1995; Robinson, Holmgren et Dewey, 1993; Smith, Roderick et Sundberg, 1994), ce qui suggère l'existence d'un modificateur prédisposant au développement d'anomalies oculaires dans le fond génétique B6 et une interaction entre celui-ci et l'allèle *Arb2a^{Tp}*.

De façon similaire, pour le modèle *Chd7^{Gt/+}*, le fond B6 présente une légère tendance, non significative, vers une pénétrance accrue de la malocclusion (Figure 3.2C) tandis que l'augmentation est importante et significative pour le modèle *Arb2a^{Tp/Tp}* (Figure 3.1D). Cette anomalie est encore une fois répertoriée en faible proportion chez les souris sauvages de fond génétique B6 (0,05 %) (Garcia-Arocena, 2016). La présence d'un modificateur B6 favorisant le développement de la malocclusion ainsi qu'une interaction entre la mutation *Arb2a^{Tp}* et ce modificateur est donc également suspectée.

Pour les anomalies aux oreilles internes, celles-ci sont beaucoup plus pénétrantes chez *B6Arb2a^{Tp/Tp}* que chez *FVBArb2a^{Tp/Tp}* et plus sévères chez *B6Chd7^{Gt/+}* que *FVBChd7^{Gt/+}* (Figure 3.1C, Tableau S 7), ce qui laisse croire à un modificateur B6 pour les défauts aux oreilles internes aussi. La rétention du *circling* par le mutant *Wheels* dans le fond B6 pourrait également être induite par la présence d'un tel modificateur dans le fond génétique B6 prédisposant aux anomalies vestibulaires (Alavizadeh *et al.*, 2001). Toutefois, il est possible que l'effet aggravateur de ce modificateur B6 soit restreint aux anomalies vestibulaires et n'affecte pas la cochlée, comme il a été rapporté chez *Chd7^{Looper/+}* que les seuils de détection auditifs étaient plus faibles dans un fond mixte BALB/c.B6 que dans un fond purement BALB/C (Ogier *et al.*, 2014). Il est aussi possible que le fond BALB/c marque une prédisposition encore plus importante que le fond B6 au développement d'anomalies de l'oreille interne.

À l'inverse des anomalies précédemment énoncées, la fente palatine « classique », soit la fermeture incomplète du palais, marque une pénétrance extrêmement marquée chez *FVBChd7^{Gt/+}* tandis qu'elle est absente chez *B6Chd7^{Gt/+}*. Elle a aussi été identifiée en une occasion en combinaison avec l'hypoplasie de l'os présphénoïde chez *FVBArb2a^{Tp/Tp}* (non montré), mais jamais chez *B6Arb2a^{Tp/Tp}*. De plus, au sein des lignées *Chd7* murines répertoriées, si la fente palatine a été décrite chez plusieurs lignées de fond C3H, ce n'est pas le cas pour celles de fond B6. Une pénétrance particulièrement élevée chez les mutants *Chd7^{Whi/+}*, caractérisés dans le fond génétique C3HeB/FeJ, a d'ailleurs été rapportée par les auteurs (Bosman *et al.*, 2005). Il serait donc tentant d'évoquer des modificateurs favorisant le développement de cette anomalie dans les fonds FVB et C3H et/ou protégeant contre cette anomalie dans le fond génétique B6, d'autant

plus que certaines études ont déjà démontré l'influence du fond génétique sur le développement de la fente palatine (Sugiyama et Takigawa, 2020). Toutefois, cette même étude avait montré, à l'inverse, une pénétrance complète de la fente palatine chez les mutants *Tgfb3* dans le fond B6 et une pénétrance bien moindre (50 %) dans le fond C3H. Pour expliquer cette divergence, il est possible que les lignées *Chd7* de fond B6 précédemment décrites n'aient pas été caractérisées pour la fente palatine, expliquant qu'elle n'ait pas été cataloguée et/ou il est possible que les mécanismes sous-jacents au développement de la fente palatine par des mutations de *Tgfb3*, *Chd7* et *Arb2a*, ne soient pas les mêmes, interagissant alors différemment avec les modificateurs de ces fonds génétiques.

Le fond génétique semble ainsi influencer la pénétrance et l'expressivité de nombreuses anomalies. Une attention particulière doit donc être portée au fond génétique sélectionné pour expériences (Sugiyama et Takigawa, 2020). Le fond génétique doit permettre une bonne pénétrance et expressivité du phénotype d'intérêt. Simultanément, les expérimentateurs doivent être conscients des phénotypes pouvant être présentés par les animaux de type sauvage (telles les anomalies oculaires et la malocclusion pour le fond B6) afin de ne pas faussement conclure à l'induction d'anomalies par une mutation donnée si cette anomalie est inhérente au fond génétique sélectionné. Une attention particulière doit également être portée lors de la comparaison de lignées issues de fonds génétiques différents ou mixtes, les effets observés pouvant à la fois être causés par les différences entre les lignées, entre les fonds génétiques ou par une interaction entre ceux-ci.

4.1.1.2 Transposition du fond génétique chez l'humain

L'observation d'un impact non négligeable du fond génétique sur le développement des anomalies associées au syndrome CHARGE chez divers modèles murins soulève la question des répercussions chez l'humain. Il serait conséquemment intéressant de mener des études à large spectre afin d'identifier si différentes populations ethniques présentent une pénétrance variable au regard de certaines anomalies. Avec un ensemble de données ainsi que des ressources computationnelles, cette étude pourrait tenter de déterminer si la présence de certains modificateurs corrèle avec certaines caractéristiques ou avec certains degrés de sévérité. L'identification d'une influence ethnique sur la présentation phénotypique du syndrome CHARGE pourrait expliquer en partie la disparité phénotypique recensée entre les diverses publications, lesquelles utilisent des banques de patients d'origine différentes, mais pourrait également permettre d'établir des critères diagnostiques plus adaptés en fonction de l'origine des patients (Thomas *et al.*, 2022)

4.1.2 Les modèles murins du syndrome CHARGE $Arb2a^{Tp/Tp}$ et $Chd7^{Gt/+}$ présentent des dissimilarités phénotypiques

L'étude comparative des modèles $Arb2a^{Tp/Tp}$ et $Chd7^{Gt/+}$ entre les fonds génétiques FVB et B6 a mis en évidence l'incidence du fond génétique sur la majorité des anomalies associées au syndrome CHARGE pour le modèle $B6Arb2a^{Tp/Tp}$ (10/15), mais sur une minorité d'anomalies pour le modèle $Chd7^{Gt/+}$ (3/15), et qui ne se chevauchent pas. La pénétrance des anomalies est également variable entre les deux modèles pour 11/15 d'entre elles dans un moins un des fonds génétiques étudiés. Et surtout, pour la fente palatine, l'os affecté dans les deux modèles diffère et pour les oreilles internes, le type d'anomalies recensé n'est pas le même. L'ensemble de ces observations suggèrent que ces deux modèles, bien que tous deux présentant de nombreuses anomalies associées au syndrome CHARGE, tendent à engendrer des présentations phénotypiques variables.

4.1.2.1 Des syndromes dans le syndrome...

Graham *et al.* évoquent d'ailleurs la présence d'un syndrome reconnaissable au sein même de l'association CHARGE, le syndrome de Hall-Hittner (Graham *et al.*, 2005), une idée qui avait déjà été évoquée par Blake *et al.* (Blake *et al.*, 1998). Ces observations sont en ligne avec les publications ultérieures rapportant que la pénétrance de diverses anomalies est variable entre les patients avec une mutation avérée de *CHD7* (*CHD7* positifs) et les patients sans mutation de *CHD7* (*CHD7* négatifs) ou entre les patients avec un diagnostic moléculaire et ceux avec un diagnostic exclusivement clinique (Bergman *et al.*, 2011; Lalani *et al.*, 2006; van Ravenswaaij-Arts et Martin, 2017; Zentner *et al.*, 2010b). Dans l'ensemble, ces éléments, de même que les divergences entre les modèles murins pour le syndrome CHARGE $Arb2a^{Tp/Tp}$ et $Chd7^{Gt/+}$ laissent penser que le gène pathologique dans le syndrome CHARGE pourrait favoriser le développement de certaines caractéristiques au détriment d'autres.

Les observations menées au cours de cette thèse n'ont identifié que très peu d'anomalies affectées par le changement de fond génétique pour les mutants $Chd7^{Gt/+}$ (3/15), indiquant que ce modèle est plus robuste face à de telles variations que le modèle $Arb2a^{Tp/Tp}$. Simultanément, le recensement des phénotypes présentés par les mutants *Chd7* murins montre une grande constance dans la prévalence de certains phénotypes, soit la létalité embryonnaire en homozygotie ainsi que la mortalité précédant le sevrage, le *circling*, l'*head-bobbing*, l'hyperactivité, les anomalies aux oreilles internes typiques (troncage du canal latéral, atteinte variable du canal postérieur) et une taille réduite en hétérozygotie (Tableau 1.3). D'autres anomalies sont toutefois variables d'une lignée à l'autre (ex : anomalies oculaires, fente palatine/atrésie

choanale, etc.) (Tableau 1.3). À noter, il est toutefois possible que certains phénotypes ne soient pas répertoriés chez certains modèles, car n'ayant pas été étudiés et un biais peut être induit dû à la sélection de la majorité de ces modèles lors de cribles comportementaux identifiant le *circling* et l'hyperactivité (Alavizadeh *et al.*, 2001; Hawker *et al.*, 2005; van Ravenswaaij-Arts et Martin, 2017), sélectionnant donc pour ces caractéristiques et délaissant de potentiels mutants *Chd7* qui ne les auraient pas.

De façon générale, ces éléments, soit 1) l'impact modéré du changement de fond génétique sur le modèle *Chd7*^{Gt/+} 2) la constance de certains phénotypes entre les modèles *Chd7* murins et 3) la pénétrance variable des anomalies entre les patients avec et sans diagnostic moléculaire (*CHD7*), suggèrent qu'une mutation de *CHD7* tend à engendrer une présentation phénotypique plutôt constante, du moins pour certaines anomalies en particulier. Ainsi, les patients *CHD7* positifs tendent à développer des caractéristiques plus similaires que les patients *CHD7* négatifs, pouvant expliquer l'observation d'un «sous-syndrome» dans le syndrome CHARGE.

En comparaison, les mutants *Arb2a*^{Tp} semblent beaucoup plus sensibles, que ce soit au fond génétique ou à des facteurs d'origine environnementale, exhibant conséquemment des présentations phénotypiques plus variables (Figure 3.1, Figure 3.4, Figure 3.5). Cette grande variabilité, de même que les dissemblances entre les mutants *Chd7* et *Arb2a* pourraient expliquer le faible nombre de patients CHARGE avec une mutation d'*ARB2A* identifiés jusqu'à présent, ceux-ci n'arborant pas nécessairement la combinaison d'anomalies CHARGE ou *CHD7* typiques et pouvant être diagnostiqués pour d'autres syndromes, par exemple, ou comme CHARGE atypiques.

Pour un autre gène associé au syndrome CHARGE, *RERE*, il est rapporté qu'un variant précis (Leu1438_His1439dup) donne lieu à une présentation phénotypique typique (colobome oculaire, atrésie choanale, défauts cardiaques, anomalies génitales, retard de croissance et de développement et déficience intellectuelle) donnant lieu, exceptionnellement, au diagnostic du syndrome CHARGE plutôt qu'aux habituels troubles liés à *RERE* (Scott et Sherr, 2019). Les patients CHARGE *RERE* positifs présentent donc possiblement un autre sous-groupe au sein du syndrome CHARGE partageant une très forte similarité phénotypique, un autre «sous-syndrome» dans le syndrome. De plus, les patients *RERE* semblent donc présenter une très faible variabilité phénotypique, là où elle semble modérée chez les individus *CHD7/Chd7* et élevée chez les individus *ARB2A/Arb2a*. Le degré de variabilité ne serait donc pas constant sur l'ensemble des gènes pathologiques associés au syndrome CHARGE.

4.1.2.2 ...ou une unification sous un seul syndrome

Tel que présenté dans le Tableau 1.2, le syndrome CHARGE présente une très grande similarité phénotypique et génotypique avec plusieurs autres conditions, ce qui peut rendre le diagnostic complexe. Bien que, tel qu'argumenté ci-haut, des mutations de *CHD7* aient tendance à engendrer une présentation phénotypique typée, certains patients *CHD7* dérogent à la présentation « classique ». Ainsi, des mutations de *CHD7*, bien qu'étant généralement associées à des patients CHARGE, ont également été identifiées chez des patients atteints des syndromes de Di-George ou de Kallmann (Bergman *et al.*, 2011; Janssen *et al.*, 2012; Jongmans *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2008). Il a d'ailleurs été proposé que le syndrome de Kallmann consiste en une forme légère du syndrome CHARGE (Bergman *et al.*, 2011; Janssen *et al.*, 2012; Jongmans *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2008). À l'aide de modèles murins doubles hétérozygotes, une synergie a été identifiée entre des allèles mutants pour les principaux gènes associés à ces syndromes, *Chd7*, *Fgfr1* et *Tbx1* (Bergman *et al.*, 2010b; Randall *et al.*, 2009). Même parmi les syndromes qui ne partagent pas les mêmes gènes causatifs, ceux-ci peuvent être associés. Ainsi, le syndrome d'anophtalmie liée à *SOX2* est causé par une mutation de *SOX2* (Engelen *et al.*, 2011). Or, *SOX2* partage de nombreux sites de liaison à l'ADN avec *CHD7*. Dans les cellules souches neurales murines, il s'agit d'un cofacteur de *CHD7* pour la régulation de cibles communes tels *Jag1*, *Gli3* et *Mycn*, qui sont, eux, mutés dans d'autres syndromes similaires au syndrome CHARGE, soit les syndromes d'Alagille, Pallister-Hall et Feingold (Engelen *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2024; Puc et Rosenfeld, 2011). De plus, une pathologie moléculaire commune liée à la dérégulation de l'épissage alternatif cotranscriptionnel, à laquelle les CCN seraient particulièrement sensibles, a été suggérée pour plusieurs de ces syndromes (Berube-Simard et Pilon, 2019). Il a donc été suggéré que ces diverses conditions pourraient en fait constituer diverses déclinaisons d'une même pathologie, qui pourraient alors potentiellement être rassemblées sous un même diagnostic et partager une thérapie commune (Berube-Simard et Pilon, 2019).

4.1.2.3 Des anomalies aux canaux semi-circulaires caractéristiques comme signe phare d'une mutation de *Chd7*

Tel que mentionné ci-haut, les anomalies aux canaux semi-circulaires ainsi que le *circling* et l'*head-bobbing* qui peuvent en découler semblent une caractéristique commune à l'ensemble des modèles murins *Chd7* générés jusqu'à présent (Tableau 1.3) - bien qu'un biais puisse avoir été induit par les critères utilisés lors des cribles ayant généré ces modèles. Le type précis de défaut observé est également hautement reproductible, soit consistant en un canal latéral tronqué avec une atteinte variable du canal postérieur et des ampoules associées (Tableau 1.3). Au sein de la littérature scientifique, Ogier *et al.* rapportent cette

même observation, cette constance pour des malformations de l'oreille interne chez l'ensemble des modèles *Chd7* (Ogier *et al.*, 2018). En comparaison, le modèle *Arb2a*^{Tp/Tp} montre une pénétrance beaucoup plus faible des anomalies aux oreilles internes dans le fond génétique FVB (Figure 3.1F), mais surtout, les anomalies observées sont très différentes (Figure 3.3D). Ces observations appuient une fonction importante de *Chd7* dans le patronage de l'oreille interne, mais soulignent également une distinction dans les rôles d'ARB2A et de CHD7.

Chez l'humain également, Hsu *et al.* mentionnent que l'absence ou l'hypoplasie des canaux semicirculaires est hautement prédictive d'une mutation de *CHD7* (Hsu *et al.*, 2014). Au niveau du syndrome CHARGE en général, Verloes reconnaît les anomalies aux canaux semi-circulaires comme un indice diagnostique sous-estimé et négligé (Verloes, 2005), tout comme Stjernholm décrit que certaines combinaisons de défauts aux os temporaux sont extrêmement rares au sein d'autres syndromes, sinon spécifiques au syndrome CHARGE (Stjernholm, 2003). Effectivement, en survolant le Tableau 1.2, qui répertorie les syndromes phénotypiquement et moléculairement associés au syndrome CHARGE, il est possible de constater que, si les anomalies aux oreilles externes et/ou les pertes auditives sont présentes dans quelques syndromes, les anomalies aux canaux semi-circulaires sont relativement spécifiques au syndrome CHARGE.

En somme, les anomalies de l'oreille interne, et particulièrement des canaux semi-circulaires, pourraient représenter un aspect clé pour le diagnostic des patients CHARGE/*CHD7*. Cela serait d'autant plus pertinent dans le cadre d'un diagnostic prénatal puisque ces anomalies peuvent être visualisées par ultrasons (Busa *et al.*, 2016; Hefner et Fassi, 2017; van Ravenswaaij-Arts et Martin, 2017). Or, l'identification et la prise en charge rapide des patients CHARGE étant cruciales pour leur survie, leur développement et leur qualité de vie, un diagnostic précoce est avantageux (Basson et van Ravenswaaij-Arts, 2015; Bélanger *et al.*, 2018; Blake et Prasad, 2006; Hsu *et al.*, 2014; Sanlaville et Verloes, 2007).

4.1.2.4 ARB2A pourrait-il agir comme cofacteur de CHD7 dans la régulation de la transcription?

Une très grande similarité a été décrite entre plusieurs syndromes associés, faisant intervenir les mêmes gènes et/ou un même réseau de gènes liés par des fonctions associées – potentiellement en lien avec l'épissage alternatif cotranscriptionnel (Tableau 1.2) (Berube-Simard et Pilon, 2019). Nos précédentes études ont ainsi positionné ARB2A, CHD7 et AGO2 au sein d'un même complexe (Bélanger *et al.*, 2018). Toutefois, la présente étude a simultanément montré plusieurs dissemblances entre les mutants *Arb2a*^{Tp/Tp} et *Chd7*^{Gt/+} (Figure 3.3). De plus, ARB2A partage une portion, mais non l'entièreté, des sites de

liaison de CHD7 sur la chromatine (S.Sallis, données non publiées). Avec l'ensemble de ces résultats, il serait possible de suggérer qu'ARB2A, à l'image de SOX2, puisse agir comme cofacteur de CHD7 pour la régulation d'une portion, mais non de l'ensemble, de ses gènes cibles, parmi lesquels les gènes associés au développement des organes affectés dans le syndrome CHARGE (Engelen *et al.*, 2011; Puc et Rosenfeld, 2011). Une telle hypothèse expliquerait simultanément les similarités, mais également les dissemblances entre les mutants *Arb2a* et *Chd7*, tel entre les syndromes d'anophtalmie liée à SOX2 et CHARGE.

4.1.3 Des facteurs environnementaux pourraient influencer le développement *in utero* des anomalies associées au syndrome CHARGE

Afin de tester l'effet de facteurs non génétiques sur le développement phénotypique du syndrome CHARGE, des composés pouvant se retrouver dans l'alimentation, soit l'éthanol et l'acide rétinoïque, ont été administrés à des femelles souris gestantes. L'observation subséquente des embryons a révélé que ces deux composés sont en mesure d'augmenter la pénétrance et/ou la sévérité des anomalies oculaires observées chez les embryons mutants pour des gènes associés au syndrome CHARGE (Figure 3.4, Figure 3.5). Ces observations indiquent que des facteurs non génétiques agissant sur le fœtus en développement seraient susceptibles de moduler la présentation phénotypique du syndrome CHARGE.

4.1.3.1 Interactions de l'éthanol et de l'acide rétinoïque avec les allèles *Arb2a^{Tp}* et *Chd7^{Gt}* ainsi qu'avec les différents fonds génétiques

Chez les embryons *B6Arb2a^{Tp/+}*, l'injection de véhicule, soit de PBS (20 µl/g) et de DMSO dilué (1 : 40) dans le PBS (3 µl/g), semble avoir causé l'augmentation de la pénétrance et de l'expressivité des anomalies oculaires alors qu'un effet aussi important du véhicule n'a pas été observé chez les lignées *Chd7^{Gt}* (Figure 3.4, Figure 3.5). Ces observations s'inscrivent bien avec celles des sections précédentes, le modèle *Arb2a^{Tp}* semble plus sensibles à diverses modulations que le modèle *Chd7^{Gt/+}*.

Pour l'éthanol, son administration intrapéritonéale, mimant le syndrome d'alcoolisme fœtal, est connue pour augmenter le taux d'anomalies oculaires comme la microphthalmie et l'anophtalmie, mais également l'opacification cornéenne (Cook, Nowotny et Sulik, 1987; Richard et Smith, 1995; Webster *et al.*, 1983). Il est décrit que cet effet est particulièrement important dans le fond génétique B6 comparativement aux autres fonds génétiques, suggérant que l'alcool accroît la propension du fond B6 au développement d'anomalies oculaires (Richard et Smith, 1995). Nous avons précédemment évoqué que le fond génétique B6 accroît également la propension du modèle *Arb2a^{Tp}* à développer de telles anomalies (4.1.1). Il n'est donc pas étonnant que la somme de ces trois facteurs, le fond génétique B6, le modèle *Arb2a^{Tp}* et l'éthanol,

se potentialise en une pénétrance complète ou presque complète des malformations oculaires avec de forts degrés de sévérité (Figure 3.4C).

Pour l'acide rétinoïque, son effet perturbateur sur le développement de l'œil chez les modèles *Arb2a^{Tp/Tp}* et *Chd7^{Gt/+}* paraît potentialisé dans le fond génétique FVB (Figure 3.5), ce qui est surprenant puisque le fond génétique FVB n'est pas connu pour sa propension aux anomalies oculaires.

Nos analyses sur l'éthanol et l'acide rétinoïque ne s'étendront pas plus loin pour cette section, mais seront poursuivies au chapitre 4.2.2.5.

4.1.3.2 Implications chez l'humain d'une susceptibilité développementale des fœtus CHARGE

Sachant l'impact négatif de l'éthanol sur le développement des anomalies oculaires chez les embryons *Arb2a^{Tp/Tp}* et *Chd7^{Gt/+}*, chez l'humain, la consommation d'éthanol pendant la grossesse pourrait représenter un facteur de risque supplémentaire chez les mères porteuses d'enfants atteints du syndrome CHARGE. Dans ce contexte, une prévention accrue pourrait s'avérer pertinente, d'autant plus que certaines statistiques rapportent que jusqu'à 10 % des femmes consomment de l'alcool pendant leur grossesse (Popova *et al.*, 2017). De telles optiques d'actions posées au cours de la grossesse se heurtent toutefois à la problématique du diagnostic prénatal. En effet, les possibilités de diagnostic prénatal du syndrome CHARGE sont très limitées. Généralement, le dépistage prénatal par des tests génétiques est limité aux très rares cas familiaux. Sinon, des tests de dépistage incorporant *CHD7* parmi les gènes testés sont disponibles auprès de certains laboratoires commerciaux, mais leur prix demeure prohibitif (van Ravenswaaij-Arts et Martin, 2017; Vermeesch, Voet et Devriendt, 2016). Rappelons également que les cas de syndrome CHARGE ne peuvent pas tous être expliqués par un diagnostic moléculaire (Moccia *et al.*, 2018). Des tests ultrasons permettent de détecter certaines anomalies avant la naissance, mais ils ne mènent généralement pas directement à un diagnostic (Busa *et al.*, 2016; Hefner et Fassi, 2017; van Ravenswaaij-Arts et Martin, 2017).

Déterminer l'impact potentiel sur le développement des fœtus CHARGE de la pollution, des perturbateurs endocriniens ou du stress, qui affectent dans diverses mesures la population actuelle, pourrait également s'avérer intéressant. Comme la consommation de tabac pendant la grossesse augmente les risques associés au développement d'un syndrome d'alcoolisme fœtal chez l'enfant à naître (Oh *et al.*, 2023), la question se pose de savoir s'il s'agit d'un facteur qui pourrait également augmenter le risque de

développer ou d'aggraver certaines anomalies associées au syndrome CHARGE. Finalement, les expériences ayant montré que certains facteurs non génétiques peuvent influencer le développement phénotypique du syndrome CHARGE (Figure 3.4, Figure 3.5), il n'est pas impossible que la grande variabilité phénotypique observée dans le syndrome CHARGE puisse être en partie induite par des facteurs liés à l'alimentation ou à l'environnement.

4.1.4 Des facteurs encore inconnus influencent le développement phénotypique du syndrome CHARGE

Les résultats présentés dans cette thèse ont permis de valider que le fond génétique impacte la présentation phénotypique chez des modèles murins du syndrome CHARGE, que des modèles mutants pour différents gènes associés à ce syndrome présentent également des caractéristiques différentes et que des facteurs environnementaux peuvent influencer sur la pénétrance et la sévérité des anomalies développées. La littérature scientifique a également corrélé des mutations distales ou non tronquantes (ex : faux-sens) de *CHD7* avec des phénotypes de moindre sévérité chez les patients CHARGE (Bergman *et al.*, 2012; Dana *et al.*, 2023; Jongmans *et al.*, 2006; Legendre *et al.*, 2017). Toutefois, malgré l'identification de l'influence de ces éléments sur le développement phénotypique du syndrome CHARGE, certains facteurs demeurent encore non identifiés. En effet, pour les quatre lignées étudiées, *FVBArb2a^{Tp/Tp}*, *B6Arb2a^{Tp/Tp}*, *FVBChd7^{Gt/+}* et *B6Chd7^{Gt/+}*, des souris génétiquement identiques, issues d'une même portée et ayant grandi dans la même cage développent pourtant des anomalies différentes, indiquant que des facteurs autres que la génétique et que les conditions environnementales générales impactent également le développement des anomalies CHARGE. Il en va de même chez l'humain, plusieurs cas de jumeaux monozygotes développant des anomalies distinctes sont recensés (Johnson *et al.*, 2006; Jongmans *et al.*, 2006; Lalani *et al.*, 2006; Oley, Baraitser et Grant, 1988; Tellier *et al.*, 1998).

L'effet de variations subtiles de l'environnement, ou du microenvironnement, pourrait être évoqué (Bosman *et al.*, 2005), les embryons issus d'une même gestation étant localisés à des endroits différents au sein de la corne utérine, par exemple. L'épigénétique constituerait aussi une piste d'étude intéressante (Lalani *et al.*, 2006). L'épigénétique peut diverger entre deux individus malgré une identité génétique commune. Des jumeaux monozygotes ayant partagé le même utérus peuvent développer des marques épigénétiques différentes, ces dernières pouvant être acquises au cours du développement de manière stochastique ou sous l'influence du microenvironnement mentionné ci-haut (Levesque *et al.*, 2014). Certaines publications suspectent également que, l'effet de *CHD7* étant dépendant de la dose, des variations même modérées dans l'expression spatiotemporelle de *CHD7* pourraient mener à des

phénotypes différentiels entre deux individus, les organes principalement affectés étant plus sensible au dosage de *CHD7* que les organes moins fréquemment affectés (Zentner *et al.*, 2010b).

4.2 Étude du rôle d'ARB2A dans le développement oculaire

4.2.1 ARB2A influence de nombreux aspects du développement oculaire

L'augmentation de la pénétrance et de la sévérité des anomalies associées au spectre MAC lors du passage de la mutation *Arb2a*^{TP} du fond génétique FVB au fond génétique B6 a suscité un intérêt envers une étude plus approfondie du rôle d'ARB2A dans l'œil. La caractérisation plus approfondie des anomalies oculaires a permis d'identifier des anomalies oculaires additionnelles s'ajoutant à celles du spectre MAC : l'énophtalmie, la déplétion des cellules ganglionnaires, l'opacification oculaire et l'hypopigmentation. D'autres anomalies sont également suspectées. Ainsi, le nerf optique étant formé par les axones des cellules ganglionnaires (Zeiss *et al.*, 2018), en présence d'une déplétion de celles-ci, une atteinte au nerf optique pourrait être observée. Si cette population rétinienne est affectée, il est également possible que d'autres populations le soient (ex : cellules de Müller, cellules amacrines, photorécepteurs, etc.). De plus, les observations menées au cours des dissections des rétines laissent croire à des anomalies de l'EPR. Les cellules semblent se désolidariser, se dispersant dans le milieu de culture lors de la dissection. Finalement, l'observation des souriceaux à P0 laisse également croire à de potentiels cas de corectopie (positionnement erroné de la pupille) (non montrée), une anomalie qui affecte les souris B6 dans des proportions similaires à la microphthalmie (Moore *et al.*, 2018). Les anomalies oculaires associées à la diminution d'ARB2A sont donc déjà multiples et la liste est propice à s'allonger, témoignant d'un rôle important d'ARB2A dans le développement oculaire.

