



**HAL**  
open science

# Etude des dysmorphoses et de la croissance de la mandibule chez un modèle murin de la dysplasie ectodermique hypohidrotique

Fabien Bornert

► **To cite this version:**

Fabien Bornert. Etude des dysmorphoses et de la croissance de la mandibule chez un modèle murin de la dysplasie ectodermique hypohidrotique. Médecine humaine et pathologie. Université de Strasbourg, 2013. Français. NNT : 2013STRAJ004 . tel-01249523

**HAL Id: tel-01249523**

**<https://theses.hal.science/tel-01249523>**

Submitted on 4 Jan 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

*ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ*

UMR INSERM U1121 - BIOMATÉRIAUX ET INGÉNIERIE TISSULAIRE

**THÈSE**

présentée par

**Fabien BORNERT**

soutenue le : 19 mars 2013

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

Discipline / Spécialité :

Sciences Médicales / Odontologie

**Etude des dysmorphoses et de la croissance  
de la mandibule chez un modèle murin  
de la dysplasie ectodermique hypohidrotique**

**THÈSE dirigée par :**

**M. SCHMITTBUHL Matthieu**

Professeur ; Université de Montréal

**RAPPORTEURS :**

**M. DE GUISE Jacques**

Professeur ; ETS, Université du Québec

**M. FORTIN Thomas**

MCU-PH ; Faculté de Chirurgie-Dentaire, Lyon I

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**MME. BLOCH-ZUPAN Agnès**

PU-PH ; Faculté de Chirurgie-Dentaire, Strasbourg

**M. FRANCK Guy**

Chargé de recherche ; CNRS, Université de Poitiers

**M. FEKI Ahmed**

PU-PH ; Faculté de Chirurgie-Dentaire, Strasbourg

**Monsieur le Professeur Matthieu SCHMITTBUHL**

Vous m'avez fait l'honneur de diriger ce travail. Je trouve ici l'opportunité de vous exprimer ma sincère reconnaissance et mon admiration pour votre implication personnelle d'une grande qualité scientifique dans ce travail, pour le temps que vous y avez consacré, ainsi que pour votre patience et votre énergie.

**Madame le Professeur Jacques De GUISE**

Vous me faites l'honneur d'être le rapporteur de cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde admiration pour votre travail et toute ma reconnaissance pour m'enrichir de votre approche scientifique.

**Monsieur le Docteur Thomas FORTIN**

Vous me faites l'honneur d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance pour votre regard scientifique et clinique porté à ce travail.

**Madame le Professeur Agnès BLOCH-ZUPAN**

Vous me faites l'honneur de participer à ce Jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde considération et de mes remerciements pour le temps consacré à ce travail.

**Monsieur le Docteur Guy FRANK**

Vous me faites l'honneur de participer à ce Jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde considération et de mes remerciements pour l'intérêt porté à ce travail.

**Monsieur le Professeur Ahmed FEKI**

Vous avez suscité chez moi il y a maintenant plus de dix ans le grand intérêt que je porte à la pathologie et la chirurgie buccale. Veuillez trouver ici l'expression de mon admiration, de mes sincères remerciements et de ma profonde gratitude pour votre confiance, votre patience, votre écoute, et votre précieuse aide dans mon parcours depuis le début de mon assistantat hospitalo-universitaire.

**Monsieur le Docteur Philippe CHOQUET**

Vous me faites l'honneur de siéger dans ce Jury. Recevez ici l'expression de mes sincères remerciements pour votre disponibilité et votre contribution majeure à ce travail et pour toutes les discussions passées et à venir. J'admire votre activité et encadrement scientifique ainsi que vos qualités humaines qui font de vous un enseignant hors pair.

A Madame le Professeur Corinne Taddéi et Monsieur le Professeur Youssef Haïkel, Doyen et Doyen Honoraire de la Faculté de Chirurgie Dentaire de Strasbourg, à Madame le Pr Anne-Marie Musset, Chef du Pôle de Médecine et de Chirurgie Bucco-dentaire, merci pour votre soutien.

A Monsieur le Pr André Constantinesco, merci pour votre réflexion, votre rigueur scientifique et votre accueil au sein de votre laboratoire il y a maintenant près de 5 ans. Vous êtes et resterez une référence sur le plan scientifique et humain que je m'efforcerais de suivre tout au long de ma carrière.

A Messieurs les Docteurs Christian Goetz et Jean-Etienne Fabre, merci pour votre sympathie, votre soutien et nos échanges scientifiques.

A Madame le Docteur Fabienne Perrin-Schmitt, merci pour votre soutien, votre sourire et nos débats scientifiques improvisés entre deux portes.

A Messieurs les Docteurs Michel Freymann et Gilbert Lutten Schlager, un grand merci pour votre présence et votre soutien.

A tous mes chers collègues du labo, Jérémy, Franz, Amira, Ilse, Ariane et JP, et en particulier à Catherine-Isabelle, ma super co-thésarde, merci pour votre soutien durant ces trois dernières années et dans les derniers moments difficiles, pour votre aide scientifique et votre bonne humeur.

A tous mes collègues et amis du département de Chirurgie Buccale et de la Faculté, merci pour votre professionnalisme et votre bonne humeur.

A mes collègues du CSD-Colmar et à Monsieur Rumpler, merci pour votre soutien et votre sympathie.

A toute ma chère famille et belle-famille, les grands et les petits. Je ne peux tous vous citer ici, vous avez toujours été à l'écoute et avez été présents à mes côtés. Votre soutien m'a été indispensable durant toutes ces années. Vous m'avez pardonné avec compréhension mes absences durant ces mois difficiles. Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi et surtout pour ce que vous êtes.

A mes chers amis Franz, Sophie, Nico, Marie-Noëlle, Alain, Nadine, Fred, Aurélie, Arnaud, Jean, Isabelle, Ben, Anne-Cat, Anne, Florian, Jérôme, Arno, Cathy, Freddo et tous ceux que je ne peux citer ici...Merci pour votre amitié malgré la distance et mes absences.

A Sébastien, un grand merci du fond du cœur, il comprendra.

A Audrey et bébé Valentine, pour dire que rien ne serait possible sans vous.

# Table des matières

---

Table des matières

Table des illustrations

Table des annexes

**Introduction** ..... p. 1

## **Matériel et méthode**

Modèle murin Tabby ..... p.4

Exploration micro-tomographique du complexe cranio-facial ..... p.5

Imagerie *ex vivo* ..... p.5

Imagerie *in vivo* ..... p.7

Protocole d'anesthésie ..... p.7

Protocole d'acquisition ..... p.7

Procédure de traitement d'images ..... p.9

Extraction du contour mandibulaire ..... p.12

Opérations préalables ..... p.12

Normalisation de la taille ..... p.20

Caractérisation de la forme mandibulaire par analyse de Fourier elliptique ..... p.20

Analyse statistique des descripteurs de Fourier elliptiques ..... p.26

Analyse de la croissance mandibulaire ..... p.27

## **Résultats**

Caractérisation de la forme mandibulaire par analyse elliptique de Fourier ..... p.31

Suivi longitudinal des lignées WT et Tabby ..... p.41

## **Discussion**

Caractérisation des dysmorphoses mandibulaires chez les individus Tabby adultes ..... p.59

Suivi longitudinal des lignées WT et Tabby ..... p. 62

**Conclusions et perspectives** ..... p.66

**Références bibliographiques** ..... p.68

**Annexes** ..... p.73

## Table des illustrations

---

### Figures

Figure 1.	Phénotypes externes des souris WT et Tabby .....	p.6
Figure 2.	Cellule d'anesthésie .....	p.8
Figure 3.	Etapes de segmentation de la mandibule .....	p.10
Figure 4.	Réorientation de l'hémi-mandibule .....	p.11
Figure 5.	Filtrage par lissage de l'image .....	p.13
Figure 6.	Lignes de segmentation .....	p.14
Figure 7.	Dilatation géodésique .....	p.15
Figure 8.	Elimination des éléments dentaires .....	p.16
Figure 9.	Extraction du contour mandibulaire .....	p.17
Figure 10.	Opération d'ébarbulage .....	p.18
Figure 11.	Détermination du point de départ du contour .....	p.11
Figure 12.	Descripteurs elliptiques de Fourier .....	p.24
Figure 13.	Processus de reconstruction du contour mandibulaire .....	p.25
Figure 14.	Mesures linéaires de la mandibule .....	p.29
Figure 15.	Mesure de la rangée dentaire .....	p.30
Figure 16.	Reconstructions pas à pas du contour mandibulaire .....	p.35
Figure 17.	Analyse discriminante des descripteurs elliptiques du contour mandibulaire .....	p.36
Figure 18.	Différences morphologiques entre les individus mâles WT et Ta .....	p.38
Figure 19.	Comparaison morphologique entre un individu mâle WT et hémizygote Ta .....	p.39
Figure 20.	Variation de la taille mandibulaire chez les individus WT et Tabby .....	p.40
Figure 21.	Suivi longitudinal de la masse corporelle des souris .....	p.43

Figure 22.	Suivi longitudinal de la surface latérale projetée de la mandibule .....	p.44
Figure 23.	Suivi longitudinal de la longueur mandibulaire .....	p.45
Figure 24.	Suivi longitudinal de la hauteur mandibulaire .....	p.46
Figure 25.	Suivi longitudinal de la largeur de la branche mandibulaire .....	p.47
Figure 26.	Suivi longitudinal de la surface de la branche mandibulaire .....	p.48
Figure 27.	Variations intra-groupes de la surface mandibulaire .....	p.49
Figure 28.	Variations intra-groupes de la longueur mandibulaire .....	p.50
Figure 29.	Variations intra-groupes de la hauteur mandibulaire .....	p.51
Figure 30.	Variations intra-groupes de la largeur de la branche mandibulaire .....	p.52
Figure 31.	Variations intra-groupes de la surface de la branche mandibulaire .....	p.53
Figure 32.	Représentation log-log des variations de surface mandibulaire .....	p.54
Figure 33.	Représentation log-log des variations de longueur mandibulaire.....	p.55
Figure 34.	Représentation log-log des variations de hauteur mandibulaire .....	p.56
Figure 35.	Variations inter et intra-groupes de la longueur de la rangée dentaire.....	p.58

## **Tableaux**

Tableau 1.	Descripteurs elliptiques de Fourier des contours mandibulaires .....	p. 34
Tableau 2.	Résultats de la procédure de classification et de la validation croisée.....	p.37
Tableau 3.	Analyse discriminante des descripteurs elliptiques .....	p.37
Tableau 4.	Synthèse des régressions linéaires .....	p.57

## Table des annexes

---

Annexe 1.	Comparaisons inter-observateurs des mesures mandibulaires .....	p.73
Annexe 2.	Comparaison droite-gauche d'hémi-mandibules.....	p.74
Annexe 3.	Suivi individuel de la masse corporelle .....	p.75
Annexe 4.	Suivi individuel de la surface mandibulaire .....	p.76
Annexe 5.	Suivi individuel de la hauteur mandibulaire .....	p.77
Annexe 6.	Suivi individuel de la longueur mandibulaire .....	p.78
Annexe 7.	Suivi individuel de la largeur de la branche mandibulaire .....	p.79
Annexe 8.	Suivi individuel de la surface de la branche mandibulaire .....	p.80
Annexe 9.	Description du microscanner eXplore 120 .....	p.81
Annexe 10.	Communications.....	p.83
Annexe 11.	Article publié : <i>Front in Physio</i> .....	p.84

## INTRODUCTION

Les dysplasies ectodermiques forment un large groupe de pathologies du développement ectodermique, caractérisées par un spectre phénotypique associant oligodontie, hypotrichose, agénésies-dystrophies des glandes exocrines. La dysplasie ectodermique hypohidrotique liée à l'X (DEX / OMIM 305100) représente la forme majoritaire des dysplasies ectodermiques hypohidrotiques (Mortier et Wackens, 2004 ; Priolo et Lagana, 2001). Sur le plan moléculaire, ce syndrome est lié à des mutations impliquant les gènes de la voie Ectodysplasine (EDA)-NF- $\kappa$ B (Smahi *et al.*, 2002). La protéine EDA appartient à la superfamille des TNF (Tumor necrosis factor) et existent sous deux isoformes (EDA1 et EDA2) liées à un splicing alternatif (Hashiguchi *et al.*, 2003). La carte d'expression de l'ARN messager de l'ectodysplasine a été au départ étudiée dans l'épithélium des dents, des cheveux, des glandes lacrymales et du cerveau en développement (Montonen *et al.*, 1998 ; Mikkola et Thesleff, 2003).

Les manifestations cranio-faciales et dentaires les plus connues et les plus fréquemment décrites dans cette maladie sont les suivantes : hypoplasie du maxillaire avec réduction en hauteur et en longueur de cette structure, réduction de la longueur de la mandibule qui présente, malgré l'hypoplasie maxillaire, un prognathisme relatif par rapport à ce dernier, croissance anormale de la base du crâne, et réduction globale de la hauteur de la face (Ruhin *et al.*, 2001 ; Bondarets *et al.*, 2002). Sur le plan dentaire, des anomalies de forme et de nombre sévères font partie du tableau phénotypique associé à ce syndrome (Clauss *et al.*, 2008). La texture osseuse semble également affectée avec un aspect ostéopétrotique plus ou moins marqué retrouvé aussi bien au niveau des structures osseuses crânio-faciales que du squelette post-crânien (Hill *et al.*, 2002).

Le modèle murin Tabby (mutation du gène *Ta*) exprime l'équivalent phénotypique de la DEX pour ce qui a été étudié jusqu'alors (Srivastava *et al.*, 1997). Si le rôle d'EDA chez l'homme et la mutation *Ta* chez la souris Tabby ont fait l'objet de nombreuses études à propos du développement et de la morphologie dentaire notamment vis-à-vis de la compréhension des interactions épithélio-mésenchymateuses lors de l'ontogenèse, leur rôle morphogène est très peu évoqué dans la littérature, et leur implication dans le développement du complexe cranio-facial reste à préciser.

La mandibule, qui a déjà fait l'objet de nombreuses études chez d'autres modèles murins (Richtsmeier *et al.*, 2000 ; Klingenberg et Leamy, 2001 ; Klingenberg *et al.*, 2001 ; Renaud *et al.*, 2007) semble constituer une structure intéressante pour étudier la fonction d'un gène sur la morphogenèse. Des corrélations génotype-phénotype et des relations phylogénétiques ont pu ainsi être mises en évidence à partir de sa caractérisation. Plusieurs gènes impliqués respectivement dans la morphogenèse de différentes parties de la mandibule ont pu être identifiés (Klingenberg *et al.*, 2001 ; Chai et Maxson, 2006). Cependant, jusqu'à ce jour, le rôle du gène *Ta* dans la morphogenèse mandibulaire n'a pas été considéré, aucune étude quantitative de la morphologie mandibulaire n'ayant été entreprise sur le modèle murin Tabby et aucun rapprochement avec les manifestations observées chez les personnes atteintes de DEH n'a été réalisé.

A côté des approches de biologie moléculaire, les approches morphologiques apparaissent ainsi pertinentes et complémentaires pour l'étude des phénomènes de croissance et de morphogenèse sur des modèles murins de maladies humaines associées à des syndromes dysmorphiques et ceci dans le but de mieux comprendre la fonction et/ou l'influence éventuelle de la mutation d'un gène lors du développement. Ces analyses morphologiques peuvent notamment être mises en œuvre grâce à des acquisitions réalisées par des modalités d'imagerie de plus en plus performantes compte tenu des contraintes imposées par la petite taille des modèles murins étudiés.

L'objectif principal de ce travail de recherche a été de détecter l'existence de dysmorphoses mandibulaires au sein du modèle murin de la DEX et de les caractériser. Une ambition supplémentaire de ce projet a été de comprendre, à partir d'un suivi longitudinal d'individus Tabby, quand et comment ces dysmorphoses mandibulaires s'installent au cours de la croissance. L'enjeu de ce travail de recherche était en effet d'apporter les caractérisations phénotypiques permettant de mieux cerner les effets des mutations du gène *Ta* sur la morphologie mandibulaire et de préciser plus largement le rôle de ce gène dans la morphogenèse cranio-faciale. Notre objectif a été également de trouver un parallélisme phénotypique entre modèle murin et espèce humaine au niveau mandibulaire. Même si d'autres convergences ont déjà été décrites, notamment au niveau dentaire, cette démarche n'a pas été entreprise à ce jour pour la mandibule.

Afin de tenter de répondre à cette problématique, une approche méthodologique totalement inédite associant acquisitions micro-CT performantes ( $\mu$ -CT), procédures de traitement d'images

particulièrement sophistiquées et analyses morphométriques originales à un suivi longitudinal de cohortes d'individus Tabby et Wild-type sur plus d'une année a été mise en œuvre.

## MATERIEL ET METHODES

### Modèle murin Tabby

Le modèle murin Tabby étudié était porteur de l'allèle  $Eda^{Ta}$  nul du gène *EDA*, transmis par le chromosome X. La mutation  $Ta$  résultait d'une délétion de 2 kilo-paires de bases incluant l'exon 1 de la région codante. Les souris  $Ta$  ont été générées par des croisements au sein de la souche B6CBACa Aw-J/A- $Eda^{Ta}$ /J-XO (Jackson Laboratory, USA). Le phénotype a été identifié selon des critères morphologiques externes : alopecie en patch derrière les oreilles, déformations de l'extrémité distale de la queue pour les mâles hémizygotes ( $Eda^{Ta/Y}$ ), rayures de la fourrure pour les femelles hétérozygotes  $Eda^{Ta/+}$ . (figure 1).

Les souris WT étudiées, étaient issues de croisements dérivés de la souche B6129PF2/J considérée comme contrôle pour les souches désignées par B6.

Les lignées de souris ont été génotypées conformément aux protocoles publiés par Bourgeois *et al.* (1998). Une amplification PCR utilisant des oligonucléotides spécifiques sens et réverses ou antisens (3F-7R, 6F-8R, and 5F-6R), dérivés de -3 to +1,9 kb de la séquence génomique murine entourant l'exon 1 du gène *Eda* WT a été réalisée. La présence d'une délétion au sein de l'exon 1 du gène *Eda* a été observée chez les individus  $Ta$ , les primers 6F-8R ne permettant l'amplification que chez les individus WT et femelles hétérozygotes. Le génotype attendu de chaque souris  $Ta$  a été confirmé par l'absence de fragments induits par 5F-6R chez les mâles  $Ta$ .

Pour l'analyse des dysmorphoses mandibulaires chez les individus adultes  $Ta$ , l'échantillon étudié comprenait 74 spécimens : 15 mâles hémizygotes ( $Eda^{Ta/Y}$ ), 24 femelles hétérozygotes ( $Eda^{Ta/+}$ ), et 35 souris contrôles WT (19 mâles, 16 femelles). Tous ces individus étaient des adultes âgés d'environ 3 mois.

Les souris ont été sacrifiées par une injection intrapéritonéale létale de pentobarbital. Le protocole a été établi conformément aux recommandations françaises pour la prise en charge des animaux de laboratoire. Les animaux ont été fixés en solution pendant 15 jours par un mélange 1:10 d'une solution à 37% de formol, 3:4 d'une solution à 100% d'éthanol et 3:20 d'eau distillée.

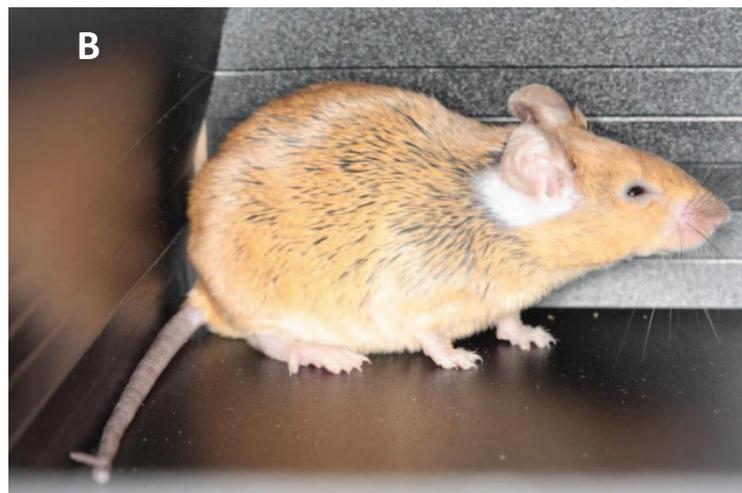
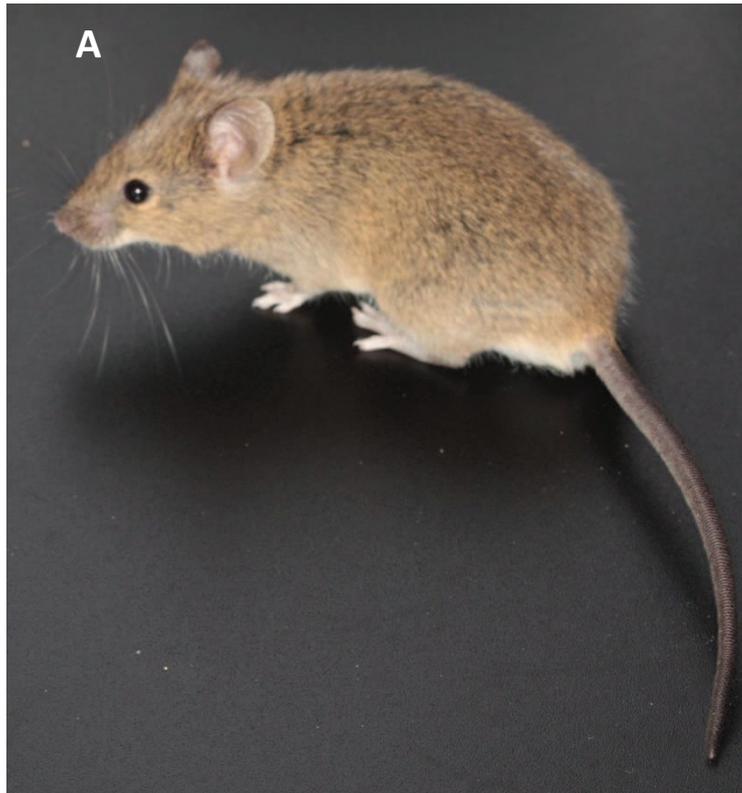
Dans le cadre du suivi longitudinal des groupes mâles et femelles WT,  $Eda^{Ta/Y}$ ,  $Eda^{Ta/+}$ , un couple fondateur a permis de constituer une lignée au sein du laboratoire et a donné naissance à plusieurs générations. Les souris WT étaient également issues d'animaux de type sauvage de la lignée B6129PF2/J considérée comme le contrôle pour les lignées désignées par B6. Toutes les souris ont été élevées dans des conditions standard avec eau et alimentation à volonté.

Au total, 23 individus ont pu être suivi dans le cadre de cette étude : 5 mâles hémizygotes, ( $Eda^{Ta/Y}$ ), 6 femelles hétérozygotes ( $Eda^{Ta/+}$ ), 12 souris WT (7 mâles, 5 femelles). Tous les individus ont été prélevés après la période de sevrage entre la 4<sup>ème</sup> et la 5<sup>ème</sup> semaine et le suivi par micro-CT de la croissance mandibulaire a été réalisé jusqu'à l'âge adulte. Au cours de la 1<sup>ère</sup> année de suivi, 4 individus (1 par groupe) ont été perdus par mort naturelle. Le phénotype était identifié selon les mêmes critères morphologiques externes que précédemment (Figure 1).

## **Exploration micro-tomographique (micro-CT) du complexe cranio-facial**

### *Imagerie ex vivo*

L'imagerie *ex vivo* des têtes entières a été réalisée à l'aide du système de micro-tomographie eXplore CT 120, GE Healthcare, Waukesha, WI, USA. Toutes les explorations de micro-tomographie ont été réalisées au sein du laboratoire « Imagerie Préclinique UF 62-37 », Service de Biophysique et de Médecine Nucléaire, Hôpital de Hautepierre (Dr Philippe Choquet et Pr André Constantinesco). Le protocole d'acquisition comprenait 360 projections sur 360°. Les paramètres d'acquisition étaient de 100 kV, 50,0 mA et 20 ms d'exposition par projection. La durée totale d'acquisition par spécimen était inférieure à 4 minutes. Les reconstructions volumiques ont été obtenues par rétroprojection filtrée selon un algorithme de Feldkamp prenant en compte la conicité du faisceau de rayons X. Les voxels reconstruits étaient isotropes et présentaient une longueur d'arête de 50  $\mu\text{m}$ . Toutes ces opérations ont été effectuées dans l'environnement logiciel du micro-scanner eXplore speCZT Vision 120.



**Figure 1.**

Phénotypes externes des souris WT et Tabby. A. Individu WT mâle avec un pelage agouti.

B. Individu Tabby mâle caractérisé par une absence de pelage derrière les oreilles, une extrémité de queue en « Z » et des phalanges d'aspect longiligne.

## *Imagerie in vivo*

### Protocole d'anesthésie

Dans le cadre du suivi longitudinal de chaque spécimen, un protocole d'anesthésie a été utilisé pour la réalisation des examens micro-CT. L'animal a tout d'abord été placé dans une chambre d'induction anesthésique ventilée par un mélange oxygène-isoflurane à 3-4% durant quelques minutes. L'isoflurane est un gaz volatil de type éther halogéné, Il est bien toléré, et permet à l'animal de conserver une ventilation spontanée tout en ayant un effet narcotique suffisant pour le maintenir immobile pendant toute la durée de l'examen. Une fois l'animal endormi dans la chambre d'induction, il était sorti pour être délicatement posé sur une table chauffée munie d'un masque fournissant un mélange gazeux air-isoflurane 2%.