Pour le colobome, on rapportait en 2017 que seulement 20 % des mutations causatives avaient été identifiées (James *et al.*, 2016). ARB2A apparaît ainsi comme un gène candidat intéressant. Dans ce contexte, il pourrait contribuer à combler une partie de la proportion de gènes causatifs encore non identifiés. De plus, sachant que certaines souris hétérozygotes *B6Arb2A*^{TP/+} ne présentent que le colobome oculaire, ARB2A pourrait s'inscrire comme causatif du colobome tant dans un contexte syndromique que non syndromique.

4.2.1.1 Réflexions sur l'hypopigmentation

Il existe deux sources de pigmentation pour la région postérieure de l'œil, les mélanocytes de la choroïde et les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien. Contrairement aux mélanocytes cutanés qui

synthétisent la mélanine en continu, les mélanocytes uvéaux produisent la majeure partie de leur mélanine avant la naissance (Coutant *et al.*, 2024). Pour les cellules de l'EPR, le sujet est controversé. En effet, si plusieurs études ont démontré que les cellules de l'EPR ne produisent de la mélanine que pendant une courte période de l'embryogenèse, d'autres études suggèrent qu'au contraire elles seraient en mesure d'effectuer de la mélanogenèse même à l'âge adulte (Kaufmann et Han, 2024). Sachant que, contrairement aux cellules de l'EPR, qui proviennent de l'ectoderme neural, les mélanocytes uvéaux sont dérivés de la crête neurale (Kaufmann et Han, 2024), dans le cadre du syndrome CHARGE, une neurocristopathie, l'hypothèse qui semble la plus logique serait que cette hypopigmentation de l'œil est induite par la déplétion des mélanocytes choroïdiens. Les mélanocytes de la choroïde pourraient ainsi être moins nombreux ou présenter une plus faible production de mélanine.

Cette hypopigmentation de l'œil semble partagée par plusieurs des modèles générés au cours du même crible génétique (Figure S 7), alors que seules les lignées *Arb2a^{Tp}* ont été associées à des anomalies oculaires (Bélanger *et al.*, 2018; Bergeron *et al.*, 2016; Pilon, 2016; Soret *et al.*, 2021; Soret *et al.*, 2015). Toutefois, ces modèles possèdent en commun des anomalies de pigmentation du pelage (Bélanger *et al.*, 2018; Bergeron *et al.*, 2016; Pilon, 2016; Soret *et al.*, 2021; Soret *et al.*, 2015). Il serait donc plus intuitif de proposer que l'hypopigmentation du globe oculaire observée chez *Arb2a^{Tp/Tp}* et chez les autres modèles n'est pas due à des anomalies du développement de l'œil, mais plutôt à des anomalies de pigmentation. Chez le modèle *Spot*, il a été démontré que la perte de pigmentation du pelage était induite par une absence de mélanocytes folliculaires et non pas par une dysfonction de la synthèse de mélanine (Bonnamour *et al.*, 2022). Il n'est pas impossible que la perte de la pigmentation dans l'œil chez les différents modèles, dont *B6Arb2a^{Tp/Tp}*, soit induite par une analogue perte de mélanocytes choroïdaux. Pour répondre à cette question, des immunomarquages de la choroïde pourraient être réalisés, utilisant des anticorps dirigés contre DCT et TYR ou une lignée rapporteuse pour c-Kit (ex : *c-Kit-Cre :: Rosa26^{FloxSTOP-YFP}* ou *c-Kit-Cre :: mtmg*), c-Kit étant exprimé de façon transitoire dans la lignée mélanocytaire (Bonnamour *et al.*, 2022; Brombin et Patton, 2024; Pai *et al.*, 2012b).

Toutefois, à l'opposé de cette hypothèse, il est possible de constater sur les coupes histologiques que, chez les souris *B6Arb2a^{Tp/Tp}*, l'EPR est légèrement plus clair que chez les souris contrôles (Figure 3.6D). Cela suggérerait donc que des anomalies de synthèse ou de conservation de la mélanine par les cellules de l'EPR pourraient potentiellement également être à l'origine de l'hypopigmentation du segment postérieur de l'œil chez *Arb2a^{Tp/Tp}*.

4.2.1.2 Réflexions sur le glaucome et la perte des cellules ganglionnaires

Une opacification de l'œil a été observée chez plusieurs souris $B6Arb2a^{Tp/Tp}$ et $B6Arb2a^{Tp/+}$. Étant donné l'identification presque systématique de la fermeture de l'angle chez ces sujets (Figure 3.6B), il a été proposé que cette opacification était la conséquence d'un glaucome par fermeture de l'angle. Cette hypothèse demeure toutefois à confirmer.

Il convient de noter que le glaucome par fermeture de l'angle peut toutefois également se présenter sans opacification. Ainsi, si cette pathologie est effectivement en cause, il est par conséquent possible que plus de souris qu'anticipé soient affectées (Karaconji, Zagora et Grigg, 2022).

Certaines publications font état d'une association entre la microphthalmie et le glaucome (Karaconji, Zagora et Grigg, 2022). Au cours de la présente étude, ces deux anomalies ont d'ailleurs fréquemment été observées conjointement. La proximité anormale des structures du segment antérieur dans un œil microphthalmique pourrait favoriser la fermeture de l'angle irido-cornéen. Or, cette fermeture entrave l'écoulement de l'humeur aqueuse, ce qui peut entraîner une augmentation de la pression intraoculaire. Lorsque cette augmentation est rapide, un œdème cornéen peut survenir et provoquer une opacification de la cornée (Briceno-Lopez *et al.*, 2024; Karaconji, Zagora et Grigg, 2022; Liu *et al.*, 2026). Une pression intraoculaire élevée est également connue pour induire des dommages aux cellules ganglionnaires rétiniennes et favoriser leur apoptose (Garner *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2026; Qu, Wang et Grosskreutz, 2010). Bien que l'implication d'un glaucome par fermeture de l'angle n'ait pas encore été confirmée chez les souris $B6Arb2a^{Tp}$, cette cascade d'événements pourrait expliquer la forte co-occurrence d'opacification et de microphthalmie. Elle permettrait également d'établir un lien entre l'opacification et la déplétion des cellules ganglionnaires rétiniennes, deux anomalies observées chez $B6Arb2a^{Tp/Tp}$ qui, contrairement aux autres, ne sont pas congénitales, mais apparaissent suivant le sevrage. Afin de valider cette théorie, la mesure de la pression intraoculaire avec un tonomètre, la mesure du rapport « cup-disc » du nerf optique par examen du fond d'œil avec une lampe à fente et/ou l'étude du nerf optique par tomographie par cohérence optique (OCT) pourraient être réalisés (Karaconji, Zagora et Grigg, 2022; Liu *et al.*, 2026).

Cette hypothèse comprend toutefois certaines lacunes, la première étant que le glaucome est souvent associé à une augmentation de la pression intraoculaire (Karaconji, Zagora et Grigg, 2022; Liu *et al.*, 2026). Or, les globes oculaires de souris $B6Arb2a^{Tp/Tp}$ et $B6Arb2a^{Tp/+}$ présentant une opacification tendent à avoir une turgescence réduite, ce qui suggérerait à l'inverse une diminution de la pression intraoculaire. De plus,

l'œdème cornéen induit par une augmentation de la pression oculaire dans un contexte de glaucome semble généralement transitoire (Liu *et al.*, 2026) alors que les souris $B6Arb2a^{Tp/Tp}$ et $B6Arb2a^{Tp/+}$ affectées par une opacification de l'œil ne montrent pas d'amélioration au fil du temps. Finalement, les sujets $B6Arb2a^{Tp/Tp}$ expérimentaux ayant permis de montrer la déplétion des cellules ganglionnaires rétiniennes ne présentaient généralement pas d'opacification oculaire. Par contre, sachant que le glaucome peut se manifester sans opacification, tel que mentionné ci-haut, cela n'indique pas nécessairement que ces sujets n'en étaient pas atteints (Karaconji, Zagora et Grigg, 2022).

En conséquence, les causes alternatives envisagées pour expliquer l'opacification de l'œil incluent des cataractes, de la kératoconjonctivite ou de la conjonctivite sèche, lesquelles ont été recensées chez les mutants murins *Chd7* (Bergman *et al.*, 2010b; Bosman *et al.*, 2005; Hrabe de Angelis *et al.*, 2000; Ogier *et al.*, 2014; Tian *et al.*, 2012; van Ravenswaaij-Arts et Martin, 2017). Des atteintes à la cornée (ex : dépôts cornéens, adhésion kératolenticulaire) pourraient aussi être à l'origine d'une opacification cornéenne (Monk, 2019).

4.2.2 Investigations des mécanismes sous-jacents au développement du spectre MAC chez le modèle $B6Arb2a^{Tp}$

4.2.2.1 Observations sur le spectre MAC

Afin de mieux comprendre le développement de la M/A au cours du développement du syndrome CHARGE, ces anomalies ont été étudiées à différents stades embryonnaires et postnataux (Figure 3.8).

L'anophtalmie est un sujet sur lequel les perceptions ont évolué en cours d'étude. Les cas observés chez les souris $B6Arb2a^{Tp/Tp}$ et $B6Arb2a^{Tp/+}$ sont peu nombreux et la majorité consistent en de l'anophtalmie clinique (microphthalmie sévère) avec un œil déstructuré de taille fortement réduite (phtisis bulbi) (Figure 3.8A). Les cas d'anophtalmie véritable (*true anophtalmia*), ne présentant aucune structure oculaire dans la cavité orbitaire, sont quant à eux suffisamment rares pour soulever des doutes, certaines structures de taille fortement réduite ayant pu passer inaperçues lors des dissections. Au stade embryonnaire, un seul embryon présentant une anophtalmie a été identifié, mais n'a pas pu être examiné histologiquement pour confirmer l'absence complète de structures. Néanmoins, sur ces bases, l'hypothèse actuellement défendue est que, chez $B6Arb2a^{Tp}$, les cas d'anophtalmie observés correspondent généralement à de l'anophtalmie clinique résultant d'une microphthalmie sévère tandis que les cas d'anophtalmie véritables, bien que possibles, sont extrêmement rares.

Pour la microphthalmie, les premiers signes ont été identifiés au stade E11.5 (Figure 3.8A). Pour tous les stades embryonnaires, la microphthalmie est marquée par une rotation de la cupule optique. Une implication possible de cette rotation dans la pathogenèse du spectre MAC est donc envisagée. En effet, le bon développement de l'œil nécessitant l'action de morphogènes et l'implication du MPO dans la fermeture de la fissure choroïdienne étant suspectée (Casey, Lusk et Kwan, 2023; Williams et Bohnsack, 2020; Zilova *et al.*, 2021), il est envisageable qu'une perturbation spatiale du champ oculaire puisse mener à des anomalies développementales. De plus, aux stades embryonnaires ainsi que postnataux, chez $B6Arb2a^{Tp/Tp}$ et $B6Arb2a^{Tp/+}$, la microphthalmie a systématiquement été observée conjointement au colobome (Figure 3.8B). Une origine mécanistique commune ou un lien de causalité entre ces deux anomalies serait donc cohérent. Une idée intéressante est d'ailleurs que la persistance de la fissure choroïdienne puisse engendrer une fuite de vitré, perturbant par la suite la croissance de la cupule optique par des processus vraisemblablement physico-chimiques (Ludwig, Lopez et Czyz, 2025). Toutefois, ce mécanisme ne semble pas appuyé par la littérature.

Les déclinaisons de la M/A présenté par $B6Arb2a^{Tp/Tp}$ et $B6Arb2a^{Tp/+}$ s'étendraient ainsi de l'anophtalmie véritable à la microphthalmie apparente, en passant par un éventail des degrés d'atteinte en taille et en structure (Figure 3.8). Cette diversité illustre bien le concept de spectre dans le spectre MAC. Cela suggère également qu'ARB2A peut agir sur de multiples aspects du développement oculaire, lesquels sont perturbés de façon plus ou moins importante chez les mutants $Arb2a^{Tp}$, menant ultimement à un éventail de phénotypes. Par exemple, s'il y a effectivement des cas de vraies anophtalmies, cela suggère des événements de dérégulation importants lors de la spécification du champ optique (E8.0), alors que le colobome témoigne d'un défaut de fermeture de la fissure choroïdienne, un processus complètement différent ayant lieu ultérieurement (E11.5-E12.5) (Bernstein *et al.*, 2018; Heavner et Pevny, 2012).

4.2.2.2 Les anomalies du spectre MAC présentées par le modèle $B6Arb2a^{Tp}$ ont-elles pour origine une perturbation des CCN?

Une action potentielle d'ARB2A sur de multiples aspects du développement oculaire est d'autant plus plausible que nos expériences indiquent que son expression est presque ubiquitaire tout au long du développement oculaire, autant dans la population cellulaire générale que dans les CCN (G4-RFP+) (Figure 3.9).

La communauté scientifique soupçonne une contribution importante du MPO, qui abrite une population de CCN, lors de la fermeture de la fissure choroïdienne (Casey, Lusk et Kwan, 2023; Weigele et Bohnsack,

2020). De plus, chez $FVBArb2a^{Tp/Tp}$, il a été démontré que de nombreux processus des CCN sont dérégulés (ex : migration, prolifération, mort cellulaire) (Bélanger *et al.*, 2018). Il serait donc intéressant d'identifier si, chez $B6Arb2a^{Tp/Tp}$, un déséquilibre est visible au niveau de la population de CCN résidant au MPO. Pour ce faire, les transgènes *Wnt1-Cre* et *Rosa26^{flox-STOP-YFP}* pourraient être combinés à la lignée $Arb2a^{Tp/Tp}$ afin de marquer les CCN, qui seraient par la suite visualisées par des coupes histologiques et des marquages immunofluorescents des cupules optiques. Actuellement, ces outils sont dans un fond génétique mixte. Sachant que le fond génétique influence le développement des anomalies chez les modèles CHARGE, il faudrait s'assurer que le fond mixte des lignées *Wnt1-Cre* et *Rosa26^{flox-STOP-YFP}* présente effectivement des défauts de fermeture de la fissure choroïdienne avant de réaliser les analyses, ou alors il faudrait transférer les lignées dans le fond génétique B6. Notons également que si des marquages immunofluorescents contre SOX10 sont généralement une alternative pour identifier les CCN, des validations doivent être effectuées pour la cupule optique, ce marqueur étant régulé à la baisse suite à l'établissement des CCN au MPO, alors qu'elles y amorcent leur différenciation afin de contribuer à diverses structures oculaires (Jasrapuria-Agrawal et Lwigale, 2014).

Les CCN contribuent également à la formation de nidogène, lequel réticule avec le collagène et les laminines pour former la membrane basale de l'EPR (Bryan *et al.*, 2020; Jasrapuria-Agrawal et Lwigale, 2014; Williams et Bohnsack, 2020). Cela soulève le questionnement de savoir si une potentielle perte de CCN au MPO chez $B6Arb2a^{Tp/Tp}$ pourrait engendrer une diminution de la production de nidogène, entraînant une faiblesse de la membrane basale, fragilisant l'intégrité tissulaire et expliquant alors un autre phénotype observé chez $B6Arb2a^{Tp/Tp}$, soit la désolidarisation des cellules du RPE (non présenté). D'ailleurs, dans le transcriptome des CCN d'embryons au stade E10.5, les niveaux de *Nid2* sont réduits de moitié chez les embryons $FVBArb2a^{Tp/Tp}$ par rapport aux contrôles (FC = 0,56, adj p-value = 0,011) (Bélanger *et al.*, 2018).

Fait intéressant, dans le syndrome d'Alport, induit par des mutations dans les gènes *COL4A5*, *COL4A3* et *COL4A4*, lesquelles provoquent l'absence de collagène IV, de l'opacification cornéenne, un amincissement de la rétine et l'apparition de taches blanc-jaune sur celle-ci sont observés (Savigne *et al.*, 2015). Dans le syndrome de Pierson, causé par une mutation du gène codant pour la laminine $\beta 2$, *LAMB2*, les anomalies oculaires recensées incluent la cataracte, la dégénérescence rétinienne, un amincissement de la choroïde, la persistance de la vascularisation hyaloïde, le détachement rétinien et le glaucome. Des cas plus rares de microphthalmie, ptose, hypoplasie du nerf optique et d'hypopigmentation de la rétine ont également été recensés (Arima *et al.*, 2018; Gooley *et al.*, 2023). Plusieurs de ces phénotypes rappellent

ceux observés chez $B6Arb2a^{Tp/Tp}$, renforçant l'idée que des anomalies de la membrane basale pourraient être impliquées.

En somme, la perturbation des CCN résidentes du MPO est une piste pertinente pour expliquer l'origine du colobome ainsi que d'autres anomalies oculaires observées chez le modèle $B6Arb2a^{Tp}$ et qui mérite donc d'être approfondie. Rappelons toutefois que les CCN ne sont pas les seules à participer à la fermeture de la fissure choroïdienne, les cellules endothéliales du MPO et la vascularisation hyaloïde sont également impliquées dans le processus (Casey, Lusk et Kwan, 2023; James *et al.*, 2016; Williams et Bohnsack, 2015).

4.2.2.3 AGO2 est-il impliqué dans le développement du spectre MAC chez le modèle $Arb2a^{Tp}$?

Récemment, l'implication d'ARB2A dans l'import nucléaire d'AGO2 a été mise en évidence (Sallis *et al.*, 2023). Afin d'étudier le rôle d'AGO2 dans la pathogenèse du syndrome CHARGE, des mutants simples et doubles transgéniques ont été générés. Cette étude montre que l'ajout d'un allèle $Arb2a^{Tp}$, généralement asymptomatique à l'état hétérozygote dans le fond génétique mixte employé, aux mutants $Ago2^{cKO/+}$ et $Ago2^{cKO/cKO}$ augmente la pénétrance du colobome et de la microphthalmie chez ces derniers (Figure 3.10). Ces résultats suggèrent donc une interaction entre les allèles $Arb2a^{Tp}$ et $Ago2^{cKO}$, ce qui laisse croire à une action conjointe au cours du développement oculaire.

4.2.2.4 Importance relative de la dérégulation de l'expression et de l'épissage dans le développement des anomalies oculaires chez le modèle $Arb2a^{Tp}$

De précédentes études du laboratoire ont mis en évidence une fonction d'ARB2A dans la régulation de la transcription, avec un accent sur son rôle dans l'épissage alternatif co-transcriptionnel (Bélanger *et al.*, 2022). Des dérégulations de l'expression et de l'épissage ont donc été investiguées pour expliquer le développement d'anomalies oculaires chez le modèle $Arb2a^{Tp}$ via deux analyses transcriptomiques.

L'analyse du transcriptome des CCN d'embryons $FVBArb2a^{Tp/Tp}$ à E10.5 a révélé des dérégulations importantes de l'expression de plusieurs gènes appartenant à des voies critiques pour le développement oculaire (Tableau 3.1, Figure S 3B). À l'inverse, pour l'épissage alternatif, seule une faible dérégulation de l'épissage d'un nombre très restreint de gènes a pu être identifiée (Tableau 3.1, Figure S 3B).

Pour l'analyse transcriptomique des cupules optiques d'embryons $B6Arb2a^{Tp/Tp}$ à E11.5, un nombre modéré de gènes sont différentiellement exprimés entre les embryons $B6Arb2a^{Tp/Tp}$ et contrôles ou entre les

cupules droites et gauches des embryons *B6Arb2a^{Tp/Tp}*, parmi lesquels des acteurs majeurs du développement oculaire (Figure 3.12, Figure S 3F). En contrepartie, plusieurs centaines de gènes sont différentiellement épissés pour chacune des comparaisons effectuées, *B6Arb2a^{Tp/Tp}* vs contrôle, cupules droites vs gauche chez *B6Arb2a^{Tp/Tp}* et même cupules droites vs gauche chez les contrôles (Figure 3.12A, B, C, Figure S 3C, D, E, G). Cette grande quantité similaire de gènes différentiellement épissés pour toutes les comparaisons effectuées, même entre les cupules droites et gauches d'embryons contrôles, qui ne sont pourtant pas marquées par une différence phénotypique, le faible nombre de gènes associés au développement oculaire retrouvés parmi ces gènes différentiellement épissés et l'obtention d'un nombre restreint de catégories de moindre pertinence en analyse d'ontologie génétique (Tableau S 9, Tableau S 13, Tableau S 14) laissent croire que la dérégulation de la transcription jouerait un rôle plus important dans la genèse des anomalies oculaires que la dérégulation de l'épissage.

4.2.2.5 Pistes mécanistiques soulevées par le transcriptome des CCN d'embryons *FVBArb2a^{Tp/Tp}* au stade E10.5

Les analyses de séquençage de l'ARN réalisées sur les CCN d'embryons *FVBArb2a^{Tp/Tp}* et contrôles à E10.5 ont révélé la dérégulation de l'expression de nombreuses voies pertinentes pour expliquer l'apparition d'anomalies oculaires. De nombreuses voies de signalisation et facteurs de transcription convergent afin de permettre l'expression de *Mitf*, puis de *Tyr*, parmi lesquels on retrouve de nombreux gènes dérégulés dans les CCN d'embryons *FVBArb2a^{Tp/Tp}* (Tableau 3.1, Figure S 8). La dérégulation de *Mitf* pourrait expliquer les anomalies de pigmentation observées chez les lignées *Arb2a^{Tp}* (de même que la dérégulation de *Tyr*), mais également le colobome, la microphthalmie et possiblement la déplétion des CGR, une atteinte de *Mitf* pouvant engendrer de la dégénérescence rétinienne (Coutant *et al.*, 2024; Garcia-Llorca et Eysteinson, 2024; Longakit, Bourget et Van Raamsdonk, 2025; Oppezio et Rosselli, 2021).

Plusieurs gènes appartenant à la voie Notch ou connus pour leur rôle dans le développement hyaloïde ont également été identifiés parmi les gènes dérégulés dans les CCN d'embryons *FVBArb2a^{Tp/Tp}* (Tableau 3.1). Or, des anomalies du réseau vasculaire hyaloïde peuvent contribuer à l'apparition du colobome oculaire lors du développement précoce de l'œil, puis contribuer aux défauts de croissance du globe oculaire au stade postnatal (James *et al.*, 2016; Khaliq *et al.*, 2001; Williams et Bohnsack, 2015). En effet, le réseau vasculaire hyaloïde a été associé à la fermeture de la fissure hyaloïde. Il est proposé que cette vascularisation et/ou les cellules endothéliales dérivées du MPO la composant participent à la dégradation de la membrane basale lors de la fermeture de la fissure choroïdienne (Williams et Bohnsack, 2015). De

plus, aux stades postnataux, des défauts de régression du réseau vasculaire hyaloïde sont associés à une perturbation de la croissance de la rétine et du cristallin pouvant mener au développement de microphthalmie (Williams et Bohnsack, 2015).

Plusieurs composantes de la voie Hippo (*Fat1*, *Yap1* et *Fgfr2*) figurent aussi parmi les gènes dérégulés dans ce transcriptome (Tableau 3.1). Cette voie de signalisation est associée à la régulation de la taille des organes, ce qui en ferait une piste intéressante pour expliquer la microphthalmie (Lee *et al.*, 2018). Par contre, dans le contexte précis du développement oculaire, la voie Hippo est plutôt connue pour réguler la prolifération des cellules progénitrices rétiniennes, la rétino-genèse, l'apoptose, la spécification régionale de l'EPR, la différenciation des photorécepteurs, le développement vasculaire rétinien, la polarité cellulaire, l'intégrité jonctionnelle ainsi que l'organisation cellulaire et laminaire. Des mutations de *YAP* humain et *Yap* murin ont conséquemment été associées au colobome et à de la dégénérescence rétinienne, incluant l'agénésie des cellules de l'EPR chez la souris (Du, 2024; Lee *et al.*, 2018). Des mutations de *YAP1* sont aussi suspectées de causer de la microphthalmie chez l'humain (Williamson et FitzPatrick, 2014). Finalement, il a été démontré dans des contextes autres que le développement oculaire que la voie Hippo peut réprimer la transcription de *Sox2*, lequel peut lui-même également antagoniser la voie Hippo par la répression de certains activateurs de la voie, suggérant des interactions dépendantes du contexte entre *Sox2* et la voie Hippo (Basu-Roy *et al.*, 2015; Frum, Watts et Ralston, 2019). Or, *SOX2* est l'un des gènes les plus fréquemment impliqués dans le développement du spectre MAC chez l'humain (Williamson et FitzPatrick, 2014). Dans l'ensemble, la voie Hippo, en coordination ou non avec *Sox2*, représenterait également une piste envisageable pour expliquer le spectre MAC chez les mutants *B6Arb2a^{TP}*.

Finalement, de nombreux gènes de la voie de l'acide rétinoïque sont régulés à la baisse dans les CCN des embryons *FVBArb2a^{TP/TP}* (Tableau 3.1). La voie de l'acide rétinoïque est impliquée dans de nombreux aspects du développement de l'œil, tels l'établissement de l'axe dorso-ventral, la morphogenèse de la cupule optique, la fermeture de la fissure choroïdienne et la morphogenèse du segment antérieur (Casey, Lusk et Kwan, 2023; James *et al.*, 2016; Thompson *et al.*, 2019). Des mutations des gènes appartenant à cette voie peuvent ainsi causer le spectre MAC (Thompson *et al.*, 2019; Williamson et FitzPatrick, 2014). *Strat6* et *Rorb*, qui font partie des gènes dérégulés à la baisse dans le transcriptome des CCN *FVBArb2a^{TP/TP}* (Tableau 3.1) sont d'ailleurs connus pour leur association avec le spectre MAC (Williamson et FitzPatrick, 2014). Des dérégulations de la voie de l'acide rétinoïque semblent donc une explication plausible aux anomalies MAC

observées chez les souris $B6Arb2a^{Tp/+}$ et $B6Arb2a^{Tp/Tp}$. Par conséquent, des injections d'acide rétinoïque ont été réalisées afin d'étudier cette hypothèse ainsi qu'un potentiel effet thérapeutique.

4.2.2.6 Pistes mécanistiques soulevées par les injections intrapéritonéales d'AR et d'éthanol

Deux substances, l'acide rétinoïque et l'éthanol, ont été administrées à des femelles gestantes (G7.5) afin d'observer l'effet sur le développement oculaire chez la lignée $B6Arb2a^{Tp}$. Ces deux substances ont engendré une augmentation, dépendante de la dose, de la pénétrance et/ou de la sévérité des anomalies oculaires observées chez les embryons au stade E13.5 (Figure 3.11).

Pour l'AR, le choix de cette substance a été motivé, notamment, par l'identification d'une diminution de l'expression de plusieurs gènes de la voie de l'acide rétinoïque dans les CCN de $FVBArb2a^{Tp/Tp}$. L'hypothèse était donc que l'administration d'acide rétinoïque à des femelles gestantes pourrait potentiellement corriger cette dérégulation et ainsi diminuer la pénétrance et/ou la sévérité du MAC chez les embryons $Arb2a^{Tp}$. Toutefois, les résultats ont plutôt montré une aggravation des phénotypes oculaires suivant l'administration d'acide rétinoïque (Figure 3.11A). Pour l'acide rétinoïque, il est toutefois connu qu'un excès, à l'image d'une insuffisance, peut être néfaste, notamment pour la morphogenèse oculaire (Rothman *et al.*, 1995; Yao *et al.*, 2018). Suivant les premières analyses sur un transcriptome des CCN, un second transcriptome a été réalisé, ciblant précisément les cupules optiques. Ce dernier a révélé l'expression à la baisse de plusieurs cibles de la voie de l'acide rétinoïque chez les embryons $B6Arb2a^{Tp/Tp}$ (Tableau S 10), mais à l'inverse une augmentation de l'expression de plusieurs gènes de la voie de l'acide rétinoïque dans la cupule optique droite de ces derniers (Tableau S 11), soit dans l'œil majoritairement affecté. Il semble donc que si la voie de l'acide rétinoïque est globalement réprimée dans les CCN d'embryons $Arb2a^{Tp}$, il pourrait à l'inverse y avoir une surexpression dans la cupule optique droite, laquelle pourrait contribuer aux malformations oculaires. Dans cette optique, il est cohérent qu'un ajout d'acide rétinoïque n'ait donc pas permis de corriger les malformations oculaires. D'ailleurs, chez le modèle $Chd7^{Gt/+}$, c'est le citral, un inhibiteur de la synthèse de l'acide rétinoïque, qui a montré un potentiel thérapeutique, prévenant l'apparition de défauts aux canaux semi-circulaires chez le tiers des animaux $Chd7^{Gt/+}$ après une exposition *in utero* (Micucci *et al.*, 2014). Tester le potentiel thérapeutique du citral sur le développement d'anomalies oculaires chez des modèles CHARGE serait donc une avenue potentielle pour de futures études.

Pour l'éthanol, bien que l'ensemble des génotypes, incluant les contrôles, aient montré une augmentation des phénotypes oculaires, l'effet des injections d'éthanol était beaucoup plus marqué chez les embryons mutants, en particulier chez *B6Arb2a^{Tp/+}* (Figure 3.11B). L'effet de l'éthanol était également beaucoup plus important sur les embryons *Arb2a^{Tp}* que sur les embryons *Chd7^{Gt/+}* (Figure 3.4). Cette potentialisation de l'effet de l'éthanol sur les mutants *Arb2a^{Tp}* suggère que les mécanismes d'action de l'éthanol et de la mutation *Arb2a^{Tp}* se chevauchent potentiellement (Figure 3.4). Les mécanismes moléculaires par lesquels l'éthanol engendre des anomalies ne sont toutefois pas entièrement compris. Néanmoins, il est connu que les CCN sont particulièrement sensibles à l'éthanol, qui perturbe plusieurs aspects de leur développement, telles leur induction, prolifération, migration, différenciation et survie (Chen et Kannan, 2023). Par conséquent, cela rend d'autant plus plausible l'idée que les anomalies oculaires observées chez *Arb2a^{Tp}* pourraient, au moins en partie, être causées par des défauts aux CCN.

4.2.2.7 Pistes mécanistiques soulevées par le transcriptome des cupules optiques d'embryons *B6Arb2a^{Tp/Tp}* au stade E11.5

Suivant une première analyse sur le transcriptome des CCN d'embryons *FVBArb2a^{Tp/Tp}*, un second transcriptome a été réalisé, plus ciblé, mais surtout permettant de questionner l'intrigant biais droit observé chez les mutants *B6Arb2a^{Tp}*. Dans le transcriptome des cupules optiques d'embryons *B6Arb2a^{Tp/Tp}* à E11.5, certains gènes appartenant aux voies de signalisation précédemment identifiées dans le transcriptome des CCN d'embryons *FVBArb2a^{Tp/Tp}* sont différenciellement exprimés entre les cupules optiques d'embryons *B6Arb2a^{Tp/Tp}* et contrôles ainsi qu'entre les cupules optiques droites et gauches des embryons *B6Arb2a^{Tp/Tp}* (Tableau S 10, Tableau S 11). Plusieurs gènes de la voie Wnt/B-caténine sont ainsi dérégulés dans les cupules optiques d'embryons *B6Arb2a^{Tp/Tp}* (Tableau S 10).

De plus, les gènes dérégulés dans les cupules optiques *B6Arb2a^{Tp/Tp}* par rapport aux contrôles incluent plusieurs gènes phares du développement des cellules de la crête neurale (*Dll1*, *Dlx3*, *ErbB3*, *Foxd3*, *Mitf*, *Ntn1*, *Sema5b*, *Sox10*, *Tfap2a*, etc.). Parmi ceux-ci se retrouvent des gènes associés à l'induction, la spécification, la transition épithélio-mésenchymateuse, la migration, le maintien, la survie et la différenciation des CCN, soit à l'ensemble des étapes du développement des CCN (Bélanger *et al.*, 2018; Jiang, Liu et Gershon, 2003; Pauli, Bajpai et Borchers, 2017; Pilon, 2021; York et McCauley, 2020). À l'opposé, la comparaison des gènes différenciellement exprimés entre les cupules droites et gauches des embryons *B6Arb2a^{Tp/Tp}* présente moins de gènes associés au développement des CCN, mais plusieurs gènes majeurs du développement oculaire connus pour causer le spectre MAC (*Aldh1a3*, *Mab21l2*, *Mitf*, *Otx2*,

Pax6, *Rax*, *Vsx2*, etc.) (Figure 3.12F) (Williamson et FitzPatrick, 2014). Par conséquent, une hypothèse pourrait être que la première comparaison témoigne d'une atteinte aux CCN chez les souris *B6Arb2a^{Tp/Tp}*, tel que prescrit pour une neurocristopathie et observé précédemment (Bélangier *et al.*, 2018). Ces anomalies aux CCN pourraient avoir pour origine un déséquilibre de diverses voies de signalisation dont la voie Wnt/B-caténine (Tableau 3.1, Tableau S 10), par exemple. Les anomalies aux CCN, lesquelles migrent puis siègent notamment au MPO, incluant spécifiquement des vagues de CCN SOX10-positives et FOXD3-positives (Williams et Bohnsack, 2020), pourraient en conséquence induire à leur tour la dérégulation de gènes du développement oculaire au sein des cupules optiques (Figure 3.12F), menant à des anomalies développementales chez *B6Arb2a^{Tp/Tp}*. D'ailleurs, soutenant cette hypothèse, *Foxd3*, *Tfap2a* et *Sox10*, dérégulés entre les souris *B6Arb2a^{Tp/Tp}* et contrôles et associés aux CCN, sont classiquement exprimés en périphérie de la vésicule optique, tandis qu'*Otx2*, *Pax6* et *Vsx2*, dérégulés entre les cupules droites et gauches, sont plutôt exprimés au sein de la vésicule optique (Williams et Bohnsack, 2020).

À l'opposé, une hypothèse plus simpliste, étant donné la liaison d'ARB2A au promoteur de plusieurs gènes dérégulés entre les cupules optiques droites et gauches (Figure 3.12F) serait qu'ARB2A contribue à la régulation de la transcription de ces gènes, avec une contribution possible d'AGO2, par exemple par une régulation transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle. Ces gènes seraient alors dérégulés lorsque les niveaux d'ARB2A et/ou AGO2 sont diminués, menant au développement du spectre MAC.

4.2.3 Investigations des mécanismes responsables du biais droit chez le modèle *B6Arb2a^{Tp}*

Dans le transcriptome des cupules optiques d'embryons *B6Arb2a^{Tp/Tp}*, la comparaison des gènes différentiellement exprimés a révélé que dans les cupules gauches d'embryons *B6Arb2a^{Tp/Tp}*, généralement saines, plusieurs gènes du développement oculaire sont régulés à la baisse, tandis que dans les cupules droites, sujettes aux anomalies oculaires, ces gènes sont régulés à la hausse (Figure 3.12F). Les pistes mécanistiques proposées dans les sections antérieures permettraient d'expliquer l'apparition des anomalies MAC chez *B6Arb2a^{Tp/Tp}*, mais pas cette asymétrie transcriptionnelle et phénotypique.

La littérature scientifique ne répertorie que de très rares cas d'asymétrie gauche-droite oculaire. Chez le planaire, *Dugesia japonica*, suivant l'inhibition des pompes H⁺/K⁺ ATPases et le retrait de la tête du vers lors d'expériences de régénération, 20 % des sujets présentent un défaut de régénération oculaire unilatéral, l'œil droit étant affecté 1.5 fois plus souvent que l'œil gauche (Nogi *et al.*, 2005). Chez *Xenopus laevis*, l'hyperpolarisation du potentiel membranaire qui marque l'induction du champ optique se produit

principalement dans l'œil droit en premier (Pai *et al.*, 2012a; Pai *et al.*, 2012b). Lorsque la détermination de l'axe gauche-droite est perturbée, cette hyperpolarisation prioritaire dans l'œil droit est perdue, suggérant que cette asymétrie est liée à la latéralité primaire et à l'asymétrie viscérale (Pai *et al.*, 2012b). De plus, l'induction d'une dépolarisation pourtant bilatérale par l'ivermectine engendre des malformations oculaires (développement oculaire incomplet, microphthalmie, anophthalmie et une fusion de l'œil avec le cerveau) principalement dans l'œil droit (Pai *et al.*, 2012b). Afin d'étudier si un effet similaire du potentiel membranaire pourrait donc être impliqué dans le biais droit rapporté chez *B6Arb2a^{TP}*, une coloration au CC2-DMPE, sensible au voltage, ou des mesures électrophysiologiques pourraient être envisagées (Pai *et al.*, 2012a). De plus, comme chez *Xenopus laevis* l'hyperpolarisation du champ optique se produit d'abord à droite (Pai *et al.*, 2012a), cela apporte la notion de différence temporelle entre les champs optiques droits et gauches. Par conséquent, une autre possibilité serait qu'un décalage temporel entre les programmes de développement des deux champs optiques soit accentué chez *B6Arb2a^{TP}*. Une telle hypothèse pourrait rendre compte à la fois des différences d'expression génique entre les cupules droites et gauches (Figure 3.12F) et de la prédominance des anomalies du côté droit (Figure 3.7).

Au cours de cette même étude sur le potentiel membranaire, les auteurs ont avancé que les dérivés de la crête neurale marqueraient de façon constante une asymétrie gauche-droite (Pai *et al.*, 2012b). Si la somme des éléments avancés pour appuyer cette idée semble mince, elle n'en demeure pas moins intrigante. En effet, la possibilité que le développement du spectre MAC chez *B6Arb2a^{TP}* soit causé par une perte de CCN au MPO a précédemment été soulevée (section 4.2.2.2.). Cette hypothèse serait donc d'autant plus plausible si les CCN sont effectivement de façon basale moins nombreuses du côté droit de l'embryon et donc en périphérie de l'œil droit, lequel est plus fortement affecté. Des analyses préliminaires réalisées par cytométrie en flux à l'aide de modèles transgéniques *G4-RFP* ne semblent *a priori* pas identifier de débalancement des CCN entre les cupules droites et gauches d'embryons contrôles à E11.5 (non montrée). Toutefois, au vu de l'importante variabilité inter-échantillon relevée, il est possible que cette technique ne permette pas l'identification d'un débalancement fin chez des contrôles.

4.2.3.1 Le biais droit observé chez *B6Arb2a^{TP}* est-il associé à l'asymétrie viscérale?

L'observation d'un biais du spectre MAC pour l'œil droit chez *B6Arb2a^{TP}* soulève le questionnement de savoir si une asymétrie gauche-droite de l'œil pourrait être soutenue par les mêmes mécanismes que ceux qui définissent l'asymétrie gauche-droite viscérale. Il serait alors intéressant de croiser le modèle *B6Arb2a^{TP}* avec un modèle de *situs inversus* afin d'observer si les anomalies oculaires subissent la même inversion

que les organes viscéraux chez ce *situs inversus*. Chez l'humain, plusieurs études suggèrent une association entre le *situs* et l'asymétrie de la torque cérébrale (Vingerhoets, Gerrits et Verhelst, 2021). Chez le poisson-zèbre, l'asymétrie du diencephale est inversée chez les animaux porteurs d'un *situs inversus*, de même que certains comportements de latéralité visuelle (Long, Ahmad et Rebagliati, 2003). Cette asymétrie directionnelle neuroanatomique a été associée à la signalisation nodale, l'absence d'expression ou l'expression symétrique de gènes nodaux randomisant la latéralité neuroanatomique chez les embryons (Long, Ahmad et Rebagliati, 2003). Le cerveau et les yeux ayant pour origine commune le diencephale, il serait cohérent de proposer que, de façon analogue, l'asymétrie directionnelle identifiée pour les yeux chez *B6Arb2a^{Tp}* pourrait être liée à l'asymétrie viscérale et à la signalisation nodale.

4.3 Étude du mécanisme de compensation entourant la délétion d'ARB2A

Tel que démontré dans les précédents chapitres, les mutants hypomorphes *Arb2a^{Tp/Tp}* présentent de nombreuses caractéristiques associées au syndrome CHARGE. Afin d'étudier l'effet d'une mutation nulle d'*Arb2a*, les souris *Arb2a^{GFP/GFP}* ont été générées. De façon étonnante, ces mutants nuls d'*Arb2a* s'avèrent presque asymptomatiques, ne présentant que de rares anomalies de moindre sévérité que ce qui avait précédemment été observé chez les mutants hypomorphes *Arb2a^{Tp/Tp}* (Figure 3.13). Un effet similaire a été observé chez *C. elegans*, certains mutants ponctuels pour l'orthologue d'*Arb2a* montrent des phénotypes assimilables au syndrome CHARGE (diminution de la fertilité, augmentation de la mortalité, problèmes locomoteurs), contrairement aux mutants nuls qui semblaient sains (Tableau S 12). Ce même schéma chez ces deux espèces nous a menés à l'hypothèse qu'un mécanisme de compensation pourrait être à l'œuvre chez les mutants nuls, prévenant l'apparition de multiples anomalies qui mettraient sinon en péril leur survie.

4.3.1 Le mécanisme de compensation ne permet pas de corriger la délocalisation d'AGO2

Dans un premier temps, il a été proposé que le mécanisme compensatoire pourrait engendrer l'expression d'une protéine similaire à ARB2A (« ARB2A-like ») et capable d'en reprendre les fonctions. ARB2A ayant été associé à l'import nucléaire d'AGO2, il a été posé qu'une protéine « ARB2A-like » permettrait de conserver l'import nucléaire d'AGO2 chez *Arb2a^{GFP/GFP}*. Toutefois, une délocalisation cytoplasmique d'AGO2 a été observée chez les MEFs d'embryons *Arb2a^{GFP/GFP}* (Figure 3.13I), de façon similaire à ce qui avait été identifié précédemment chez *Arb2a^{Tp/Tp}* (Sallis *et al.*, 2023). Conséquemment, l'hypothèse de la surexpression d'une protéine « ARB2A-like » comme mécanisme compensatoire chez *Arb2a^{GFP/GFP}* semble

moins plausible. Il n'est toutefois pas impossible que cette fonction d'import nucléaire d'AGO2 ne soit pas compensée par telle une protéine, mais que d'autres fonctions le soient.

4.3.2 La réponse ISR pourrait être impliquée dans la compensation observée chez *Arb2a*^{GFP/GFP}

Afin d'identifier l'origine du mécanisme de compensation chez *Arb2a*^{GFP/GFP}, un séquençage de l'ARN a été réalisé sur des MEFs contrôles, *FVBArb2a*^{Tp/Tp} et *FVBArb2a*^{GFP/GFP} (Figure 3.14A). L'analyse d'ontologie génétique sur les gènes différentiellement régulés entre *Arb2a*^{Tp/Tp} et *Arb2a*^{GFP/GFP} montre la surexpression de gènes rappelant la signature de la réponse ISR, une voie de réponse permettant à la cellule de s'adapter et de survivre à divers stress cellulaires (Figure 3.14C) (Pakos-Zebrucka *et al.*, 2016). Cette réponse a pour composante clé ATF4, un facteur de transcription responsable de l'activation de nombreux gènes adaptatifs (Pakos-Zebrucka *et al.*, 2016). Or, les analyses ont identifié ARB2A au promoteur d'*Atf4*, lequel est régulé à la hausse chez *FVBArb2a*^{Tp/Tp} (Figure 3.14D). Il a donc été proposé qu'ARB2A pourrait agir comme inhibiteur de la transcription d'*Atf4*. En conséquence, le mécanisme de compensation à l'œuvre chez *Arb2a*^{GFP/GFP} pourrait consister en la levée de l'inhibition d'ARB2A sur *Atf4*, menant donc à la surexpression d'ATF4 et à l'expression de nombreux gènes adaptatifs permettant aux cellules de surmonter les stress induits par la perte d'ARB2A.

En opposition avec cette hypothèse, les analyses d'immunobuvardage ont plutôt montré une légère diminution d'ATF4 dans les embryons entiers au stade E10.5 (Figure 3.14E). Toutefois, lorsque les CCN ont été spécifiquement analysées par qPCR, les résultats indiquent que la transcription d'*Atf4* pourrait être régulée à la hausse chez les mutants (Figure 3.14F). Des répliques supplémentaires doivent toutefois être réalisés afin d'identifier si cette hausse est bien inversement proportionnelle aux niveaux d'ARB2A et plus élevée chez *FVBArb2a*^{GFP/GFP} que chez *FVBArb2a*^{Tp/Tp}, expliquant alors l'activation de la compensation chez *FVBArb2a*^{GFP/GFP} et non chez *FVBArb2a*^{Tp/Tp}. Éventuellement, si les répliques supplémentaires soutiennent l'hypothèse posée, il pourrait être envisagé de la valider en inhibant la réponse ISR chez *FVBArb2a*^{GFP/GFP} grâce à des inhibiteurs chimiques ou par *knockdown* ou *knockout* d'*Atf4*, par exemple. La perte de la compensation chez *FVBArb2a*^{GFP/GFP} confirmerait alors l'implication de la voie ISR. À l'inverse, stimuler la réponse ISR ou surexprimer *Atf4* chez *FVBArb2a*^{Tp/Tp} pourrait également s'avérer intéressant. En somme, si l'implication de la réponse ISR dans le mécanisme de compensation chez *FVBArb2a*^{GFP/GFP} n'a pas pu être confirmée, cette hypothèse demeure d'actualité.

4.3.3 La réponse UPR pourrait être impliquée dans la compensation observée chez *Arb2a^{GFP/GFP}*

4.3.3.1 ARB2A remplit une fonction au RE

L'isoforme longue d'ARB2A possède un peptide signal ainsi qu'un signal de rétention au RE présumés (Figure 1.6), qui pourraient permettre à ARB2A d'être dirigé au RE, puis d'y être retenu. Ces domaines ne présentent toutefois pas les séquences classiques reconnues. Cependant, des chercheurs ont pu valider que la séquence du signal de rétention au RE d'ARB2A (HEEL) permet la rétention au RE de la GFP lorsqu'elle y est fusionnée (Capitani et Sallese, 2009; Derkx et Madrid, 2001; Lewis et Pelham, 1990; Munro et Pelham, 1987). Le peptide signal d'ARB2A pourrait être validé de façon similaire, par fusion avec une GFP, par exemple. Une analyse par microscopie confocale en direct pourrait être employée afin de suivre l'adressage de la construction.

Toutefois, bien que la séquence du peptide signal d'ARB2A n'ait pas été validée, la perte systématique des étiquettes localisées en N-terminal suggère le clivage et donc la fonctionnalité de ce peptide signal (non montré). De plus, ARB2A, bien que majoritairement nucléaire, est aussi localisé au cytoplasme avec un enrichissement occasionnel au RE, ce qui indique qu'il peut effectivement être adressé et retenu au RE (Bélanger *et al.*, 2018; Sallis *et al.*, 2023). Cela implique qu'ARB2A remplit probablement certaines fonctions au RE, mais ces dernières sont encore méconnues.

4.3.3.2 La fonction d'ARB2A au RE est-elle associée à la voie UPR?

Des expériences de BioID ont identifié une interaction entre ARB2A et MANF, ainsi qu'entre ARB2A et BiP. MANF et BiP appartenant à la réponse UPR, il est donc proposé que le rôle rempli par ARB2A au RE est associé à cette réponse. La réponse UPR a pour fonction de rétablir l'homéostasie lors d'un stress du RE induit par des protéines mal repliées (Hetz, 2012). De façon similaire à la réponse ISR, l'activation de la réponse UPR pourrait potentiellement permettre à la cellule de mieux survivre à un stress induit par la perte d'ARB2A et donc être impliqué dans la réponse compensatoire.

MANF et BiP ayant tous deux été associés avec la branche IRE1 de la réponse UPR, l'expression de composantes clés de cette voie, BiP, IRE1 et XBP1 a donc été étudiée chez *FVBArb2a^{Tp/Tp}* et *FVBArb2a^{GFP/GFP}* (Figure 3.15). De façon similaire à ATF4, dans les embryons entiers, les niveaux de BiP et de pIRE1α sont diminués chez les mutants *FVBArb2a^{Tp/Tp}* et *FVBArb2a^{GFP/GFP}* par rapport aux contrôles. Pour BiP, les niveaux sont diminués environ de moitié, tandis que pour pIRE1α, la diminution est moins importante (13 et 30 %) et dépendante du génotype (Figure 3.15A, B). À l'inverse, selon les marquages immunofluorescents, BiP

est surexprimé dans les N2a transfectées avec des shARN contre *Arb2a*. En qPCR sur des CCN, la tendance observée pour *Ire1* semble consister en une légère diminution chez *FVBArb2a^{TP/TP}* avec une diminution un peu plus importante chez *FVBArb2a^{GFP/GFP}*.

BiP et MANF sont tous deux des inhibiteurs de l'activation la voie UPR. Leur liaison à IRE1 α prévient son activation (Hetz, 2012; Kovaleva *et al.*, 2023). L'observation de l'augmentation de l'expression de BiP dans les MEFs et de la diminution de l'expression d'*Ire1 α* dans les CCN d'embryons *FVBArb2a^{TP/TP}* et *FVBArb2a^{GFP/GFP}* (Figure 3.15C, D, E) pourrait donc témoigner d'une inhibition de la réponse UPR. Conséquemment, il est possible d'envisager qu'ARB2A soit un activateur de la réponse UPR. Cette fonction serait alors à l'opposé de celles de ses partenaires d'interaction BiP et MANF, ce qui semble contre-intuitif, mais pourrait aussi représenter un mécanisme permettant de réguler l'équilibre entre l'activation de la réponse UPR et l'induction de l'apoptose suivant une activation chronique ou excessive.

Afin d'étudier la dynamique des interactions entre ARB2A et ses partenaires MANF et BiP, il pourrait être pertinent de réaliser des expériences de microscopie en temps réel sur des cellules N2a transfectées avec des constructions BiFC en absence et en présence d'inhibiteurs de l'import (ex : ivermectine) et de l'export nucléaire (ex : leptomycine B), à l'image de ce qui avait précédemment été réalisé pour l'interaction ARB2A-AGO2 (Sallis *et al.*, 2023). Ces expériences pourraient être réalisées en présence et en absence de stress du RE, par exemple induit par la tunicamycine, afin d'identifier si ce stress favorise ou non l'import nucléaire des complexes.

ARB2A ayant été observé au promoteur de plusieurs gènes codant pour les protéines de la réponse UPR (BiP, MANF, XBP1 et ATF6b) (non montré), cela soutiendrait l'idée d'une régulation transcriptionnelle sur les composantes de la réponse UPR (ex : boucles d'amplification ou de rétro-inhibition). Des essais avec des gènes rapporteurs pourraient être pertinents pour identifier si les gènes de réponse au stress liés par ARB2A en sont des cibles transcriptionnelles.

Xbp1 est principalement transcrit sous forme d'un ARNm dit non épissé, *Xbp1-u*, qui peut être traduit en une protéine, XBP1-u. Lors de la détection d'une grande quantité de protéines mal repliées par BiP, puis l'activation d'IRE1 α , pIRE1 α peut catalyser l'épissage de *Xbp1-u* en *Xbp1-s*, *Xbp1* épissé, qui code pour une protéine différente, XBP1-s, agissant comme facteur de transcription pour de nombreux gènes de la réponse UPR (Hetz, 2012; Kovaleva *et al.*, 2023). Les niveaux de *Xbp1-s* témoignent donc des niveaux d'activation de la réponse UPR. Or, dans les CCN, les niveaux de *Xbp1-s* semblent constants pour

l'ensemble des génotypes (Figure 3.15F). Toutefois, pour *Xbp1-u*, si les niveaux semblent inchangés chez *FVBArb2a^{Tp/Tp}*, ils diminuent drastiquement chez *FVBArb2a^{GFP/GFP}* (Figure 3.15F). Comme cette diminution est spécifique aux mutants *FVBArb2a^{GFP/GFP}*, cela soulève la question de savoir s'il pourrait s'agir d'un des mécanismes de la réponse compensatoire. Longtemps, les chercheurs ont pensé que XBP1-u n'était qu'un précurseur de XBP1-s, sans fonction propre. Toutefois, plusieurs fonctions non liées au stress du RE lui ont depuis été découvertes telles que sa participation dans la régulation de l'autophagie, l'homéostasie vasculaire, l'homéostasie rédox et la protection contre le stress oxydatif. Il avait également été rapporté que XBP1-u, en altérant la localisation subcellulaire de XBP1-s, peut mener à la dégradation de ce dernier par le protéasome, mettant fin à la régulation transcriptomique de la réponse UPR (Luo *et al.*, 2022). Nous pourrions alors proposer que la diminution de XBP1-u aurait pour effet de promouvoir indirectement la réponse UPR. Par ailleurs, ARB2A ayant été identifié au promoteur de *Xbp1*, il est possible qu'ARB2A participe directement à la régulation de sa transcription. Il est toutefois curieux que, bien que les niveaux de *Xbp1-u* varient entre les conditions étudiées, ceux de *Xbp1-s* demeurent relativement stables. Une hypothèse pouvant expliquer cette dissociation serait l'existence d'une saturation ou d'une limitation de la capacité d'épissage médiée par IRE1α, empêchant une augmentation proportionnelle de la production de *Xbp1-s*.

La majorité des éléments discutés ci-haut pourraient se rapporter à la fonction d'ARB2A au RE, au mécanisme compensatoire enclenché par sa perte ou aux deux. Les zones floues sont encore nombreuses et nécessiteront des expériences supplémentaires, mais les éléments rassemblés jusqu'à présent soutiennent néanmoins fortement un rôle d'ARB2A en lien avec la réponse UPR.

4.3.4 Réflexions sur le mode d'activation du mécanisme de compensation chez les mutants *Arb2a^{GFP/GFP}*

Étant donné la présence d'anomalies associées au syndrome CHARGE chez les souris hypomorphes *Arb2a^{Tp/Tp}* (15 % d'ARB2A résiduel), alors que les mutants nuls *Arb2a^{GFP/GFP}* (absence d'ARB2A) ne sont que peu affectés, l'hypothèse initiale concernant l'activation du mécanisme de compensation reposait sur un effet de dosage, où des niveaux trop faibles d'ARB2A seraient à l'origine du déclenchement de la réponse compensatoire. Notons également que les souris *B6Arb2a^{Tp/+}* (58 % d'ARB2A estimé) présentent occasionnellement de la M/A, un retard de croissance et/ou de la déformation crâniofaciale. Si l'activation du mécanisme compensatoire repose sur un effet de dosage, il serait alors attendu que les sujets *B6Arb2a^{GFP/+}* (50% d'ARB2A estimé) présentent un phénotype intermédiaire entre les souris *B6Arb2a^{Tp/+}* et

B6Arb2a^{Tp/Tp}, avec l'apparition occasionnelle de certaines anomalies telles des anomalies oculaires, ce qui ne semble pas être le cas. L'hypothèse d'un effet de dosage semble donc remise en question.

Par conséquent, un autre questionnement soulevé est celui de savoir si la nature variable des transgènes *GFP* et *tyrosinase* explique la capacité à déclencher une réponse compensatoire chez *Arb2a^{GFP/GFP}*, mais pas chez *B6Arb2a^{Tp/Tp}*. Des observations et hypothèses seront émises relativement à la nature des transgènes dans la section suivante.

4.3.5 Est-ce que l'adaptation transcriptionnelle est à l'origine de la diminution des phénotypes observés chez *Arb2a^{GFP/GFP}*?

De précédentes études, menées principalement chez le poisson-zèbre, ont mis en lumière l'existence d'un mécanisme de compensation génétique induit par de l'adaptation transcriptionnelle. L'implication de ce mécanisme a pu être validée dans certaines situations où des *knockouts* d'un gène donné ne semblaient montrer aucun effet alors que les *knockdowns* du même gène présentaient des défauts majeurs (El-Brolosy et Stainier, 2017; Ma *et al.*, 2019; Rouf *et al.*, 2023). Par conséquent, la possibilité que cette adaptation transcriptionnelle soit à l'origine de la compensation chez *Arb2a^{GFP/GFP}* est questionnée.

L'adaptation transcriptionnelle d'un gène muté repose sur la transcription d'un ARNm, puis sur la détection d'un PTC et/ou la dégradation cet ARNm par la voie NMD. Cela déclenche une réponse adaptative au cours de laquelle, via WDR5 et le complexe COMPASS, l'expression d'un gène possédant une séquence homologue est régulée à la hausse afin de compenser la perte du premier (El-Brolosy *et al.*, 2019; El-Brolosy et Stainier, 2017; Ma *et al.*, 2019; Rossi *et al.*, 2015).

Afin de permettre l'adaptation transcriptionnelle, un transcrit doit par conséquent être produit (El-Brolosy *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2019; Rouf *et al.*, 2023). Les expériences de qPCR confirment l'existence d'un ARNm pour *Arb2a^{Tp}* (Bélanger *et al.*, 2018). Pour *Arb2a^{GFP/GFP}*, les résultats de qPCR n'ont pas été considérés pour la présente discussion étant donné la divergence entre ceux-ci et des résultats de RT-PCR (non montrés). D'ailleurs, une façon d'identifier si la compensation observée chez *Arb2a^{GFP/GFP}* passe par l'adaptation transcriptionnelle serait de réaliser des mutants nuls portant une délétion complète d'*Arb2a*. Si ces mutants, incapables de produire un ARNm d'*Arb2a*, maintiennent une quasi absence de phénotype, alors cela indiquerait que le mécanisme en cause n'est vraisemblablement pas l'adaptation transcriptionnelle.