Un transfert de l'animal dans une cellule d'imagerie (Minerve<sup>MD</sup>, Esternay, France) dédiée au micro-CT (figure 2A) était ensuite effectué. La tête était placée dans un masque anesthésique où une encoche permettait de caler les incisives supérieures. L'axe cranio-caudal de l'animal était aligné avec l'axe longitudinal de la de la cellule d'imagerie. La cellule était munie de plusieurs raccords pour le passage du gaz anesthésique et de l'air chauffé ; le chauffage de la cellule à 37°C étant indispensable pour maintenir l'homéostasie de l'animal. La cellule était ensuite fermée et l'animal laissé plusieurs minutes afin d'atteindre l'équilibre thermique. La cellule était alors déconnectée de la table de préparation pour être rapidement raccordée aux dispositifs du micro-scanner (figure 2B).

Une fois l'acquisition terminée, une procédure de réveil était mise en œuvre. Tous les animaux ont été traités selon le même protocole anesthésique.

### Protocole d'acquisition

Une acquisition micro-CT *in vivo* corps entier a été réalisée avec le même dispositif que précédemment (eXplore CT 120, GE Healthcare, Waukesha, WI, USA). Le protocole d'acquisition comprenait 360 projections sur 360°. Les paramètres d'acquisition étaient de 80 kV, 32 mA et 16 ms d'exposition en mode pulsé par projection. La durée totale d'acquisition par spécimen était d'environ 4 minutes.



**Figure 2.**

Imagerie in vivo : procédure d'anesthésie. A. Cellule d'imagerie (Minerve<sup>MD</sup>, Esternay, France) dédiée au micro-CT. La tête de l'animal est placée dans un masque d'anesthésie. L'axe du corps de l'animal est aligné avec l'axe longitudinal de la cellule. B. Transfert de la cellule dans le micro-CT et connexion au dispositif d'anesthésie du micro-CT.

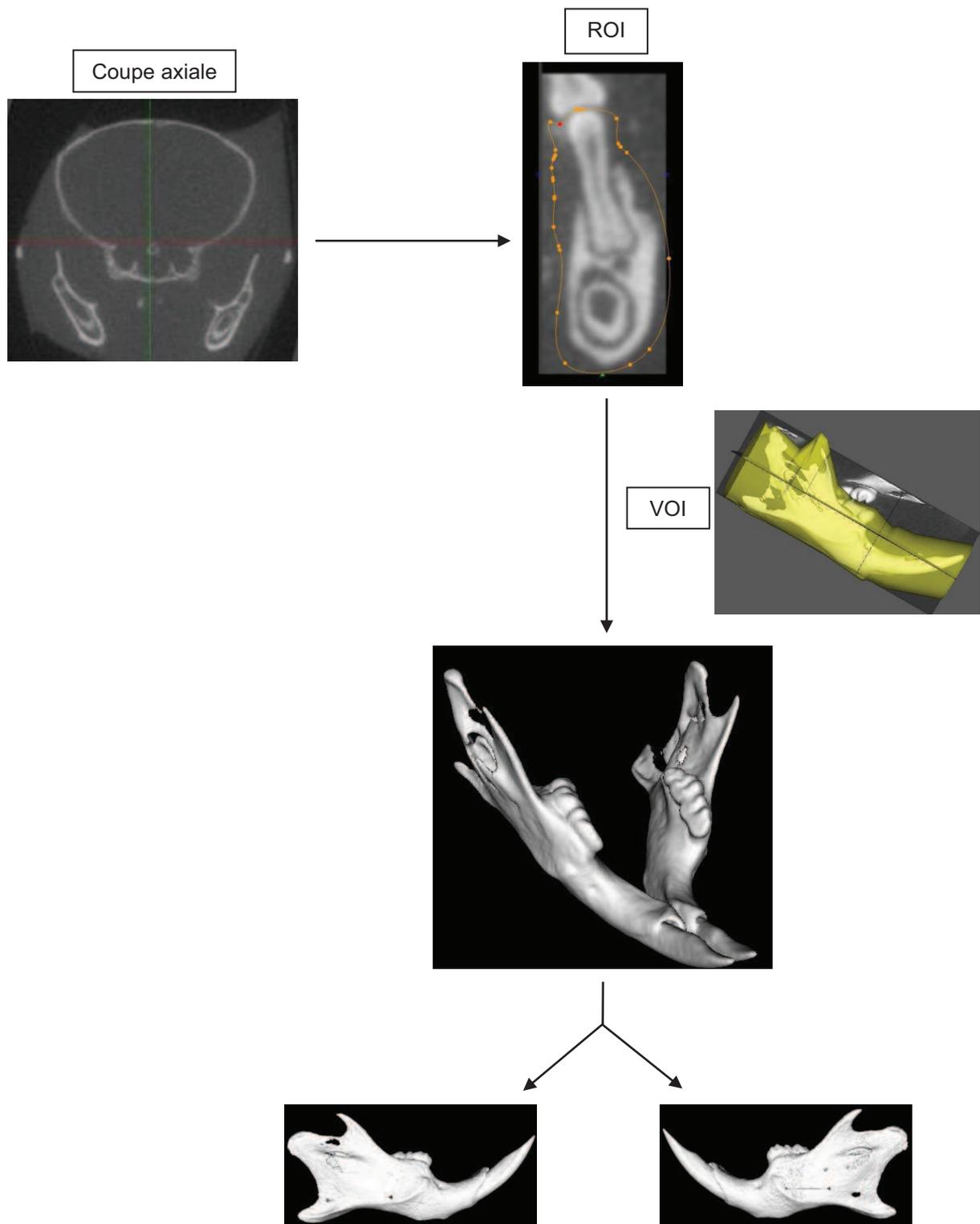
Les examens étaient répétés toutes les semaines entre le 1<sup>er</sup> et le 4<sup>ème</sup> mois puis tous les 15 jours entre les 5<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> mois et enfin tous les 3 mois au-delà du 6<sup>ème</sup> mois. Au total, ce sont plus de 500 examens qui ont été réalisés.

Les reconstructions volumiques ont été obtenues par rétroprojection filtrée selon la même approche que précédemment. Les voxels reconstruits étaient isotropes et présentaient une longueur d'arête de 100 µm.

### **Procédure de traitement d'images**

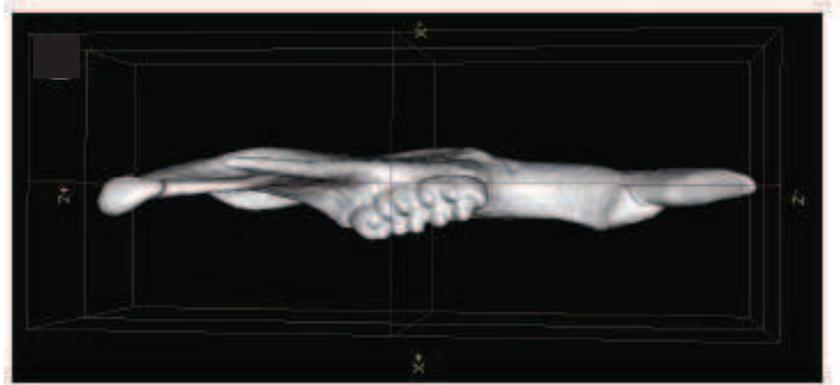
Les premières étapes de post-traitement et de visualisation ont été réalisées avec le logiciel MicroView® (GE Healthcare, Waukesha, WI, USA, <http://sourceforge.net/>). Une segmentation par région d'intérêt (ROI) a été mise en œuvre. A partir de coupes micro-CT axiales, une région d'intérêt correspondant aux structures mandibulaires osseuses et dentaires a été déterminée. La définition de cette ROI permettait de sélectionner un volume mandibulaire comprenant l'ensemble des voxels connexes selon une direction orthogonale au plan de coupe axial (figure 3). Les différentes ROI ont ensuite été réunies afin d'obtenir un volume d'intérêt (VOI) correspondant à l'ensemble de la mandibule (figure 3). Le VOI mandibulaire a été ensuite segmenté en deux VOI cubiques, chacun contenant une hémi-mandibule (figure 3).

Une seule hémi-mandibule a été retenue pour les analyses ultérieures. La reconstruction isosurfacique de chaque hémi-mandibule a été générée par «marching cube algorithm» (Lorenson et Cline, 1987) en choisissant un seuil de 600 HU (unités Hounsfield) (figure 3), le microCT étant calibré en HU. Chaque hémi-mandibule a été alignée verticalement selon un plan sagittal, le plan mandibulaire étant orienté horizontalement (figure 4).



**Figure 3.**

Segmentation de la mandibule à partir de régions d'intérêt (ROI) et de volumes d'intérêt (VOI).  
 Cette procédure a permis d'isoler les héli-mandibules droite et gauche.



**Figure 4.**

Procédure de réorientation des mandibules.

A. Chaque hémi-mandibule a été alignée verticalement selon un plan sagittal.

B. Position de référence caractérisée par une orientation horizontale du plan mandibulaire.

La suite de la procédure de traitement d'images a été réalisée dans l'environnement du logiciel Visiolog 5.4<sup>MD</sup> (Noesis, Gif sur Yvette, France). A partir de l'image projetée de la mandibule, un filtrage linéaire avec la fonction de voisinage suivante a été appliqué :

$$\begin{array}{ccc} 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \end{array}$$

Cette fonction de voisinage a consisté à remplacer la valeur de chaque point par la moyenne effectuée sur ses premiers voisins (Russ, 2002). L'opération a donc permis d'adoucir les bords de la mandibule (figure 5) ; des artéfacts générés par l'acquisition micro-CT et la reconstruction (composantes spectrales de fréquences élevées) ont pu être enlevés.

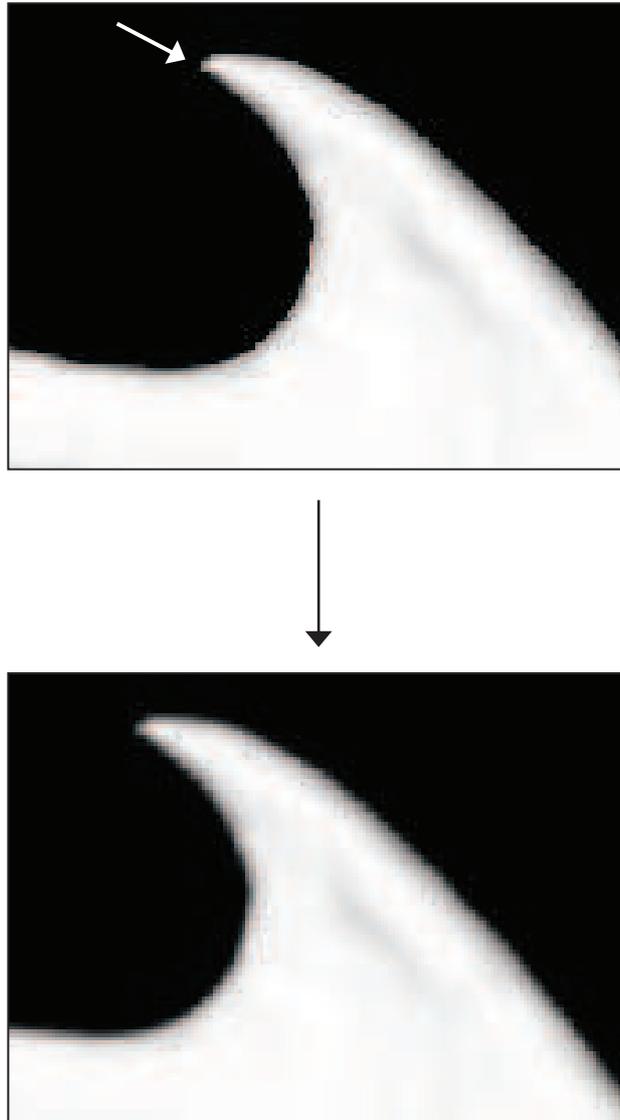
La portion osseuse de la mandibule a ensuite été isolée en traçant une ligne de segmentation correspondant à la partie du rebord alvéolaire en regard de la face vestibulaire des molaires et de l'incisive (figure 6).

Une opération de seuillage a ensuite été effectuée, permettant de passer d'une image en niveaux de gris à une image binaire. Les paramètres de rendu volumique (isosurface) étant identiques pour l'ensemble des mandibules étudiées, la valeur de seuillage était constante. Les trous apparaissant au niveau de la mandibule après seuillage ont été éliminés (figure 7) à partir d'une dilatation géodésique de l'inverse de l'image selon l'ensemble complémentaire de l'image initiale (Coster et Chermant, 1985).

## **Extraction du contour mandibulaire**

### *Opérations préalables*

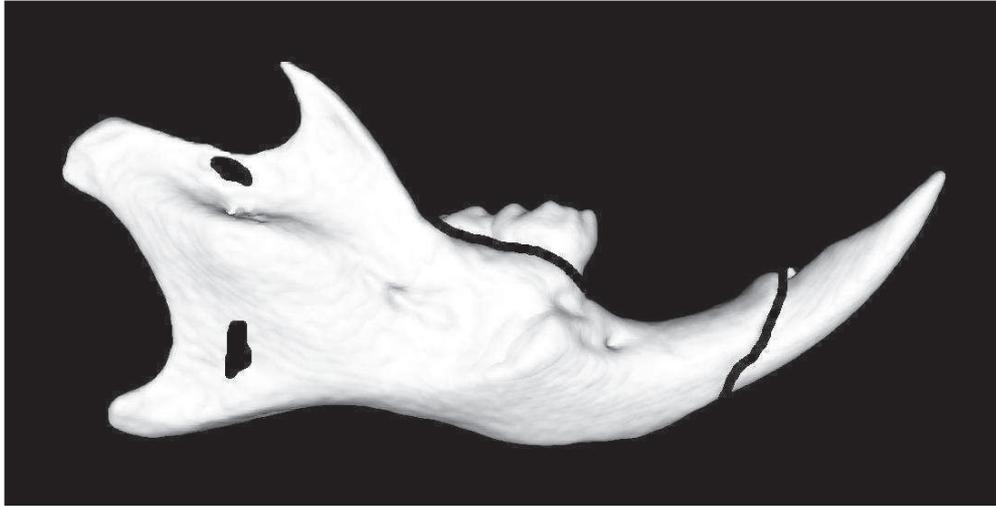
Les portions coronaires des dents considérées ont alors été supprimées à partir d'un algorithme de morphologie mathématique dit de « reconstruction » (Coster et Chermant, 1985). Cet algorithme associe une série d'érosions suivie d'une dilatation géodésique de l'image érodée. La dilatation géodésique a permis de retrouver la portion originale de la mandibule osseuse après suppression des structures dentaires par érosions multiples (figure 8).



**Figure 5.**

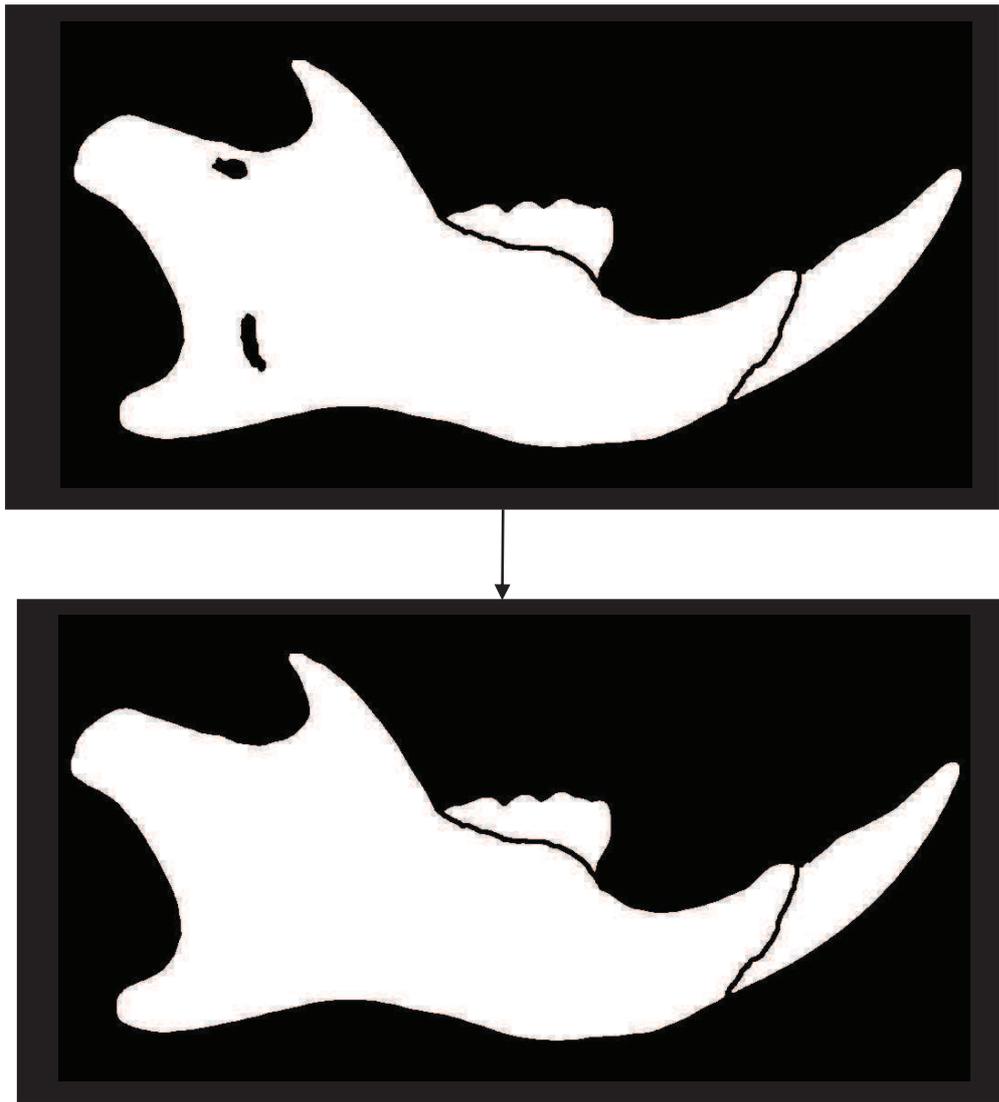
Filtrage par lissage de l'image.

Cette opération d'adoucissement des bords mandibulaires a permis de supprimer les artéfacts générés au cours de l'acquisition et de la reconstruction tomographiques.



**Figure 6.**

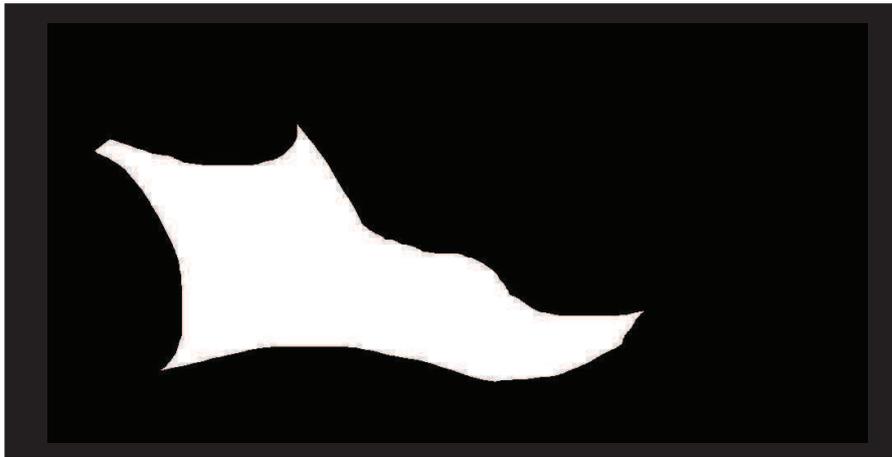
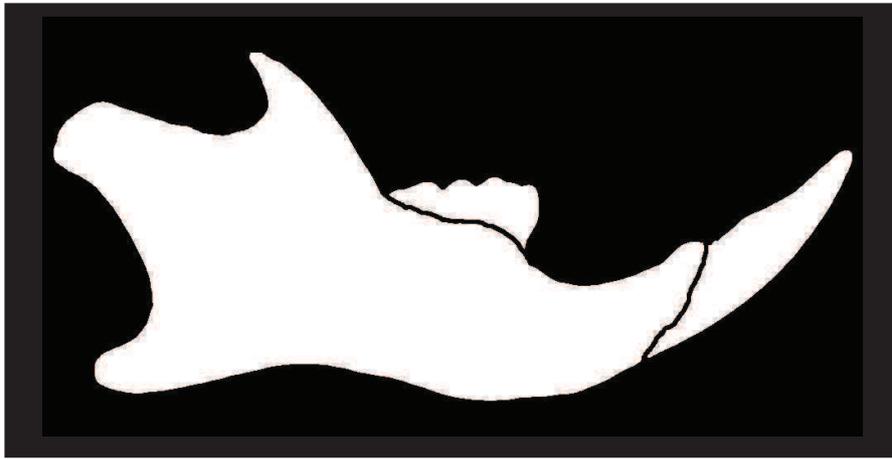
Tracé des lignes de segmentation séparant les éléments dentaires de la mandibule.



**Figure 7.**

Résultats de la dilatation géodésique.

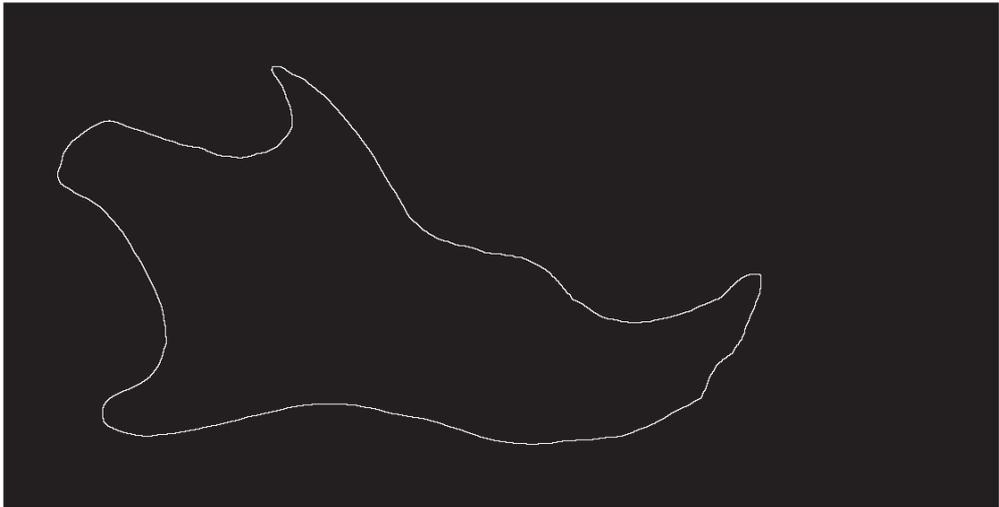
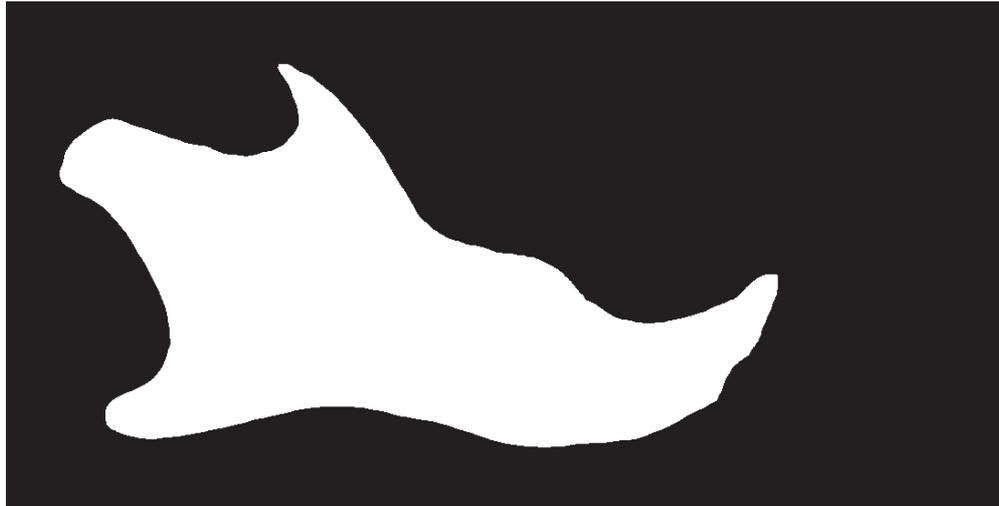
Cette opération a permis de remplir les trous, correspondant en général à des zones osseuses très fines au niveau de la mandibule.



**Figure 8.**

Procédure de reconstruction.

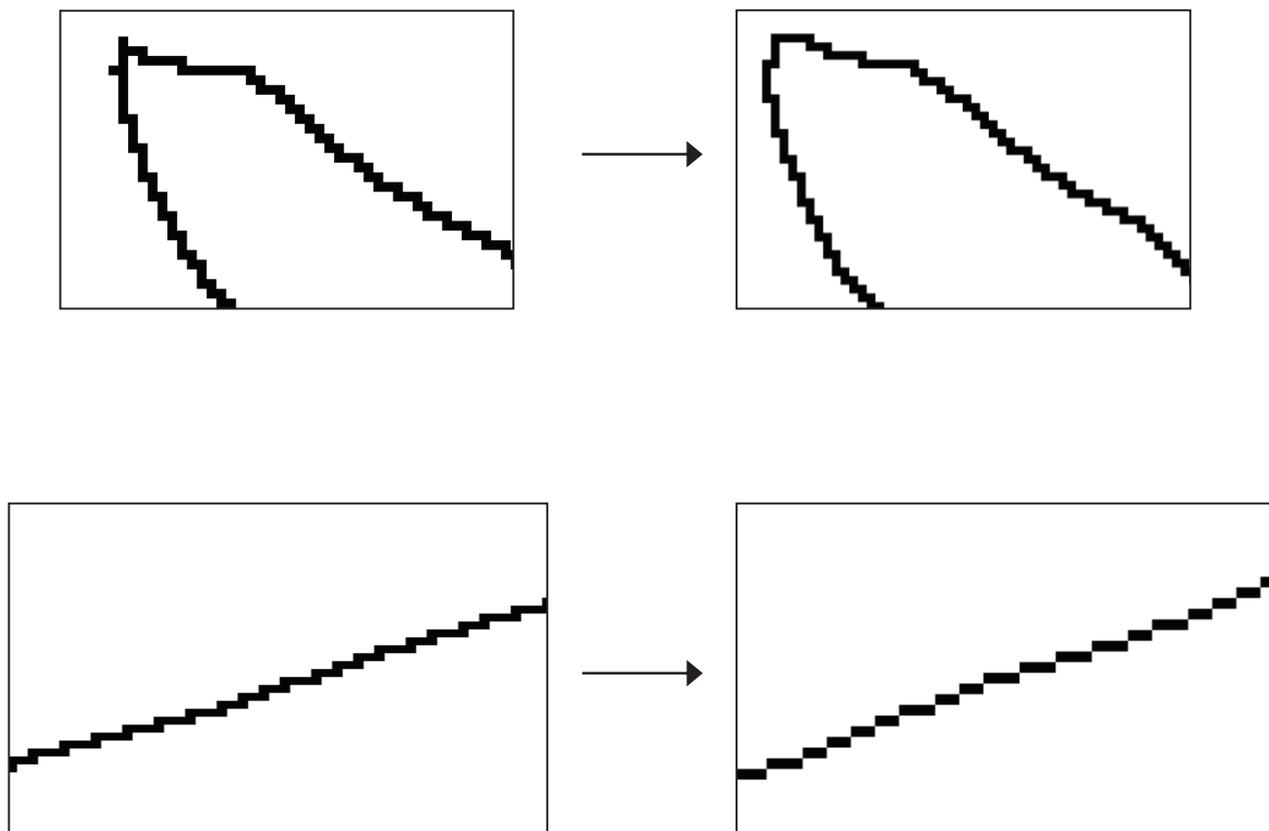
Les éléments dentaires sont éliminés par érosions itératives. La mandibule est ensuite reconstruite à partir d'une dilatation géodésique.



**Figure 9.**

Détection du contour mandibulaire.

Une transformation de voisinage par amincissement a été utilisée pour extraire le contour.



**Figure 10.**

Exemples de suppression des points extrêmes du contour.

Une opération d'ébarbulage est appliquée afin d'obtenir une ligne de contour d'un pixel d'épaisseur.

Chaque hémimandibule pouvant être considérée comme une structure osseuse relativement plane (figure 4A), son contour 2D a pu être extrait à partir de l'image binarisée de cette structure en vue latérale.

La détection du contour mandibulaire a été obtenue par amincissement (figure 9). La configuration de voisinage (V) utilisée pour cette opération était la suivante :

$$\begin{array}{ccc} 1 & 1 & 1 \\ 1 & \bullet & 1 \\ 1 & 1 & 1 \end{array}$$

L'amincissement d'une image (I) par la configuration de voisinage V se définissait de la manière suivante (Coster et Chermant, 1985) :

$$I \circ V = \begin{cases} 0 & \text{si } V_x \in V \\ \text{inchangé} & \text{si } V_x \notin V \end{cases}$$

où  $V_x$  est la configuration de voisinage centrée en x.

Les points extrêmes du contour (figure 10) ont été supprimés par une opération d'ébarbulage (Coster et Chermant, 1985) afin d'obtenir une ligne de contour d'un pixel épaisseur. L'ébarbulage correspond à un amincissement avec la configuration de voisinage suivante :

$$\begin{array}{ccc} 0 & x & x \\ 0 & \bullet & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{array}$$

Cette opération associe itérations des amincissements et rotations successives de la configuration de voisinage jusqu'à obtenir une convergence.

Ce contour mandibulaire pixélisé a ensuite été échantillonné en une série de 512 points exprimés en coordonnées cartésiennes. Pour tous les individus étudiés, une procédure de standardisation du point de départ du contour a été appliquée en désignant la pointe antéro-dorsale de l'os alvéolaire comme le premier point de ce contour (figure 11).

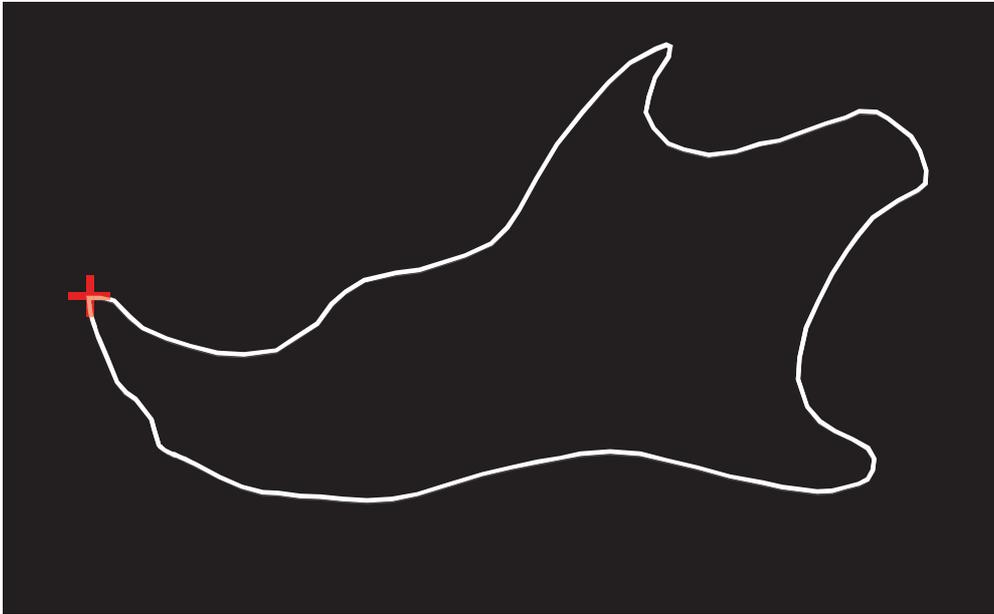
### **Normalisation de la taille**

Les contours mandibulaires ont été étudiés après normalisation de leur taille. Cette procédure consistait à recalculer les contours mandibulaires en utilisant la même surface projetée pour toutes les mandibules.

### **Caractérisation de la forme mandibulaire par analyse de Fourier elliptique**

L'analyse de Fourier elliptique a été utilisée pour caractériser le contour mandibulaire des souris adultes WT et Tabby en s'appuyant sur les développements méthodologiques de Kuhl et Giardina (1982) et Schmittbuhl *et al.* (2003).

Pour réaliser cette analyse, les coordonnées cartésiennes (x,y) des points du contour ont été exprimées en fonction de leur position sur le contour, c'est-à-dire en fonction de leur abscisse curvilinéaire (t). Le contour était donc caractérisé par deux fonctions paramétriques x(t) et y(t). Ces deux fonctions ont ensuite été développées en série de Fourier.



**Figure 11.**

Procédure de standardisation du point de départ du contour. Ce point correspond à la pointe antéro-dorsale de l'os alvéolaire de l'incisive (croix rouge).

$$x_f(t) = a_0 + \sum_{j=1}^k a_j \cos\left(\frac{2j\pi t}{T}\right) + \sum_{j=1}^k b_j \sin\left(\frac{2j\pi t}{T}\right)$$

et

$$y_f(t) = c_0 + \sum_{j=1}^k c_j \cos\left(\frac{2j\pi t}{T}\right) + \sum_{j=1}^k d_j \sin\left(\frac{2j\pi t}{T}\right)$$

où  $a_j, b_j, c_j, d_j$ , les coefficients de Fourier de l'harmonique d'ordre  $j$ , sont obtenus comme suit :

$$a_j = \frac{1}{2j^2\pi^2} \sum_{i=1}^n \frac{\Delta x_i}{\Delta t_i} \cdot \left[ \cos\left(\frac{2j\pi t_i}{T}\right) - \cos\left(\frac{2j\pi t_{i-1}}{T}\right) \right]$$

$$b_j = \frac{1}{2j^2\pi^2} \sum_{i=1}^n \frac{\Delta x_i}{\Delta t_i} \cdot \left[ \sin\left(\frac{2j\pi t_i}{T}\right) - \sin\left(\frac{2j\pi t_{i-1}}{T}\right) \right]$$

$$c_j = \frac{1}{2j^2\pi^2} \sum_{i=1}^n \frac{\Delta y_i}{\Delta t_i} \cdot \left[ \cos\left(\frac{2j\pi t_i}{T}\right) - \cos\left(\frac{2j\pi t_{i-1}}{T}\right) \right]$$

$$d_j = \frac{1}{2j^2\pi^2} \sum_{i=1}^n \frac{\Delta y_i}{\Delta t_i} \cdot \left[ \sin\left(\frac{2j\pi t_i}{T}\right) - \sin\left(\frac{2j\pi t_{i-1}}{T}\right) \right]$$

et les termes constants  $a_0$  et  $c_0$  sont donnés par les formules :

$$a_0 = \frac{1}{T} \sum_{i=1}^n \frac{1}{2} \cdot \frac{\Delta x_i}{\Delta t_i} \cdot (t_i^2 - t_{i-1}^2) - \frac{\Delta x_i}{\Delta t_i} \cdot t_i$$

et

$$c_0 = \frac{1}{T} \sum_{i=1}^n \frac{1}{2} \cdot \frac{\Delta y_i}{\Delta t_i} \cdot (t_i^2 - t_{i-1}^2) - \frac{\Delta y_i}{\Delta t_i} \cdot t_i$$

avec  $j$  = ordre de l'harmonique ;  $k$  = le nombre maximum d'harmoniques utilisés ;  $T$  = le périmètre du contour ;  $\Delta x_i$  = longueur projetée sur l'axe des abscisses du segment compris entre les points  $i$  et  $i + 1$  du contour ;  $\Delta y_i$  = longueur projetée sur l'axe des ordonnées du segment compris entre les points  $i$  et  $i + 1$  du contour ;  $\Delta t_i$  = longueur du segment compris entre les points  $i$  et  $i + 1$  du contour ;  $t_i$  = abscisse curvilinéaire du point  $i$  ;  $n$  = nombre de points du contour échantillonnés.

Le lieu géométrique des points  $(x_i(t), y_i(t))$  issus de la transformation de coordonnées relative à la matrice des coefficients de Fourier de l'harmonique d'ordre  $j$

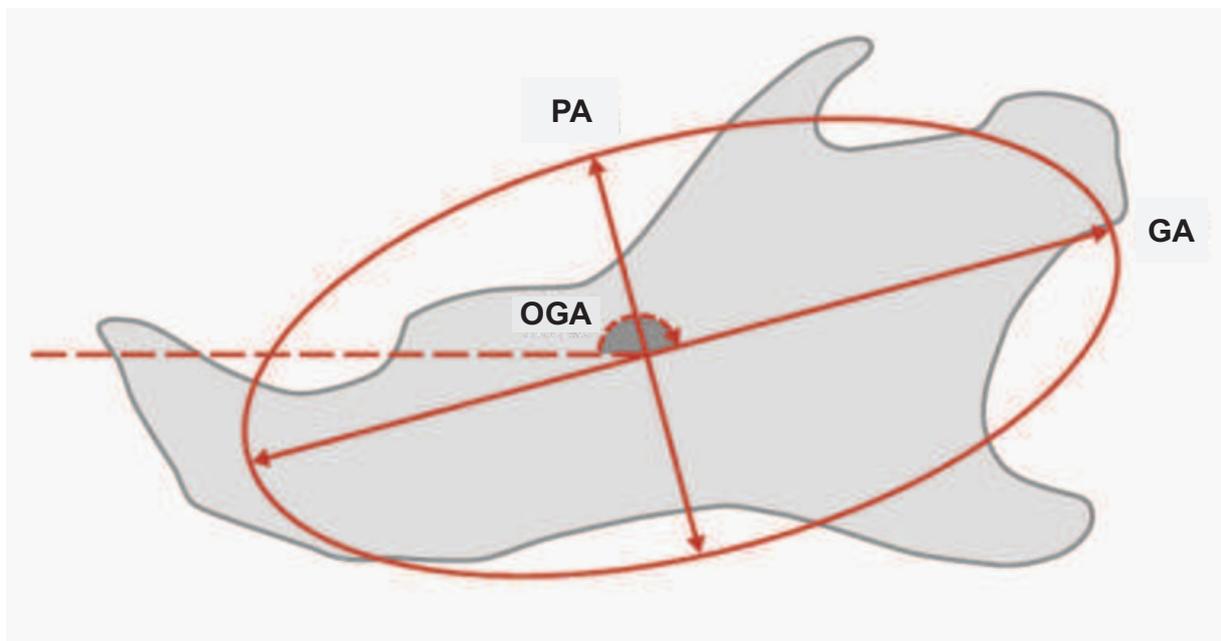
$$\begin{bmatrix} a_j & b_j \\ c_j & d_j \end{bmatrix}$$

correspondait à une ellipse (Schmittbuhl *et al.*, 2003). L'harmonique d'ordre  $j$  pouvait ainsi être caractérisée par 4 paramètres appelés descripteurs elliptiques (figure 12) :

- longueurs du grand axe et du petit axe de la  $j^{\text{ème}}$  ellipse,
- orientation de l'ellipse correspondant à l'orientation du grand axe de cette dernière,
- angle de phase correspondant à la position des points sur la  $j^{\text{ème}}$  ellipse.

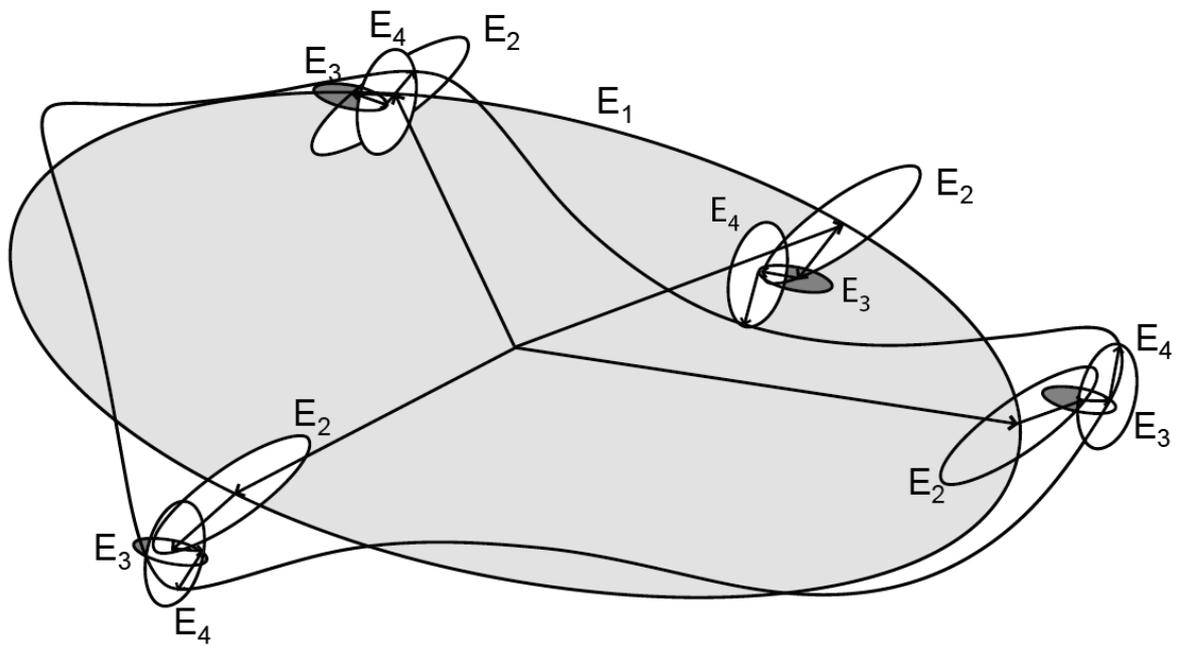
Des reconstructions pas à pas ont été réalisées en utilisant un nombre croissant d'harmoniques. Un indice de convergence, obtenu par la somme des carrés des distances entre le point reconstruit et le point situé sur le contour original, a été calculé pour chaque étape de la reconstruction (Schmittbuhl *et al.*, 2003). Les reconstructions ont été réalisées point par point et correspondaient à une somme vectorielle, chaque vecteur ayant son origine sur le centre de l'ellipse correspondante et son extrémité sur le contour de cette même ellipse (figure 13).

L'échantillonnage des contours, leur normalisation et l'analyse elliptique de Fourier ont été réalisés à l'aide de routines développées en Visual C++ (Schmittbuhl *et al.*, 2003).



**Figure 12.**

Chaque ellipse est caractérisée par géométriquement par trois descripteurs de Fourier elliptiques : longueur du grand axe (GA), longueur du petit axe (PA) et orientation du grand axe (OGA). L'orientation de l'ellipse correspond à l'angle formé par le grand axe et l'axe de référence horizontal correspondant au plan mandibulaire.



**Figure 13.**

Processus de reconstruction du contour mandibulaire. Chaque point du contour est obtenu par sommation vectorielle, chaque vecteur ayant son origine sur le centre de l'ellipse correspondante et son extrémité sur le contour de cette même ellipse (E1 : 1<sup>ère</sup> ellipse ; E2 : 2<sup>ème</sup> ellipse ; E3 : 3<sup>ème</sup> ellipse ; E4 : 4<sup>ème</sup> ellipse de la série de Fourier)

## Analyse statistique des descripteurs de Fourier elliptiques

Les statistiques descriptives (moyenne, écart-type ET) des descripteurs de Fourier elliptiques ont été calculées pour chaque groupe de souris et pour chaque sexe (mâles et femelles WT,  $Eda^{Ta/Y}$ ,  $Eda^{Ta/+}$ ). La normalité des distributions a été vérifiée par un test de Kolmogorov–Smirnov.

Le degré de distinction entre les groupes de souris (WT,  $Eda^{Ta/Y}$ ,  $Eda^{Ta/+}$ ) a été évalué et représenté graphiquement à l'aide d'une analyse discriminante. Les corrélations entre les descripteurs elliptiques et les axes discriminants ont été déterminées. Les distances non biaisées de Mahalanobis  $D^2$  - c'est à dire pondérées en fonction de la taille des échantillons entre les centroïdes de chaque groupe ont été calculées afin d'analyser la variabilité inter-groupes. Une procédure de classification des individus a été réalisée à partir des scores discriminants, suivie d'une validation croisée (Jackknifed procedure) (Everitt and Rabe-Hesketh, 2001). La comparaison de la taille mandibulaire entre les groupes de souris a été calculée par une analyse de la variance (ANOVA). L'homogénéité des variances a été évaluée par un test de Levene. En présence de variances inégales, un test F de Welch était utilisé pour détecter les différences inter-groupes significatives. Une comparaison post hoc par paire a alors été réalisée à l'aide du test de Tukey afin de déterminer quel groupe de souris était statistiquement différent des autres. Toutes ces analyses statistiques ont été effectuées à partir des logiciels Statistica (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) et PAST 1.92 (Hammer *et al.*, 2001).

## Analyse de la croissance mandibulaire

La procédure de post-traitement mise en œuvre (segmentation, rendu isosurfacique, filtrage, seuillage et opérateurs de morphologie mathématique) était identique à celle décrite ci-dessus.

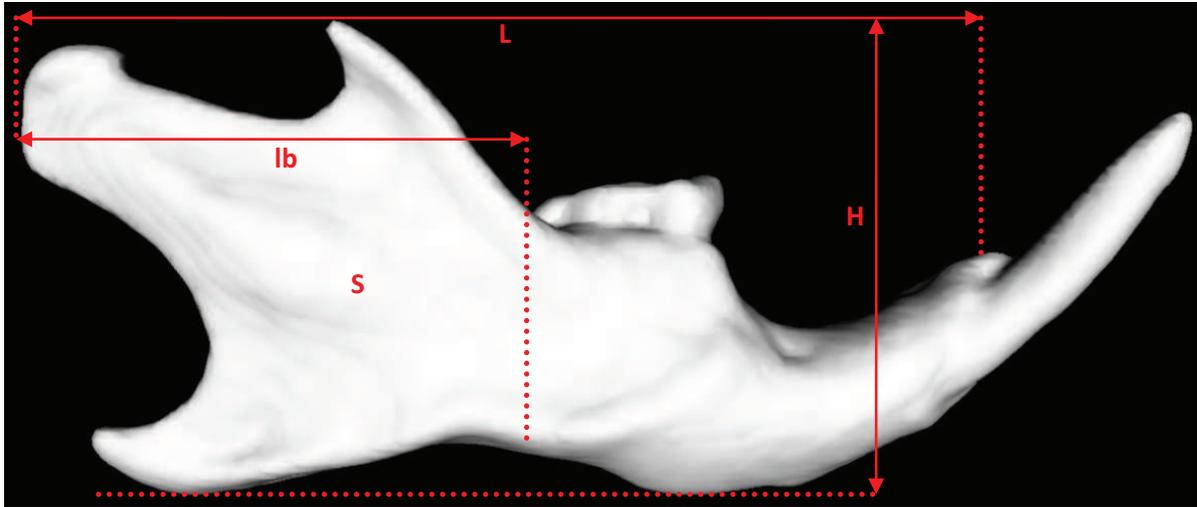
La croissance mandibulaire chez tous les groupes de souris (WT,  $Eda^{Ta/Y}$ ,  $Eda^{Ta/+}$ ) a été étudiée à partir des mesures surfaciques et linéaires suivantes (figure 14).

- Surface mandibulaire (S) : surface de la mandibule projetée en vue latérale ( $\text{mm}^2$ ),
- Hauteur mandibulaire (H) : hauteur mesurée entre le plan mandibulaire et la pointe du processus coronoïde (mm),
- Longueur mandibulaire (L) (mm) : distance horizontale mesurée entre la tangente verticale au processus condyloïde et la pointe antéro-dorsale du rebord alvéolaire en regard de l'incisive,
- Largeur de la branche mandibulaire (lb) : distance horizontale mesurée entre la tangente verticale au processus condyloïde et le point rétromolaire (mm),
- Surface de la branche mandibulaire ( $S_b$ ) de la mandibule : surface de la mandibule située en arrière d'une ligne verticale passant par le point rétromolaire ( $\text{mm}^2$ ).

Des comparaisons droite - gauche d'hémi-mandibules ont été réalisées afin de s'assurer de l'absence de différence gauche-droite. Les variations inter et intra-observateurs des mesures linéaires ont été comparées avec un test de Wilcoxon, ces comparaisons ayant été réalisées pour tous les individus âgés de 11 semaines ou de 12 semaines en fonction des groupes étudiés.

Les variations de chaque mesure surfacique et de chaque mesure linéaire au cours de la croissance ont fait l'objet d'une représentation graphique. Des représentations graphiques en échelle logarithmique (log-log) de chaque mesure surfacique et de chaque mesure linéaire en fonction de la masse relevée au cours du temps ont également été effectuées pour chaque groupe de souris. Des corrélations entre chacune de ces mesures et la masse des individus ont été calculées. A partir d'une estimation des moindres carrés, des droites de régressions linéaires ont été déterminées entre ces mêmes variables.

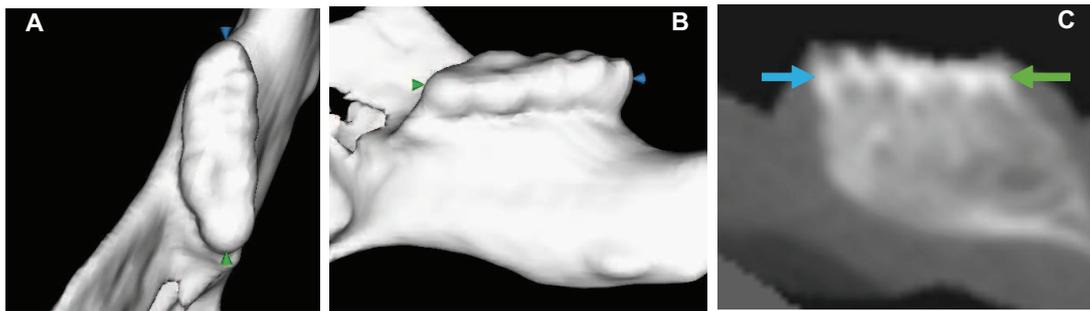
Enfin, la longueur mésio-distale des rangées dentaires droites et gauches a été mesurée au niveau du groupe des molaires mandibulaires. Cette distance était mesurée entre les points mésial et distal du plus grand contour de la première et de la dernière molaire. Le placement de ces points a été validé à partir de coupes MPR verticales réalisées dans l'axe de la rangée dentaire (figure 15). En raison des effectifs réduits de chaque groupe de souris, les comparaisons inter-groupes des longueurs de rangées dentaires ont été effectuées à l'aide de tests non-paramétriques de Mann-Whitney.



**Figure 14.**

Analyse de la croissance mandibulaire. Mesures linéaires utilisées.