Ensuite, l'implication de la voie NMD est requise pour médier l'adaptation transcriptionnelle. L'hypothèse avancée pour expliquer le fonctionnement de l'allèle *Arb2a^{Tp}* était que l'insertion du minigène de tyrosinase dans le dernier intron d'*Arb2a* cause une instabilité du transcrit menant à sa dégradation par la voie NMD. L'implication de la voie NMD n'a toutefois jamais été confirmée. De plus, ce ne sont pas les souris *Arb2a^{Tp/Tp}* qui effectuent la compensation, mais plutôt les souris *Arb2a^{GFP/GFP}*. Une autre façon de tester l'implication de l'adaptation transcriptionnelle chez ces dernières pourrait par conséquent consister en l'inhibition pharmacologique de la voie NMD, par exemple avec le NMDi14 ou du DMSO. Si, suivant l'inhibition de la voie NMD, les mutants GFP conservent leur état, alors cela soutiendrait que l'adaptation transcriptionnelle telle qu'elle a été décrite n'est probablement pas à l'œuvre (El-Brolosy *et al.*, 2019).

Finalement, l'adaptation transcriptionnelle passe par la régulation à la hausse d'un gène compensatoire partageant une similarité de séquence avec l'ARNm du gène compensé. Dans de nombreux cas, la compensation génétique est donc médiée par un gène paralogue (El-Brolosy *et al.*, 2019; El-Brolosy et Stainier, 2017; Ma *et al.*, 2019; Rossi *et al.*, 2015; Salanga et Salanga, 2021). Toutefois, *Arb2a* ne semble pas posséder de tel paralogue. Chez l'humain, la famille ARB2 contient également le pseudogène ARB2BP, toutefois les analyses BLASTN ne montrent pas de similarité de séquence entre les différents transcrits d'*ARB2A* et *ARB2BP*. D'ailleurs, l'ARNm d'*Arb2a* ne présente que peu de similarité de séquence avec d'autres gènes (Tableau S 15). La plus grande similarité est avec Gm38604 (Tableau S 15), un gène prédit pour un long ARN non codant dont la position chevauche l'intron 10 et l'exon 11 d'*Arb2a*. Les longs ARN non codants peuvent intervenir dans la régulation de l'expression génique (Angrand *et al.*, 2015) et Gm38604 est significativement régulé à la hausse dans les MEFs d'embryons *Arb2a^{GFP/GFP}* par rapport aux contrôles et aux embryons *Arb2a^{Tp/Tp}* (non montré). Cela en fait une piste potentielle comme médiateur de la compensation, d'autant plus qu'avec une localisation à proximité de l'insert transgénique chez *Arb2a^{Tp}*, cela pourrait également expliquer l'absence de compensation chez ce mutant. Toutefois, malgré une hausse d'expression chez *Arb2a^{GFP/GFP}*, les niveaux d'expression demeurent extrêmement faibles (compte moyen = 47), mettant en doute cette hypothèse. Parmi les autres gènes présentant une certaine similarité de séquence avec l'ARNm d'*Arb2a*, la séquence présentant une similarité est très courte, les gènes ne sont pas différenciellement exprimés entre les différents génotypes ou alors l'expression est légèrement diminuée chez *Arb2a^{GFP/GFP}* (Tableau S 15). Au vu de ces éléments, l'hypothèse de la compensation par l'adaptation transcriptionnelle semble donc moins plausible comme aucun gène ne semble présenter de forte similarité de séquence et donc aucune piste solide de gène compensatoire n'a pu être identifiée.

4.3.6 Implication d'un mécanisme de compensation pour le syndrome CHARGE

Si le mécanisme de compensation se produit également chez l'humain, cela pourrait être une des raisons expliquant la faible proportion de patients CHARGE porteurs d'une mutation d'*ARB2A*. Cela soulève l'intrigante question de savoir si des individus portant des mutations importantes d'*ARB2A* existent, mais n'ont pas été identifiés car asymptomatiques en raison de l'activation d'un mécanisme de compensation. D'ailleurs, il a été relevé pour plusieurs maladies humaines que les mutations faux-sens et indels sans décalage du cadre de lecture sont plus fréquentes que les mutations non-sens ou indel avec décalage du cadre de lecture. Il a donc été proposé par certains chercheurs que ces mutations non-sens ou de décalage du cadre de lecture pourraient mener à la dégradation de l'ARNm, activant une adaptation transcriptionnelle et menant à l'absence de symptômes (El-Brolosy *et al.*, 2019).

Dans le cadre précis du syndrome CHARGE, mais se rapportant cette fois aux mutants *Chd7*, la compensation génétique a d'ailleurs déjà été évoquée. En effet, chez les poissons-zèbres, certains mutants *Chd7* présentent des phénotypes de moindre sévérité que les morphants *Chd7*. Une « compensation génétique » a donc été évoquée pour expliquer ces observations, d'autant plus que certains allèles mutants – quoique pas tous – engendrent la dégradation des transcrits, pouvant alors théoriquement activer la compensation génétique. Parmi les gènes médiateurs de la compensation alors proposés se trouvent les autres membres du sous-groupe III des protéines CHD, soit CHD6, CHD8 et CHD9 ainsi que des gènes mutés dans des syndromes similaires au syndrome CHARGE, soit *SOX2* (syndromes de Feinglod, Alagille et Pallister-Hall), *ZEB2* (Mowat-Wilson) et *KMT2D* (Kabuki) et donc susceptibles de remplir des fonctions similaires (Sun *et al.*, 2022).

4.4 Limites dans la transférabilité des résultats

Les modèles murins pour le syndrome CHARGE permettent d'étudier ce syndrome. Ils ont toutefois des limites. Ainsi, tel que présenté dans le Tableau 1.3, aucun des modèles *Chd7* ne répertorie de colobome oculaire alors qu'il s'agit d'une caractéristique majeure du syndrome CHARGE. Une publication de Ogier en témoigne également que, selon leur recensement, la perte de CHD7 chez la souris n'engendre le colobome dans aucune structure de l'œil (Ogier *et al.*, 2014). Il s'agit d'ailleurs d'un élément intéressant du modèle *Arb2a^{Tp/Tp}*, qui lui en présente avec une bonne pénétrance, de même que de la microphthalmie, également associée au syndrome CHARGE. À l'inverse, le modèle *Arb2a^{Tp/Tp}* montre une perte de pigmentation alors que cela n'a jamais été identifié chez les patients CHARGE. De façon similaire, les phénotypes de *circling* et d'*head-bobbing* sont typiquement murins. De façon générale, ces différences

interspèce pourraient être induites par un processus développemental s'appuyant plus ou moins fortement sur l'expression de ces gènes et/ou un programme d'expression spatiotemporel variable (Zentner *et al.*, 2010b).

De plus, la métabolisation de l'éthanol marque certaines différences entre la souris et l'humain. Chez la première, la concentration sanguine en éthanol augmente rapidement, atteint un pic, puis diminue relativement rapidement, alors que chez l'humain l'absorption et l'élimination sont plus lentes (Livy, Parnell et West, 2003). Ces différences peuvent engendrer des variations dans l'étendue des dommages observés suite à l'administration d'éthanol (Livy, Parnell et West, 2003). La méthode d'administration employée pour l'éthanol et l'acide rétinoïque, par injection intrapéritonéale, ne permet pas non plus de mimer l'effet d'une prise alimentaire de ces composés. Toutefois, cette méthode permet un meilleur contrôle des doses administrées que l'administration par l'eau de boisson et une possible influence plus directe sur l'environnement fœtal.

Finalement, pour la compensation suspectée chez les mutants *Arb2a* chez *Mus musculus* et *C. elegans*, l'existence du même phénomène chez les patients *ARB2A* humains n'a pas encore été étudiée. Il est possible que certaines différences existent entre la régulation et les fonctions d'ARB2A chez la souris et chez l'humain, d'autant plus que ce sont les souris homozygotes qui phénotypent le syndrome CHARGE alors que les patients *ARB2A* identifiés jusqu'à présent sont hétérozygotes (Bélanger *et al.*, 2018).

CONCLUSION

Le syndrome CHARGE est une maladie génétique rare appartenant à la classe des neurocristopathies. Elle est caractérisée par une très grande variabilité phénotypique, inter- et également intra-familiale. Plusieurs équipes ont tenté d'expliquer cette variabilité par des études de corrélations génotype-phénotype, mais celles-ci ont rencontré un succès modéré. À ce jour, la variabilité phénotypique du syndrome CHARGE demeure ainsi peu comprise.

Dans un premier temps, nous avons donc tenté d'identifier des facteurs influençant la présentation phénotypique du syndrome CHARGE. Deux modèles murins pour le syndrome CHARGE, *Arb2a^{Tp/Tp}* et *Chd7^{Gt/+}* ont été caractérisés dans les fonds génétiques FVB et B6. Selon les résultats obtenus, le fond génétique semble impacter de façon non négligeable la présentation phénotypique des modèles CHARGE. Une telle hypothèse a d'ailleurs été évoquée fréquemment dans la littérature, mais la présente étude est la première à aborder en détail la question. D'un point de vue humain, il serait donc intéressant de réaliser des études métagénomiques afin de tenter d'identifier si la présence de modificateurs corrèle avec le développement de certaines anomalies.

Les dissimilarités observées entre les deux modèles suggèrent également que le gène pathogène dans le syndrome CHARGE pourrait influencer la présentation phénotypique du syndrome. La littérature scientifique portant sur les modèles murins *Chd7* et les corrélations phénotypes-génotypes identifiées chez les patients soutiennent ce point de vue. Des mutations de *CHD7* tendent à engendrer de façon préférentielle un certain lot d'anomalies correspondant aux individus CHARGE « typiques ».

Des facteurs génétiques ne permettant toutefois pas d'expliquer les divergences phénotypiques observées entre les animaux génétiquement identiques ou entre les jumeaux monozygotes, l'influence de facteurs non génétiques a par la suite été investiguée. De l'éthanol et de l'acide rétinoïque ont été administrés à des femelles porteuses d'embryons *Arb2a^{Tp}* et *Chd7^{Gt/+}*, engendrant une augmentation importante la pénétrance et la sévérité des anomalies oculaires chez les embryons CHARGE. Ces résultats révèlent donc que l'environnement du fœtus en développement est susceptible d'impacter le développement des anomalies CHARGE. Cela pourrait ouvrir la porte à des campagnes de prévention auprès des mères porteuses d'enfant CHARGE, mais cette éventualité se heurte à l'enjeu du dépistage prénatal.

Au cours du premier volet expérimental, des phénotypes oculaires sévères ont été identifiés chez les souris *B6Arb2a^{Tp/Tp}*. Dans un deuxième temps, nous nous sommes donc penchés sur le rôle d'ARB2A au cours du développement de l'œil. Lors d'une caractérisation plus approfondie, l'identification de nombreuses anomalies oculaires chez les souris *B6Arb2a^{Tp/Tp}* a mis en évidence qu'ARB2A participe à la régulation de nombreux aspects du développement oculaire. De façon cohérente, les études par immunofluorescence ont montré qu'ARB2A est exprimée de façon presque ubiquitaire tout au long du développement de l'œil. Afin d'identifier les événements de dérégulation moléculaires à l'origine de ces anomalies, une analyse transcriptomique a été réalisée sur les cupules optiques d'embryons *B6Arb2a^{Tp/Tp}* et contrôles. Les résultats obtenus sont cohérents avec une perturbation, chez *B6Arb2a^{Tp/Tp}*, des CCN, plusieurs gènes associés à leur développement étant dérégulés. Pour ce volet expérimental, il serait donc hautement pertinent de déterminer, par exemple par des marquages immunofluorescents, si une perte de CCN est visible au MPO chez *B6Arb2a^{Tp/Tp}*, afin de vérifier cette hypothèse. Cette piste serait d'autant plus pertinente si elle révélait une diminution spécifique des CCN au MPO des cupules optiques droites des embryons *B6Arb2a^{Tp/Tp}*, ce qui pourrait alors expliquer le biais pour l'œil droit observé chez ce modèle.

Une hypothèse alternative est qu'ARB2A régule directement l'expression de nombreux gènes du développement de l'œil, ce qui entraînerait alors leur dérégulation et à l'apparition d'anomalies oculaires chez la lignée *Arb2a^{Tp}*. Afin de tester cette hypothèse, des essais rapporteurs à la luciférase utilisant les promoteurs des gènes cibles potentiels, par exemple, pourraient être envisagés. Une autre possibilité serait qu'un décalage temporel entre les programmes de développement des deux champs optiques soit accentué chez *B6Arb2a^{Tp}*. Une telle hypothèse pourrait rendre compte à la fois des différences d'expression génique entre les cupules droites et gauches et de la prédominance des anomalies du côté droit. En bref, bien que les mécanismes exacts menant à l'apparition d'anomalies oculaires chez le modèle *B6Arb2a^{Tp}* n'aient pas encore été entièrement élucidés, cela ouvre la voie à l'étude d'une intrigante asymétrie.

Enfin, le mutant hypomorphe *Arb2a^{Tp/Tp}* ayant été établi comme modèle pour le syndrome CHARGE, nous étions curieux de connaître l'impact d'un mutant nul. En réponse, le mutant nul *Arb2a^{GFP/GFP}* a été généré. Alors que nous nous attendions à une aggravation des phénotypes CHARGE, les souris *Arb2a^{GFP/GFP}* sont étonnamment très peu symptomatiques. Une observation similaire ayant également été réalisée chez *C. elegans*, il a été proposé qu'un mécanisme de compensation pourrait être à l'œuvre chez les mutants nuls d'*Arb2a*. Dans un dernier temps, nous avons donc cherché à identifier ce mécanisme de compensation. Un transcriptome a été réalisé sur des MEFs, lequel a permis d'identifier chez les embryons *FVBArb2a^{GFP/GFP}*

l'expression à la hausse de gènes rappelant la réponse ISR. Comme ARB2A lie le promoteur d'*Atf4*, qui code pour un facteur de transcription médiateur de la réponse ISR, il a été proposé que la perte complète d'ARB2A pourrait lever l'inhibition exercée sur ATF4, permettant sa surexpression et l'induction des gènes adaptatifs de la réponse ISR. Afin de tester ce mécanisme, l'expression d'*Atf4* a été évaluée chez les CCN d'embryons des différents génotypes. La tendance observée appuie la théorie proposée. Toutefois, des répliques supplémentaires doivent être réalisés avant toute conclusion. Si ces répliques suivent la même tendance, il pourrait par la suite être intéressant de valider si la voie ISR médie effectivement la compensation chez *FVBArb2a^{GFP/GFP}* en l'inhibant grâce à des inhibiteurs chimiques, par exemple. Le *knockdown* ou le *knockout* d'*Atf4* est aussi envisageable. À l'inverse, l'implication de la voie ISR dans la compensation pourrait également être validée si sa stimulation chez *Arb2a^{Tr/Tr}* permet de prévenir l'apparition d'anomalies.

La présence d'un peptide signal et d'un signal de rétention au RE chez l'isoforme longue d'ARB2A ainsi que son observation par immunofluorescence au cytoplasme suggèrent qu'ARB2A est adressé au RE, où elle pourrait remplir certaines fonctions. De plus, il a été démontré qu'ARB2A interagit directement avec MANF et BiP, deux protéines de la réponse UPR, une voie de réponse au stress du RE. Conséquemment, il a été posé qu'ARB2A pourrait jouer un rôle dans la régulation de la voie UPR, avec une possible implication de cette voie dans le mécanisme de compensation chez *FVBArb2a^{GFP/GFP}*. Des analyses préliminaires de l'expression de BiP, IRE1α et XBP1 ont été effectuées, mais ces expériences doivent toutefois être répétées afin de valider si les tendances observées sont réelles. Un panel plus complet de gènes pourrait également être testé en qPCR sur les CCN embryonnaires afin d'avoir un portrait global au sein de ce type cellulaire. Il serait aussi hautement intéressant d'établir la dynamique des interactions entre ARB2A, BiP et MANF. Néanmoins, les résultats préliminaires, lesquels suggèrent la dérégulation de plusieurs composantes de la voie UPR chez les mutants *Arb2a*, soutiennent une fonction d'ARB2A en lien avec la régulation de la réponse UPR.

ANNEXE A

FIGURES SUPPLÉMENTAIRES

5'-TGCATCATCAGTGATGTTCTGAGCTTGTTATATTCTACTTGACATGTGGTAAGGACTGTAACCATCTCTGTGATAGTCCTTCA
GAAGACTATGATACTGGTAGGGCGCAGTAGTCCAGGGTTTCCTTGATGATGTCATACTTATCCTGTCCCTTTTTTCCACAGCT
CGCGGTTGAGGACAACTCTTCGCGGTCTTTCCAGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCT
GGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCT
GACCCTGAAGTTCATCTGCACCACGGCAAGCTGCCCCTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGACGTG
CTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCAT
CTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTG
AAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACAGCCACAACGTCTATATCAT
GGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAGTTCAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGAC
CACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGC
AAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCT
GTACAAGTAAAGCGGCCGCGACTCTAGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCAC
ACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAG
CAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTACG
CAAATGAAAGTATCAACAAGGAACAAGTTCCATAGTTGGCAAGTCACATAAACTGAAGGACATGAATTTGAGCATTCACTTTG
ATCTAACTGGAGAC-3'

Figure S 1 : Séquence de l'ADN donneur monocaténaire employé pour générer le modèle *Arb2a^{GFP}*.

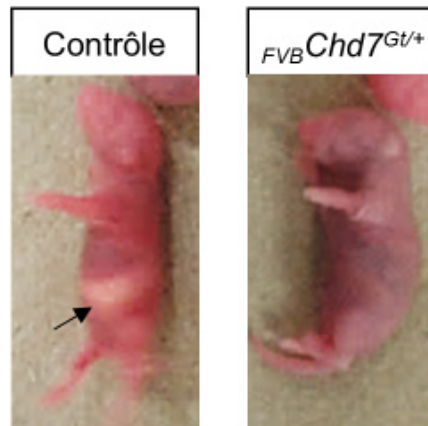


Figure S 2 : Apparence des souriceaux *FVBChd7^{Gt/+}* atteints de mortalité néonatale (P0). Les souriceaux *FVBChd7^{Gt/+}* décédés présentent une coloration mauvâtre ainsi qu'une absence de tache de lait (flèche).

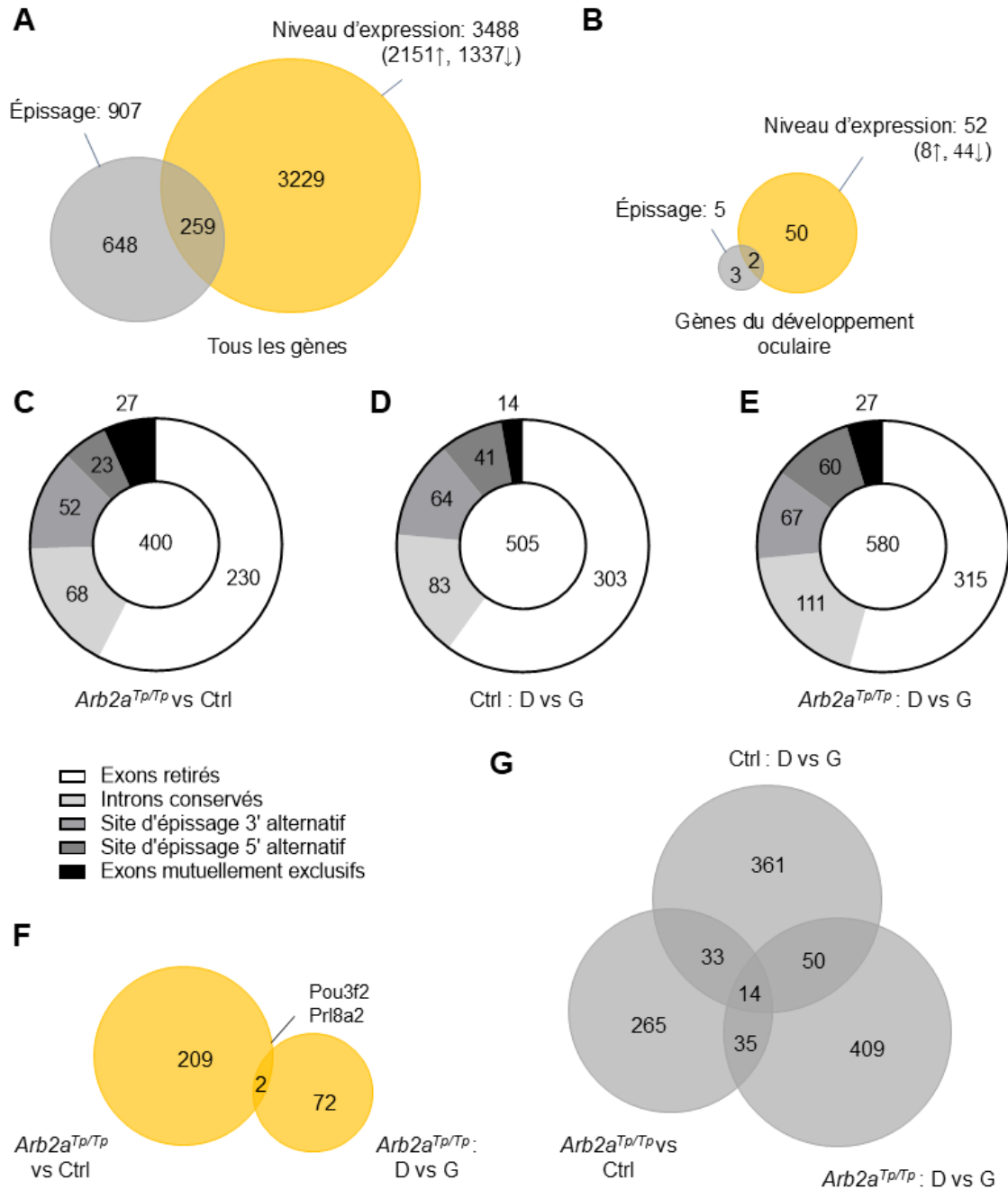


Figure S3 : Expression et épissage différentiels chez *FVBArb2a^{Tp/Tp}* et *B6Arb2a^{Tp/Tp}*.

(A) Diagramme de Venn du nombre de gènes dérégulés dans les CCN d'embryons *FVBArb2a^{Tp/Tp}* au stade E10.5. (B) Gènes connus du développement oculaire identifiés en (A). Données tirées de (Bélanger *et al.*, 2018). (C) Diagramme en anneau de la répartition des gènes différentiellement épissés ($p < 0.05$; variation du niveau d'inclusion ≥ 0.1) entre les cupules optiques d'embryons *B6Arb2a^{Tp/Tp}* et contrôles, (D) entre les cupules droites et gauches d'embryons contrôles (E) et entre les cupules droites et gauches d'embryons *B6Arb2a^{Tp/Tp}*. (F) Diagramme de Venn illustrant la superposition des événements d'expression différentiels ($p < 0.05$; $FC > |1.5|$) dans les cupules optiques d'embryons E11.5. (G) Diagramme de Venn illustrant la superposition des événements d'épissage différentiels dans les cupules optiques d'embryons E11.5 ($n = 2$). (Analyses informatiques de l'expression différentielle par S.Sallis).

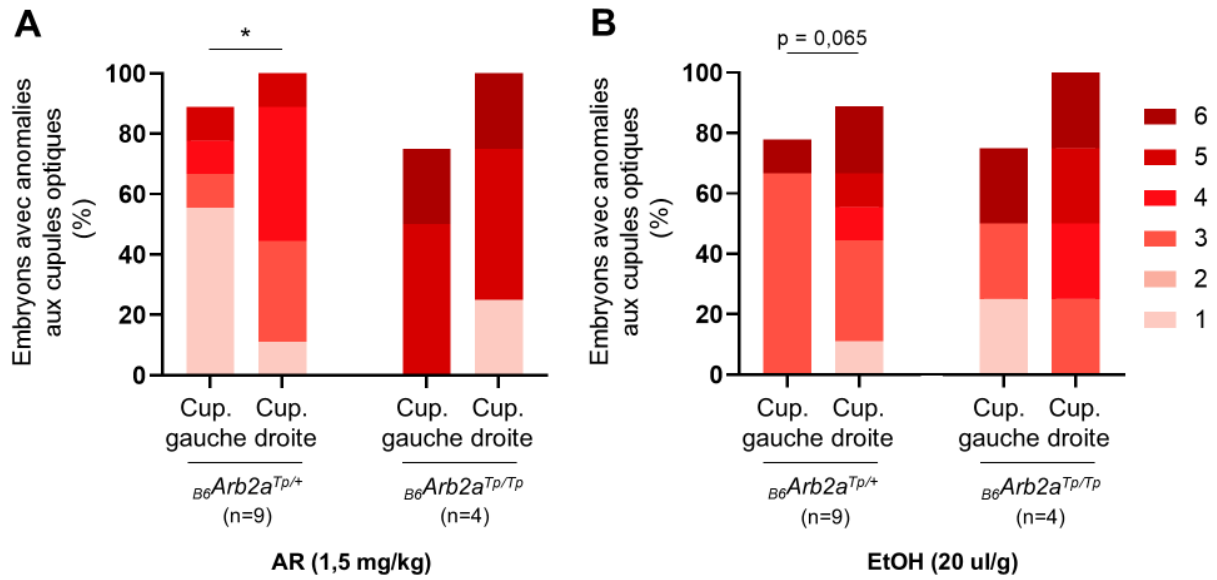


Figure S 4 : Effet de l'acide rétinoïque et de l'éthanol sur le biais droit observé chez le modèle $Arb2a^{Tp}$.

(A) Répartition gauche-droite des anomalies de développement de la cupule optique observées chez les embryons $Arb2a^{Tp/+}$ et $Arb2a^{Tp/Tp}$ à E13.5 suivant administration intrapéritonéale de 1,5 mg/kg d'AR (B) ou de 20 µl/g d'EtOH à des femelles gestantes (G7.5). 1, légère déformation; 2, déformation; 3, colobome; 4, légère microphthalmie; 5, microphthalmie; 6, anophtalmie. AR, acide rétinoïque; Cup., cupule optique; EtOH, éthanol. *p < 0,05 (test de Student).

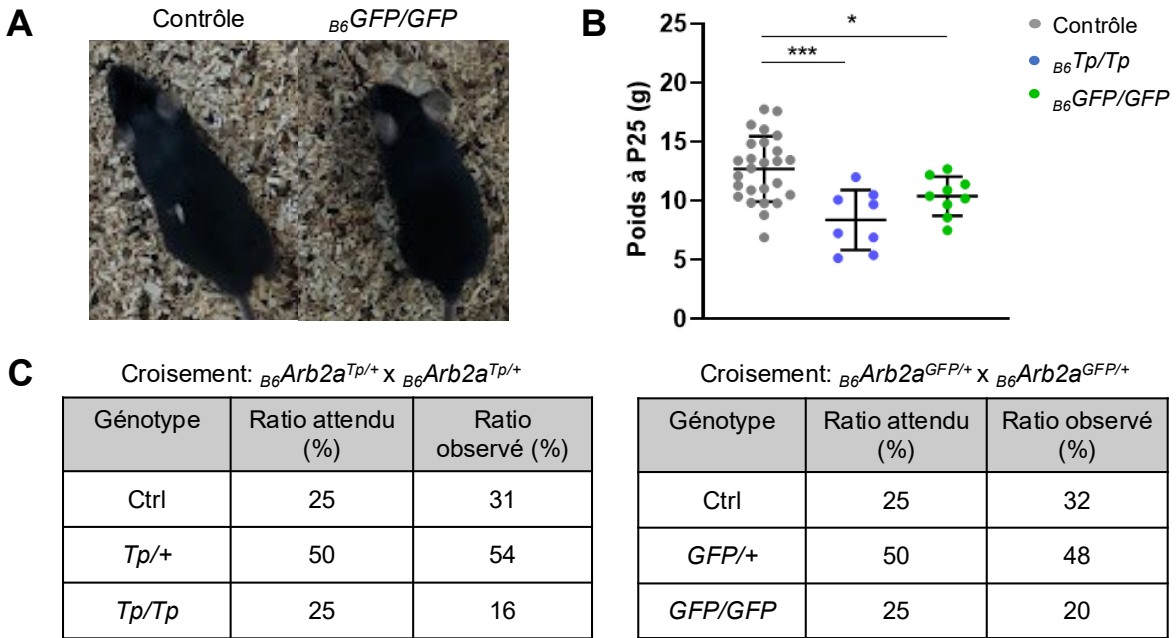


Figure S 5 : Le modèle $B6^{Arb2a^{GFP/GFP}}$ présente des phénotypes de moindre pénétrance et sévérité que le modèle $B6^{Arb2a^{Tp/Tp}}$.