S : surface mandibulaire ; H : hauteur mandibulaire ; L : longueur mandibulaire ; lb : largeur de la  
branche mandibulaire



**Figure 15.**

Mesure de la rangée dentaire. A. Vue occlusale de la rangée dentaire gauche chez un individu mâle wild-type (flèche bleue = point mésial, flèche verte = point distal). B. Vue médiale des molaires. C. Validation du positionnement des points à partir d'une coupe verticale réalisée dans l'axe de la rangée dentaire.

## RESULTATS

### Caractérisation de la forme mandibulaire par analyse elliptique de Fourier

Les statistiques élémentaires (moyenne, écart-type) des descripteurs elliptiques de Fourier (GA, PA, OGA) des contours mandibulaires des souris des souris WT et Ta sont présentées pour les 10 premiers harmoniques dans le tableau 1.

Un exemple des reconstructions pas-à-pas du contour mandibulaire en vue latérale d'un individu hémizygote  $Eda^{Ta/Y}$  est donné dans la figure 16. La précision de la reconstruction augmentait à mesure que les harmoniques étaient sommées. Avec les 24 premiers harmoniques, l'indice de convergence calculé entre le contour reconstruit et l'original était supérieur à 99,5 %. Par ailleurs, les principales portions mandibulaires étant correctement décrites à partir des 10 premiers harmoniques (tableau 1, figure 16), l'analyse discriminante n'a pris en compte que les 10 premiers harmoniques. Cette observation était également corroborée par la non-significativité de l'analyse multivariée au-delà du 10<sup>ème</sup> harmonique (valeur du lambda de Wilks,  $p > 0.05$ ).

Les ébauches morphologiques du ramus et du corps de la mandibule étaient décrites à partir du 2<sup>ème</sup> et du 3<sup>ème</sup> harmonique. La silhouette du processus coronoïde, du condyle mandibulaire et du processus angulaire a été observée avec le 5<sup>ème</sup> harmonique. La description de l'incisure mandibulaire et de la concavité du bord postérieur du ramus débute également avec le 5<sup>ème</sup> harmonique. La caractérisation de ces structures semble être obtenue par la sommation des 9 premiers harmoniques, les détails morphologiques de ces portions étant reconstruits à partir du 16<sup>ème</sup> harmonique. La hauteur du corps mandibulaire semblait définie par les 4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> harmoniques. L'ébauche du processus alvéolaire de l'incisive commençait à être décrite par le 4<sup>ème</sup> harmonique et une caractérisation fine était obtenue avec les 9 premiers harmoniques.

Des différences morphologiques subtiles et significatives ont été mises en évidence entre les individus hémizygotes  $Eda^{Ta/Y}$ , les mâles WT et les groupes formés par les femelles hétérozygotes  $Eda^{Ta/+}$  et WT (figure 17). Les 2 premières fonctions discriminantes (DF1, DF2) décrivaient 94,6% de la variabilité totale, la première expliquant 60,6 % de cette variabilité et la deuxième 34,0 %.

Une partition complète du groupe mâle Ta a été observée (figure 17). Cette distinction était confirmée à la fois par (1) l'absence de chevauchement des nuages de points, (2) l'existence de distances significatives entre les individus  $Eda^{Ta/Y}$  et les 3 autres groupes (figure 17) et (3) le taux d'individus correctement classés (tableau 2). La différence la plus importante était retrouvée entre les mâles Ta et les mâles WT et la plus petite était observée entre les mâles Ta et les individus hétérozygotes Ta femelles (figure 17).

Les variables les plus pertinentes dans l'expression de la partition  $Eda^{Ta/Y}$  - WT selon le 1<sup>er</sup> axe discriminant (DF1) étaient les longueurs des grands axes des 1<sup>ère</sup>, 2<sup>ème</sup>, 4<sup>ème</sup> et 9<sup>ème</sup> ellipses de Fourier (tableau 3). Une différenciation entre les groupes  $Eda^{Ta/Y}$  et  $Eda^{Ta/+}$  a également été mise en évidence par la 2<sup>ème</sup> fonction discriminante (DF2). Cette distinction était également confirmée par la distance inter-groupe correspondante et la procédure de classification (figure 17, tableau 2). Les variables responsables de cette partition inter-groupe correspondaient principalement à la longueur du grand axe de 4<sup>ème</sup> ellipse de Fourier et à l'orientation de la 9<sup>ème</sup> ellipse (tableau 3).

Un important chevauchement était retrouvé entre les femelles hétérozygotes  $Eda^{Ta/+}$  et les femelles WT (figure 17). La distance inter-groupe correspondante n'était pas significative et la proportion d'individus bien classés était moins importante (tableau 2). Ce chevauchement semblait refléter une relative proximité morphologique entre les mandibules de 2 lignées de souris.

En termes de variation de forme mandibulaire, les différences morphologiques entre les mâles Ta et mâles WT consistaient principalement en des différences géométriques des 1<sup>ère</sup>, 2<sup>ème</sup>, 4<sup>ème</sup> et 9<sup>ème</sup> ellipses de Fourier (tableau 3). L'élongation plus importante de la 1<sup>ère</sup> ellipse chez les mâles Ta hémizygotés reflétait un allongement elliptique plus marqué et donc un hypo-développement dorso-ventral relatif chez ces spécimens avec un ramus mandibulaire plus court. Dans ce contexte morphologique, les longueurs plus importantes de grand axe des 2<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> ellipses semblaient indiquer une hauteur de corps mandibulaire plus réduite chez les individus  $Eda^{Ta/Y}$  (figure 16). Le processus coronoïde chez les mâles Ta hémizygotés présentait également des différences de forme ; l'élongation plus importante de la 9<sup>ème</sup> ellipse de Fourier reflétait une version caudale plus marquée de cette structure (figure 18). La contribution du 6<sup>ème</sup> harmonique semblait caractériser un col condyloire plus fin chez les mâles Ta comparé à celui observé chez les mâles WT (figure 19).

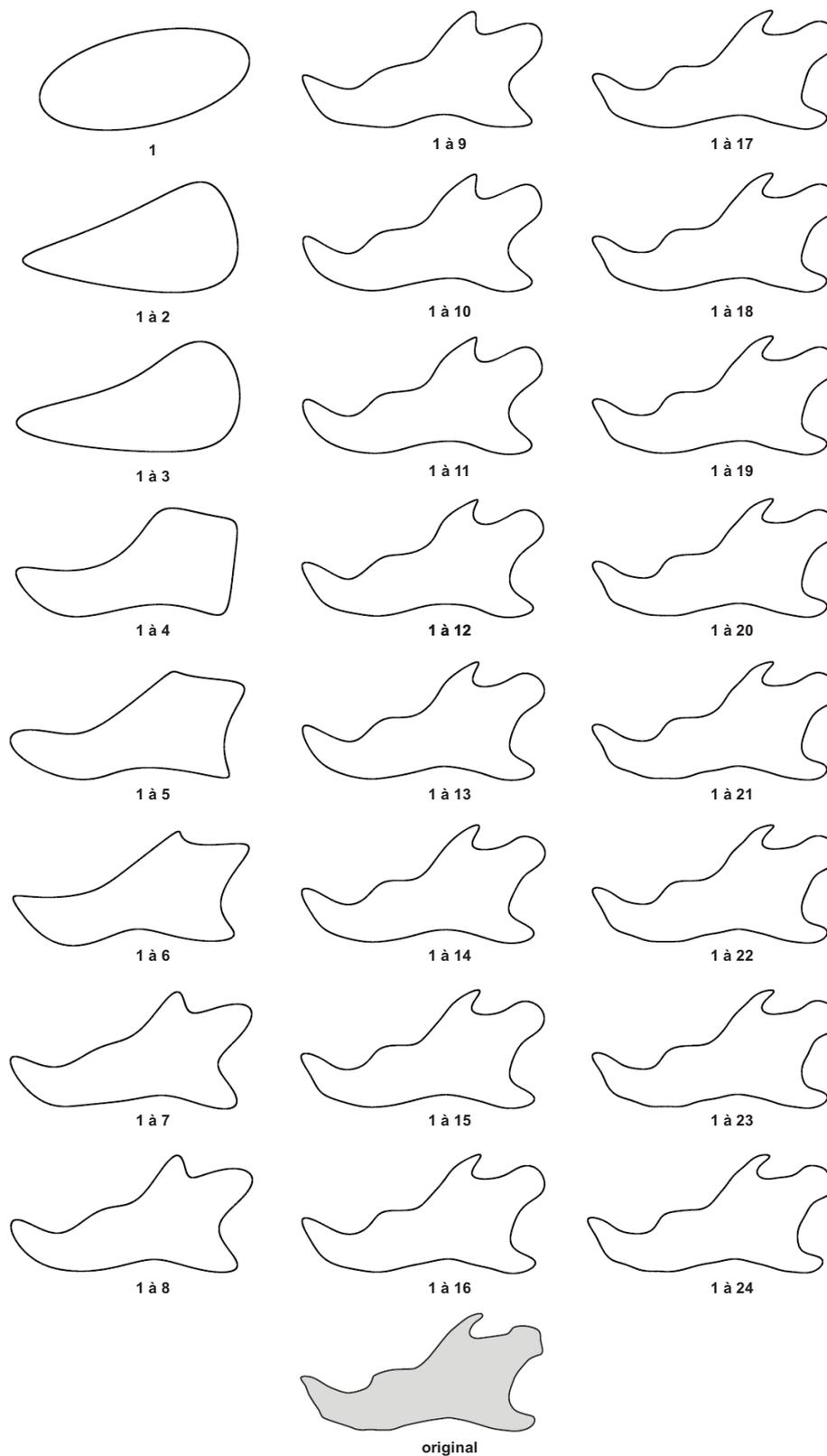
Par ailleurs, les mâles Ta se distinguaient de l'ensemble des femelles Ta et WT en raison d'un corps mandibulaire plus étroit comme le suggérait la longueur plus importante du grand axe de la 4<sup>ème</sup> ellipse de Fourier chez les individus  $Eda^{Ta/Y}$  (tableaux 1-3). Toutefois, une relative proximité morphologique pouvait être observée entre certaines femelles  $Eda^{Ta/+}$  et certains mâles Ta hémizygotés. En considérant une projection des individus sur DF2, plusieurs spécimens étaient en effet proches du groupe de mâles Ta (figure 17).

La surface projetée de la mandibule présentait des différences entre les mâles et femelles aussi bien des groupes Ta que WT (figure 20), des différences significatives entre les 4 groupes de souris ayant été mise en évidence par le Test de Welch ( $F=19,25$ ,  $p < 0,001$ ). Au sein du groupe WT, les femelles présentaient des mandibules plus grandes que les mâles. Les souris Ta exprimaient également cette tendance, l'amplitude des différences de taille étant proche de celle observée au sein du groupe WT. Aucune différence significative de taille mandibulaire n'a été retrouvée entre les mâles  $Eda^{Ta/Y}$  et les mâles WT. Toutefois, les souris Ta étaient caractérisées par une variabilité de taille mandibulaire plus importante, les mâles  $Eda^{Ta/Y}$  présentant le profil de variation le plus étendu.

**Tableau 1.** Descripteurs de Fourier elliptiques des contours mandibulaires des souris WT et Ta : statistiques descriptives.

Harmoniques de Fourier	Descripteurs elliptiques	Wild-Type				Tabby			
		mâles		femelles		mâles		femelles	
		Moyenne	E.T.	Moyenne	E.T.	Moyenne	E.T.	Moyenne	E.T.
1	GA	8,44	0,15	8,5	0,09	8,71	0,19	8,57	0,16
	PA	3,98	0,08	3,98	0,06	3,91	0,11	3,95	0,08
	OGA	167,83	1,62	168,5	0,95	167,47	0,96	168,06	2,54
2	GA	1,44	0,13	1,5	0,09	1,62	0,08	1,5	0,1
	PA	0,62	0,06	0,67	0,06	0,64	0,11	0,63	0,06
	OGA	213,33	4,01	208,33	3,1	210,83	4,72	210,39	4,22
3	MA	0,56	0,04	0,48	0,04	0,58	0,1	0,55	0,08
	PA	0,33	0,07	0,33	0,04	0,28	0,05	0,28	0,07
	OGA	178,46	42,13	177,99	29,86	190,28	11,8	178,36	17,45
4	GA	0,81	0,04	0,82	0,03	0,9	0,05	0,83	0,04
	PA	0,31	0,07	0,29	0,04	0,37	0,06	0,35	0,07
	OGA	251,58	10,03	247,71	8,11	252,7	6,31	250,13	8,6
5	GA	0,61	0,06	0,65	0,04	0,67	0,05	0,66	0,04
	PA	0,04	0,03	0,05	0,04	0,08	0,05	0,07	0,05
	OGA	182,83	3,44	178,81	3,66	179,82	4,08	180,44	4,22
6	GA	0,43	0,03	0,45	0,04	0,49	0,03	0,44	0,04
	PA	0,05	0,03	0,04	0,02	0,02	0,01	0,04	0,03
	OGA	149,16	8,85	149,42	4,32	146,25	5,72	147,43	4,97
7	GA	0,39	0,02	0,37	0,02	0,4	0,03	0,39	0,03
	PA	0,22	0,05	0,25	0,03	0,2	0,05	0,2	0,07
	OGA	254,48	8,18	257,19	10,48	254,98	14,08	249,78	5,53
8	GA	0,17	0,05	0,19	0,05	0,18	0,05	0,18	0,04
	PA	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02	0,02
	OGA	250,64	24,65	262,81	9,38	271,71	11,88	274,13	12,57
9	GA	0,16	0,03	0,19	0,03	0,2	0,02	0,2	0,03
	PA	0,07	0,04	0,09	0,04	0,09	0,02	0,1	0,03
	OGA	185,41	12,46	200,92	11,74	186,67	8,9	198,43	18,28
10	GA	0,14	0,02	0,16	0,02	0,15	0,02	0,15	0,02
	PA	0,03	0,02	0,05	0,01	0,05	0,02	0,04	0,02
	OGA	291,45	13,36	288,01	8,51	284,43	10,31	278,35	14,95

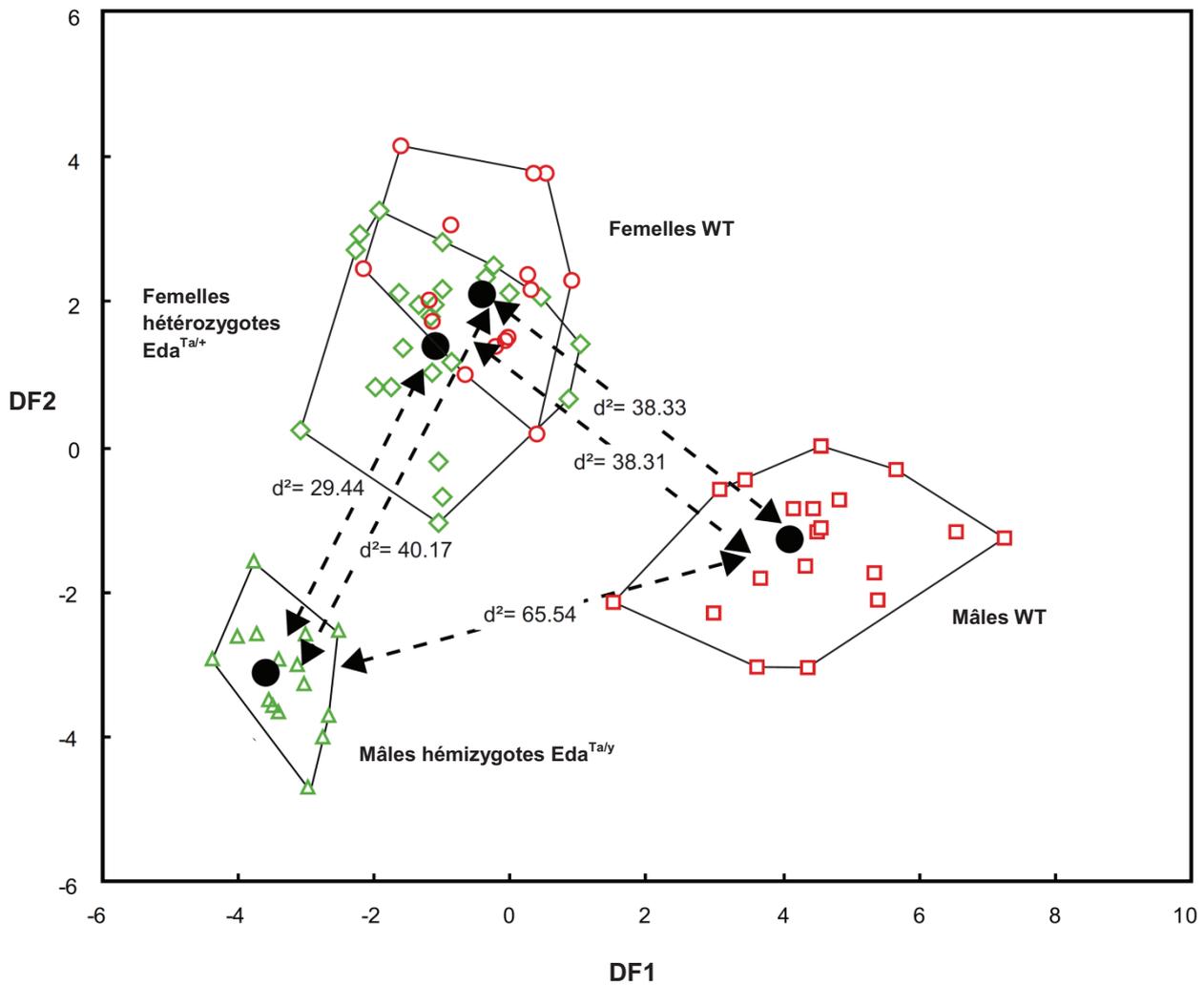
*E.T.* = écart-type ; *GA* = longueur du grand axe ; *PA* = longueur du petit axe ; *OGA* : orientation du grand axe



**Figure 16.**

Analyse de Fourier elliptique du contour mandibulaire.

Reconstructions pas à pas du contour à partir des 24 premiers harmoniques de la série de Fourier



**Figure 17.**

**Analyse discriminante des descripteurs de Fourier elliptiques du contour mandibulaire.**

Représentation en nuages de points des individus WT (mâles : carrés rouges ; femelles : cercles rouges), hémizygotés  $Eda^{Ta/Y}$  (triangles verts), et hétérozygotés  $Eda^{Ta/+}$  (losanges verts) selon les axes discriminants (DF1, DF2).

Les distances inter-groupes de Mahalanobis  $D^2$  sont également indiquées.

**Tableau 2.** Résultats de la procédure de classification et de la validation croisée.

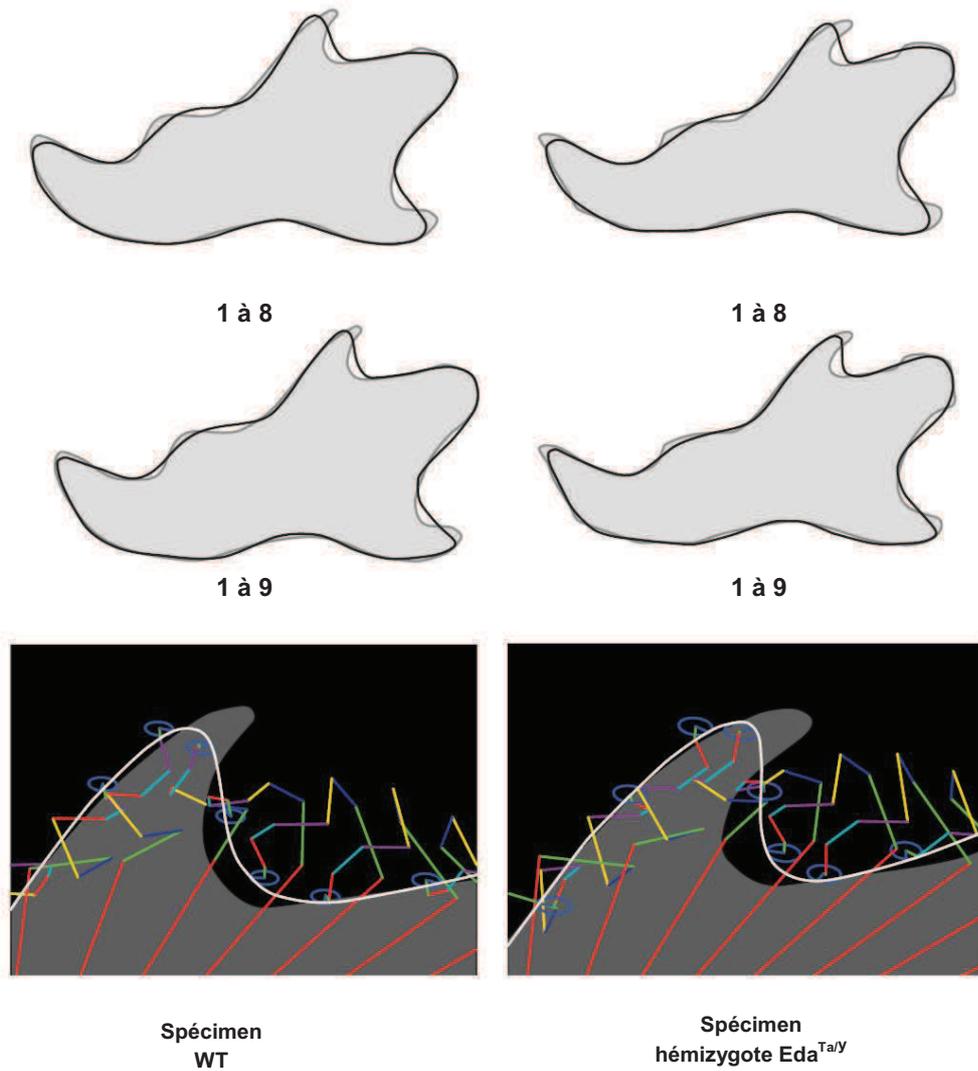
	Proportion (%) d'individus classés comme :			
	<i>WT femelles</i>	<i>WT mâles</i>	<i>Hétérozygotes femelles Eda<sup>Ta/+</sup></i>	<i>Hémizygotés mâles Eda<sup>Ta/y</sup></i>
<i>WT femelles</i>	<b>87,5/62,5</b>	0,0/6,2	12,5/31,3	0,0/0,0
<i>WT mâles</i>	0,0/5,3	<b>100,0/89,5</b>	0,0/5,2	0,0/0,0
<i>Hétérozygotes femelles Eda<sup>Ta/+</sup></i>	12,5/33,3	0,0/4,2	<b>87,5/50,0</b>	0,0/12,5
<i>Hémizygotés mâles Eda<sup>Ta/y</sup></i>	0,0/0,0	0,0/0,0	0,0/0,0	<b>100,0/100,0</b>

Les proportions d'individus correctement classés sont indiquées en gras.

**Tableau 3.** Analyse discriminante des descripteurs elliptiques chez les souris WT, Eda<sup>Ta/Y</sup> et Eda<sup>Ta/+</sup>.  
Corrélations entre les descripteurs elliptiques de Fourier et les deux fonctions discriminantes.

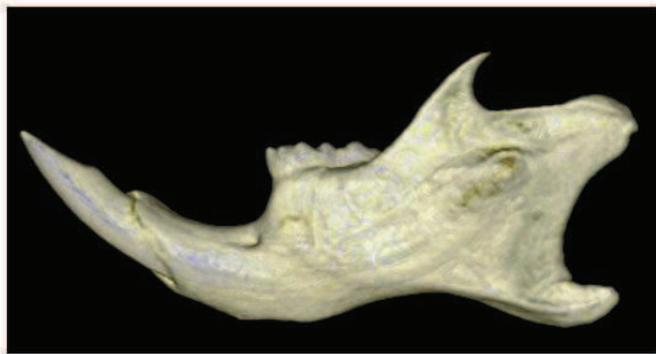
Harmoniques de Fourier	Première fonction discriminante			Deuxième fonction discriminante		
	<i>r</i>			<i>r</i>		
	GA	PA	OGA	GA	PA	OGA
1	-0,24*	0,09	0,02	-0,11	0,06	0,09
2	-0,22*	-0,04	0,10	-0,12	0,05	-0,13
3	-0,02	0,11	-0,03	-0,14	0,01	-0,07
4	-0,28*	-0,13	0,01	-0,22*	-0,07	-0,10
5	-0,17	-0,10	0,12	0,02	-0,02	-0,10
6	-0,13	0,14	0,06	-0,15	0,07	0,03
7	-0,05	0,04	0,02	-0,11	0,03	-0,04
8	-0,04	-0,01	-0,19	0,08	-0,07	0,06
9	-0,20*	-0,10	-0,05	0,01	0,03	0,20*
10	-0,04	-0,18	0,11	0,09	0,03	-0,09

*r*, Coefficient de corrélation; \* indique un coefficient de corrélation  $\geq 0,20$ .

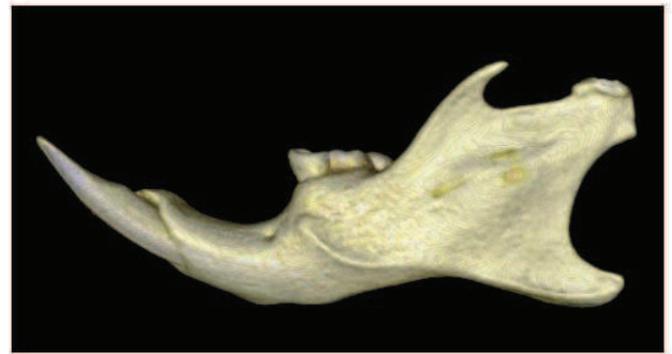


**Figure 18.**

Mise en évidence de subtilités morphologiques entre les individus WT et Ta mâles. Les différences de contribution de la 9<sup>ème</sup> ellipse de Fourier (élongation plus marquée chez Ta) reflètent une projection plus caudale du processus coronoïde chez les individus  $Eda^{Ta/Y}$ .  
 (9<sup>ème</sup> ellipse représentée en bleu ci-dessus)



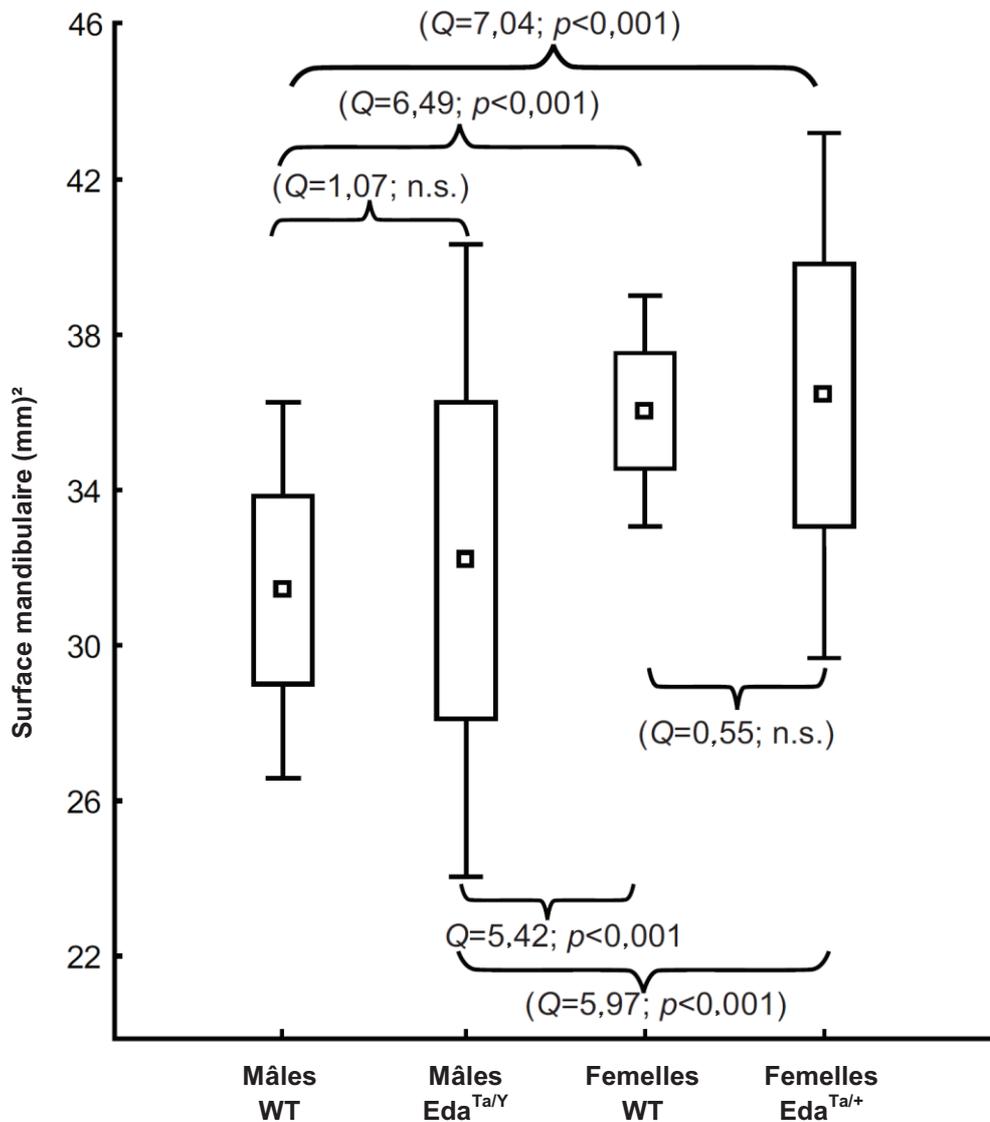
Spécimen  
WT



Spécimen  
hémizygote Eda<sup>Tabby</sup>

**Figure 19.**

Comparaison morphologique entre un individu mâle WT et un individu hémizygote Tabby. Ces reconstructions isosurfaciques permettent notamment d'illustrer la version caudale plus marquée du processus coronoïde, l'étranglement du col du condyle et la réduction de hauteur corps mandibulaire chez l'individu Tabby.



**Figure 20.**

Variation de la taille mandibulaire chez les individus WT, hémizygotes  $Eda^{Ta/Y}$  et hétérozygotes  $Eda^{Ta/+}$ . Résultats des comparaisons inter-groupes deux à deux (test de Tukey). Les barres verticales représentent les variations de  $\pm 1$  écart-type de part et d'autre de la moyenne (carrés noirs); les taquets correspondent aux surfaces extrêmes (maximum et minimum).

## Suivi longitudinal des lignées WT et Tabby

L'analyse des variations inter-observateurs est présentée en Annexe 1. Les erreurs de mesures étaient inférieures à 2 %.

Les résultats des comparaisons droite-gauche sont donnés en Annexe 2. Aucune différence significative de surface, de longueur et de hauteur mandibulaire n'était observée, excepté chez la souris hétérozygotes  $Eda^{Ta/+}$  et chez les femelles WT qui présentaient pour un ou deux stades de croissance (5<sup>ème</sup> semaine et 15<sup>ème</sup> semaine) des différences de surface et de hauteur. Toutefois, ces différences n'étaient plus retrouvées au stade ultérieur.

Les données relatives au suivi des individus WT (mâles et femelles), hémizygotés  $Eda^{Ta/Y}$  et hétérozygotés  $Eda^{Ta/+}$  sont présentées en Annexes 3-8. Pour chaque groupe de souris, les variations de masse corporelle, de surface, de longueur et de hauteur mandibulaires en fonction de l'âge sont illustrées à partir des figures 21-26. Les variations intra-groupes de chacune de ces mesures en fonction du stade de croissance sont représentées par les figures 27-31.

A l'exception de la masse corporelle (figure 21), toutes les caractéristiques mandibulaires étudiées présentaient, quelque soit le groupe considéré, des profils de variation relativement comparables (figures 2-6). Les courbes de suivi longitudinal présentaient toutes un point d'inflexion situé autour de 20 semaines. Les mesures surfaciques et les mesures linéaires étaient dans leur ensemble caractérisées par une première phase de variation importante (avant la 20<sup>ème</sup> semaine) suivie d'une phase d'évolution plus lente. Concernant la masse, les variations au cours de la première phase étaient moins marquées (figure 21).

Des différences inter-groupes ont également pu être mises en évidence à partir du suivi longitudinal de la croissance mandibulaire. Les individus hémizygotés  $Eda^{Ta/Y}$  présentaient, par rapport aux autres groupes, un profil de courbe décalé vers le bas quelque soient les mesures mandibulaires considérées (figures 21-26). Par ailleurs, les individus hétérozygotés  $Eda^{Ta/+}$  exprimaient un profil intermédiaire comparativement aux groupes WT et mâles Ta.

Les variations intra-groupes étaient plus importantes au sein des groupes de souris Ta que chez les groupes WT quelque soit la variable mandibulaire considérée. Chez les souris hémizygotes  $Eda^{Ta/Y}$ , ces variations étaient particulièrement marquées pour les premiers et les derniers stades de croissance (figures 27-31).

Les représentations log-log ont confirmé la particularité des profils de croissance chez les souris hétérozygotes  $Eda^{Ta/+}$  et chez les souris hémizygotes  $Eda^{Ta/Y}$ . Qu'il s'agisse de la surface projetée en vue latérale, de la longueur et de la hauteur mandibulaire, les coefficients directeurs des droites de régression présentaient des valeurs supérieures à celles observées chez les spécimens WT (figures 32-34 ; tableau 4).

Concernant la rangée dentaire, des variations inter-groupes ont pu être démontrées (figure 35). Les individus hémizygotes  $Eda^{Ta/Y}$  présentaient la rangée dentaire la plus courte. Des dimensions intermédiaires étaient observées chez les individus hétérozygotes  $Eda^{Ta/+}$ . Par rapport aux groupes WT, les souris Ta étaient caractérisées par une variabilité intra-groupe supérieure, les plus grandes variations étant retrouvées au sein du groupe hétérozygotes  $Eda^{Ta/+}$ . Parallèlement à ces résultats, des agénésies de molaire inférieure ont été retrouvées chez les individus Ta : 2 spécimens hétérozygotes  $Eda^{Ta/+}$  et 1 individu hémizygote  $Eda^{Ta/Y}$ .

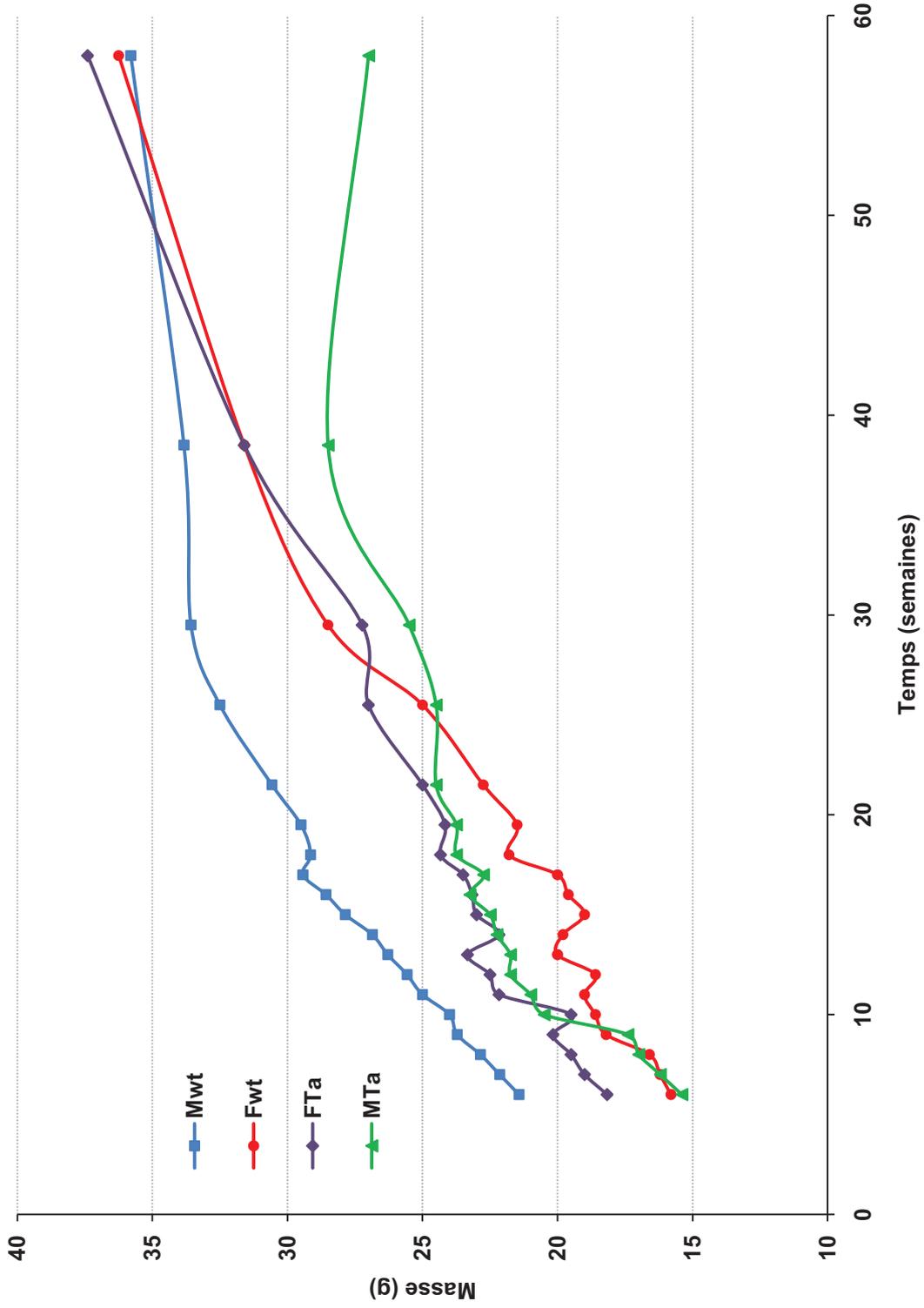


Figure 21. Suivi longitudinal de la masse corporelle des souris au cours de la première année

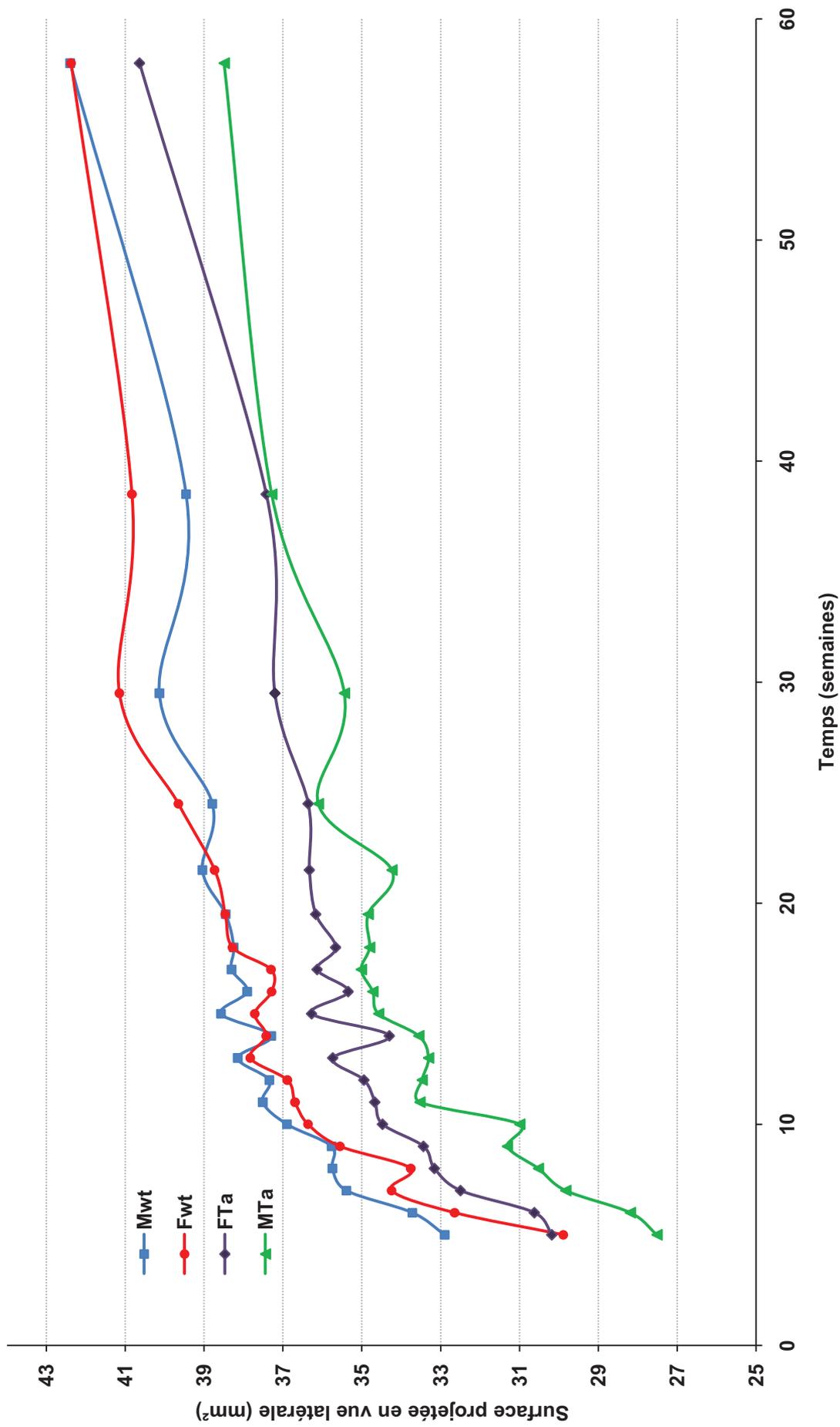


Figure 22.

Suivi longitudinal de la surface latérale projetée de la mandibule au cours de la première année

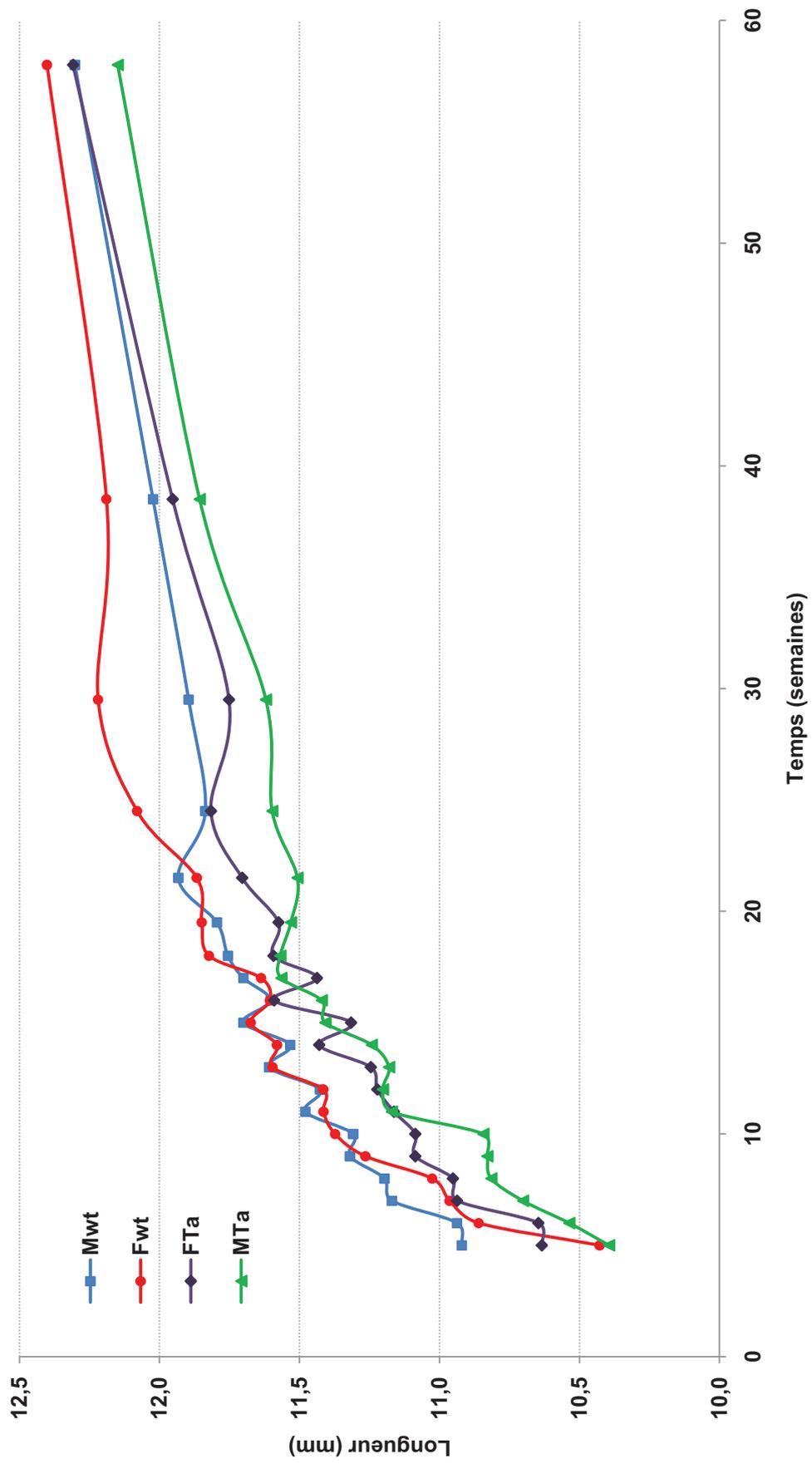
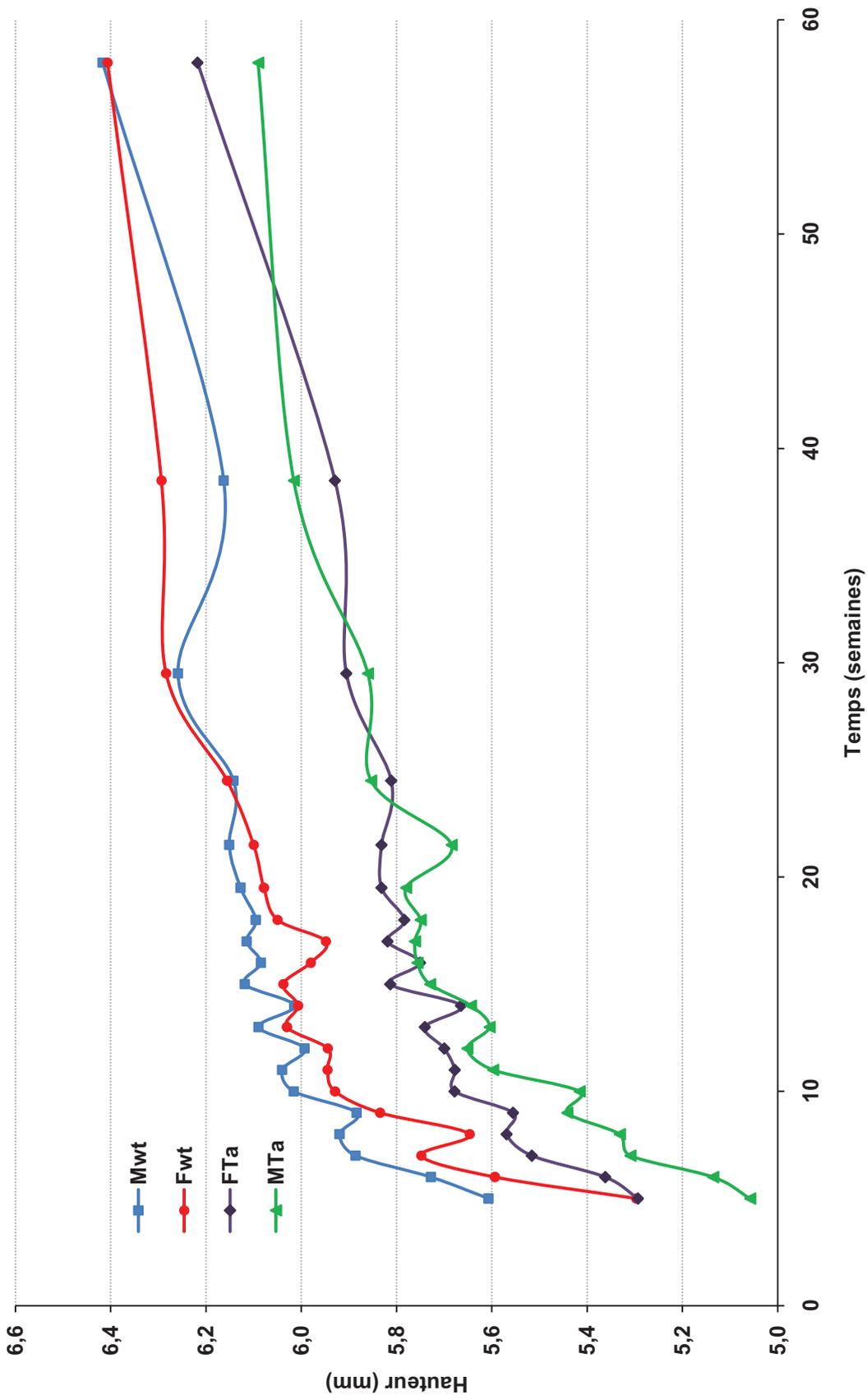


Figure 23. Suivi longitudinal de la longueur mandibulaire au cours de la première année