(A) Les souris $B6^{Arb2a^{GFP/GFP}}$ ne montrent comme signe visible d'anomalie qu'un léger retard de croissance. (B) À P25, ce retard de croissance est toutefois moins important que celui observé chez les souris $B6^{Arb2a^{Tp/Tp}}$ ($n = 26$ ctrl, $n = 8$ $B6^{Arb2a^{Tp/Tp}}$, $n = 9$ $B6^{Arb2a^{GFP/GFP}}$). (C) La proportion de souris $B6^{Arb2a^{GFP/GFP}}$ observée au sevrage suggère de la mortalité, mais moindre que celle affectant les souris $B6^{Arb2a^{Tp/Tp}}$ ($n = 32$ ctrl, $n = 48$ $B6^{Arb2a^{GFP/+}}$, $n = 20$ $B6^{Arb2a^{GFP/GFP}}$) ($n = 83$ ctrl, $n = 144$ $B6^{Arb2a^{Tp/+}}$, $n = 42$ $B6^{Arb2a^{Tp/Tp}}$). * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ (tests de Student).

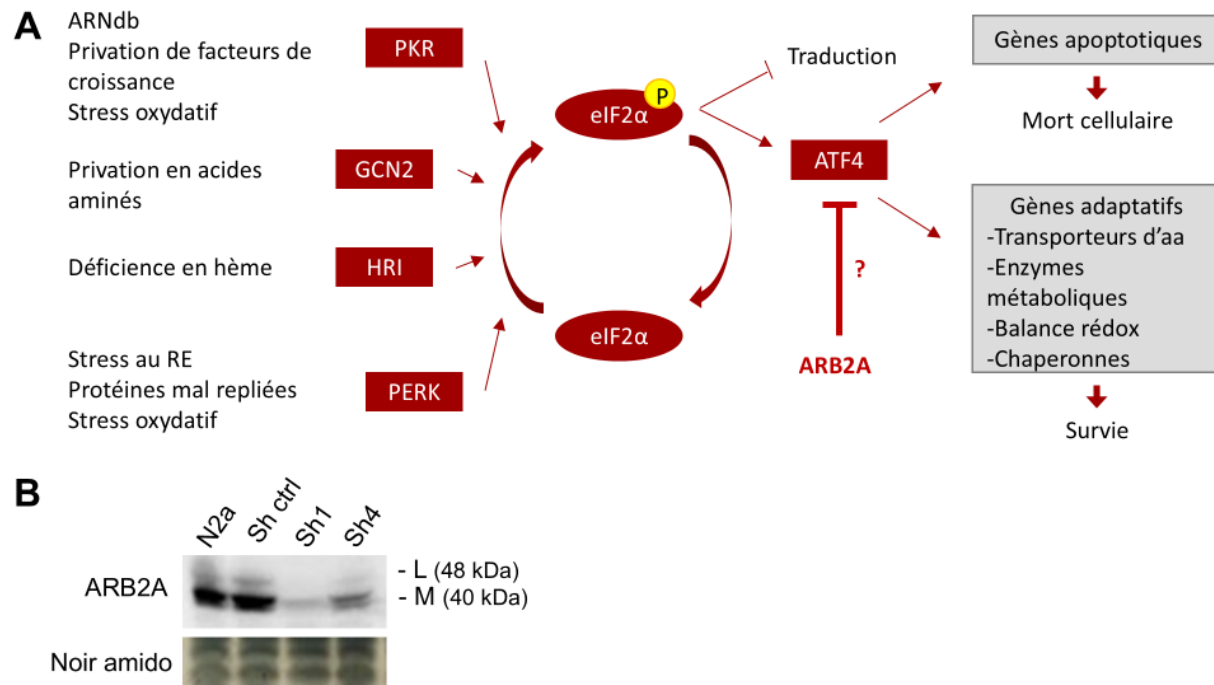


Figure S 6 : Régulation d'ATF4 par ARB2A.

(A) Schéma de la voie ISR représentant l'inhibition potentielle de l'expression d'ATF4 par ARB2A. (B) Immunobuvardage de type Western évaluant les niveaux d'ARB2A chez des N2a transfectées avec des shARN dirigés contre *Arb2a* (n = 5). (B.Grondin). L, isoforme longue; M, isoforme moyenne.

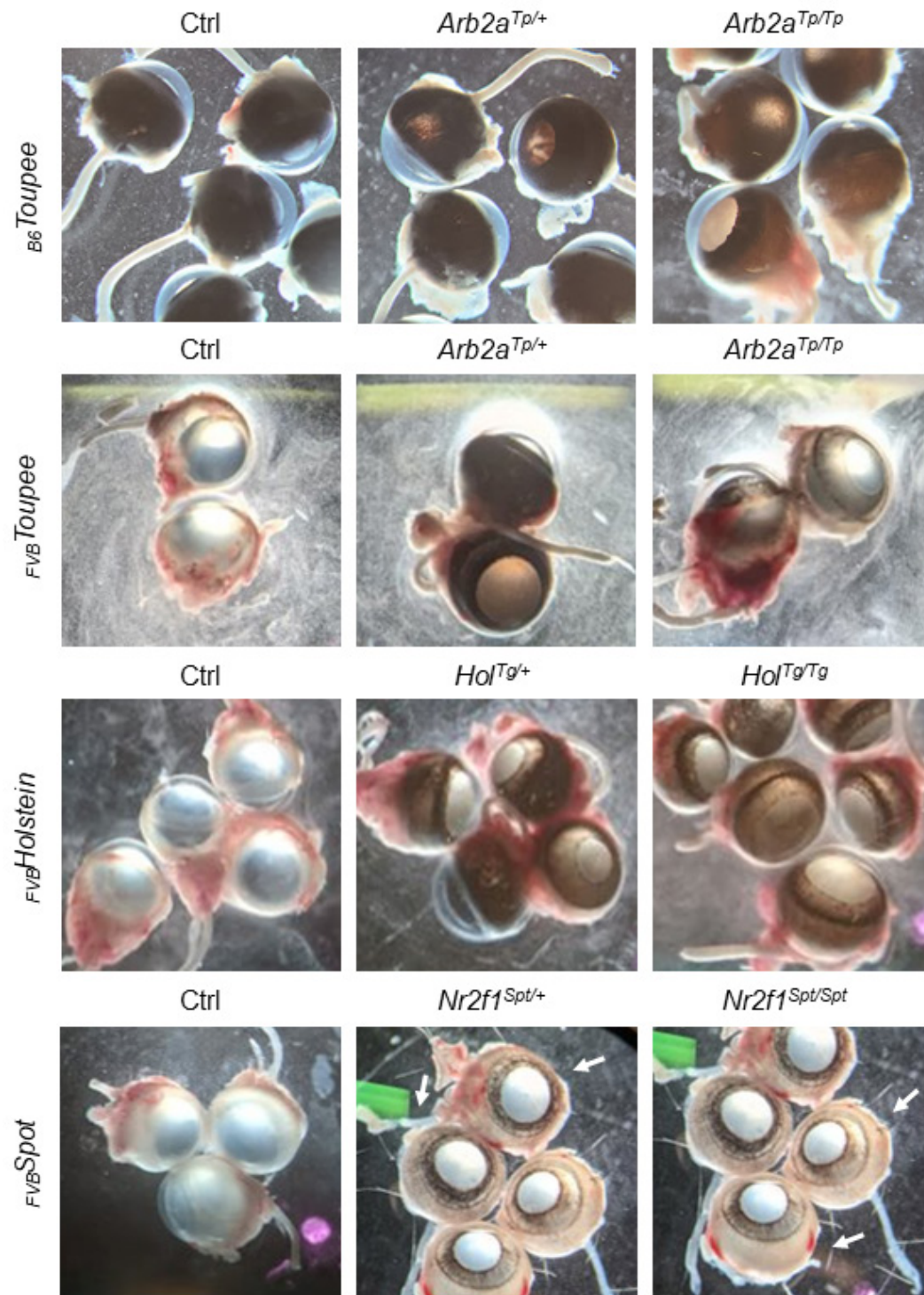


Figure S 7 : Pigmentation des globes oculaires chez diverses lignées murines issues d'un même crible génétique par insertion d'un minigène de tyrosinase.

Lorsque plus d'un génotype est présent dans une même image, les échantillons du génotype d'intérêt sont identifiés par des flèches (n = 2-12).

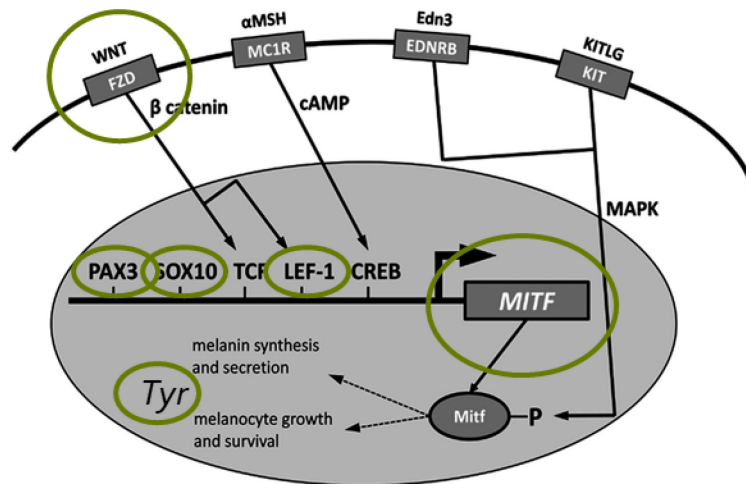


Figure S 8 : Voies de signalisation et facteurs de transcription régulant l'expression de *Mitf*.

Les gènes dont l'expression est dérégulée dans les CCN d'embryons $FVB/Arb2a^{Tp/Tp}$ sont encerclés en vert. Adaptée de (Strain, 2015).

ANNEXE B
TABLEAUX SUPPLÉMENTAIRES

Tableau S 1 : Séquences des amorces utilisées pour le géotypage et le sexage.

Lignée	Allèle(s)	Séquences des amorces
<i>Ago2^{flox}</i>	Allèles sauvage et <i>floxée</i>	5'- TGATCATGGTTGAGGTCTGA -3'
		5'- GTGAGCCACTCACTGTGCAC -3'
<i>Arb2a^{GFP}</i>	Allèles sauvage et <i>GFP</i>	5' - GCAGATGAACTTCAGGGTCAGCTTG -3'
		5' - GGGCCAATGTTTCTTACTTTGGG -3'
		5' - ACCACAGTGTATCCGTCCAC -3'
<i>Arb2a^{Tp}</i>	Allèle sauvage	5'- GAAGTGGGAACAAAACACCCTTGG -3'
		5'- GTAAGGCTCGCACTGACATAGC -3'
	Allèle <i>toupee</i>	5'- GGGAGTAAGTCCTACCAATGTAAATC -3'
		5'- TGACCTTCTAAACAGTCCCATATCCCC -3'
<i>Chd7^{Gt}</i>	Allèles sauvage et <i>genetrap</i>	5'- GCTCGCTTTTCAACCTCATTACG -3'
		5'- ATCAACAATGCCAACCAGGC -3'
		5'- CCTCCGATTGACTGAGTCGC -3'
<i>G4-RFP</i>	Allèle <i>G4-RFP</i>	5'- GGGGATCCAGTCAGAGCAGGCGATCGCA -3'
		5'- AAGGACAGCTTCTTGTAGTCG -3'
<i>Wnt1-Cre^{Tg}</i>	Allèle transgénique <i>cre</i>	5'- CAGCGCCGCAACTATAAGAG -3'
		5'- CATCGACCGGTAATGCAG -3'
Sexage chromosomique	<i>Smcx/Smcy</i> (X)	5'- TGAAGCTTTTGGCTTTGAG -3'
		5'- CCACTGCCAAATTCTTTGG -3'
	<i>Xfy</i> (Y)	5'- GACCAGATTGTTGTGGAAGTACAAG -3'
		5'- CCAGTATATCTGAAGTGTGAGCTG -3'

Tableau S 2 : Programmes PCR employés pour le génotypage et le sexage.

Lignée(s)	Programme
<i>Ago2^{fllox}</i>	35 x (30s à 96°C, 30s à 59°C, 1min à 72°C)
<i>Arb2a^{GFP}</i> , <i>Arb2a^{TP}</i> (allèle <i>Toupee</i>), <i>Chd7^{Gt}</i> , <i>Wnt1-Cre^{Tg}</i> et sexage chromosomique	35 x (30s à 96°C, 30s à 60°C, 1min à 72°C)
<i>Arb2a^{TP}</i> (allèle sauvage)	40 x (30s à 96°C, 30s à 64°C, 1min15s à 72°C)
<i>G4-RFP</i>	35 x (20s à 96°C, 40s à 60°C, 30s à 72°C)

Tableau S 3 : Liste des anticorps employés.

IHC, immunohistochimie; IF, immunofluorescence; WB, immunobuvardage de type western.

Anticorps	Espèces	No de catalogue	Compagnie	Dilution
Anticorps primaires				
Anti-2H3	Souris	ab531793	Developmental Studies Hybridoma Bank	1/200
Anti-AGO2	Lapin	ab32381	Abcam	IF 1/200
Anti-ATF4	Lapin	d4b8	Cell Signaling	WB 1/1000
Anti-ARB2A	Lapin	ab121364	Abcam	WB 1/1000
Anti-BiP	Lapin	c50d12	Cell Signaling	IF 1/500 WB 1/1000
Anti-BRN3A	Souris	sc8429	Santa Cruz	IF 1/700
Anti-pIRE1α	Lapin	ab48187	Abcam	WB 1/2000
Anticorps secondaires				
Anti-IgG de lapin – 647	Âne	711-605-152	Cedarlane	IF 1/1000
Anti-IgG de lapin - HRP	Chèvre	170-6516	Bio-Rad	IF 1/10 000
Anti-IgG de souris – 647	Âne	715-605-150	Cedarlane	IF 1/500
Anti-IgG de souris - HRP	Chèvre	sc2005	Santa Cruz	IHC 1/500
Anti-IgG de souris - HRP	Chèvre	7076s	Cell Signaling	IHC 1/500

Tableau S 4 : Séquences des shARN employés.

Identification	No de catalogue	Séquence
shARN contre Arb2a, 1 (sh1)	TRCN0000347009	5'-GTCGTGATGTGTCCGTCTAAACTCGAGTTTAGACGGACACAT CACGAC -3'
shARN contre Arb2a, 4 (sh4)	TRCN0000346936	5'-ACAAAGAAGCGTCGTGATTTCTCGAGGAAATCACGACGCT TCTTTGT -3'
shARN contrôle, non mammifère (sh ctrl)	SHC202V	5'-CAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGCTCTTCAT CTTGTTG -3'

Tableau S 5 : Séquences des amorces utilisées pour les expériences de qPCR.

Transcrit	Séquences des amorces
<i>Atf4</i>	5'- GCCAAGCACTTGAAACCTCA -3'
	5'- CTCCAACATCCAATCTGTCCC -3'
<i>Atf6</i>	5'- GACTCACCCATCCGAGTTGTG -3'
	5'- CTCCCAGTCTTCATCTGGTCC -3'
<i>Ire1α</i>	5'- CCAGGATGTAAGTGACCGAATAG -3'
	5'- GGAAGCGGGAAGTGAAGTAG -3'
<i>Psmb2</i>	5'- CCCAGACTATGTCCTCGTCG -3'
	5'- CCGTGTGAAGTTAGCTGCTG -3'
<i>Xbp-s</i>	5'- CAGCACTCAGACTATGTGCA -3'
	5'- GTCCATGGGAAGATGTTCTGG -3'
<i>Xbp-u</i>	5'- CTGAGTCCGAATCAGGTGCAG -3'
	5'- GTCCATGGGAAGATGTTCTGG -3'

Tableau S 6 : Évaluation des capacités respiratoires chez les lignées murines *Chd7^{Gt}*.

Des embryons E18.5 issus de croisements Ctrl x *Chd7^{Gt/+}* ont été rapidement extraits et placés sur une plaque chauffante à 37 °C. Leurs capacités respiratoires ont été surveillées pendant une heure. (test exact de Fisher)

Score	FVB		B6	
	Ctrl	<i>Chd7^{Gt/+}</i>	Ctrl	<i>Chd7^{Gt/+}</i>
0 – Respiration facile	64%	46%	62%	50%
1 – Difficultés respiratoires, halètements	36%	38%	23%	33%
2 - Décédé	0%	15%	15%	17%
	n = 11	n = 13	n = 13	n = 6
	p = 0,2502		p = 1	

Tableau S 7 : Types d'anomalies de l'oreille interne observées dans les modèles *Arb2a^{Tp/Tp}* et *Chd7^{Gt/+}*.

Les pourcentages sont exprimés par rapport au nombre total d'oreilles internes (n = 18 *FVB**Arb2a^{Tp/Tp}*, n = 13 *B6**Arb2a^{Tp/Tp}*, n = 12 *FVB**Chd7^{Gt/+}*, n = 16 *B6**Chd7^{Gt/+}*). (test exact de Fisher).

Modèle	Défaut(s) aux oreilles internes	Distribution p = 4,2e ⁻⁶
<i>FVB</i> <i>Arb2a^{Tp/Tp}</i>	Global Boursouflées: 6%	
<i>B6</i> <i>Arb2a^{Tp/Tp}</i>	Global Boursouflées: 65%	
<i>FVB</i> <i>Chd7^{Gt/+}</i>	Canal latéral Tronqué: 50% Hypercoudé: 13% Absent: 4%	
<i>B6</i> <i>Chd7^{Gt/+}</i>	Canal latéral Tronqué: 22% Absent: 63% Canal postérieur Hypercoudé: 28% Absent: 6%	

Tableau S 8 : Gènes associés au développement de l'oeil dont l'expression est dérégulée dans les CCN d'embryons *FVB* *Arb2a^{Tp/Tp}* par rapport aux contrôles au stade E10.5.

Analyse réalisée sur les gènes présentant une expression différentielle significative ($p < 0.05$; $FC > |1.5|$). Les gènes en bleu n'ont pas été retenus lors de l'analyse initiale ($0.01 < p < 0.05$). Données tirées de (Bélanger *et al.*, 2018).

Gène	Fold change (Tp/Tp vs Ctrl)	p-value	Gène	Fold change (Tp/Tp vs Ctrl)	p-value
<i>Abcb6</i>	3,78	0,0029	<i>Nrp1</i>	0,51	0,0029
<i>Actg1</i>	0,56	0,010	<i>Onecut1</i>	0,44	0,020
<i>Arb2a</i>	0,44	0,00027	<i>Pax3</i>	0,43	0,00013
<i>Bmp7</i>	0,52	0,0040	<i>Porcn</i>	0,50	0,0096
<i>Bmpr1a</i>	0,53	0,0064	<i>Psmb1</i>	1,70	0,016
<i>Cdh4</i>	0,47	0,0069	<i>Pxdn</i>	0,49	0,0013
<i>Cdon</i>	0,53	0,0051	<i>Rara</i>	0,52	0,0040
<i>Chd7</i>	0,63	0,038	<i>Rarb</i>	0,54	0,050
<i>Crim1</i>	3,18	1,5E-09	<i>Rbm24</i>	0,42	0,0028
<i>Ctnnb1</i>	0,58	0,015	<i>Rbp1</i>	0,41	3,3E-05
<i>Dlx</i>	0,52	0,036	<i>Rere</i>	0,55	0,0059
<i>Dpyd</i>	0,36	0,0017	<i>Rorb</i>	0,33	0,0049
<i>Fat1</i>	0,49	0,00093	<i>Sall2</i>	0,48	0,00081
<i>Fbn1</i>	0,44	0,00019	<i>Sall4</i>	0,49	0,0025
<i>Fbn2</i>	0,43	9,0E-05	<i>Sema2a</i>	0,57	0,028
<i>Flna</i>	0,46	0,00027	<i>Slc7a14</i>	0,39	0,0070
<i>Fzd5</i>	10,31	1,1E-07	<i>Smo</i>	0,63	0,049
<i>Gja1</i>	0,51	0,0034	<i>Sox2</i>	0,54	0,029
<i>Gli2</i>	0,59	0,036	<i>Sox8</i>	0,40	3,6E-05
<i>Grip1</i>	0,52	0,0051	<i>Sox9</i>	0,57	0,021
<i>Gsk3a</i>	1,84	0,0018	<i>Sox10</i>	0,41	2,8E-05
<i>Hes5</i>	0,45	0,0021	<i>Spred1</i>	0,49	0,0039
<i>Jag1</i>	0,45	0,00025	<i>Stra6</i>	0,57	0,031
<i>Jag2</i>	3,69	5,8E-06	<i>Tbx3</i>	0,46	0,0030
<i>Kctd1</i>	0,53	0,012	<i>Tctn2</i>	0,49	0,0057
<i>Kif7</i>	0,54	0,0082	<i>Tenm3</i>	0,49	0,0014
<i>Lcp1</i>	3,11	5,5E-9	<i>Tfap2a</i>	0,27	1,6E-08
<i>Lef1</i>	0,50	0,0028	<i>Tfap2b</i>	0,41	3,5E-05
<i>Lhx2</i>	0,55	0,032	<i>Tgfb2</i>	0,44	0,00078
<i>Lmo2</i>	12,91	5,5E-08	<i>Tmem67</i>	0,49	0,0046
<i>Lrp5</i>	0,51	0,0025	<i>Tmem98</i>	0,56	0,017
<i>Lrp6</i>	0,57	0,015	<i>Tyr</i>	0,35	5,8E-06
<i>Maf1</i>	2,44	0,0022	<i>Wfs1</i>	0,56	0,048
<i>Mitf</i>	0,26	9,4E-11	<i>Yap1</i>	0,52	0,0036
<i>Mpdz</i>	0,48	0,00091	<i>Zeb2</i>	0,57	0,012
<i>Notch1</i>	0,43	7,5E-05			

Tableau S 9 : Gènes associés au développement de l'oeil dont l'épissage est dérégulé dans les CCN d'embryons *FVB* *Arb2a^{Tp/Tp}* par rapport aux contrôles au stade E10.5.

Analyse réalisée sur les gènes présentant un épissage différentiel significatif ($p < 0.05$; différentiel des niveaux d'inclusion ≥ 0.1). RI, Rétention d'intron ; SE, exclusion d'exons. Données tirées de (Bélanger *et al.*, 2018).

Gène	Différentiel des niveaux d'inclusion (<i>Tp/Tp</i> vs Ctrl)	Valeur p	Type
<i>Abcb6</i>	-0,104	4.3E-10	RI
<i>Cspp1</i>	0,104	0,0022	SE
<i>Fgfr2</i>	-0,100	0,0016	SE
<i>Lcp1</i>	-0,371	2.9E-10	SE
<i>Ptpn11</i>	-0,134	9.4E-10	RI
<i>Tubgcp4</i>	-0,212	5,7E-06	RI

Tableau S 10 : Principales voies auxquelles appartiennent les gènes dont l'expression est dérégulée dans les cupules optiques d'embryons *B6* *Arb2a^{Tp/Tp}* à E11.5.

Analyse réalisée sur les gènes présentant une expression différentielle significative ($p < 0.05$; FC $> |1.5|$). *Gènes qui n'appartiennent pas à la voie de signalisation, mais qui sont régulés par ou interagissent avec cette dernière. (Bélanger *et al.*, 2018; Kanehisa *et al.*, 2025; Nedelec, Rozet et Fares Taie, 2019; Strain, 2015; Subramanian *et al.*, 2005; Weiss *et al.*, 2012).

Voie de signalisation	Gènes dérégulés
Wnt/ β -caténine/Mitf	Hausse : <i>Wnt7a</i> , <i>Wnt7b</i> , <i>Gpc4</i> , <i>Sfrp4</i> , <i>Celsr2</i> Baisse : <i>Sox10</i> , <i>Wnt10b</i> , <i>Shisa3</i> , <i>Shisa1</i>
Notch (et développement hyaloïde)	Hausse : <i>Dlk1</i> , <i>Lrp2</i> , <i>Crb2</i> Baisse : <i>Heyl</i> (+ de la voie de signalisation Wnt)
Hedgehog	Hausse : <i>Kif27</i> , <i>Gpc4</i> , <i>Dlk1</i>
TGF- β /BMP	Hausse : * <i>ErbB4</i> Baisse : <i>Sfn</i> , <i>Grhl3</i> , <i>Trp63</i>
Hippo	Hausse : <i>Fat3</i> (+ voies de signalisation Wnt, TGF- β et BMP)
Acide rétinoïque	Hausse : * <i>Nr2e1</i> Baisse : * <i>Tfap2a</i> , * <i>Dlx3</i> , * <i>Foxa1</i>

Tableau S 11 : Principales voies auxquelles appartiennent les gènes différentiellement exprimés entre les cupules optiques droites et gauches d'embryons *B6Arb2a^{TP/TP}* à E11.5.

Analyse réalisée sur les gènes présentant une expression différentielle significative ($p < 0.05$; $FC > |1.5|$). *Gènes qui n'appartiennent pas à la voie de signalisation, mais qui sont régulés par ou interagissent avec cette dernière. (Bélanger *et al.*, 2018; Kanehisa *et al.*, 2025; Nedelec, Rozet et Fares Taie, 2019; Strain, 2015; Subramanian *et al.*, 2005; Weiss *et al.*, 2012).

Voie de signalisation	Gènes dérégulés
Wnt/ β -caténine/Mitf	Hausse : <i>Lgr5</i> , <i>Ptpru</i> , * <i>Tbx3</i> , * <i>Tbx5</i> , * <i>Tbx20</i>
Notch (et développement hyaloïde)	Hausse : <i>Ptpru</i> Baisse : <i>Dll1</i> , <i>Dll3</i> (+ de la voie de signalisation Wnt)
Hedgehog	Hausse : <i>Cdon</i> , <i>Glis3</i> , * <i>Otx1</i> , * <i>Otx2</i> Baisse : * <i>Rfx4</i>
TGF- β /BMP	Hausse : <i>Ltbp1</i> , <i>Emb</i> , <i>Htra1</i> , * <i>Erb3</i> , * <i>Lamc2</i> , * <i>Krt18</i>
Acide rétinoïque	Hausse : <i>Aldh1a3</i> , <i>Aldh1a7</i> , <i>Rlbp1</i> , * <i>Pitx1</i>

Tableau S 12 : Caractéristiques de lignées mutantes pour l'orthologue d'*ARB2A* chez *C. elegans*.

Évaluation de la mortalité embryonnaire, de la fertilité et de la locomotion chez des lignées homozygotes de *C. elegans* portant des mutations ponctuelles ou nulles de l'orthologue d'*ARB2A* (Y75B8A.31). La fertilité a été évaluée par décompte de la progéniture de cinq hermaphrodite. La locomotion a été évaluée par des tests de nage (thrashing assays) sur des larves de stade 4 ($n > 10$). (L.Rivollet).

Souche	Mutation	Mortalité embryonnaire	Nb de larves/ hermaphrodite	Nb d'ondulations/ minute
N2	Type sauvage	1%	301	128
GK474195	Ponctuelle (E300K)	4%	129	90
GK704444	Ponctuelle (G64E)	0%	376	118
GK499440	Ponctuelle (G128E)	3%	211	120
GK926464	Ponctuelle (G230R)	15%	80	42
GK188181	Ponctuelle (S261N)	24%	58	122
GK895578	Ponctuelle (S279F)	8%	271	120
GK358687	Ponctuelle (L202F)	3%	262	44
TM3114	Nulle (Del 208pb)	2%	235	130

Tableau S 13 : Analyse d'ontologie génétique pour les gènes dont l'épissage est dérégulé dans les cupules optiques d'embryons *B6Arb2a^{Tp/Tp}* au stade E11.5 par rapport aux contrôles.

Analyse réalisée sur les gènes présentant un épissage différentiel significatif ($p < 0.05$; $FC > |1.5|$).

Nom	p-value	Nb gènes de la liste d'entrée	Nb gènes dans l'annotation
Fonctions moléculaires – Aucun résultat			
Processus biologiques			
Organisation des projections cellulaires liées à la membrane plasmique	8.64E-6	53	1927
Synthèse translésionnelle à faible fidélité	2.17E-5	4	12
Réponse aux dommages à l'ADN	3.11E-5	32	986
Établissement ou maintien de la polarité cellulaire	3.36E-5	14	257

Tableau S 14 : Analyse d'ontologie génétique pour les gènes différentiellement épissés dans les cupules optiques droites et gauches d'embryons *B6Arb2a^{Tp/Tp}*.