**Figure 24.** Suivi longitudinal de la hauteur mandibulaire au cours de la première année

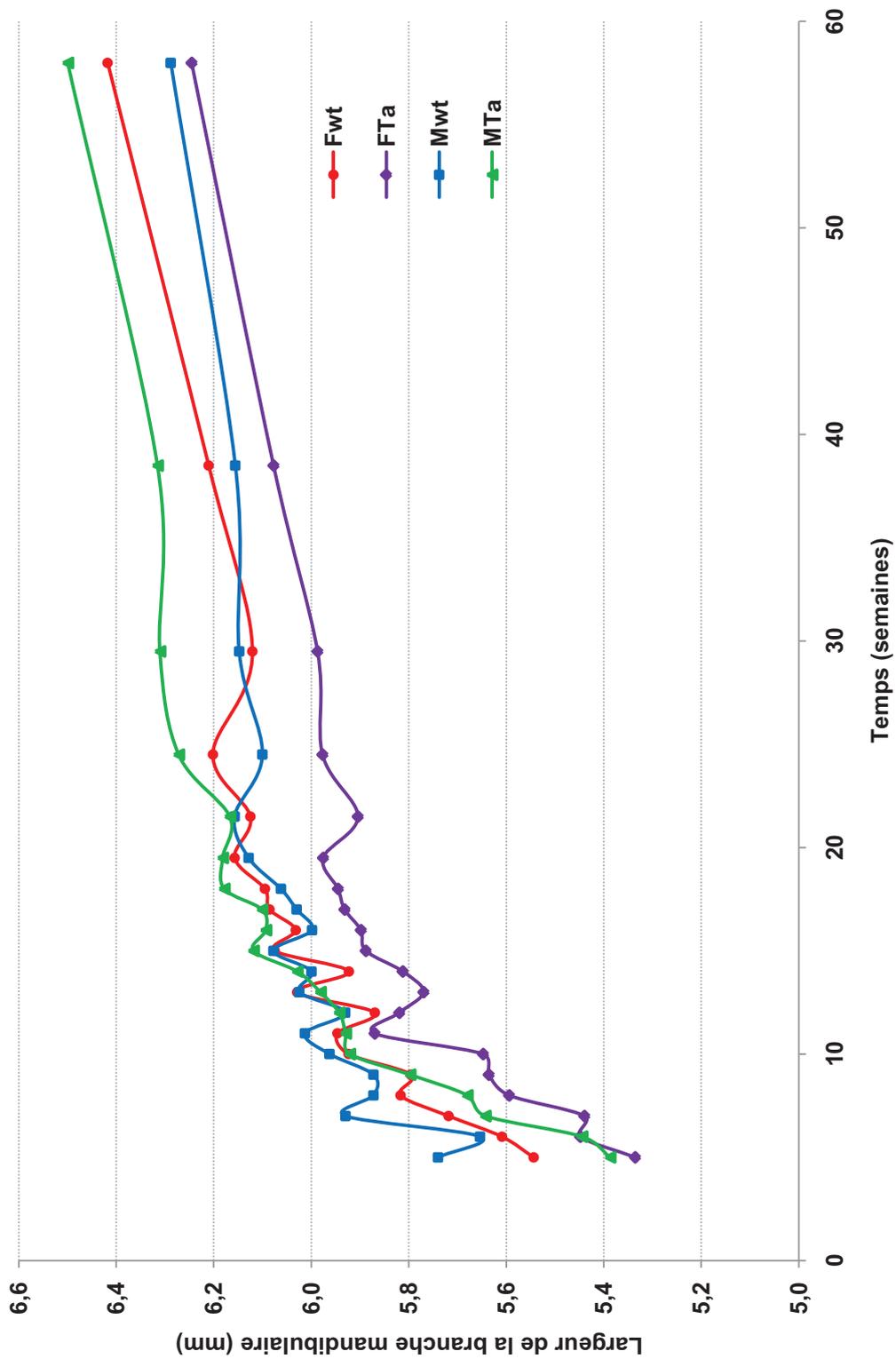
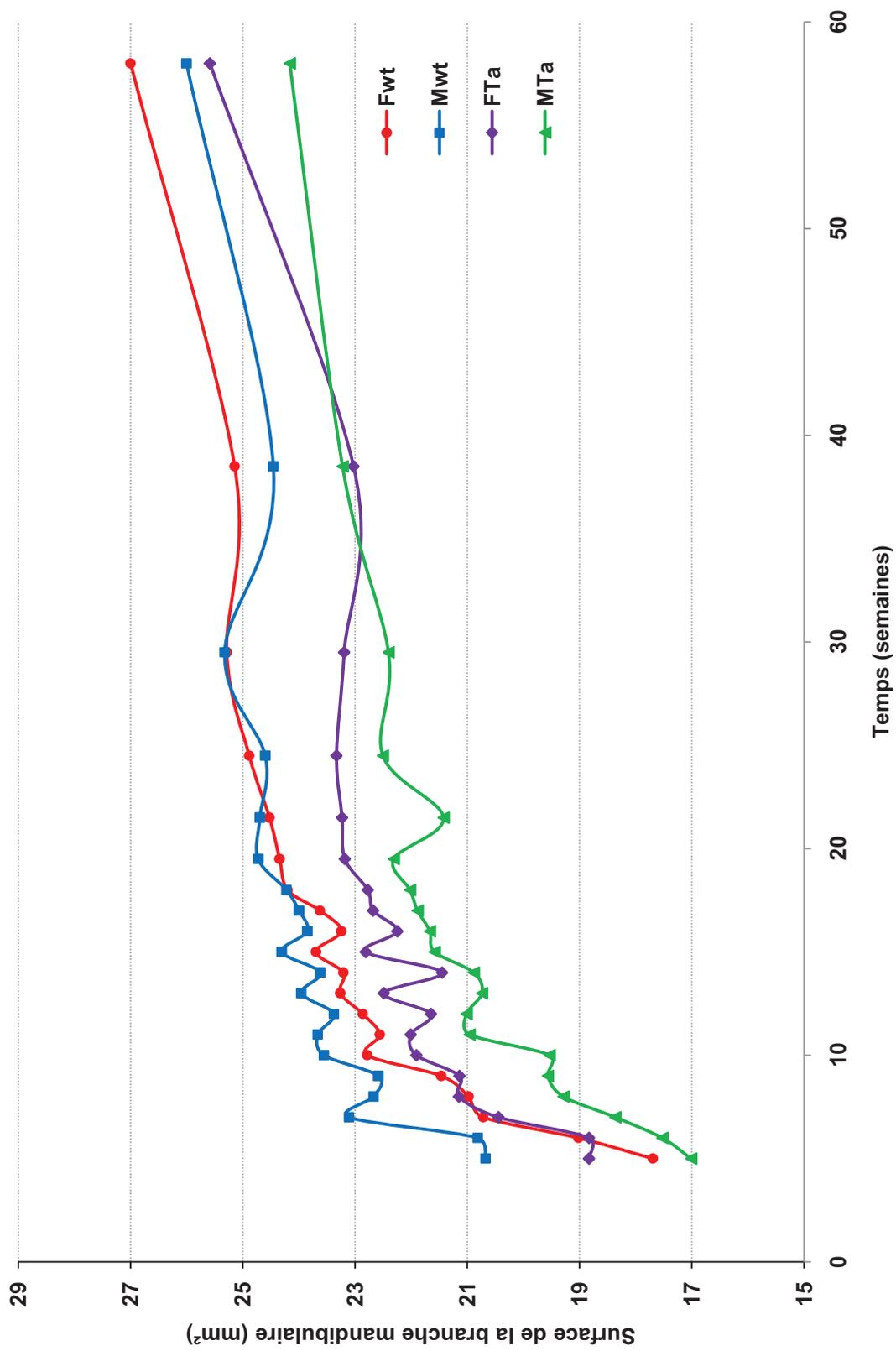
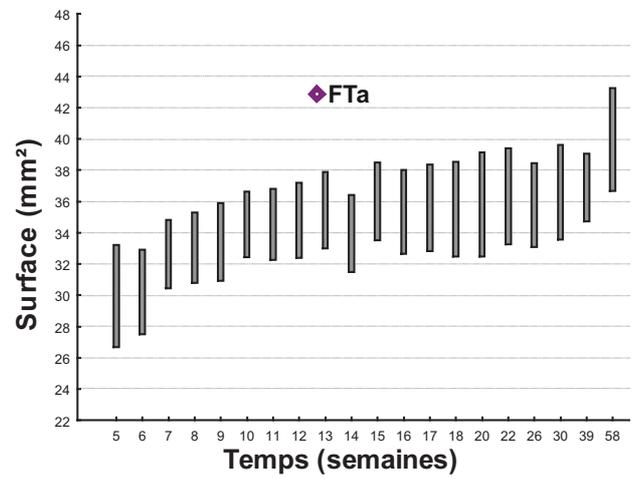
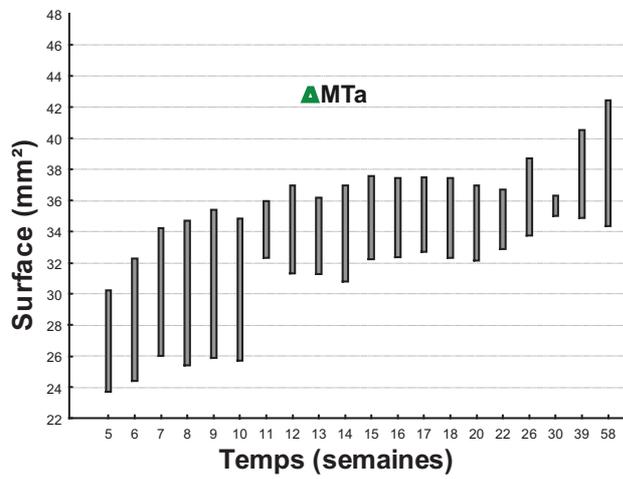
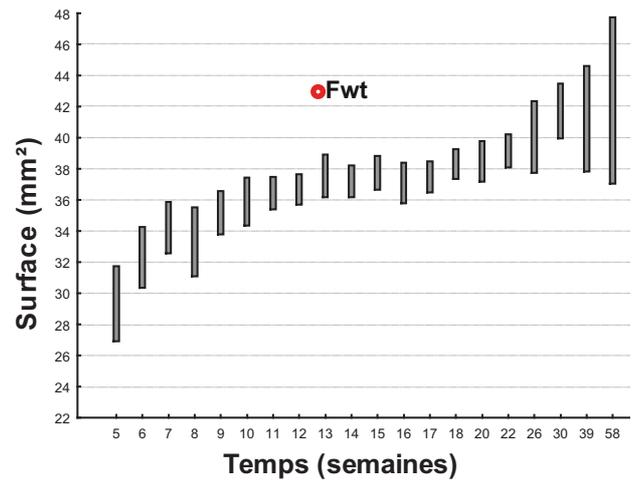
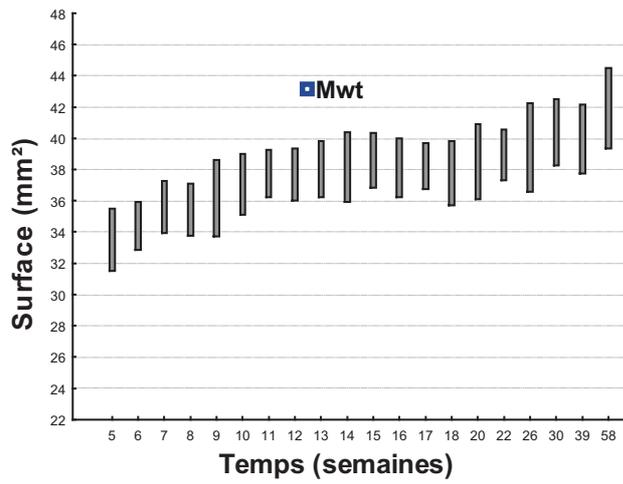


Figure 25. Suivi longitudinal de la largeur de la branche mandibulaire au cours de la première année



**Figure 26.**  
Suivi longitudinal de la surface de la branche mandibulaire au cours de la première année



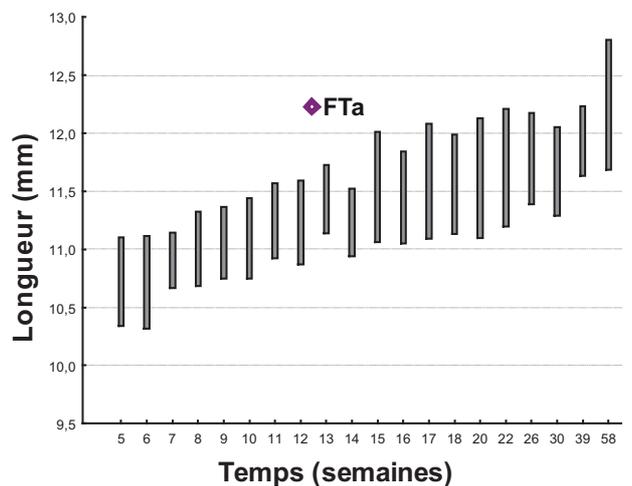
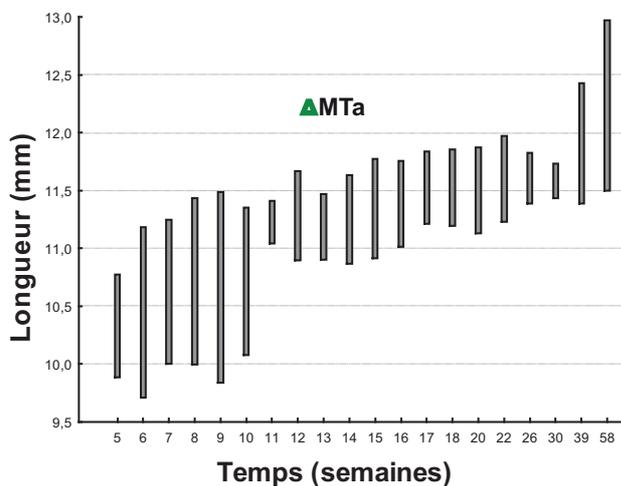
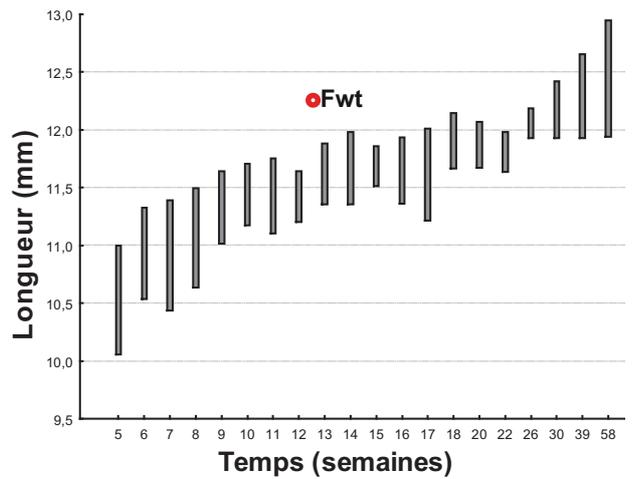
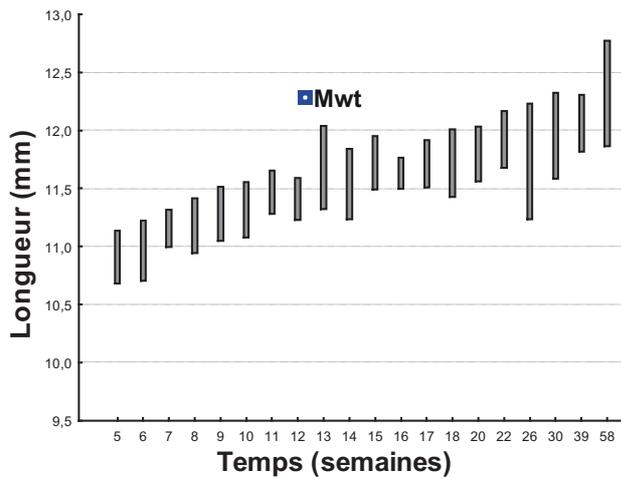
**Figure 27.**

Surface mandibulaire : variations intra-groupes

Pour chaque stade de croissance et pour chaque groupe,

les écarts entre les valeurs extrêmes sont représentés

Mwt : mâles WT ; Fwt : femelles WT ; FTa : femelles Tabby ; MTa : mâles Tabby.



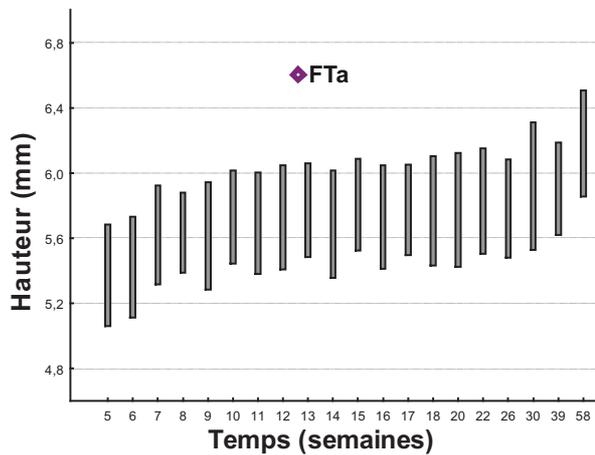
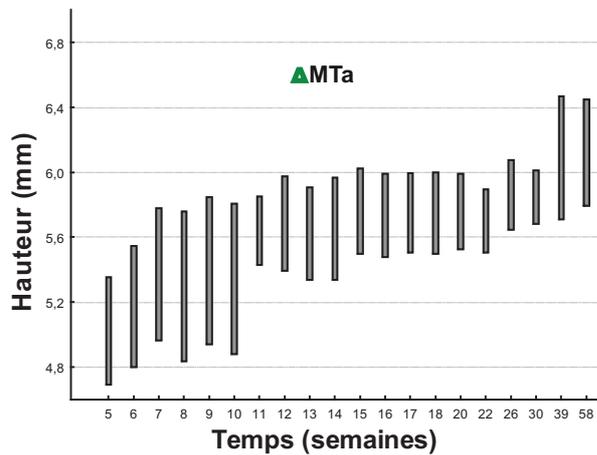
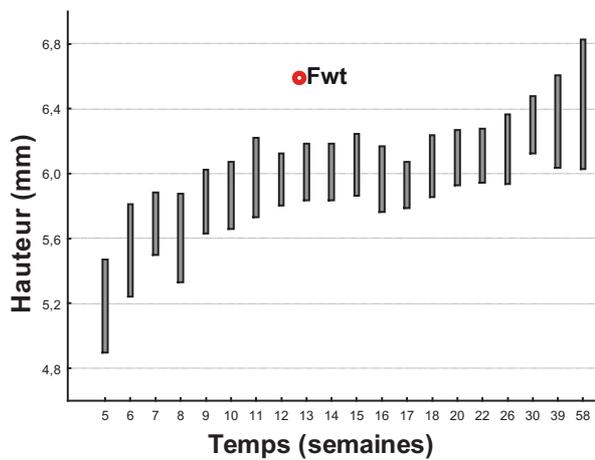
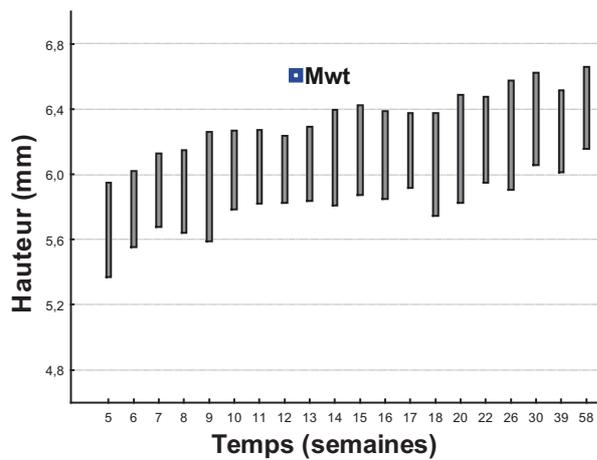
**Figure 28.**

Longueur mandibulaire : variations intra-groupes

Pour chaque stade de croissance et pour chaque groupe,

les écarts entre les valeurs extrêmes sont représentés

Mwt : mâles WT ; Fwt : femelles WT; FTa : femelles Tabby ; MTa : mâles Tabby.



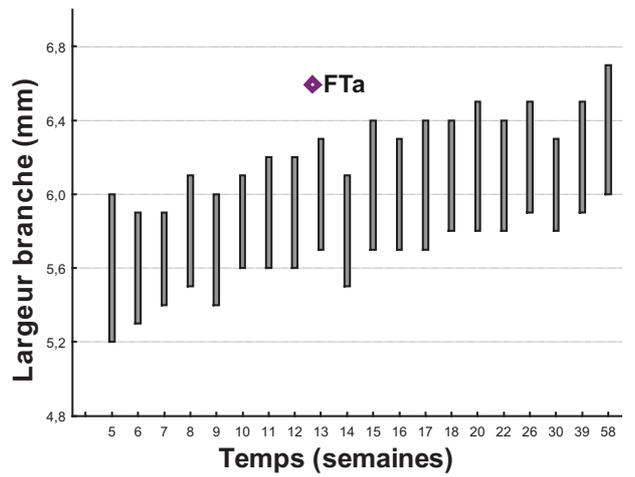
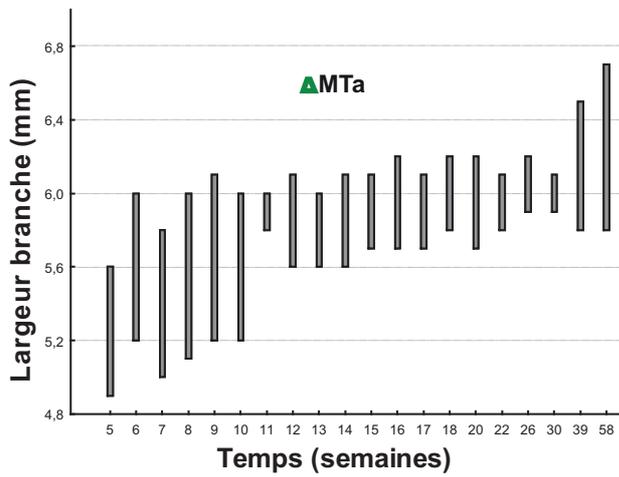
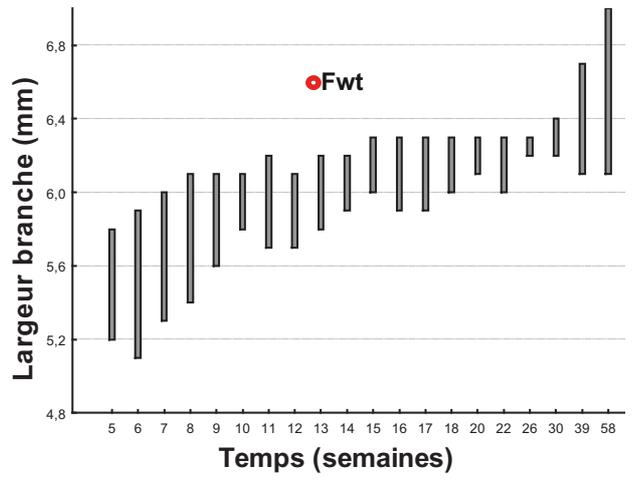
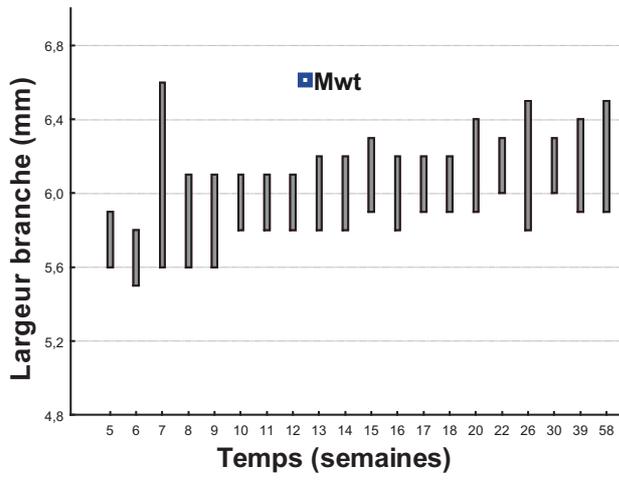
**Figure 29.**

Hauteur mandibulaire : variations intra-groupes

Pour chaque stade de croissance et pour chaque groupe,

les écarts entre les valeurs extrêmes sont représentés

Mwt : mâles WT ; Fwt : femelles WT; FTa : femelles Tabby ; MTa : mâles Tabby.



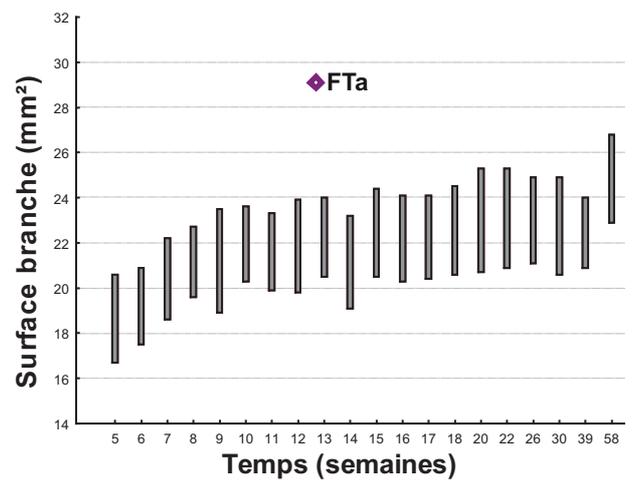
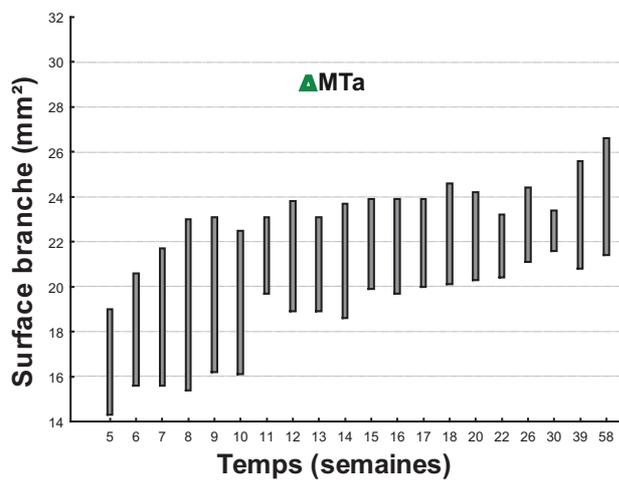
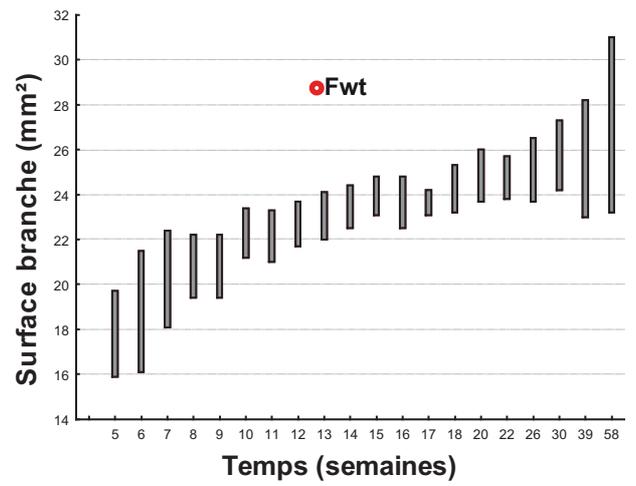
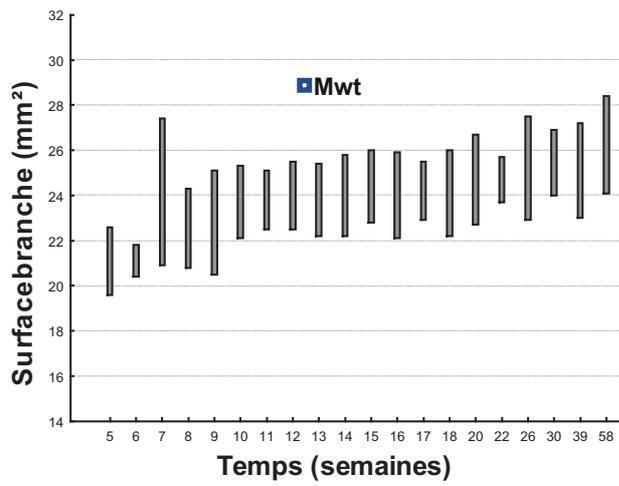
**Figure 30.**

Largeur de la branche mandibulaire : variations intra-groupes

Pour chaque stade de croissance et pour chaque groupe,

les écarts entre les valeurs extrêmes sont représentés

Mwt : mâles WT ; Fwt : femelles WT; FTa : femelles Tabby ; MTa : mâles Tabby.



**Figure 31.**

Surface de la branche mandibulaire : variations intra-groupes

Pour chaque stade de croissance et pour chaque groupe,

les écarts entre les valeurs extrêmes sont représentés

Mwt : mâles WT ; Fwt : femelles WT ; FTa : femelles Tabby ; MTa : mâles Tabby.

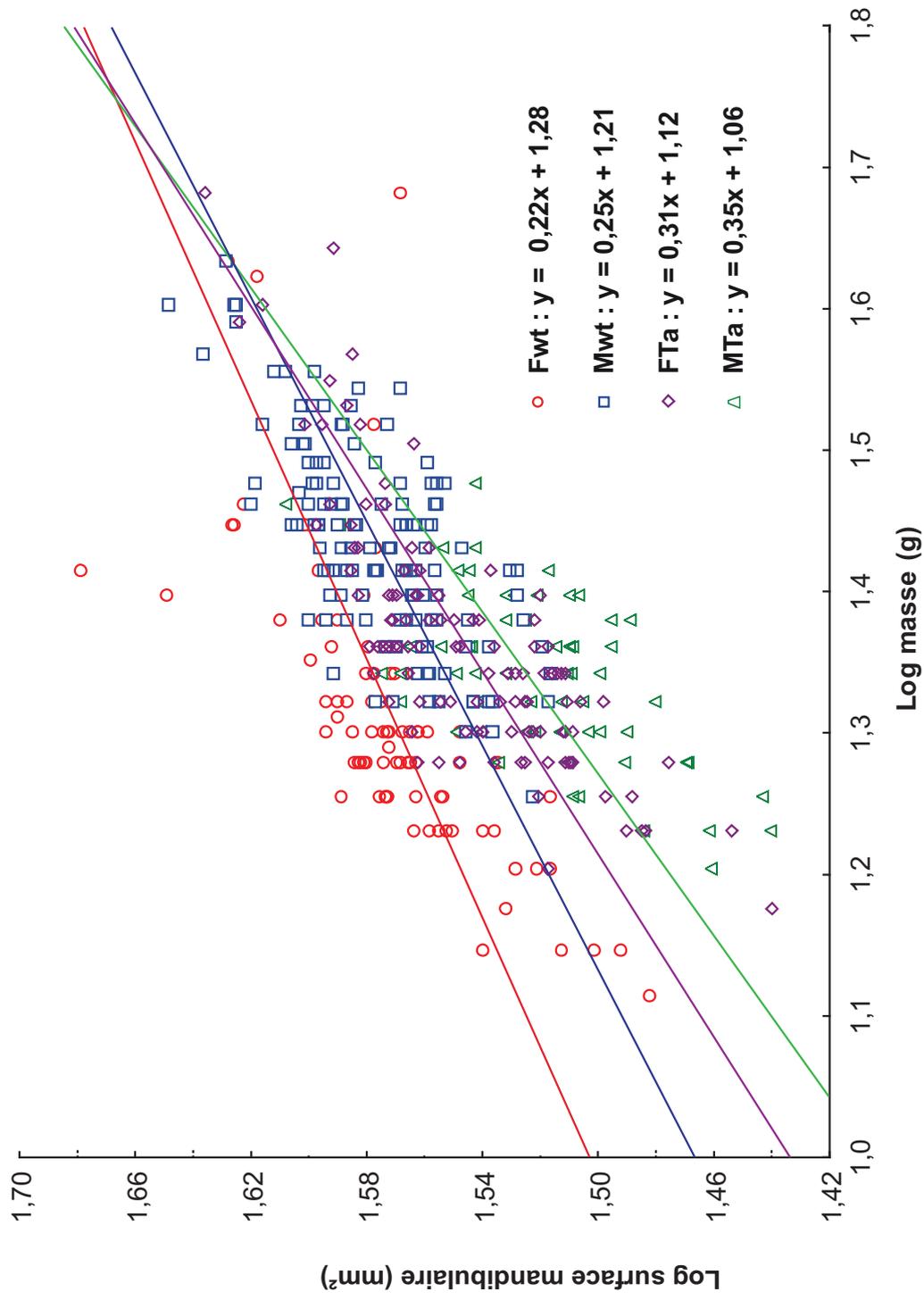


Figure 32.

**Suivi longitudinal : représentation log-log des variations de surface mandibulaire en fonction de l'âge**

Les équations des droites de régression pour chaque groupe sont également présentées.

Fwt : femelles WT ; Mwt : mâles WT ; FTa : femelles Tabby ; MTa : mâles Tabby.

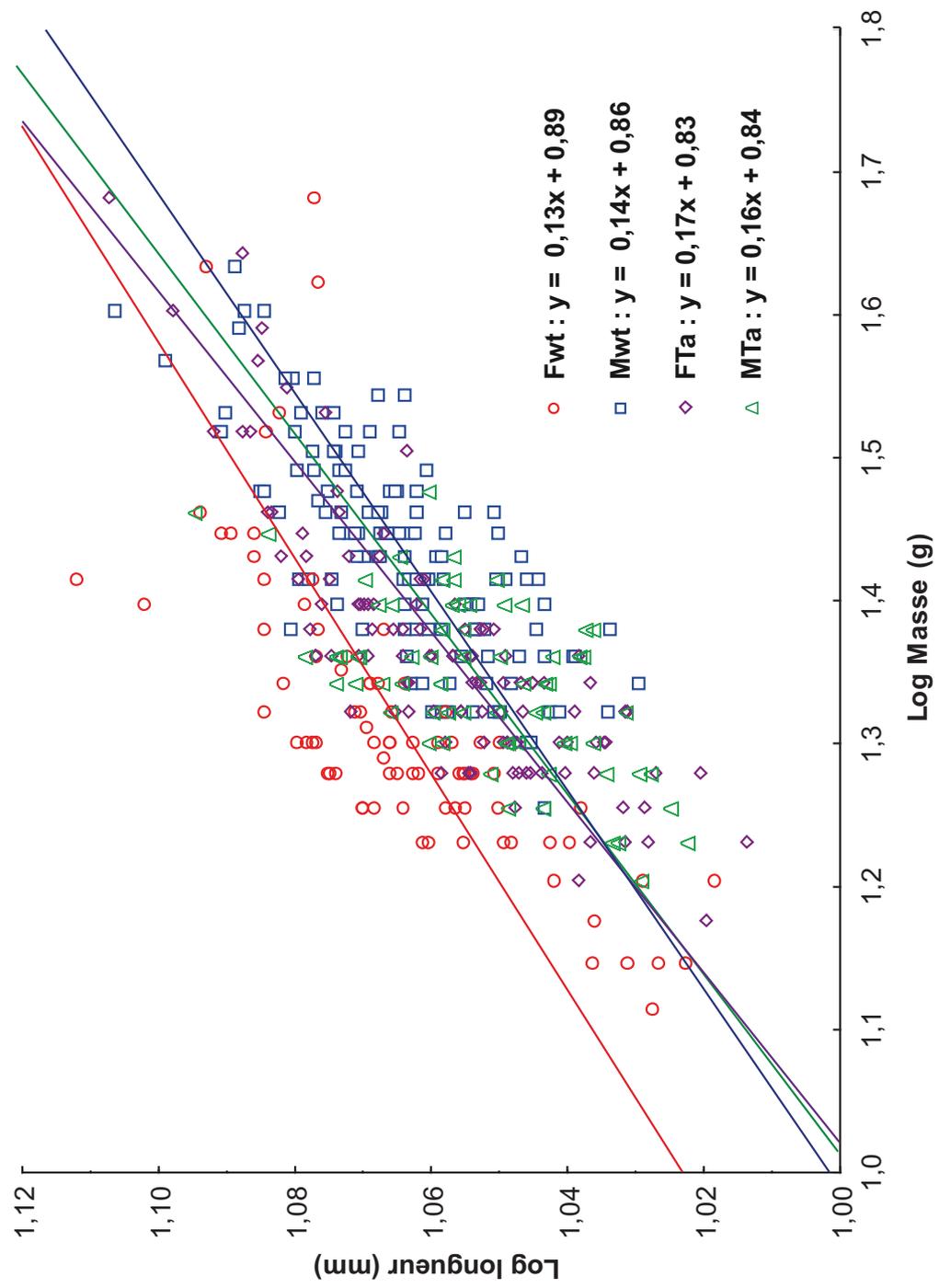


Figure 33

**Suivi longitudinal : représentation log-log des variations de longueur mandibulaire en fonction de l'âge**

Les équations des droites de régression pour chaque groupe sont également présentées.

Fwt : femelles WT ; Mwt : mâles WT ; FTa : femelles Tabby ; MTa : mâles Tabby.

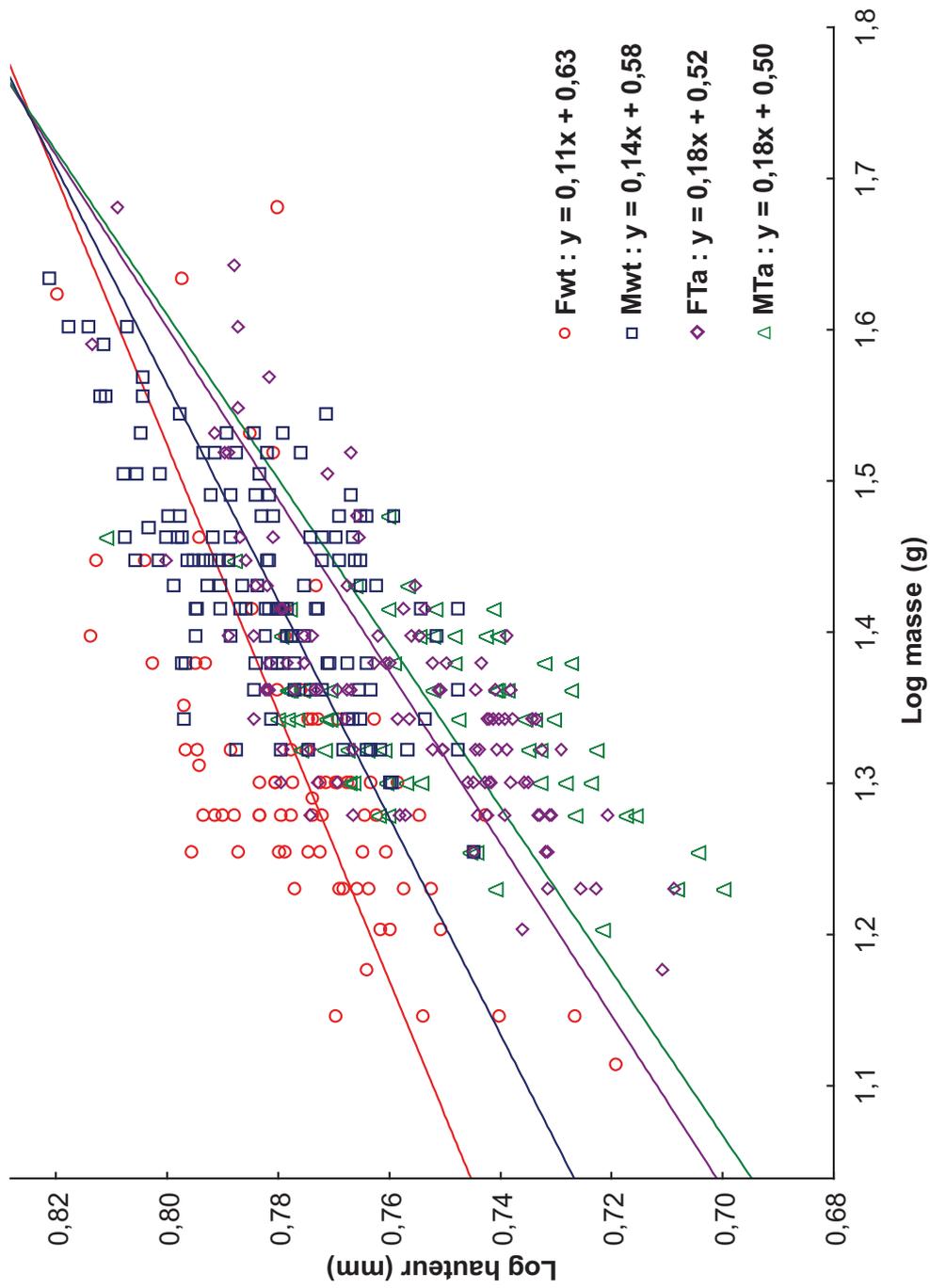


Figure 34

**Suivi longitudinal : représentation log-log des variations de hauteur mandibulaire en fonction de l'âge**

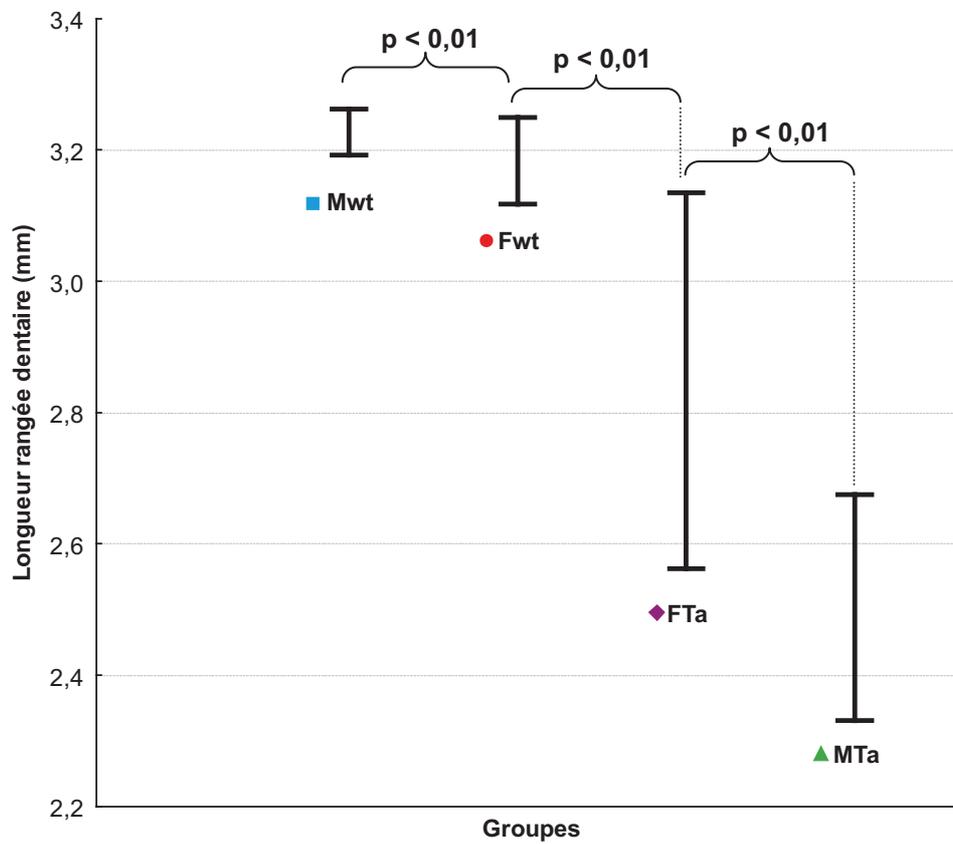
Les équations des droites de régression pour chaque groupe sont également présentées.

Fwt : femelles WT ; Mwt : mâles WT ; FTa : femelles Tabby ; MTa : mâles Tabby.

**Tableau 4.** Synthèse des régressions linéaires calculées à partir des représentations log-log de la surface, de la hauteur et de la longueur mandibulaire en fonction de l'âge pour chaque groupe étudié (WT, Eda<sup>Ta/Y</sup> et Eda<sup>Ta/+</sup>).

		<b>A</b>	<b>b</b>	<b>r<sup>2</sup></b>	<b>r</b>	<b>p</b>
<b>Mâles WT</b>	<b>Surface</b>	0,25	1,21	0,50	0,71	< 0,01*
	<b>Hauteur</b>	0,14	0,58	0,39	0,63	< 0,01*
	<b>Longueur</b>	0,14	0,86	0,58	0,76	< 0,01*
<b>Femelles WT</b>	<b>Surface</b>	0,22	1,28	0,50	0,71	< 0,01*
	<b>Hauteur</b>	0,11	0,63	0,39	0,62	< 0,01*
	<b>Longueur</b>	0,13	0,89	0,57	0,75	< 0,01*
<b>Femelles Ta</b>	<b>Surface</b>	0,31	1,12	0,65	0,80	< 0,01*
	<b>Hauteur</b>	0,18	0,52	0,54	0,73	< 0,01*
	<b>Longueur</b>	0,17	0,83	0,71	0,84	< 0,01*
<b>Mâles Ta</b>	<b>Surface</b>	0,35	1,06	0,35	0,59	< 0,01
	<b>Hauteur</b>	0,18	0,50	0,23	0,48	< 0,01
	<b>Longueur</b>	0,16	0,84	0,38	0,62	< 0,01

*a* : coefficient directeur de la droite de régression ; *b* : ordonnée à l'origine ; *r* : coefficient de corrélation ; *p* : seuil de significativité ; \* indique un  $p < 0,01$ .



**Figure 35.**

**Longueur de la rangée dentaire**

Variations inter et intra-groupes. Résultats des comparaisons inter-groupes (test de Mann-Whitney)

Mwt : mâles WT ; Fwt : femelles WT; FTa : femelles Tabby ; MTa : mâles Tabby.

## DISCUSSION

### **Caractérisation des dysmorphoses mandibulaires chez les mutants Ta adultes**

L'analyse de Fourier elliptique a été choisie pour caractériser la forme mandibulaire en vue latérale. Cette méthodologie a déjà été appliquée avec succès dans le cadre de nombreuses applications morphométriques (Erlich and Weinberg, 1970 ; Christopher et Waters, 1974 ; Jacobshagen, 1986 ; Flook, 1987 ; O'Higgins et Williams, 1987 ; Johnson *et al.*, 1992 ; Cheng *et al.*, 1999 ; Zhang et Lu, 2002), et notamment pour la quantification de la forme mandibulaire dans l'espèce humaine (Ferrario *et al.*, 1996 ; Lestrel, 1997) et chez les primates (Raveloson *et al.*, 2005 ; Schmittbuhl *et al.*, 2007).

Contrairement à d'autres approches morphométriques basées sur l'utilisation de points de référence et de mesures associées (Bookstein, 1991 ; Rohlf and Marcus, 1993 ; Richtsmeier *et al.*, 2002), l'analyse de Fourier elliptique considère la forme mandibulaire dans sa globalité. Elle est donc particulièrement adaptée à la caractérisation de cette structure ; peu de points de références avec une valeur biologique reconnue au sens de la classification de Bookstein (1991) ne pouvant en effet être repérés au niveau mandibulaire. Les quelques études qui s'intéressent à la morphologie mandibulaire chez les mutants Tabby ne fournissent que des descriptions générales des anomalies mandibulaires, basées essentiellement sur des estimations visuelles et qualitatives de cette structure osseuse (Grüneberg, 1971).

Les reconstructions pas à pas du contour mandibulaire apportent une aide précieuse pour interpréter les contributions morphologiques de chaque harmonique de la série de Fourier. Les premiers harmoniques fournissent une description des caractéristiques générales de la silhouette mandibulaire ; en effet, tous les aspects du profil mandibulaire apparaissent au cours de la sommation des 9 premiers harmoniques. Les harmoniques d'ordre plus élevés (à partir du 10<sup>ème</sup>) décrivent des caractéristiques morphologiques plus fines (figure 16). Les descripteurs de Fourier elliptiques (longueurs du grand axe et du petit axe, orientation elliptique) illustrant directement la contribution géométrique de l'harmonique d'ordre  $j$ , l'étude simultanée de ces descripteurs et des reconstructions

pas à pas nous a donc permis d'interpréter morphologiquement les contributions des harmoniques de la série de Fourier.

A notre connaissance, aucune analyse quantitative du phénotype mandibulaire n'a été entreprise alors que le massif cranio-facial, aussi bien du mutant Ta que de l'embryon humain atteint de DEX (Montonen *et al.*, 1998), présente des anomalies morphologiques. L'analyse de Fourier elliptique a, quant à elle, permis d'obtenir, pour la première fois, des données quantitatives mettant en évidence des différences mandibulaires significatives entre les souris Tabby et la lignée non mutée WT.

La forme du contour mandibulaire en vue latérale permet à elle seule une distinction claire entre le groupe  $Eda^{Ta/Y}$  et les autres groupes. Ce ne sont pas les différences de taille qui contribuent à cette distinction, aucune différence significative entre les mâles Ta et leurs correspondants WT n'ayant pu être démontrée (figure 20). La forme mandibulaire apparaît donc comme une caractéristique pertinente dans la compréhension des conséquences de la mutation  $EDA/Ta$  ; la distinction marquée du groupe hémizygote  $Eda^{Ta/Y}$  (figure 17) semble en effet indiquer que les altérations du gène  $EDA/Ta$  contribuent plus spécifiquement à des anomalies de forme qu'à des anomalies de taille. Même si des différences sexuelles de forme mandibulaire semblent exister au sein des lignées étudiées (cf distance inter-groupe entre les mâles et femelles WT, figure 17), la distinction marquée entre les mâles Ta et WT comparée à la différence relativement plus réduite, observée entre les mâles et femelles Ta, apporte un argument supplémentaire en faveur du rôle important que joue le gène  $Ta$  sur la morphogenèse mandibulaire.

Ces traits morphologiques distincts, mis en évidence au niveau de la mandibule des souris hémizygotes  $Eda^{Ta/Y}$  corroborent le tableau phénotypique sévère qu'expriment les mâles mutants Ta (Sofaer, 1969 ; Blecher, 1986). Nos résultats sont à rapprocher d'autres anomalies squelettiques connues comme, par exemple, celles observées au niveau des vertèbres de la queue (Hill *et al.*, 2002). Même si ces structures osseuses se développent à partir de condensations mésenchymateuse (Dixon, 1997), les anomalies osseuses retrouvées chez les souris hémizygotes  $Eda^{Ta/Y}$  soulignent tout particulièrement le rôle d'EDA-A dans les interactions épithélio-mésenchymateuses qui constituent un phénomène essentiel à la formation normale du squelette (Hall, 1980 ; Hall et Coffin-Collins, 1990 ; Dixon, 1997). Ces anomalies suggèrent également que l'expression d'EDA-A dans les ostéoblastes peut jouer un rôle important dans le développement osseux (Hill *et al.*, 2002).

Les anomalies morphologiques retrouvées chez les souris hémizygotes  $Eda^{Ta/Y}$  consistent principalement en un hypo-développement mandibulaire dorso-ventral, la hauteur du corps mandibulaire étant particulièrement affectée (figure 19). Des différences subtiles sont également mises en évidence, notamment une version plus postérieure du processus coronoïde et un col du condyle plus étroit (figures 18 et 19). L'origine de ces modifications morphologiques reste toutefois à analyser. Des investigations supplémentaires sont en effet nécessaire afin de préciser (1) si ces différences ne résultent pas de phénomènes de compensation vis-à-vis d'autres anomalies cranio-faciales classiquement rencontrées chez les patients DEX telles que l'hypoplasie et la rétrognathie maxillaire (Bondarets *et al.*, 2002 ; Johnson *et al.*, 2002 ; Dellavia *et al.*, 2006) mais qui restent toutefois à démontrer chez le mutant Ta ou (2) si ces anomalies sont directement la conséquence de la mutation Ta elle-même. Les modifications significatives de la morphologie mandibulaire sont probablement à rapprocher des anomalies bien documentées de la rangée dentaire inférieure (Kristenova *et al.*, 2002 ; Peterkova *et al.*, 2002). Les individus hémizygotes  $Eda^{Ta/Y}$ , en exprimant un patron d'expression dentaire et mandibulaire très différent de celui des individus WT, apportent autant d'arguments supplémentaires en faveur de l'existence d'une forte corrélation entre les dysmorphoses mandibulaires quantifiées chez les souris  $Eda^{Ta/Y}$  et le défaut du gène *EDA/Ta*.