Analyse réalisée sur les gènes présentant un épissage différentiel significatif ($p < 0.05$; $FC > |1.5|$).

Nom	p-value	Nb gènes de la liste d'entrée	Nb gènes dans l'annotation
Fonctions moléculaires			
Activité phosphatidylsérine floppase	3.08E-5	4	9
Activité inositol phosphate kinase	7.78E-5	4	11
Processus biologiques – Aucun résultat			

Tableau S 15 : Gènes présentant une similarité de séquence avec l'ARNm d'*Arb2a*.

Analyse blastn pour des homologues distants.

Gène	Taille de la région de similarité (pdb)	E-val	Pourcentage d'identité (%)
<i>Gm38604</i>	153	3.43 ^e -59	99
<i>Gm43948, Pdzn3</i>	69	0.022	71
<i>A4galt</i>	48	0,065	83
<i>Slc26a3</i>	47	0,19	79
<i>Tbc1d5</i>	32	0,58	91
<i>Fam149a</i>	44	0,58	80
<i>Gm12648</i>	44	0,58	80

APPENDICE A
AUTRES CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES



Life Science Alliance

Research Article

The CHARGE syndrome-associated protein FAM172A controls AGO2 nuclear import

Sephora Sallis, Félix-Antoine Bérubé-Simard, Benoit Grondin, Elizabeth Leduc, Fatiha Azouz, Catherine Bélanger,  Nicolas Pilon 

Published 23 May 2023. DOI: 10.26508/lsa.202302133

PIGMENT CELL & MELANOMA Research

ORIGINAL ARTICLE

NR2F1 regulates a Schwann cell precursor-vs-melanocyte cell fate switch in a mouse model of Waardenburg syndrome type IV

[Grégoire Bonnamour](#), [Baptiste Charrier](#), [Sephora Sallis](#), [Elizabeth Leduc](#), [Nicolas Pilon](#) 

First published: 11 July 2022 | <https://doi.org/10.1111/pcmr.13054> |

Grégoire Bonnamour and Baptiste Charrier contributed equally to this work.

RESEARCH ARTICLE |

CHARGE syndrome-associated proteins FAM172A and CHD7 influence male sex determination and differentiation through transcriptional and alternative splicing mechanisms

[Catherine Bélanger](#), [Tatiana Cardinal](#), [Elizabeth Leduc](#), [Robert S. Viger](#), [Nicolas Pilon](#) ✉

First published: 07 February 2022 | <https://doi.org/10.1096/fj.202100837RR> |

PNAS

RESEARCH ARTICLE | DEVELOPMENTAL BIOLOGY | ✓

Dysregulation of cotranscriptional alternative splicing underlies CHARGE syndrome

[Catherine Bélanger](#), [Félix-Antoine Bérubé-Simard](#), [Elizabeth Leduc](#), [Guillaume Bernas](#), [Philippe M. Campeau](#), [Seema R. Lalani](#), [Donna M. Martin](#), [Stephanie Bielas](#), [Amanda Moccia](#), [Anshika Srivastava](#), [David W. Silversides](#), and [Nicolas Pilon](#) 

Edited by Robb Krumlauf, Stowers Institute for Medical Research, Kansas City, MO, and approved December 11, 2017 (received for review August 31, 2017)

January 8, 2018 | 115 (4) E620-E629 | <https://doi.org/10.1073/pnas.1715378115>

RÉFÉRENCES

- Abadie V, Wiener-Vacher S, Morisseau-Durand MP, Poree C, Amiel J, Amanou L, Peigne C, Lyonnet S et Manac'h Y (2000) Vestibular anomalies in CHARGE syndrome: investigations on and consequences for postural development. *European Journal of Pediatrics* 159: 569-574.
- Adams ME, Hurd EA, Beyer LA, Swiderski DL, Raphael Y et Martin DM (2007) Defects in vestibular sensory epithelia and innervation in mice with loss of *Chd7* function: implications for human CHARGE syndrome. *Journal of Comparative Neurology* 504: 519-532.
- Ahlgren SC, Thakur V et Bronner-Fraser M (2002) Sonic hedgehog rescues cranial neural crest from cell death induced by ethanol exposure. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 10476-10481.
- Ahmad Y, Boisvert FM, Gregor P, Cobley A et Lamond AI (2009) NOPdb: Nucleolar Proteome Database--2008 update. *Nucleic Acids Research* 37: D181-184.
- Ajala I, Tiaiba I, Grondin B, Lipuma D, Jmii S, Benlyamani H, Cappadocia L et Vanderperre B (2025) The dual-coding gene SLC35A4 protects against oxidative stress. *The Protein Society* 34: e70197.
- Al ST, Cottrell DA et Hughes CV (2002) Dental findings associated with the malformations of CHARGE. *Pediatric Dentistry* 24: 43-46.
- Alavizadeh A, Kiernan AE, Nolan P, Lo C, Steel KP et Bucan M (2001) The *Wheels* mutation in the mouse causes vascular, hindbrain, and inner ear defects. *Developmental Biology* 234: 244-260.
- Allan D, Houle M, Bouchard N, Meyer BI, Gruss P et Lohnes D (2001) RARgamma and Cdx1 interactions in vertebral patterning. *Developmental Biology* 240: 46-60.
- Allemand E, Myers MP, Garcia-Bernardo J, Harel-Bellan A, Krainer AR et Muchardt C (2016) A broad set of chromatin factors influences splicing. *PLoS Genetics* 12: e1006318.
- Allouche C, Sarda P, Tronc F, Jalaguier J, Montoya F et Bonnet H (1989) [The CHARGE association]. *Pediatric* 44: 391-395.

- Ameyar-Zazoua M, Rachez C, Souidi M, Robin P, Fritsch L, Young R, Morozova N, Fenouil R, Descostes N, Andrau JC, et al. (2012) Argonaute proteins couple chromatin silencing to alternative splicing. *Nature Structural & Molecular Biology* 19: 998-1004.
- Amiel J, Attiee-Bitach T, Marianowski R, Cormier-Daire V, Abadie V, Bonnet D, Gonzales M, Chemouny S, Brunelle F, Munnich A, et al. (2001) Temporal bone anomaly proposed as a major criteria for diagnosis of CHARGE syndrome. *American Journal of Medical Genetics* 99: 124-127.
- Ampofo E, Sokolowsky T, Gotz C et Montenarh M (2013) Functional interaction of protein kinase CK2 and activating transcription factor 4 (ATF4), a key player in the cellular stress response. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1833: 439-451.
- Anderson NS et Haynes CM (2020) Folding the mitochondrial UPR into the integrated stress response. *Trends in Cell Biology* 30: 428-439.
- Angrand PO, Vennin C, Le Bourhis X et Adriaenssens E (2015) The role of long non-coding RNAs in genome formatting and expression. *Frontiers in Genetics* 6: 165.
- Aramaki M, Kimura T, Udaka T, Kosaki R, Mitsuhashi T, Okada Y, Takahashi T et Kosaki K (2007) Embryonic expression profile of chicken *CHD7*, the ortholog of the causative gene for CHARGE syndrome. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 79: 50-57.
- Aramaki M, Udaka T, Kosaki R, Makita Y, Okamoto N, Yoshihashi H, Oki H, Nanao K, Moriyama N, Oku S, et al. (2006a) Phenotypic spectrum of CHARGE syndrome with *CHD7* mutations. *The Journal of Pediatrics* 148: 410-414.
- Aramaki M, Udaka T, Torii C, Samejima H, Kosaki R, Takahashi T et Kosaki K (2006b) Screening for CHARGE syndrome mutations in the *CHD7* gene using denaturing high-performance liquid chromatography. *Genetic Testing* 10: 244-251.
- Arima M, Tsukamoto S, Akiyama R, Nishiyama K, Kohno RI, Tachibana T, Hayashida A, Murayama M, Hisatomi T, Nozu K, et al. (2018) Ocular findings in a case of Pierson syndrome with a novel mutation in laminin ss2 gene. *Journal of American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus* 22: 401-403 e401.

- Asakura Y, Toyota Y, Muroya K, Kurosawa K, Fujita K, Aida N, Kawame H, Kosaki K et Adachi M (2008) Endocrine and radiological studies in patients with molecularly confirmed CHARGE syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 93: 920-924.
- Aybar MJ et Mayor R (2002) Early induction of neural crest cells: lessons learned from frog, fish and chick. *Current Opinion in Genetics & Development* 12: 452-458.
- Bajpai R, Chen DA, Rada-Iglesias A, Zhang J, Xiong Y, Helms J, Chang CP, Zhao Y, Swigut T et Wysocka J (2010) CHD7 cooperates with PBAF to control multipotent neural crest formation. *Nature* 463: 958-962.
- Baker KE et Parker R (2004) Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression. *Current Opinion in Cell Biology* 16: 293-299.
- Barlow AJ (2014) Neural crest cells in enteric nervous system development and disease. Dans *Neural Crest Cells*. Elsevier.
- Basson MA et van Ravenswaaij-Arts C (2015) Functional insights into chromatin remodelling from studies on CHARGE syndrome. *Trends in Genetics* 31: 600-611.
- Basu-Roy U, Bayin NS, Rattanakorn K, Han E, Placantonakis DG, Mansukhani A et Basilico C (2015) Sox2 antagonizes the Hippo pathway to maintain stemness in cancer cells. *Nature Communications* 6: 6411.
- Batsukh T, Pieper L, Koszucka AM, von Velsen N, Hoyer-Fender S, Elbracht M, Bergman JE, Hoefsloot LH et Pauli S (2010) CHD8 interacts with CHD7, a protein which is mutated in CHARGE syndrome. *Human Molecular Genetics* 19: 2858-2866.
- Becker PB et Workman JL (2013) Nucleosome remodeling and epigenetics. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5:
- Bélanger C, Bérubé-Simard FA, Leduc E, Bernas G, Campeau PM, Lalani SR, Martin DM, Bielas S, Moccia A, Srivastava A, et al. (2018) Dysregulation of cotranscriptional alternative splicing underlies CHARGE syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115: E620-E629.

- Bélanger C, Cardinal T, Leduc E, Viger RS et Pilon N (2022) CHARGE syndrome-associated proteins FAM172A and CHD7 influence male sex determination and differentiation through transcriptional and alternative splicing mechanisms. *The FASEB Journal* 36: e22176.
- Benhammed M, Herbig U, Ye T, Dejean A et Bischof O (2012) Senescence is an endogenous trigger for microRNA-directed transcriptional gene silencing in human cells. *Nature Cell Biology* 14: 266-275.
- Benson MD, Jivraj I, Damji KF et Solarte CE (2017) Congenital glaucoma and CHARGE syndrome: A case report. *Journal of Glaucoma* 26: e84-e86.
- Bergeron KF, Nguyen CM, Cardinal T, Charrier B, Silversides DW et Pilon N (2016) Upregulation of the Nr2f1-A830082K12Rik gene pair in murine neural crest cells results in a complex phenotype reminiscent of Waardenburg syndrome type 4. *Disease Models & Mechanisms* 9: 1283-1293.
- Bergman JE, Blake KD, Bakker MK, du Marchie Sarvaas GJ, Free RH et van Ravenswaaij-Arts CM (2010a) Death in CHARGE syndrome after the neonatal period. *Clinical Genetics* 77: 232-240.
- Bergman JE, Bosman EA, van Ravenswaaij-Arts CM et Steel KP (2010b) Study of smell and reproductive organs in a mouse model for CHARGE syndrome. *European Journal of Human Genetics* 18: 171-177.
- Bergman JE, de Wijs I, Jongmans MC, Admiraal RJ, Hoefsloot LH et van Ravenswaaij-Arts CM (2008) Exon copy number alterations of the *CHD7* gene are not a major cause of CHARGE and CHARGE-like syndrome. *European Journal of Medical Genetics* 51: 417-425.
- Bergman JE, Janssen N, Hoefsloot LH, Jongmans MC, Hofstra RM et van Ravenswaaij-Arts CM (2011) *CHD7* mutations and CHARGE syndrome: the clinical implications of an expanding phenotype. *Journal of Medical Genetics* 48: 334-342.
- Bergman JE, Janssen N, van der Sloot AM, de Walle HE, Schoots J, Rendtorff ND, Tranebjaerg L, Hoefsloot LH, van Ravenswaaij-Arts CM et Hofstra RM (2012) A novel classification system to predict the pathogenic effects of *CHD7* missense variants in CHARGE syndrome. *Human Mutation* 33: 1251-1260.

Bergstrom L et Owens O (1984) Posterior choanal atresia: a syndromal disorder. *Laryngoscope* 94: 1273-1276.

Bernstein CS, Anderson MT, Gohel C, Slater K, Gross JM et Agarwala S (2018) The cellular bases of choroid fissure formation and closure. *Developmental Biology* 440: 137-151.

Bernstein V et Denno LS (2005) Repetitive behaviors in CHARGE syndrome: differential diagnosis and treatment options. *American Journal of Medical Genetics Part A* 133A: 232-239.

Berube-Simard FA et Pilon N (2019) Molecular dissection of CHARGE syndrome highlights the vulnerability of neural crest cells to problems with alternative splicing and other transcription-related processes. *Transcription* 10: 21-28.

Betancur P, Bronner-Fraser M et Sauka-Spengler T (2010) Assembling neural crest regulatory circuits into a gene regulatory network. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 26: 581-603.

Bissa B, Claude-Taupin A, Ivanov P, Jia J et Pu J (2025) Editorial: Survival strategies: cellular responses to stress and damage. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 13: 1630652.

Blake KD, Davenport SL, Hall BD, Hefner MA, Pagon RA, Williams MS, Lin AE et Graham JM, Jr. (1998) CHARGE association: an update and review for the primary pediatrician. *Clinical pediatrics* 37: 159-173.

Blake KD, Hartshorne TS, Lawand C, Dailor AN et Thelin JW (2008) Cranial nerve manifestations in CHARGE syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A* 146A: 585-592.

Blake KD et Hudson AS (2017) Gastrointestinal and feeding difficulties in CHARGE syndrome: A review from head-to-toe. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics* 175: 496-506.

Blake KD et Prasad C (2006) CHARGE syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 1: 34.

Blake KD, Russell-Eggitt IM, Morgan DW, Ratcliffe JM et Wyse RK (1990) Who's in CHARGE? Multidisciplinary management of patients with CHARGE association. *Archives of Disease in Childhood* 65: 217-223.

Bohnsack BL et Kahana A (2013) Thyroid hormone and retinoic acid interact to regulate zebrafish craniofacial neural crest development. *Developmental Biology* 373: 300-309.

Bolande RP (1974) The neurocristopathies: a unifying concept of disease arising in neural crest maldevelopment. *Human Pathology* 5: 409-429.

Bonnamour G, Charrier B, Sallis S, Leduc E et Pilon N (2022) NR2F1 regulates a Schwann cell precursor-vs-melanocyte cell fate switch in a mouse model of Waardenburg syndrome type IV. *Pigment Cell & Melanoma Research* 35: 506-516.

Bosman EA, Penn AC, Ambrose JC, Kettleborough R, Stemple DL et Steel KP (2005) Multiple mutations in mouse *Chd7* provide models for CHARGE syndrome. *Human Molecular Genetics* 14: 3463-3476.

Bouazoune K et Kingston RE (2012) Chromatin remodeling by the CHD7 protein is impaired by mutations that cause human developmental disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 19238-19243.

Brajadenta G, Kitzis A et Thoreau V (2019) *Localization study of CHD7 protein expressed in HeLa and HEK293 cells*. IOP Publishing,

Brandon AA, Almeida D et Powder KE (2023) Neural crest cells as a source of microevolutionary variation. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 145: 42-51.

Bravo-Jimenez MA, Sharma S et Karimi-Abdolrezaee S (2025) The integrated stress response in neurodegenerative diseases. *Molecular Neurodegeneration* 20: 20.

Briceno-Lopez C, Garcia-Domene MC, Peris-Martinez C, Luque-Cobija MJ, Diez-Ajenjo MA et Burguera-Gimenez N (2024) The Impact of Corneal Oedema on UV Light Transmission: An Experimental Study in Porcine Eyes. *Journal of Clinical Medicine* 13:

Brombin A et Patton EE (2024) Melanocyte lineage dynamics in development, growth and disease. *Development* 151:

- Bryan CD, Casey MA, Pfeiffer RL, Jones BW et Kwan KM (2020) Optic cup morphogenesis requires neural crest-mediated basement membrane assembly. *Development* 147:
- Buker SM, Iida T, Buhler M, Villen J, Gygi SP, Nakayama J et Moazed D (2007) Two different Argonaute complexes are required for siRNA generation and heterochromatin assembly in fission yeast. *Nature Structural & Molecular Biology* 14: 200-207.
- Busa T, Legendre M, Bauge M, Quarello E, Bretelle F, Bilan F, Sigaudy S, Gilbert-Dussardier B et Philip N (2016) Prenatal findings in children with early postnatal diagnosis of CHARGE syndrome. *Prenatal Diagnosis* 36: 561-567.
- Byerly KA et Pauli RM (1993) Cranial nerve abnormalities in CHARGE association. *American Journal of Medical Genetics* 45: 751-757.
- Capitani M et Salles M (2009) The KDEL receptor: new functions for an old protein. *FEBS Letters* 583: 3863-3871.
- Cariboni A, Andre V, Chauvet S, Cassatella D, Davidson K, Caramello A, Fantin A, Bouloux P, Mann F et Ruhrberg C (2015) Dysfunctional SEMA3E signaling underlies gonadotropin-releasing hormone neuron deficiency in Kallmann syndrome. *The Journal of Clinical Investigation* 125: 2413-2428.
- Carvajal P, Bahamondes V, Jara D, Castro I, Matus S, Aguilera S, Molina C, Gonzalez S, Hermoso M, Barrera MJ et Gonzalez MJ (2023) The integrated stress response is activated in the salivary glands of Sjogren's syndrome patients. *Frontiers in Medicine* 10: 1118703.
- Casey MA, Lusk S et Kwan KM (2023) Eye morphogenesis in vertebrates. *Annual Review of Vision Science* 9: 221-243.
- Casper DS et Sparrow JR (2019) Orbital and ocular anatomy. Dans *The Columbia Guide to Basic Elements of Eye Care: A Manual for Healthcare Professionals*. Springer.
- Castanotto D, Zhang X, Alluin J, Zhang X, Ruger J, Armstrong B, Rossi J, Riggs A et Stein CA (2018) A stress-induced response complex (SIRC) shuttles miRNAs, siRNAs, and oligonucleotides to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115: E5756-E5765.

- Castel SE et Martienssen RA (2013) RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nature Reviews Genetics* 14: 100-112.
- Cerutti L, Mian N et Bateman A (2000) Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends in Biochemical Sciences* 25: 481-482.
- Chalouhi C, Faulcon P, Le Bihan C, Hertz-Pannier L, Bonfils P et Abadie V (2005) Olfactory evaluation in children: application to the CHARGE syndrome. *Pediatrics* 116: e81-88.
- Chen L, Dahlstrom JE, Lee SH et Rangasamy D (2012) Naturally occurring endo-siRNA silences LINE-1 retrotransposons in human cells through DNA methylation. *Epigenetics* 7: 758-771.
- Chen SY et Kannan M (2023) Neural crest cells and fetal alcohol spectrum disorders: Mechanisms and potential targets for prevention. *Pharmacological Research* 194: 106855.
- Chohra I, Chung K, Giri S et Malgrange B (2023) ATP-dependent chromatin remodellers in inner ear development. *Cells* 12:
- Coniglio JU, Manzione JV et Hengerer AS (1988) Anatomic findings and management of choanal atresia and the CHARGE association. *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology* 97: 448-453.
- Cook CS, Nowotny AZ et Sulik KK (1987) Fetal alcohol syndrome. Eye malformations in a mouse model. *Archives of Ophthalmology* 105: 1576-1581.
- Corsten-Janssen N, Kerstjens-Frederikse WS, du Marchie Sarvaas GJ, Baardman ME, Bakker MK, Bergman JE, Hove HD, Heimdal KR, Rustad CF, Hennekam RC, et al. (2013a) The cardiac phenotype in patients with a *CHD7* mutation. *Circulation: Cardiovascular Genetics* 6: 248-254.
- Corsten-Janssen N, Saitta SC, Hoefsloot LH, McDonald-McGinn DM, Driscoll DA, Derks R, Dickinson KA, Kerstjens-Frederikse WS, Emanuel BS, Zackai EH et van Ravenswaaij-Arts CM (2013b) More clinical overlap between 22q11.2 deletion syndrome and CHARGE syndrome than often anticipated. *Molecular Syndromology* 4: 235-245.

- Coutant K, Magne B, Ferland K, Fuentes-Rodriguez A, Chancy O, Mitchell A, Germain L et Landreville S (2024) Melanocytes in regenerative medicine applications and disease modeling. *Journal of Translational Medicine* 22: 336.
- Cox JS, Shamu CE et Walter P (1993) Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell* 73: 1197-1206.
- Dana J, Dorval G, Martin CS, Belhous K, Levy R, Marlin S, De Bie I, Mautret-Godefroy M, Rausell A, Rio M, et al. (2023) Investigating genotype-to-phenotype correlation in CHARGE syndrome by deep phenotyping and multiparametric clustering. *Clinical Genetics* 104: 466-471.
- Davenport SL, Hefner MA et Mitchell JA (1986) The spectrum of clinical features in CHARGE syndrome. *Clinical Genetics* 29: 298-310.
- De La Hoz Polo M, Torramilans Lluís A, Pozuelo Segura O, Anguera Bosque A, Esmerado Appiani C et Caminal Mitjana JM (2016) Ocular ultrasonography focused on the posterior eye segment: what radiologists should know. *Insights Imaging* 7: 351-364.
- de Lonlay-Debeney P, Cormier-Daire V, Amiel J, Abadie V, Odent S, Paupe A, Couderc S, Tellier AL, Bonnet D, Prieur M, et al. (1997) Features of DiGeorge syndrome and CHARGE association in five patients. *Journal of Medical Genetics* 34: 986-989.
- Deflandre B, Thiebaut N, Planckaert S, Jourdan S, Anderssen S, Hanikenne M, Devreese B, Francis I et Rigali S (2020) Deletion of *bglC* triggers a genetic compensation response by awakening the expression of alternative beta-glucosidase. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech* 1863: 194615.
- Delahaye A, Sznajer Y, Lyonnet S, Elmaleh-Berges M, Delpierre I, Audollent S, Wiener-Vacher S, Mansbach AL, Amiel J, Baumann C, et al. (2007) Familial CHARGE syndrome because of *CHD7* mutation: clinical intra- and interfamilial variability. *Clinical Genetics* 72: 112-121.
- Derkx PM et Madrid SM (2001) The foldase CYPB is a component of the secretory pathway of *Aspergillus niger* and contains the endoplasmic reticulum retention signal HEEL. *Molecular Genetics and Genomics* 266: 537-545.

- Dhooge I, Lemmerling M, Lagache M, Standaert L, Govaert P et Mortier G (1998) Otological manifestations of CHARGE association. *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology* 107: 935-941.
- Dixon J et Dixon MJ (2004) Genetic background has a major effect on the penetrance and severity of craniofacial defects in mice heterozygous for the gene encoding the nucleolar protein Treacle. *Developmental Dynamics* 229: 907-914.
- Dixon J, Trainor P et Dixon MJ (2007) Treacher Collins syndrome. *Orthodontics & Craniofacial Research* 10: 88-95.
- Dobbelsteyn C, Peacocke SD, Blake K, Crist W et Rashid M (2008) Feeding difficulties in children with CHARGE syndrome: prevalence, risk factors, and prognosis. *Dysphagia* 23: 127-135.
- Dooley CM, Wali N, Sealy IM, White RJ, Stemple DL, Collins JE et Busch-Nentwich EM (2019) The gene regulatory basis of genetic compensation during neural crest induction. *PLoS Genetics* 15: e1008213.
- Doyle C et Blake K (2005) Scoliosis in CHARGE: a prospective survey and two case reports. *American Journal of Medical Genetics Part A* 133A: 340-343.
- Du Y (2024) The Hippo signalling pathway and its impact on eye diseases. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 28: e18300.
- Duester G (2022) Towards a better vision of retinoic acid signaling during eye development. *Cells* 11:
- El-Brolosy MA, Kontarakis Z, Rossi A, Kuenne C, Gunther S, Fukuda N, Kikhi K, Boezio GLM, Takacs CM, Lai SL, et al. (2019) Genetic compensation triggered by mutant mRNA degradation. *Nature* 568: 193-197.
- El-Brolosy MA et Stainier DYR (2017) Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS Genetics* 13: e1006780.

Engelen E, Akinci U, Bryne JC, Hou J, Gontan C, Moen M, Szumska D, Kockx C, van Ijcken W, Dekkers DH, et al. (2011) Sox2 cooperates with Chd7 to regulate genes that are mutated in human syndromes. *Nature Genetics* 43: 607-611.

Felix TM, Hanshaw BC, Mueller R, Bitoun P et Murray JC (2006) *CHD7* gene and non-syndromic cleft lip and palate. *American Journal of Medical Genetics Part A* 140: 2110-2114.

Feng W, Kawauchi D, Korkel-Qu H, Deng H, Serger E, Sieber L, Lieberman JA, Jimeno-Gonzalez S, Lambo S, Hanna BS, et al. (2017) Chd7 is indispensable for mammalian brain development through activation of a neuronal differentiation programme. *Nature Communications* 8: 14758.

Flaus A et Owen-Hughes T (2001) Mechanisms for ATP-dependent chromatin remodelling. *Current Opinion in Genetics & Development* 11: 148-154.

Frum T, Watts JL et Ralston A (2019) Sox2 repression delays the establishment of pluripotency. *Development* 146: e1702-e1702.

Gao J, Skidmore JM, Cimerman J, Ritter KE, Qiu J, Wilson LMQ, Raphael Y, Kwan KY et Martin DM (2024) CHD7 and SOX2 act in a common gene regulatory network during mammalian semicircular canal and cochlear development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 121: e2311720121.

Garcia-Arocena D (2016) *How to spot and manage malocclusion in research mice*. The Jackson Laboratory,

Garcia-Llorca A et Eysteinnsson T (2024) The microphthalmia-associated transcription factor (MITF) and its role in the structure and function of the eye. *Genes* 15:

Garner MA, Strickland RG, Girkin CA et Gross AK (2022) Mechanisms of retinal ganglion cell injury following acute increases in intraocular pressure. *Frontiers in Ophthalmology* 2: 1007103.

Gaspar P, Almudi I, Nunes MDS et McGregor AP (2019) Human eye conditions: insights from the fly eye. *Human Genetics* 138: 973-991.

Giefing-Kroll C, Jelencsics KE, Reipert S et Nagy E (2011) Absence of pneumococcal PcsB is associated with overexpression of LysM domain-containing proteins. *Microbiology* 157: 1897-1909.

- González-Gutiérrez JA, Díaz-Jiménez DF, Vargas-Pérez I, Guillén-Solís G, Stülke J et Olmedo-Álvarez G (2018) The DEAD-box RNA helicases of *Bacillus subtilis* as a model to evaluate genetic compensation among duplicate genes. *Frontiers in Microbiology* 9: 2261.
- Gonzalez D et Collier J (2015) Genomic adaptations to the loss of a conserved bacterial DNA methyltransferase. *mBio* 6: e00952.
- Gooley K, Williams P, Mack H, Zhu V, Langsford D, Pianta T, Barit D, Mahmood K et Savige J (2023) A comparison of the ocular features in Pierson and Alport syndrome: a case report and literature review. *Ophthalmic Genetics* 44: 417-422.
- Graham JM, Jr., Rosner B, Dykens E et Visootsak J (2005) Behavioral features of CHARGE syndrome (Hall-Hittner syndrome) comparison with Down syndrome, Prader-Willi syndrome, and Williams syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A* 133A: 240-247.
- Granadillo JL, Wegner DJ, Paul AJ, Willing M, Sisco K, Tedder ML, Sadikovic B, Wambach JA, Baldridge D, Cole FS et Undiagnosed Diseases N (2021) Discovery of a novel *CHD7* CHARGE syndrome variant by integrated omics analyses. *American Journal of Medical Genetics Part A* 185: 544-548.
- Green SA, Simoes-Costa M et Bronner ME (2015) Evolution of vertebrates as viewed from the crest. *Nature* 520: 474-482.
- Haas M, Beyer D, Gahlmann R et Freiberg C (2001) YkrB is the main peptide deformylase in *Bacillus subtilis*, a eubacterium containing two functional peptide deformylases. *Microbiology* 147: 1783-1791.
- Hale CL, Niederriter AN, Green GE et Martin DM (2016) Atypical phenotypes associated with pathogenic *CHD7* variants and a proposal for broadening CHARGE syndrome clinical diagnostic criteria. *American Journal of Medical Genetics Part A* 170A: 344-354.
- Hall BD (1979) Choanal atresia and associated multiple anomalies. *The Journal of Pediatrics* 95: 395-398.
- Hall BK (2000) The neural crest as a fourth germ layer and vertebrates as quadroblastic not triploblastic. *Evolution & Development* 2: 3-5.

- Hall JA et Georgel PT (2007) CHD proteins: a diverse family with strong ties. *Biochemistry and Cell Biology* 85: 463-476.
- Hartsock A, Lee C, Arnold V et Gross JM (2014) In vivo analysis of hyaloid vasculature morphogenesis in zebrafish: A role for the lens in maturation and maintenance of the hyaloid. *Developmental Biology* 394: 327-339.
- Hawker K, Fuchs H, Angelis MH et Steel KP (2005) Two new mouse mutants with vestibular defects that map to the highly mutable locus on chromosome 4. *International Journal of Audiology* 44: 171-177.
- He D, Marie C, Zhao C, Kim B, Wang J, Deng Y, Clavairoly A, Frah M, Wang H, He X, et al. (2016) Chd7 cooperates with Sox10 and regulates the onset of CNS myelination and remyelination. *Nature Neuroscience* 19: 678-689.
- Heavner W et Pevny L (2012) Eye development and retinogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4:
- Hefner MA et Fassi E (2017) Genetic counseling in CHARGE syndrome: Diagnostic evaluation through follow up. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics* 175: 407-416.
- Herman TE et Siegel MJ (1998) Special imaging casebook. CHARGE association-DiGeorge syndrome with congenital short esophagus and single kidney. *Journal of Perinatology* 18: 322-324.
- Hetz C (2012) The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13: 89-102.
- Hittner HM, Hirsch NJ, Kreh GM et Rudolph AJ (1979) Colobomatous microphthalmia, heart disease, hearing loss, and mental retardation--a syndrome. *Journal of Pediatric Ophthalmology & Strabismus* 16: 122-128.
- Hong M, Luo S, Baumeister P, Huang JM, Gogia RK, Li M et Lee AS (2004) Underglycosylation of ATF6 as a novel sensing mechanism for activation of the unfolded protein response. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 11354-11363.

- Hoogenboom A, Falix FA, van der Laan L, Kerkhof J, Alders M, Sadikovic B et van Haelst MM (2024) Novel *PUF60* variant suggesting an interaction between Verheij and Cornelia de Lange syndrome: phenotype description and review of the literature. *European Journal of Human Genetics* 32: 435-439.
- Hovland AS, Rothstein M et Simoes-Costa M (2020) Network architecture and regulatory logic in neural crest development. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* 12: e1468.
- Hrabe de Angelis MH, Flaswinkel H, Fuchs H, Rathkolb B, Soewarto D, Marschall S, Heffner S, Pargent W, Wuensch K, Jung M, et al. (2000) Genome-wide, large-scale production of mutant mice by ENU mutagenesis. *Nature Genetics* 25: 444-447.
- Hsu P, Ma A, Wilson M, Williams G, Curotta J, Munns CF et Mehr S (2014) CHARGE syndrome: a review. *Journal of Paediatrics and Child Health* 50: 504-511.
- Hu R, Zhao J, Lai KC, Wang S, Zheng J, Stoddard C et Lai L (2025) CHD7 regulates definitive endodermal and mesodermal development from human embryonic stem cells. *Stem Cell Research & Therapy* 16: 311.
- Huang X et Saint-Jeannet JP (2004) Induction of the neural crest and the opportunities of life on the edge. *Developmental Biology* 275: 1-11.
- Huang Z, He C, Wang G, Zhu M, Tong X, Feng Y, Zhang C, Dong S, Harim Y, Liu HK, et al. (2025) Mutation of CHD7 impairs the output of neuroepithelium transition that is reversed by the inhibition of EZH2. *Molecular Psychiatry* 30: 4094-4109.
- Huber K, Kalcheim C et Unsicker K (2009) The development of the chromaffin cell lineage from the neural crest. *Autonomic Neuroscience* 151: 10-16.
- Hudson A, Trider CL et Blake K (2017) CHARGE Syndrome. *Pediatrics in Review* 38: 56-59.
- Hurd EA, Capers PL, Blauwkamp MN, Adams ME, Raphael Y, Poucher HK et Martin DM (2007) Loss of *Chd7* function in gene-trapped reporter mice is embryonic lethal and associated with severe defects in multiple developing tissues. *Mammalian Genome* 18: 94-104.

- Hurd EA, Poucher HK, Cheng K, Raphael Y et Martin DM (2010) The ATP-dependent chromatin remodeling enzyme *CHD7* regulates pro-neural gene expression and neurogenesis in the inner ear. *Development* 137: 3139-3150.
- Hutvagner G et Simard MJ (2008) Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9: 22-32.
- Iida Y, Hobley L, Lambert C, Fenton AK, Sockett RE et Aizawa S (2009) Roles of multiple flagellins in flagellar formation and flagellar growth post bdelloplast lysis in *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Journal of Molecular Biology* 394: 1011-1021.
- Iki T, Kawaguchi S et Kai T (2023) miRNA/siRNA-directed pathway to produce noncoding piRNAs from endogenous protein-coding regions ensures Drosophila spermatogenesis. *Science Advances* 9: eadh0397.
- Issekutz KA, Graham JM, Jr., Prasad C, Smith IM et Blake KD (2005) An epidemiological analysis of CHARGE syndrome: preliminary results from a Canadian study. *American Journal of Medical Genetics Part A* 133A: 309-317.
- James A, Lee C, Williams AM, Angileri K, Lathrop KL et Gross JM (2016) The hyaloid vasculature facilitates basement membrane breakdown during choroid fissure closure in the zebrafish eye. *Developmental Biology* 419: 262-272.
- Janssen N, Bergman JE, Swertz MA, Tranebjaerg L, Lodahl M, Schoots J, Hofstra RM, van Ravenswaaij-Arts CM et Hoefsloot LH (2012) Mutation update on the *CHD7* gene involved in CHARGE syndrome. *Human Mutation* 33: 1149-1160.
- Jasrapuria-Agrawal S et Lwigale P (2014) *Chapter 10-neural crest cells in ocular development*. Neural crest cells. Boston: Academic Press,
- Ji Y, Hao H, Reynolds K, McMahon M et Zhou CJ (2019) Wnt signaling in neural crest ontogenesis and oncogenesis. *Cells* 8:

- Jiang X, Zhou Y, Xian L, Chen W, Wu H et Gao X (2012) The mutation in *Chd7* causes misexpression of *Bmp4* and developmental defects in telencephalic midline. *The American Journal of Pathology* 181: 626-641.
- Jiang Y, Liu MT et Gershon MD (2003) Netrins and DCC in the guidance of migrating neural crest-derived cells in the developing bowel and pancreas. *Developmental Biology* 258: 364-384.
- Jinno H, Morozova O, Jones KL, Biernaskie JA, Paris M, Hosokawa R, Rudnicki MA, Chai Y, Rossi F, Marra MA et Miller FD (2010) Convergent genesis of an adult neural crest-like dermal stem cell from distinct developmental origins. *Stem Cells* 28: 2027-2040.
- Johnson D, Morrison N, Grant L, Turner T, Fantes J, Connor JM et Murday V (2006) Confirmation of *CHD7* as a cause of CHARGE association identified by mapping a balanced chromosome translocation in affected monozygotic twins. *Journal of Medical Genetics* 43: 280-284.
- Jongmans MC, Admiraal RJ, van der Donk KP, Vissers LE, Baas AF, Kapusta L, van Hagen JM, Donnai D, de Ravel TJ, Veltman JA, et al. (2006) CHARGE syndrome: the phenotypic spectrum of mutations in the *CHD7* gene. *Journal of Medical Genetics* 43: 306-314.
- Jongmans MC, Hoefsloot LH, van der Donk KP, Admiraal RJ, Magee A, van de Laar I, Hendriks Y, Verheij JB, Walpole I, Brunner HG et van Ravenswaaij CM (2008) Familial CHARGE syndrome and the *CHD7* gene: a recurrent missense mutation, intrafamilial recurrence and variability. *American Journal of Medical Genetics Part A* 146A: 43-50.
- Jongmans MC, van Ravenswaaij-Arts CM, Pitteloud N, Ogata T, Sato N, Claahsen-van der Grinten HL, van der Donk K, Seminara S, Bergman JE, Brunner HG, et al. (2009) *CHD7* mutations in patients initially diagnosed with Kallmann syndrome--the clinical overlap with CHARGE syndrome. *Clinical Genetics* 75: 65-71.
- Joukal M (2017) Anatomy of the human visual pathway. Dans *Homonymous visual field defects*. Springer.
- Kalantari R, Chiang CM et Corey DR (2016) Regulation of mammalian transcription and splicing by Nuclear RNAi. *Nucleic Acids Research* 44: 524-537.
- Kalinin A, Zubkova E et Menshikov M (2023) Integrated stress response (ISR) pathway: unraveling its role in cellular senescence. *International Journal of Molecular Sciences* 24:

Kallen K, Robert E, Mastroiacovo P, Castilla EE et Kallen B (1999) CHARGE Association in newborns: a registry-based study. *Teratology* 60: 334-343.

Kanehisa M, Furumichi M, Sato Y, Matsuura Y et Ishiguro-Watanabe M (2025) KEGG: biological systems database as a model of the real world. *Nucleic acids research* 53: D672-D677.

Kanwar K, Bashey S, Bohnsack BL, Drackley A, Ing A, Rahmani S, Ranaivo HR, McMullen P, Skol A, Yap K, et al. (2024) Ocular manifestations of CHARGE syndrome in a pediatric cohort with genotype/phenotype analysis. *American Journal of Medical Genetics Part A* 194: e63618.

Kaplan J et Hudgins L (2008) Neonatal presentations of CHARGE syndrome and VATER/VACTERL association. *Neoreviews* 9: e299-e304.

Kaplan LC (1985) Choanal atresia and its associated anomalies. Further support for the CHARGE Association. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 8: 237-242.

Karaconji T, Zagora S et Grigg JR (2022) Approach to childhood glaucoma: A review. *Clinical & Experimental Ophthalmology* 50: 232-246.

Katai N, Urakawa Y, Sato Y, Miyanaga K, Segawa K et Yoshimura N (1997) CHARGE association with congenital glaucoma due to maldevelopment of the anterior chamber angle. *Acta Ophthalmologica Scandinavica* 75: 322-324.

Kaufmann M et Han Z (2024) RPE melanin and its influence on the progression of AMD. *Ageing Research Reviews* 99: 102358.

Khaliq S, Hameed A, Ismail M, Anwar K, Leroy B, Payne AM, Bhattacharya SS et Mehdi SQ (2001) Locus for autosomal recessive nonsyndromic persistent hyperplastic primary vitreous. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 42: 2225-2228.

Kiernan AE, Erven A, Voegelings S, Peters J, Nolan P, Hunter J, Bacon Y, Steel KP, Brown SD et Guenet JL (2002) ENU mutagenesis reveals a highly mutable locus on mouse Chromosome 4 that affects ear morphogenesis. *Mammalian Genome* 13: 142-148.

- Kim HG, Kurth I, Lan F, Meliciani I, Wenzel W, Eom SH, Kang GB, Rosenberger G, Tekin M, Ozata M, et al. (2008) Mutations in *CHD7*, encoding a chromatin-remodeling protein, cause idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *American Journal of Medical Genetics* 83: 511-519.
- Kirby ML et Hutson MR (2010) Factors controlling cardiac neural crest cell migration. *Cell Adhesion & Migration* 4: 609-621.
- Knecht AK et Bronner-Fraser M (2002) Induction of the neural crest: a multigene process. *Nature Reviews Genetics* 3: 453-461.
- Kok FO, Shin M, Ni CW, Gupta A, Grosse AS, van Impel A, Kirchmaier BC, Peterson-Maduro J, Kourkoulis G, Male I, et al. (2015) Reverse genetic screening reveals poor correlation between morpholino-induced and mutant phenotypes in zebrafish. *Developmental Cell* 32: 97-108.
- Kosaki K (2011) Role of rare cases in deciphering the mechanisms of congenital anomalies: CHARGE syndrome research. *Congenital Anomalies* 51: 12-15.
- Kovaleva V, Yu LY, Ivanova L, Shpironok O, Nam J, Eesmaa A, Kumpula EP, Sakson S, Toots U, Ustav M, et al. (2023) MANF regulates neuronal survival and UPR through its ER-located receptor IRE1alpha. *Cell Reports* 42: 112066.
- Krueger LA et Morris AC (2022) Eyes on CHARGE syndrome: Roles of CHD7 in ocular development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10: 994412.
- Lake JJ et Heuckeroth RO (2013) Enteric nervous system development: migration, differentiation, and disease. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 305: G1-24.
- Lalani SR, Safiullah AM, Fernbach SD, Harutyunyan KG, Thaller C, Peterson LE, McPherson JD, Gibbs RA, White LD, Hefner M, et al. (2006) Spectrum of *CHD7* mutations in 110 individuals with CHARGE syndrome and genotype-phenotype correlation. *American Journal of Medical Genetics* 78: 303-314.
- Lalani SR, Safiullah AM, Molinari LM, Fernbach SD, Martin DM et Belmont JW (2004) *SEMA3E* mutation in a patient with CHARGE syndrome. *Journal of Medical Genetics* 41: e94.

Lapedriza A, Petratos K et Kelsh RN (2014) Neural crest cells and pigmentation. *Neural Crest Cells* 287-311.

Latcheva NK, Ghosh R et Marenda DR (2016) The epigenetics of CHARGE syndrome. *Frontiers in Biology* 11: 85-95.

Lawand C, Prasad C, Graham J et Blake K (2003) The cranial nerve anomalies in CHARGE association/syndrome. *Paediatr Child Health* 8: 26B.

Layman WS, Hurd EA et Martin DM (2010) Chromodomain proteins in development: lessons from CHARGE syndrome. *Clinical Genetics* 78: 11-20.

Layman WS, Hurd EA et Martin DM (2011) Reproductive dysfunction and decreased GnRH neurogenesis in a mouse model of CHARGE syndrome. *Human Molecular Genetics* 20: 3138-3150.

Layman WS, McEwen DP, Beyer LA, Lalani SR, Fernbach SD, Oh E, Swaroop A, Hegg CC, Raphael Y, Martens JR et Martin DM (2009) Defects in neural stem cell proliferation and olfaction in *Chd7* deficient mice indicate a mechanism for hyposmia in human CHARGE syndrome. *Human Molecular Genetics* 18: 1909-1923.

Le Douarin NM et Teillet MA (1974) Experimental analysis of the migration and differentiation of neuroblasts of the autonomic nervous system and of neur ectodermal mesenchymal derivatives, using a biological cell marking technique. *Developmental Biology* 41: 162-184.

Lee M, Goraya N, Kim S et Cho SH (2018) Hippo-yap signaling in ocular development and disease. *Developmental Dynamics* 247: 794-806.

Lee YW, Kim SC, Shin YL, Kim JW, Hong HS, Lee YK et Ki CS (2009) Clinical and genetic analysis of the *CHD7* gene in Korean patients with CHARGE syndrome. *Clinical Genetics* 75: 290-293.

Legendre M, Abadie V, Attie-Bitach T, Philip N, Busa T, Bonneau D, Colin E, Dollfus H, Lacombe D, Toutain A, et al. (2017) Phenotype and genotype analysis of a french cohort of 119 patients with CHARGE syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics* 175: 417-430.

- Legendre M, Rodriguez-Ballesteros M, Rossi M, Abadie V, Amiel J, Revencu N, Blanchet P, Brioude F, Delrue MA, Doubaj Y, et al. (2018) CHARGE syndrome: a recurrent hotspot of mutations in *CHD7* IVS25 analyzed by bioinformatic tools and minigene assays. *European Journal of Human Genetics* 26: 287-292.
- Lenz DR, Dror AA, Wekselman G, Fuchs H, de Angelis MH et Avraham KB (2010) The inner ear phenotype of *Volchok* (*Vlk*): An ENU-induced mouse model for CHARGE syndrome. *Audiological Medicine* 8: 110-119.
- Lettieri A, Oleari R, Paganoni AJJ, Gervasini C, Massa V, Fantin A et Cariboni A (2021) Semaphorin regulation by the chromatin remodeler CHD7: An emerging genetic interaction shaping neural cells and neural crest in development and cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9: 638674.
- Levesque ML, Casey KF, Szyf M, Ismaylova E, Ly V, Verner MP, Suderman M, Brendgen M, Vitaro F, Dionne G, et al. (2014) Genome-wide DNA methylation variability in adolescent monozygotic twins followed since birth. *Epigenetics* 9: 1410-1421.
- Lewis MJ et Pelham HR (1990) A human homologue of the yeast HDEL receptor. *Nature* 348: 162-163.
- Li A, Song NJ, Riesenberger BP et Li Z (2019) The emerging roles of endoplasmic reticulum stress in balancing immunity and tolerance in health and diseases: Mechanisms and opportunities. *Frontiers in Immunology* 10: 3154.
- Li X, Wang X, Cheng Z et Zhu Q (2020) AGO2 and its partners: a silencing complex, a chromatin modulator, and new features. *Critical reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 55: 33-53.
- Lin AE, Siebert JR et Graham JM, Jr. (1990) Central nervous system malformations in the CHARGE association. *American Journal of Medical Genetics* 37: 304-310.
- Lingam G, Sen AC, Lingam V, Bhende M, Padhi TR et Xinyi S (2021) Ocular coloboma-a comprehensive review for the clinician. *Eye* 35: 2086-2109.
- Lisitskaya L, Aravin AA et Kulbachinskiy A (2018) DNA interference and beyond: structure and functions of prokaryotic Argonaute proteins. *Nature Communications* 9: 5165.

Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L et Hannon GJ (2004) Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305: 1437-1441.

Liu X, Shen J, Zhang X, Gong J, Lin H, Liu C et Bi Y (2026) Acute high intraocular pressure induced by vitreous cavity infusion: an animal model to evaluate corneal endothelial injuries. *Experimental Eye Research* 263: 110765.

Liu ZZ, Guo J, Lu Y, Liu W, Fu X, Yao T, Zhou Y et Xu HA (2019) *Sema3E* is required for migration of cranial neural crest cells in zebrafish: Implications for the pathogenesis of CHARGE syndrome. *International Journal of Experimental Pathology* 100: 234-243.

Livy DJ, Parnell SE et West JR (2003) Blood ethanol concentration profiles: a comparison between rats and mice. *Alcohol* 29: 165-171.

Long S, Ahmad N et Rebagliati M (2003) The zebrafish nodal-related gene southpaw is required for visceral and diencephalic left-right asymmetry. *Development* 130: 2303-2316.

Longakit AN, Bourget H et Van Raamsdonk CD (2025) Mitf over-expression leads to microphthalmia and coloboma in Mitf-cre mice. *Experimental Eye Research* 251: 110209.

Lorber B, Hsiao WK et Martin KR (2016) Three-dimensional printing of the retina. *Current Opinion in Ophthalmology* 27: 262-267.

Ludwig PE, Lopez MJ et Czyz CN (2025) Embryology, Eye Malformations. Dans *StatPearls*. Treasure Island (FL).

Luo X, Alfason L, Wei M, Wu S et Kasim V (2022) Spliced or Unspliced, That Is the Question: The Biological Roles of XBP1 Isoforms in Pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences* 23:

Ma Z, Zhu P, Shi H, Guo L, Zhang Q, Chen Y, Chen S, Zhang Z, Peng J et Chen J (2019) PTC-bearing mRNA elicits a genetic compensation response via Upf3a and COMPASS components. *Nature* 568: 259-263.

- Machado RAC, Schneider H, DeOcesano-Pereira C, Lichtenstein F, Andrade F, Fujita A, Trombetta-Lima M, Weller M, Bowman-Colin C et Sogayar MC (2019) CHD7 promotes glioblastoma cell motility and invasiveness through transcriptional modulation of an invasion signature. *Scientific Reports* 9: 3952.
- Malhotra A, Minja FJ, Crum A et Burrowes D (2011) Ocular anatomy and cross-sectional imaging of the eye. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI* 32: 2-13.
- Manning BJ et Yusufzai T (2017) The ATP-dependent chromatin remodeling enzymes CHD6, CHD7, and CHD8 exhibit distinct nucleosome binding and remodeling activities. *Journal of Biological Chemistry* 292: 11927-11936.
- Marfella CG et Imbalzano AN (2007) The Chd family of chromatin remodelers. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 618: 30-40.
- Martik ML et Bronner ME (2017) Regulatory logic underlying diversification of the neural crest. *Trends in Genetics* 33: 715-727.
- Mather K (1953) Genetical control of stability in development.
- Matveeva E, Maiorano J, Zhang Q, Eteleeb AM, Convertini P, Chen J, Infantino V, Stamm S, Wang J, Rouchka EC et Fondufe-Mittendorf YN (2016) Involvement of PARP1 in the regulation of alternative splicing. *Cell Discovery* 2: 15046.
- McMain K, Blake K, Smith I, Johnson J, Wood E, Tremblay F et Robitaille J (2008) Ocular features of CHARGE syndrome. *Journal of American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus* 12: 460-465.
- Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G et Tuschl T (2004) Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Molecular Cell* 15: 185-197.
- Melicharek DJ, Ramirez LC, Singh S, Thompson R et Marends DR (2010) *Kismet/CHD7* regulates axon morphology, memory and locomotion in a *Drosophila* model of CHARGE syndrome. *Human Molecular Genetics* 19: 4253-4264.

- Meulemans D et Bronner-Fraser M (2004) Gene-regulatory interactions in neural crest evolution and development. *Developmental Cell* 7: 291-299.
- Micucci JA, Layman WS, Hurd EA, Sperry ED, Frank SF, Durham MA, Swiderski DL, Skidmore JM, Scacheri PC, Raphael Y et Martin DM (2014) CHD7 and retinoic acid signaling cooperate to regulate neural stem cell and inner ear development in mouse models of CHARGE syndrome. *Human Molecular Genetics* 23: 434-448.
- Miesfeld JB et Brown NL (2019) Eye organogenesis: A hierarchical view of ocular development. *Current Topics in Developmental Biology* 132: 351-393.
- Milet C et Monsoro-Burq AH (2012) Neural crest induction at the neural plate border in vertebrates. *Developmental Biology* 366: 22-33.
- Mitchell JA, Davenport SL, Hefner MA et Shei MM (1985) Use of an expert model to test diagnostic criteria in CHARGE syndrome. *Journal of Medical Systems* 9: 425-436.
- Mitsiadis TA et Graf D (2009) Cell fate determination during tooth development and regeneration. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 87: 199-211.
- Moccia A, Srivastava A, Skidmore JM, Bernat JA, Wheeler M, Chong JX, Nickerson D, Bamshad M, Hefner MA, Martin DM et Bielas SL (2018) Genetic analysis of CHARGE syndrome identifies overlapping molecular biology. *Genetics in Medicine* 20: 1022-1029.
- Monk C (2019) Ocular Surface Disease in Rodents (Guinea Pigs, Mice, Rats, Chinchillas). *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice* 22: 15-26.
- Moore BA, Roux MJ, Sebbag L, Cooper A, Edwards SG, Leonard BC, Imai DM, Griffey S, Bower L, Clary D, et al. (2018) A population study of common ocular abnormalities in C57BL/6N *rd8* mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 59: 2252-2261.
- Muller M, Fazi F et Ciaudo C (2019) Argonaute proteins: From structure to function in development and pathological cell fate determination. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 7: 360.

- Munro S et Pelham HR (1987) A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48: 899-907.
- Nakanishi K (2022) Anatomy of four human Argonaute proteins. *Nucleic Acids Research* 50: 6618-6638.
- Nazer E, Gomez Acuna L et Kornblihtt AR (2022) Seeking the truth behind the myth: Argonaute tales from "nuclearland". *Molecular Cell* 82: 503-513.
- Nedelec B, Rozet JM et Fares Taie L (2019) Genetic architecture of retinoic-acid signaling-associated ocular developmental defects. *Human Genetics* 138: 937-955.
- Newbern JM (2015) Molecular control of the neural crest and peripheral nervous system development. *Current Topics in Developmental Biology* 111: 201-231.
- Nishina S, Kosaki R, Yagihashi T, Azuma N, Okamoto N, Hatsukawa Y, Kurosawa K, Yamane T, Mizuno S, Tsuzuki K et Kosaki K (2012) Ophthalmic features of CHARGE syndrome with *CHD7* mutations. *American Journal of Medical Genetics Part A* 158A: 514-518.
- Nogi T, Yuan YE, Sorocco D, Perez-Tomas R et Levin M (2005) Eye regeneration assay reveals an invariant functional left-right asymmetry in the early bilaterian, *Dugesia japonica*. *Laterality* 10: 193-205.
- Nolan PM, Sollars PJ, Bohne BA, Ewens WJ, Pickard GE et Bucan M (1995) Heterozygosity mapping of partially congenic lines: mapping of a semidominant neurological mutation, *Wheels (Whl)*, on mouse chromosome 4. *Genetics* 140: 245-254.
- Northcutt RG et Gans C (1983) The genesis of neural crest and epidermal placodes: a reinterpretation of vertebrate origins. *The Quarterly Review of Biology* 58: 1-28.
- O'Rahilly R et Muller F (2007) The development of the neural crest in the human. *Journal of Anatomy* 211: 335-351.
- Ogata T, Fujiwara I, Ogawa E, Sato N, Udaka T et Kosaki K (2006) Kallmann syndrome phenotype in a female patient with CHARGE syndrome and *CHD7* mutation. *Endocrine Journal* 53: 741-743.

- Ogier JM, Arhatari BD, Carpinelli MR, McColl BK, Wilson MA et Burt RA (2018) An intronic mutation in *Chd7* creates a cryptic splice site, causing aberrant splicing in a mouse model of CHARGE syndrome. *Scientific Reports* 8: 5482.
- Ogier JM, Carpinelli MR, Arhatari BD, Symons RC, Kile BT et Burt RA (2014) CHD7 deficiency in *Looper*, a new mouse model of CHARGE syndrome, results in ossicle malformation, otosclerosis and hearing impairment. *PLoS One* 9: e97559.
- Oh SS, Kang B, Park J, Kim S, Park EC, Lee SH et Kawachi I (2023) Racial/Ethnic disparity in association between fetal alcohol syndrome and alcohol intake during pregnancy: multisite retrospective cohort study. *JMIR Public Health and Surveillance* 9: e45358.
- Oley CA, Baraitser M et Grant DB (1988) A reappraisal of the CHARGE association. *Journal of Medical Genetics* 25: 147-156.
- Oppezzo A et Rosselli F (2021) The underestimated role of the microphthalmia-associated transcription factor (MiTF) in normal and pathological haematopoiesis. *Cell & Bioscience* 11: 18.
- Ottens F, Efstathiou S et Hoppe T (2024) Cutting through the stress: RNA decay pathways at the endoplasmic reticulum. *Trends in Cell Biology* 34: 1056-1068.
- Pagon RA, Graham JM, Jr., Zonana J et Yong SL (1981) Coloboma, congenital heart disease, and choanal atresia with multiple anomalies: CHARGE association. *The Journal of Pediatrics* 99: 223-227.
- Pai VP, Aw S, Shomrat T, Lemire JM et Levin M (2012a) Transmembrane voltage potential controls embryonic eye patterning in *Xenopus laevis*. *Development* 139: 313-323.
- Pai VP, Vandenberg LN, Blackiston D et Levin M (2012b) Neurally derived tissues in *Xenopus laevis* embryos exhibit a consistent bioelectrical left-right asymmetry. *Stem Cells International* 2012: 353491.
- Pakos-Zebrucka K, Koryga I, Mnich K, Ljujic M, Samali A et Gorman AM (2016) The integrated stress response. *EMBO Reports* 17: 1374-1395.

- Pantazopoulou VI, Delis AD, Georgiou S, Pagakis SN, Filippa V, Dragona E, Kloukina I, Chatzitheodoridis E, Trebicka J, Velentzas AD, et al. (2021) AGO2 localizes to cytokinetic protrusions in a p38-dependent manner and is needed for accurate cell division. *Communication Biology* 4: 726.
- Pau H, Hawker K, Fuchs H, De Angelis MH et Steel KP (2004) Characterization of a new mouse mutant, *flouncer*, with a balance defect and inner ear malformation. *Otology & Neurotology* 25: 707-713.
- Pauli S, Bajpai R et Borchers A (2017) CHARGEd with neural crest defects. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics* 175: 478-486.
- Pauli S, Pieper L, Haberle J, Grzmil P, Burfeind P, Steckel M, Lenz U et Michelmann HW (2009) Proven germline mosaicism in a father of two children with CHARGE syndrome. *Clinical Genetics* 75: 473-479.
- Pearring JN, Salinas RY, Baker SA et Arshavsky VY (2013) Protein sorting, targeting and trafficking in photoreceptor cells. *Progress in Retinal and Eye Research* 36: 24-51.
- Peng J (2019) Gene redundancy and gene compensation: An updated view. *Journal of Genetics and Genomics* 46: 329-333.
- Petri S, Dueck A, Lehmann G, Putz N, Rudel S, Kremmer E et Meister G (2011) Increased siRNA duplex stability correlates with reduced off-target and elevated on-target effects. *RNA* 17: 737-749.
- Pickard GE, Sollars PJ, Rinchik EM, Nolan PM et Bucan M (1995) Mutagenesis and behavioral screening for altered circadian activity identifies the mouse mutant, *Wheels*. *Brain Research* 705: 255-266.
- Pilon N (2016) Pigmentation-based insertional mutagenesis is a simple and potent screening approach for identifying neurocristopathy-associated genes in mice. *Rare Diseases* 4: e1156287.
- Pilon N (2021) Treatment and prevention of neurocristopathies. *Trends in Molecular Medicine* 27: 451-468.
- Pilon N, Raiwet D, Viger RS et Silversides DW (2008) Novel pre- and post-gastrulation expression of Gata4 within cells of the inner cell mass and migratory neural crest cells. *Developmental Dynamics* 237: 1133-1143.

Pinto G, Abadie V, Mesnage R, Blustajn J, Cabrol S, Amiel J, Hertz-Pannier L, Bertrand AM, Lyonnet S, Rappaport R et Netchine I (2005) CHARGE syndrome includes hypogonadotropic hypogonadism and abnormal olfactory bulb development. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 90: 5621-5626.

Pla P et Monsoro-Burq AH (2018) The neural border: Induction, specification and maturation of the territory that generates neural crest cells. *Developmental Biology* 444 Suppl 1: S36-S46.

Popova S, Lange S, Probst C, Gmel G et Rehm J (2017) Estimation of national, regional, and global prevalence of alcohol use during pregnancy and fetal alcohol syndrome: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Global Health* 5: e290-e299.

Prendergast A et Raible DW (2014) Neural crest cells and peripheral nervous system development. Dans *Neural Crest Cells*. Elsevier.

Puc J et Rosenfeld MG (2011) SOX2 and CHD7 cooperatively regulate human disease genes. *Nature Genetics* 43: 505-506.

Putty K, Marcus SA, Mittl PR, Bogadi LE, Hunter AM, Arur S, Berg DE, Sethu P et Kalia A (2013) Robustness of *Helicobacter pylori* infection conferred by context-variable redundancy among cysteine-rich paralogs. *PLoS One* 8: e59560.

Qu J, Wang D et Grosskreutz CL (2010) Mechanisms of retinal ganglion cell injury and defense in glaucoma. *Experimental Eye Research* 91: 48-53.

Quadros RM, Miura H, Harms DW, Akatsuka H, Sato T, Aida T, Redder R, Richardson GP, Inagaki Y, Sakai D, et al. (2017) Easi-CRISPR: a robust method for one-step generation of mice carrying conditional and insertion alleles using long ssDNA donors and CRISPR ribonucleoproteins. *Genome Biol* 18: 92.

Ragan DC, Casale AJ, Rink RC, Cain MP et Weaver DD (1999) Genitourinary anomalies in the CHARGE association. *The Journal of Urology* 161: 622-625.

- Randall V, McCue K, Roberts C, Kyriakopoulou V, Beddow S, Barrett AN, Vitelli F, Prescott K, Shaw-Smith C, Devriendt K, et al. (2009) Great vessel development requires biallelic expression of *Chd7* and *Tbx1* in pharyngeal ectoderm in mice. *The Journal of Clinical Investigation* 119: 3301-3310.
- Rentschler M, Chen Y, Pahl J, Soria-Martinez L, Braumuller H, Brenner E, Bischof O, Rocken M et Wieder T (2018) Nuclear translocation of argonaute 2 in cytokine-induced senescence. *Cellular Physiology and Biochemistry* 51: 1103-1118.
- Reynaert N, de Zegher F, Francois I, Devriendt K, Beckers D et Casteels K (2016) Expanding the CHARGE geno-phenotype: A girl with novel *CHD7* deletion, hypogonadotropic hypogonadism, and agenesis of uterus and ovaries. *Hormone Research in Paediatrics* 85: 288-290.
- Richard S et Smith J (1995) Microphthalmia and ocular infections in inbred C57 black mice. *JAX Notes*
- Robinson ML, Holmgren A et Dewey MJ (1993) Genetic control of ocular morphogenesis: defective lens development associated with ocular anomalies in C57BL/6 mice. *Experimental Eye Research* 56: 7-16.
- Rocha M, Singh N, Ahsan K, Beiriger A et Prince VE (2020) Neural crest development: insights from the zebrafish. *Developmental Dynamics* 249: 88-111.
- Rodrigues-Da-Silva MA, de Espindola da Silveira G, Taufer CR et Calloni GW (2022) The mesenchymal potential of trunk neural crest cells. *The International Journal of Developmental Biology* 66: 317-331.
- Rodriguez-Paredes M, Ceballos-Chavez M, Esteller M, Garcia-Dominguez M et Reyes JC (2009) The chromatin remodeling factor CHD8 interacts with elongating RNA polymerase II and controls expression of the cyclin E2 gene. *Nucleic Acids Research* 37: 2449-2460.
- Rogers CD et Nie S (2018) Specifying neural crest cells: From chromatin to morphogens and factors in between. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 7: e322.
- Rossi A, Kontarakis Z, Gerri C, Nolte H, Holper S, Kruger M et Stainier DY (2015) Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature* 524: 230-233.

- Rothman KJ, Moore LL, Singer MR, Nguyen US, Mannino S et Milunsky A (1995) Teratogenicity of high vitamin A intake. *New England Journal of Medicine* 333: 1369-1373.
- Rouf MA, Wen L, Mahendra Y, Wang J, Zhang K, Liang S, Wang Y, Li Z, Wang Y et Wang G (2023) The recent advances and future perspectives of genetic compensation studies in the zebrafish model. *Genes & Diseases* 10: 468-479.
- Rudel S, Flatley A, Weinmann L, Kremmer E et Meister G (2008) A multifunctional human Argonaute2-specific monoclonal antibody. *RNA* 14: 1244-1253.
- Russell-Eggitt IM, Blake KD, Taylor DS et Wyse RK (1990) The eye in the CHARGE association. *British Journal of Ophthalmology* 74: 421-426.
- Sala L, Chandrasekhar S et Vidigal JA (2020) AGO unchained: Canonical and non-canonical roles of Argonaute proteins in mammals. *Frontiers in Bioscience* 25: 1-42.
- Salanga CM et Salanga MC (2021) Genotype to phenotype: CRISPR gene editing reveals genetic compensation as a mechanism for phenotypic disjunction of morphants and mutants. *International Journal of Molecular Sciences* 22:
- Sallis S (2024) *Les rôles de FAM172A dans les mécanismes d'épissage alternatif co-transcriptionnel dans le contexte du syndrome CHARGE*. Université du Québec à Montréal, Montréal, Canada.
- Sallis S, Bérubé-Simard FA, Grondin B, Leduc E, Azouz F, Bélanger C et Pilon N (2023) The CHARGE syndrome-associated protein FAM172A controls AGO2 nuclear import. *Life Science Alliance* 6:
- Sanchez-Ferras O, Bernas G, Farnos O, Toure AM, Souchkova O et Pilon N (2016) A direct role for murine Cdx proteins in the trunk neural crest gene regulatory network. *Development* 143: 1363-1374.
- Sanka M, Tangsinmankong N, Loscalzo M, Sleasman JW et Dorsey MJ (2007) Complete DiGeorge syndrome associated with *CHD7* mutation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120: 952-954.
- Sanlaville D, Etchevers HC, Gonzales M, Martinovic J, Clement-Ziza M, Delezoide AL, Aubry MC, Pelet A, Chemouny S, Cruaud C, et al. (2006) Phenotypic spectrum of CHARGE syndrome in fetuses with

CHD7 truncating mutations correlates with expression during human development. *Journal of Medical Genetics* 43: 211-217.

Sanlaville D et Verloes A (2007) CHARGE syndrome: an update. *European Journal of Human Genetics* 15: 389-399.

Santagati F et Rijli FM (2003) Cranial neural crest and the building of the vertebrate head. *Nature Reviews Neuroscience* 4: 806-818.

Sarshad AA, Juan AH, Muler AIC, Anastasakis DG, Wang X, Genzor P, Feng X, Tsai PF, Sun HW, Haase AD, et al. (2018) Argonaute-miRNA complexes silence target mRNAs in the nucleus of mammalian stem cells. *Molecular Cell* 71: 1040-1050 e1048.

Sasaki T, Shiohama A, Minoshima S et Shimizu N (2003) Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome. *Genomics* 82: 323-330.

Savige J, Sheth S, Leys A, Nicholson A, Mack HG et Colville D (2015) Ocular features in Alport syndrome: pathogenesis and clinical significance. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 10: 703-709.

Sayed M, Kim SO, Salh BS, Issinger OG et Pelech SL (2000) Stress-induced activation of protein kinase CK2 by direct interaction with p38 mitogen-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 275: 16569-16573.

Schilling TF et Le Pabic P (2014) Neural crest cells in craniofacial skeletal development. Dans *Neural Crest Cells*. Elsevier.

Schnetz MP, Bartels CF, Shastri K, Balasubramanian D, Zentner GE, Balaji R, Zhang X, Song L, Wang Z, Laframboise T, et al. (2009) Genomic distribution of *CHD7* on chromatin tracks H3K4 methylation patterns. *Genome Research* 19: 590-601.

Schnetz MP, Handoko L, Akhtar-Zaidi B, Bartels CF, Pereira CF, Fisher AG, Adams DJ, Flicek P, Crawford GE, Laframboise T, et al. (2010) CHD7 targets active gene enhancer elements to modulate ES cell-specific gene expression. *PLoS Genetics* 6: e1001023.

- Schraivogel D et Meister G (2014) Import routes and nuclear functions of Argonaute and other small RNA-silencing proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 39: 420-431.
- Schraivogel D, Schindler SG, Danner J, Kremmer E, Pfaff J, Hannus S, Depping R et Meister G (2015) Importin-beta facilitates nuclear import of human GW proteins and balances cytoplasmic gene silencing protein levels. *Nucleic Acids Research* 43: 7447-7461.
- Schussler O, Gharibeh L, Mootoosamy P, Murith N, Tien V, Rougemont AL, Sologashvili T, Suuronen E, Lecarpentier Y et Ruel M (2021) Cardiac neural crest cells: Their rhombomeric specification, migration, and association with heart and great vessel anomalies. *Cellular and Molecular Neurobiology* 41: 403-429.
- Scott DA et Sherr EH (2019) RERE-related disorders.
- Seroby V, Kontarakis Z, El-Brolosy MA, Welker JM, Tolstenkov O, Saadeldein AM, Retzer N, Gottschalk A, Wehman AM et Stainier DY (2020) Transcriptional adaptation in *Caenorhabditis elegans*. *Elife* 9:
- Sharma NR, Wang X, Majerciak V, Ajiro M, Kruhlak M, Meyers C et Zheng ZM (2016) Cell type- and tissue context-dependent nuclear distribution of human AGO2. *Journal of Biological Chemistry* 291: 2302-2309.
- Shen J, Chen X, Hendershot L et Prywes R (2002) ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Developmental Cell* 3: 99-111.
- Shyamala K, Yanduri S, Girish HC et Murgod S (2015) Neural crest: The fourth germ layer. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology* 19: 221-229.
- Siebert JR, Graham JM, Jr. et MacDonald C (1985) Pathologic features of the CHARGE association: support for involvement of the neural crest. *Teratology* 31: 331-336.
- Simoës-Costa M et Bronner ME (2015) Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. *Development* 142: 242-257.

- Skarnes WC, von Melchner H, Wurst W, Hicks G, Nord AS, Cox T, Young SG, Ruiz P, Soriano P, Tessier-Lavigne M, et al. (2004) A public gene trap resource for mouse functional genomics. *Nature Genetics* 36: 543-544.
- Smith RS, Roderick TH et Sundberg JP (1994) Microphthalmia and associated abnormalities in inbred black mice. *Laboratory Animal Science* 44: 551-560.
- Snijders Blok C, Corsten-Janssen N, FitzPatrick DR, Romano C, Fichera M, Vitello GA, Willemsen MH, Schoots J, Pfundt R, van Ravenswaaij-Arts CM, et al. (2014) Definition of 5q11.2 microdeletion syndrome reveals overlap with CHARGE syndrome and 22q11 deletion syndrome phenotypes. *American Journal of Medical Genetics Part A* 164A: 2843-2848.
- Sohn YB, Ko JM, Shin CH, Yang SW, Chae JH et Lee KA (2016) Cerebellar vermis hypoplasia in CHARGE syndrome: clinical and molecular characterization of 18 unrelated Korean patients. *Journal of Human Genetics* 61: 235-239.
- Sommer L (2011) Generation of melanocytes from neural crest cells. *Pigment Cell & Melanoma Research* 24: 411-421.
- Song X, Wang X, Ding L, He D, Sun J, Xi N, Yin Y, Peng H et Sun L (2020) Identification of a novel heterozygous missense mutation of *SEMA3E* (c.1327G>A; p. Ala443Thr) in a labor induced fetus with CHARGE syndrome. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 8: e1034.
- Soret R, Lassoued N, Bonnamour G, Bernas G, Barbe A, Pelletier M, Aichi M et Pilon N (2021) Genetic background influences severity of colonic aganglionosis and response to GDNF enemas in the *Holstein* mouse model of Hirschsprung disease. *International Journal of Molecular Sciences* 22:
- Soret R, Mennetrey M, Bergeron KF, Dariel A, Neunlist M, Grunder F, Faure C, Silversides DW, Pilon N et Ente-Hirsch Study G (2015) A collagen VI-dependent pathogenic mechanism for Hirschsprung's disease. *The Journal of Clinical Investigation* 125: 4483-4496.
- Soto J, Ding X, Wang A et Li S (2021) Neural crest-like stem cells for tissue regeneration. *Stem Cells Translational Medicine* 10: 681-693.
- Spadea L, Maraone G, Verboschi F, Vingolo EM et Tognetto D (2016) Effect of corneal light scatter on vision: a review of the literature. *International Journal of Ophthalmology* 9: 459-464.

- Srinivasan S, Armstrong JA, Deuring R, Dahlsveen IK, McNeill H et Tamkun JW (2005) The *Drosophila trithorax* group protein Kismet facilitates an early step in transcriptional elongation by RNA Polymerase II. *Development* 132: 1623-1635.
- Stahl A, Connor KM, Sapieha P, Chen J, Dennison RJ, Krah NM, Seaward MR, Willett KL, Aderman CM, Guerin KI, et al. (2010) The mouse retina as an angiogenesis model. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 51: 2813-2826.
- Stjernholm C (2003) Aspects of temporal bone anatomy and pathology in conjunction with cochlear implant surgery. *Acta Radiologica* 430: 2-15.
- Strain GM (2015) The genetics of deafness in domestic animals. *Frontiers in Veterinary Science* 2: 29.
- Stromland K, Sjogreen L, Johansson M, Ekman Joelsson BM, Miller M, Danielsson S, Billstedt E, Gillberg C, Jacobsson C, Norinder JA et Granstrom G (2005) CHARGE association in Sweden: malformations and functional deficits. *American Journal of Medical Genetics Part A* 133A: 331-339.
- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES et Mesirov JP (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102: 15545-15550.
- Sugiyama A et Takigawa T (2020) Genetic background influences the capacity for medial edge epithelium disintegration and phenotype of cleft palate in *TGFbeta3* knockout mice. *Journal of Oral Biosciences* 62: 260-266.
- Sullivan KE (2008) Chromosome 22q11.2 deletion syndrome: DiGeorge syndrome/velocardiofacial Syndrome. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 28: 353-366.
- Sun Y, Kumar SR, Wong CED, Tian Z, Bai H, Crump JG, Bajpai R et Lien CL (2022) Craniofacial and cardiac defects in *chd7* zebrafish mutants mimic CHARGE syndrome. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10: 1030587.

- Takada I, Mihara M, Suzawa M, Ohtake F, Kobayashi S, Igarashi M, Youn MY, Takeyama K, Nakamura T, Mezaki Y, et al. (2007) A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signalling suppresses PPAR-gamma transactivation. *Nature Cell Biology* 9: 1273-1285.
- Takeuchi T, Kojima M, Nakajima K et Kondo S (1999) Jumonji gene is essential for the neurulation and cardiac development of mouse embryos with a C3H/He background. *Mechanisms of Development* 86: 29-38.
- Taliaferro JM, Aspden JL, Bradley T, Marwha D, Blanchette M et Rio DC (2013) Two new and distinct roles for Drosophila Argonaute-2 in the nucleus: alternative pre-mRNA splicing and transcriptional repression. *Genes & Development* 27: 378-389.
- Talkowski ME, Rosenfeld JA, Blumenthal I, Pillalamarri V, Chiang C, Heilbut A, Ernst C, Hanscom C, Rossin E, Lindgren AM, et al. (2012) Sequencing chromosomal abnormalities reveals neurodevelopmental loci that confer risk across diagnostic boundaries. *Cell* 149: 525-537.
- Tan NB, Stapleton R, Stark Z, Delatycki MB, Yeung A, Hunter MF, Amor DJ, Brown NJ, Stutterd CA, McGillivray G, et al. (2020) Evaluating systematic reanalysis of clinical genomic data in rare disease from single center experience and literature review. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 8: e1508.
- Tangthirasunun N, Navarro D, Garajova S, Chevret D, Tong LCH, Gautier V, Hyde KD, Silar P et Berrin JG (2017) Inactivation of cellobiose dehydrogenases modifies the cellulose degradation mechanism of *Podospira anserina*. *Applied and Environmental Microbiology* 83:
- Tao J-X, Zhou W-C et Zhu X-G (2019) Mitochondria as potential targets and initiators of the blue light hazard to the retina. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2019: 6435364.
- Tellier AL, Cormier-Daire V, Abadie V, Amiel J, Sigaudy S, Bonnet D, de Lonlay-Debeney P, Morrisseau-Durand MP, Hubert P, Michel JL, et al. (1998) CHARGE syndrome: report of 47 cases and review. *American Journal of Medical Genetics* 76: 402-409.
- Theveneau E, Marchant L, Kuriyama S, Gull M, Moepps B, Parsons M et Mayor R (2010) Collective chemotaxis requires contact-dependent cell polarity. *Developmental Cell* 19: 39-53.

- Theveneau E et Mayor R (2012) Neural crest delamination and migration: from epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration. *Developmental Biology* 366: 34-54.
- Thomas AT, Waite J, Williams CA, Kirk J, Oliver C et Richards C (2022) Phenotypic characteristics and variability in CHARGE syndrome: a PRISMA compliant systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurodevelopmental Disorders* 14: 49.
- Thompson B, Katsanis N, Apostolopoulos N, Thompson DC, Nebert DW et Vasiliou V (2019) Genetics and functions of the retinoic acid pathway, with special emphasis on the eye. *Hum Genomics* 13: 61.
- Tian C, Yu H, Yang B, Han F, Zheng Y, Bartels CF, Schelling D, Arnold JE, Scacheri PC et Zheng QY (2012) Otitis media in a new mouse model for CHARGE syndrome with a deletion in the *Chd7* gene. *PLoS One* 7: e34944.
- Tong AH, Evangelista M, Parsons AB, Xu H, Bader GD, Page N, Robinson M, Raghbizadeh S, Hogue CW, Bussey H, et al. (2001) Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science* 294: 2364-2368.
- Turgeon B et Meloche S (2009) Interpreting neonatal lethal phenotypes in mouse mutants: insights into gene function and human diseases. *Physiological Reviews* 89: 1-26.
- Van Gils J, Magdinier F, Fergelot P et Lacombe D (2021) Rubinstein-Taybi syndrome: A model of epigenetic disorder. *Genes* 12:
- Van Meter TD et Weaver DD (1996) Oculo-auriculo-vertebral spectrum and the CHARGE association: clinical evidence for a common pathogenetic mechanism. *Clinical Dysmorphology* 5: 187-196.
- van Ravenswaaij-Arts C et Martin DM (2017) New insights and advances in CHARGE syndrome: Diagnosis, etiologies, treatments, and research discoveries. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics* 175: 397-406.
- van Zyl T, Yan W, McAdams AM, Monavarfeshani A, Hageman GS et Sanes JR (2022) Cell atlas of the human ocular anterior segment: Tissue-specific and shared cell types. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 119: e2200914119.

- Vaucheret H (2008) Plant Argonautes. *Trends in Plant Science* 13: 350-358.
- Verloes A (2005) Updated diagnostic criteria for CHARGE syndrome: a proposal. *American Journal of Medical Genetics Part A* 133A: 306-308.
- Vermeesch JR, Voet T et Devriendt K (2016) Prenatal and pre-implantation genetic diagnosis. *Nature Reviews Genetics* 17: 643-656.
- Vingerhoets G, Gerrits R et Verhelst H (2021) Atypical brain asymmetry in human situs inversus: gut feeling or real evidence? *Symmetry* 13: 695.
- Vissers LE, van Ravenswaaij CM, Admiraal R, Hurst JA, de Vries BB, Janssen IM, van der Vliet WA, Huys EH, de Jong PJ, Hamel BC, et al. (2004) Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. *Nature Genetics* 36: 955-957.
- Vuorela P, Ala-Mello S, Saloranta C, Penttinen M, Poyhonen M, Huoponen K, Borozdin W, Bausch B, Botzenhart EM, Wilhelm C, et al. (2007) Molecular analysis of the *CHD7* gene in CHARGE syndrome: identification of 22 novel mutations and evidence for a low contribution of large *CHD7* deletions. *Genetics in Medicine* 9: 690-694.
- Walter P et Ron D (2011) The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334: 1081-1086.
- Wang D, Zhang Z, O'Loughlin E, Lee T, Houel S, O'Carroll D, Tarakhovsky A, Ahn NG et Yi R (2012) Quantitative functions of Argonaute proteins in mammalian development. *Genes & Development* 26: 693-704.
- Wang Z, Liu CH, Huang S et Chen J (2019) Assessment and characterization of hyaloid vessels in mice. *Journal of Visualized Experiments*
- Watabe M et Nakaki T (2011) Protein kinase CK2 regulates the formation and clearance of aggresomes in response to stress. *Journal of Cell Science* 124: 1519-1532.

Webster WS, Walsh DA, McEwen SE et Lipson AH (1983) Some teratogenic properties of ethanol and acetaldehyde in C57BL/6J mice: Implications for the study of the fetal alcohol syndrome. *Teratology* 27: 231-243.

Wei W, Ba Z, Gao M, Wu Y, Ma Y, Amiard S, White CI, Rendtlew Danielsen JM, Yang YG et Qi Y (2012) A role for small RNAs in DNA double-strand break repair. *Cell* 149: 101-112.

Weigle J et Bohnsack BL (2020) Genetics underlying the interactions between neural crest cells and eye development. *Journal of Developmental Biology* 8:

Weiss O, Kaufman R, Michaeli N et Inbal A (2012) Abnormal vasculature interferes with optic fissure closure in *lmo2* mutant zebrafish embryos. *Developmental Biology* 369: 191-198.

Wessels K, Bohnhorst B, Luhmer I, Morlot S, Bohring A, Jonasson J, Epplen JT, Gadzicki D, Glaser S, Gohring G, et al. (2010) Novel *CHD7* mutations contributing to the mutation spectrum in patients with CHARGE syndrome. *European Journal of Medical Genetics* 53: 280-285.

White DR, Giambra BK, Hopkin RJ, Daines CL et Rutter MJ (2005) Aspiration in children with CHARGE syndrome. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 69: 1205-1209.

Williams AL et Bohnsack BL (2015) Neural crest derivatives in ocular development: discerning the eye of the storm. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 105: 87-95.

Williams AL et Bohnsack BL (2019) What's retinoic acid got to do with it? Retinoic acid regulation of the neural crest in craniofacial and ocular development. *Genesis* 57: e23308.

Williams AL et Bohnsack BL (2020) The ocular neural crest: specification, migration, and then what? *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8: 595896.

Williams MS (2005) Speculations on the pathogenesis of CHARGE syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A* 133A: 318-325.

Williamson KA et FitzPatrick DR (2014) The genetic architecture of microphthalmia, anophthalmia and coloboma. *European Journal of Medical Genetics* 57: 369-380.

- Wincent J, Holmberg E, Stromland K, Soller M, Mirzaei L, Djureinovic T, Robinson K, Anderlid B et Schoumans J (2008) *CHD7* mutation spectrum in 28 Swedish patients diagnosed with CHARGE syndrome. *Clinical Genetics* 74: 31-38.
- Woda JM, Pastagia J, Mercola M et Artinger KB (2003) Dlx proteins position the neural plate border and determine adjacent cell fates. *Development* 130: 331-342.
- Wong SL et Roth FP (2005) Transcriptional compensation for gene loss plays a minor role in maintaining genetic robustness in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 171: 829-833.
- Woodage T, Basrai MA, Baxevanis AD, Hieter P et Collins FS (1997) Characterization of the CHD family of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94: 11472-11477.
- Wright CG, Brown OE, Meyerhoff WL et Rutledge JC (1986) Auditory and temporal bone abnormalities in CHARGE association. *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology* 95: 480-486.
- Wu J, Yang J, Cho WC et Zheng Y (2020) Argonaute proteins: Structural features, functions and emerging roles. *Journal of Advanced Research* 24: 317-324.
- Wu X, Chen L, Lu W, He S, Li X, Sun L, Zhang L, Wang D, Zhang R, Liu Y, et al. (2022) Discovery of novel variants on the CHD7 gene: A case series of CHARGE syndrome. *Frontiers in Genetics* 13: 852429.
- Xiao F, Gao M, Yang J, He L et Wei H (2021) FAM172A deletion may enhance hepatic steatosis by promoting ER stress. *Digestive Diseases and Sciences* 66: 3054-3061.
- Yao H, Hill SF, Skidmore JM, Sperry ED, Swiderski DL, Sanchez GJ, Bartels CF, Raphael Y, Scacheri PC, Iwase S et Martin DM (2018) CHD7 represses the retinoic acid synthesis enzyme ALDH1A3 during inner ear development. *JCI Insight* 3:
- Yigit E, Batista PJ, Bei Y, Pang KM, Chen CC, Tolia NH, Joshua-Tor L, Mitani S, Simard MJ et Mello CC (2006) Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi. *Cell* 127: 747-757.

- Yoo SH, Lee BH, Moon Y, Spalding MH et Jane JL (2014) Glycogen synthase isoforms in *Synechocystis* sp. PCC6803: identification of different roles to produce glycogen by targeted mutagenesis. *PLoS One* 9: e91524.
- York JR et McCauley DW (2020) The origin and evolution of vertebrate neural crest cells. *Open Biology* 10: 190285.
- Zeiss CJ, Tu DC, Phan I, Wong R et Treuting PM (2018) Special senses: eye. Dans *Comparative Anatomy and Histology*. Elsevier.
- Zeng Y, Petralia RS, Vijayasarathy C, Wu Z, Hiriyanna S, Song H, Wang YX, Sieving PA et Bush RA (2016) Retinal structure and gene therapy outcome in retinoschisin-deficient mice assessed by spectral-domain optical coherence tomography. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 57: OCT277-287.
- Zentner GE, Hurd EA, Schnetz MP, Handoko L, Wang C, Wang Z, Wei C, Tesar PJ, Hatzoglou M et Martin DM (2010a) *CHD7* functions in the nucleolus as a positive regulator of ribosomal RNA biogenesis. *Human Molecular Genetics* 19: 3491-3501.
- Zentner GE, Layman WS, Martin DM et Scacheri PC (2010b) Molecular and phenotypic aspects of *CHD7* mutation in CHARGE syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A* 152A: 674-686.
- Zhang G, Wang X, Rothermel BA, Lavandero S et Wang ZV (2022) The integrated stress response in ischemic diseases. *Cell Death & Differentiation* 29: 750-757.
- Zilova L, Weinhardt V, Tavhelidse T, Schlagheck C, Thumberger T et Wittbrodt J (2021) Fish primary embryonic pluripotent cells assemble into retinal tissue mirroring in vivo early eye development. *Elife* 10: e66998.