Le patron d'expression mandibulaire chez les souris hétérozygotes  $Eda^{Ta/+}$  semblent être relativement moins affecté, comme le suggère le chevauchement de ce groupe avec celui des femelles WT (figure 17). Néanmoins, les variations intra-groupes chez les femelles hétérozygotes semblent être supérieures à celles observées chez les mâles hémizygotes, une proximité morphologique de certains individus femelles avec les souris hémizygotes  $Eda^{Ta/Y}$  ayant même été retrouvée (figure 17). Ce niveau de variation marqué pourrait être rapproché de l'important polymorphisme de la rangée dentaire décrit chez les femelles  $Eda^{Ta/+}$  (Sofaer, 1969 ; Kristenova *et al.*, 2002 ; Peterkova *et al.*, 2002 ; Charles *et al.*, 2009). Le degré de variabilité élevé de la rangée dentaire et de la morphologie mandibulaire pourrait être lié à un probable effet d'inactivation du chromosome X (Lyon, 1961 ; Plath *et al.*, 2002). Ce mécanisme moléculaire conduit, chez les femelles Ta hétérozygotes, à une mosaïque de cellules regroupant cellules WT ou encore cellules à expression nulle du gène *EDA*. L'effet de l'inactivation du chromosome X pourrait donc potentiellement induire des patrons d'expression dentaires et mandibulaires variés, susceptibles d'expliquer le degré de polymorphisme mandibulaire plus élevé chez les femelles hétérozygotes  $Eda^{Ta/+}$ .

Concernant la forme mandibulaire, les descripteurs de Fourier elliptiques ont donc permis de fournir une description originale des anomalies mandibulaires chez les mutants Ta. Les performances de cette approche à détecter de subtiles différences du contour mandibulaire (projection postérieure du processus coronoïde, étroitesse du col du condyle) ne font que renforcer l'intérêt de ce type d'analyse par rapport aux approches morphométriques conventionnelles. Les différences de morphologie mandibulaire mises en évidence ici, complètent le tableau phénotypique des mutant Ta et sont à rapprocher des anomalies dentaires et squelettiques observées chez les souris Tabby.

### **Suivi longitudinal des lignées WT et Tabby**

Le suivi longitudinal des dimensions et des mesures de surface mandibulaires semble indiquer l'existence d'un hypo-développement de la mandibule chez les souris mâles hémizygotes  $Eda^{Ta/Y}$ . Ce résultat vient non seulement confirmer les observations de Moutier *et al.* (1992) sur des mutants Ta adultes, mais montre que cet hypo-développement s'exprime précocement au cours de la croissance (figures 22-26). Ce phénomène est en effet détecté dès les premières acquisitions (5<sup>ème</sup> semaine) et il aurait probablement été mis en évidence plus tôt si des acquisitions avaient pu être réalisées dès la naissance des spécimens.

Cette tentative de suivi longitudinal et de caractérisation des dysmorphoses mandibulaire chez les mutants Ta au cours de la croissance est inédite. A notre connaissance, aucun suivi longitudinal ne semble avoir été réalisé chez le modèle murin de la dysplasie ectodermique hypohidrotique. Plus généralement, le couplage d'explorations micro-CT et d'analyses morphométriques *in vivo* en vue de la caractérisation de dysmorphoses au cours de la croissance reste peu répandu. Non seulement l'approche développée dans le cadre de ce travail de recherche permet d'apprécier la mise en place de ces anomalies du complexe cranio-facial, mais également fourni une base de données précieuse grâce notamment à la cohorte d'individus WT utilisés ici comme groupe contrôle. Rares sont en effet les études qui fournissent un suivi aussi systématisé et sur une période aussi longue (examens hebdomadaires entre le 1<sup>er</sup> et le 4<sup>ème</sup> mois, tous les 15 jours entre les 5<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> mois et tous les 3 mois au-delà du 6<sup>ème</sup> mois). Si des approches existent, elles sont limitées à des périodes plus courtes (Eckstein *et al.*, 2004 ; Laperre *et al.*, 2011) et se focalisent plutôt sur des mesures de densité osseuse (Eckstein *et al.*, 2004) ou le suivi de marqueurs biologiques (Lindberg *et al.*, 2001). Ce suivi

longitudinal des souris WT constitue donc un référentiel pour l'exploration phénotypique du modèle Tabby mais fournit également une base de données unique pour l'étude d'autres modèles syndromiques.

Le niveau d'irradiation lié aux explorations micro-CT répétées pourrait néanmoins avoir un impact sur la croissance osseuse des spécimens étudiés dans le cadre de ce suivi longitudinal. La dose absorbée à la tête serait, selon les données constructeur, de 100 mGy par acquisition. Laperre *et al.* (2011) ont récemment montré qu'une dose de 434 mGy associée à une série de 3 examens micro-CT réalisés sur une période de 28 jours, n'aurait pas d'effets radio-induits sur l'architecture de la corticale ou encore sur la trabéculatation osseuse. Sur la base de ces observations, le niveau d'exposition lié aux explorations micro-CT hebdomadaires ne serait donc pas à l'origine de l'hypo-développement mandibulaire observé chez les mutants Ta à moins que ces derniers présentent une plus grande sensibilité aux radiations ionisantes que les individus Ta. Aucune donnée de la littérature ne semble pourtant mettre en évidence une radio-sensibilité plus importante au sein de cette lignée.

Parmi les caractéristiques mandibulaires analysées, la hauteur de la branche mandibulaire semble particulièrement affectée chez les mutants Ta (figure 24). Ce résultat semble cohérent avec celui observé dans le cadre de la quantification de la forme mandibulaire chez les souris hémizygotés  $Eda^{Ta/Y}$  adultes (Bornert *et al.* 2011), une version postérieure plus marquée du processus coronoïde ayant en effet été mise en évidence chez ces individus.

L'origine de cet hypo-développement dorso-ventral de la mandibule chez les mutants Ta est probablement la résultante de plusieurs phénomènes complexes. La mutation Ta a en effet un impact majeur sur le phénotype dentaire comme le souligne les données de la littérature (Kristenova *et al.*, 2002 ; Peterkova *et al.*, 2002 ; Charles *et al.*, 2009) ainsi que nos résultats (figure 35). Ces anomalies dentaires et notamment la réduction de la longueur de la rangée dentaire pourraient s'accompagner d'un manque de sollicitation mandibulaire et donc affecter la croissance de la branche mandibulaire comme semble le suggérer plusieurs observations réalisées à partir de modèles murins d'agénésies dentaires (Grewe et Felts, 1969 ; Kawata *et al.*, 1997). D'autre part, des processus d'ossification anormaux pourraient également perturber la croissance mandibulaire. Kawata *et al.* (1997) ont montré que des profils ostéopétrotiques pouvaient être associés à des anomalies du processus condyloïde et du ramus mandibulaire. Dans la mesure où le phénotype osseux chez les souris hémizygotés  $Eda^{Ta/Y}$

présente également des signes d'ostéopétrose (Hill *et al.*, 2002), l'hypo-développement mandibulaire mis en évidence par ce suivi longitudinal pourrait donc résulter d'une combinaison de facteurs fonctionnels et trophiques liés respectivement aux anomalies dentaires et au phénotype ostéopétrotique de ces spécimens.

Le polymorphisme mandibulaire au cours de la croissance semble toujours plus marqué chez les mutants Ta mâles que chez les correspondants WT (figures 27-31). Ce résultat est cohérent avec les variations surfaciques observées chez les individus hémizygotés  $Eda^{Ta/Y}$  (figure 20) et est à rapprocher des variations importantes de longueur de rangée dentaire (figure 35). Comme certaines approches expérimentales ont pu le mettre en évidence sur d'autres modèles (Grewe et Felts, 1969), nos observations pourraient fournir un argument supplémentaire en faveur de l'impact fonctionnel et morphologique des anomalies dentaires sur la croissance mandibulaire et donc sur la variabilité d'expression phénotypique rencontrée chez les mutants Ta mâles.

Les souris hétérozygotes  $Eda^{Ta/+}$  semblent exprimer un profil de croissance intermédiaire (figures 22-26 et 32). Ce patron d'expression phénotypique est à rapprocher de celui retrouvé au niveau de la forme mandibulaire (figure 17), soulignant ainsi une relative cohérence entre les résultats obtenus respectivement à partir de l'analyse de la forme mandibulaire et du suivi longitudinal. Par ailleurs, le degré de polymorphisme plus important chez les femelles Ta que chez les femelles WT (figures 22-26) se retrouve également au niveau de la longueur de la rangée dentaire (figure 35), venant ainsi appuyer les nombreuses observations relatives à la variabilité du phénotype dentaire chez les individus hétérozygotes  $Eda^{Ta/+}$  (Sofaer, 1969 ; Kristenova *et al.*, 2002 ; Peterkova *et al.*, 2002 ; Charles *et al.*, 2009). Comme évoqué précédemment, cette variabilité phénotypique pourrait résulter d'un effet d'inactivation du chromosome X, susceptible de générer des patrons d'expression très variés aussi bien au plan dentaire que mandibulaire.

Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la mise en place des dysmorphoses mandibulaires pourraient avant tout être liés à un rôle direct que le gène *EDA* pourrait jouer dans le développement du complexe cranio-facial (Montonen *et al.*, 1998 ; Bushdid *et al.*, 2001) et plus spécialement dans celui du cartilage de Meckel (Tucker *et al.*, 2000). La fonction du gène *EDA* aussi bien dans le développement cranio-facial normal que celui des anomalies du massif facial chez les patients affectés par les DEH reste toutefois à préciser.

Une des hypothèses qui pourrait être évoquée serait que les anomalies de morphologie mandibulaire chez la souris *Ta* soient la conséquence d'un développement ectodermique défectueux (Mina, 2001 ; Pummila *et al.*, 2007). Selon Haworth *et al.* (2004), les cellules qui viendront occuper l'épithélium des parties distale et proximale de la mandibule primitive occupent déjà différentes localisations spatiales au cours du développement ectodermique céphalique précédent la formation du premier arc pharyngien et la migration des cellules des crêtes neurales. Par conséquent, les anomalies ectodermiques telles que celles associées à la mutation *EDA/Ta* pourraient être responsables d'altérations du développement mandibulaire. De plus, l'implication de gènes ectodermiques dans le patron d'expression mandibulaire a déjà été mise en évidence à travers, notamment, l'inactivation de *Ptx1*, un autre gène ecto-mésodermique, menant à des altérations de la chondrogenèse et à la perte d'éléments osseux dérivés de la partie proximale du mésenchyme mandibulaire (Lanctôt *et al.*, 1999).

L'ensemble de ces résultats confirment donc le rôle de la protéine EDA-A dans les interactions épithélio-mésenchymateuses, interactions qui jouent un rôle majeur dans le développement normal du complexe dento-cranio-facial. Même si des travaux complémentaires sont nécessaires pour explorer l'ensemble du squelette cranio-facial, nos analyses ont permis de fournir pour la première fois une description détaillée des dysmorphoses mandibulaires chez les mutants *Ta*, d'apprécier leur mise en place précoce au cours de la croissance, de cerner la complexité des phénomènes multifactoriels qui contribuent à ces anomalies de développement et enfin d'identifier les portions mandibulaires qui devraient faire l'objet d'une analyse en profondeur des mécanismes cellulaires et moléculaires liés à la mutation du gène *EDA/Ta*.

## CONCLUSION

Sur le plan méthodologique, des développements supplémentaires concernant les procédures de traitements d'images, de réorientation automatique et de segmentation 3D sont nécessaires pour optimiser notre protocole. Notre expérimentation a montré que ces étapes étaient particulièrement chronophages et constituaient donc un facteur limitant pour mener des études de plus grande ampleur.

Au-delà des anomalies dentaires classiquement décrites chez le modèle murin de la DEX, des dysmorphoses mandibulaires ont pu être mises en évidence chez les mutants *ta*. Les anomalies du gène *EDA* semblent affecter non seulement les dérivés ectodermiques mais également le développement mandibulaire. Ces résultats apportent donc des éléments nouveaux en faveur d'une implication du gène *EDA* et plus largement de la voie NF- $\kappa$ B dans le développement et la croissance mandibulaire voire du massif cranio-facial.

Le polymorphisme mandibulaire retrouvé aussi bien chez les souris hémizygotes  $Eda^{Ta/Y}$  que les souris hétérozygotes  $Eda^{Ta/+}$  apporte un éclairage nouveau sur le patron d'expression phénotypique des mutants *Ta* et semble indiquer que cette variabilité pourrait résulter d'une combinaison de phénomènes complexes basée à la fois sur des mécanismes moléculaires (voie NF- $\kappa$ B), trophiques (ostéopétrose), morphologiques (anomalies dentaires) et fonctionnels (troubles de l'occlusion). A cela s'ajoute chez les souris hétérozygotes  $Eda^{Ta/+}$  un probable effet d'inactivation du chromosome X conduisant à des patrons d'expression dentaires et mandibulaires particulièrement variés, susceptibles d'expliquer le degré de polymorphisme mandibulaire plus élevé chez les femelles hétérozygotes  $Eda^{Ta/+}$ .

Le suivi longitudinal des mutants *Ta* semble révéler l'existence, précoce, d'un hypo-développement de la mandibule particulièrement marqué chez les souris mâles hémizygotes  $Eda^{Ta/Y}$ . Le suivi des souris WT constitue par ailleurs un référentiel particulièrement intéressant pour la lignée Tabby et fournit plus largement une base de données unique pour l'étude d'autres modèles syndromiques. En effet, l'approche développée dans ce travail serait tout à fait transposable à d'autres modèles murins. Toutefois, les contraintes techniques des modalités d'imagerie utilisées empêchent d'examiner des spécimens murins plus précocement. Ces explorations, au cours des premières semaines de vie, nécessiteraient, compte-tenu de la petite taille des individus, le recours à des protocoles de plus haute

résolution qui sont beaucoup plus irradiants avec comme corollaire un risque d'altération du processus de croissance.

Sur le plan thérapeutique, certains chercheurs envisagent dans un futur proche, d'obtenir, à partir d'une protéine EDA recombinante, une réversion du phénotype de patients DEX. Ces essais sont motivés par les résultats encourageant d'études similaires menées chez la souris ou le chien. Des reversions phénotypiques quasi-complètes ont pu être réalisées en se basant sur des critères de succès qualitatifs ou quantitatifs limités (nombre de dents présentes, aspect du pelage...). La connaissance des dysmorphoses mandibulaires chez le mutant Ta pourrait également servir de critère référence permettant d'obtenir une comparaison quantitative et tester ainsi l'efficacité de la réversion phénotypique pour une protéine recombinante donnée.

## RÉFÉRENCES

- Blecher SR (1986). Anhidrosis et absence of sweat glands in mice hemizygous for the tabby gene: supportive evidence for the hypothesis of homology between tabby et human anhidrotic (hypohidrotic) ectodermal dysplasia (Christ-Siemens-Touraine syndrome). *J Invest Dermatol.* 87, 720-722.
- Bondarets N, Jones RM et McDonald F (2002). Analysis of facial growth in subjects with syndromic ectodermal dysplasia: a longitudinal analysis. *Orthod Craniofac Res.* 5, 71-84.
- Bookstein FL (1991). *Morphometric tools for landmark data: geometry et biology.* New York: Cambridge university press.
- Bornert F, Choquet P, Gros C-I, Aubertin G, Perrin-Schmitt F, Clauss F, Lesot H, Constantinesco A et Schmittbuhl M (2011). Subtle morphological changes in the mandible of Tabby mice revealed by micro-CT imaging and elliptical Fourier quantification. *Front Physio.* 2, 1-9.
- Bourgeois P, Bolcato-Bellemin AL, Danse JM, Bloch-Zupan, A, Yoshida, K, Stoetzel C et Perrin-Schmitt F (1998). The variable expressivity et incomplete penetrance of the twist-null heterozygous mouse phenotype resemble those of human Saethre-Chotzen syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 7, 945-957.
- Bushdid PB, Chen CL, Brantley DM, Yull F, Raghoebar R, Kerr LD et Barnett JV (2001). NF-kappaB mediates FGF signal regulation of msx-1 expression. *Dev. Biol.* 237, 107-115.
- Chai Y et Maxson RE (2006). Recent advances in craniofacial morphogenesis. *Dev Dyn.* 235, 2353-2375.
- Charles C, Pantalacci S, Perterkova R, Tafforeau P, Laudet V et Viriot L (2009). Effect of eda loss of function on upper jugal tooth morphology. *Anat. Rec.* 292, 299-308.
- Cheng D, Ward RK, Yan H, Recognition of handwritten numerals using topological structures et Fourier descriptors of numeral contours. *Can J Electr Comput Eng,* 1999. 24: 73-83.
- Christopher RA et Waters JA (1974). Fourier analysis as a quantitative descriptor of miospore shape. *J Paleontol.* 48, 697-709.
- Clauss F, Maniere MC, Obry F, Waltmann E, Hadj-Rabia S, Bodemer C, Alembik Y, Lesot H et Schmittbuhl M (2008). Dento-craniofacial phenotypes et underlying molecular mechanism in hypohidrotic ectodermal dysplasia (HED): a review. *J Dent Res.* 87, 1089-1099.
- Coster M et Chermant JL (1995). *Précis d'analyses d'images.* Paris : CNRS.
- Dellavia C, Sforza C, Malerba A, Strohmenger L et Ferrario VF (2006). Palatal size et shape in 6-year olds affected by hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Angle Orthod.* 76, 978-983.

- Dixon AD (1997). "Prenatal development of the facial skeleton," in *Fundamentals of Craniofacial Growth*, eds AD Dixon, DAN Hoyte, et O Rönning (Boca Raton: CRC Press), 59-97.
- Eckstein F, Weusten A, Schmidt C, Wehr U, Wanke R, Rambeck W, Wolf E et Mohan S (2004). Longitudinal in vivo effects of growth hormone overexpression on bone in transgenic mice. *J Bone Miner Res.* 19, 802-10.
- Ehrlich R et Weinberg B, An exact method for the characterization of grain shape. *J Sediment Petrol*, 1970. 40: 205-212.
- Everitt B et Rabe-Hesketh S (2001). *Analysis of Medical Data Using S-Plus*. New York: Springer.
- Ferrario VF, Sforza C, Guzzi M, et Serrao G (1996). Elliptic Fourier analysis of mandibular shape. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 16, 208-217.
- Flook A (1987). The quantitative measurement of particle shape. *Acta Stereol.* 6, 1009-1027.
- Grewe JM et Felts WJ (1969). The consequences of mandibular incisor extraction in the young mouse. I-Histologic aspects. *J Dent Res.* 48, 583-9.
- Grüneberg H (1971). The gletular aspects of the tabby syndrome in the mouse. *J Embryol Exp Morphol.* 25, 1-19.
- Hall BK (1980). Tissue interactions et the initiation of osteogenesis et chondrogenesis in the neural crest-derived mandibular skeleton of the embryonic mouse as seen in isolated murine tissues et in recombinations of murine et avian tissues. *J Embryol Exp Morphol.* 58, 251-264.
- Hall BK et Coffin-Collins PA (1990). Reciprocal interactions between epithelium, mesenchyme, et epidermal growth factor (EGF) in the regulation of mandibular mitotic activity in the embryonic chick. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 10, 241-261.
- Hammer O, Harper DAT et Ryan PD (2001). PAST: paleontological statistics software package for education et data analysis. *Palaeontol Electronica.* 4, 1-9.
- Hashiguchi T, Yotsumoto S et Kanzaki T (2003). Mutations in the ED1 gene in Japanese families with X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Exp Dermatol.* 12, 518-522.
- Haworth KE, Healy C, Morgan P et Sharpe PT (2004). Regionalisation of early head ectoderm is regulated by endoderm et prepatterns the orofacial epithelium. *Development.* 131, 4797-4806.
- Herring SW et Lakars TC (1982). Craniofacial development in the absence of muscle contraction. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1, 341-57.
- Hill NL, Laib A et Duncan MK (2002). Mutation of the ectodysplasin-A gene results in bone defects in mice. *J Comp Pathol.* 126, 220-225.

- Jacobshagen B (1986). Size et shape of the orbital outline : a multivariate comparison et analysis of intraspecific variation in four hominoid species, in *Primate Evolution*, JG Else et PC Lee editors. New York : Cambridge university press. 281-288.
- Johnson DR, O'Higgins P, McEtreu TJ, et Kida MY (1992). The inheritance of vertebral shape in the mouse. I. Fourier analysis to examine patterns of inheritance in the morphology of cervical et upper thoracic vertebrae. *J Anat.* 180, 507-514.
- Johnson EL, Roberts MW, Guckes AD, Bailey LJ, Phillips CL et Wright JT (2002). Analysis of craniofacial development in children with hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Am J Med Genet A.* 112, 327-334.
- Kawata T, Niida S, Kawasoko S, Kaku M, Fujita T, Sugiyama H et Tanne K (1997). Morphology of the mandibular condyle in "toothless" osteopetrotic (op/op) mice. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 17, 198-203.
- Klingenberg CP et Leamy LJ (2001). Quantitative genetics of geometric shape in the mouse mandible. *Evolution.* 55, 2342-2352.
- Klingenberg CP, Leamy LJ, Routman EJ, et Cheverud JM (2001). Genetic architecture of mandible shape in mice: effects of quantitative trait loci analyzed by geometric morphometrics. *Genetics.* 157, 785-802.
- Kristenova P, Peterka M, Lisi S, Gendrault JL, Lesot H et Peterkova R (2002). Different morphotypes of functional dentition in the lower molar region of tabby (EDA) mice. *Orthod Craniofac Res.* 5, 205-214.
- Kuhl FP et Giardana CR (1982). Elliptic Fourier features of closed contour. *Comput Graph Image Process.* 18, 236-258.
- Lanctôt C, Moreau A, Chamberlet M, Tremblay ML et Drouin J (1999). Hindlimb patterning et mandible development require the Ptx1 gene. *Development.* 126,1805-1810.
- Laperre K, Depypere M, van Gastel N, Torrekens S, Moermans K, Bogaerts R, Maes F et Carmeliet G. (2011). Development of micro-CT protocols for in vivo follow-up of mouse bone architecture without major radiation side effects. *Bone.* 49, 613-22.
- Lestrel PE (199). Morphometrics of Craniofacial growth, in *Fundamentals of Craniofacial Growth*, A.D. Dixon, D. Hoyte, and O. Ronning, Editors, Boca Raton: CRC Press. 155-185.
- Lindberg MK, Alatalo SL, Halleen JM, Mohan S, Gustafsson JA et Ohlsson C (2001). *J Endocrinol,* 171 : 229-36.
- Lorensen WE et Cline HE (1987). Marching Cubes: A high resolution 3D surface construction algorithm. In: *Computer Graphics.* 21, 163-169.

- Lyon M. (1961). Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 190, 372-373.
- Mikkola ML et Thesleff I (2003). Ectodysplasin signaling in development. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14, 211-224.
- Mina M (2001). Regulation of mandibular growth et morphogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 12, 276-300.
- Montonen O, Ezer S, Saarialho-Kere UK, Herva R, Karjalainen-Lindsberg ML, Kaitila I, Schlessinger D, Srivastava AK, Thesleff I et Kere J (1998). The gene defective in anhidrotic ectodermal dysplasia is expressed in the developing epithelium, neuroectoderm, thymus, et bone. *J Histochem Cytochem.* 46, 281-289.
- Mortier K et Wackens G (2004). Ectodermal Dysplasia anhidrotic, in Orphanet Encyclopedia. September. Orphanet. <http://www.orpha.net>.
- Moutier R, Signore P et Nosten-Bertrand M (1992). Mandible shape analysis in a testicular feminization (Tfm) strain of mice. *J Hered.* 83, 235-237.
- O'Higgins P et Williams NW, An investigation into the use of coefficients in characterizing cranial shape in primates. *J Zool.* 1987. 211: 409-430.
- Peterkova R, Kristenova P, Lesot H, Lisi S, Vonesch JL, Gendrault JL et Peterka M (2002). Different morphotypes of the tabby (EDA) dentition in the mouse mandible result from a defect in the mesio-distal segmentation of dental epithelium. *Orthod Craniofac Res.* 5, 215-226.
- Plath K, Mlynarczyk-Evans S, Nusinow D et Panning B (2002). XIST RNA et the mechanism of X chromosome inactivation. *Annu Rev Genet.* 36, 233-278.
- Priolo M et Lagana C (2001). Ectodermal dysplasias: a new clinical-genetic classification. *J Med Genet.* 38, 579-585.
- Pummila M, Fliniaux I, Jaatinen R, James MJ, Laurikkala J, Schneider P, Thesleff I et Mikkola, ML. (2007). Ectodysplasin has a dual role in ectodermal organogenesis: inhibition of Bmp activity et induction of Shh expression. *Development.* 134, 117-125.
- Raveloson H, Le Minor JM, Rumpler Y, et Schmittbuhl M (2005). Shape of the lateral mandibular outline in Lemuridae: a quantitative analysis of variability usinig elliptical Fourier analysis. *Folia Primatol.* 76, 245-261.
- Renaud S, Chevret P, et Michaux J (2007). Morphological vs. molecular evolution: ecology et phylogeny both shape the mandible of rodents. *Zoologica Scripta.* 36, 525-535.
- Richtsmeier JT, Baxter LL et Reeves RH (2000). Parallels of craniofacial maldevelopment in Down syndrome and Ts65Dn mice. *Dev Dyn.* 217, 137-45.

- Richtsmeier J, Zumwalt A, Carlson E, Epstein C et Reeves R (2002). Craniofacial phenotypes in segmentally trisomic mouse models for Down syndrome. *Am J Med Genet.* 107, 317-324.
- Rohlf FJ et Marcus LF (1993). A revolution in morphometrics. *Trends in Ecology et Evolutions.* 8, 129-132.
- Ruhin B, Martinot V, Lafforgue P, Catteau B, Manouvrier-Hanu S et Ferri J (2001). Pure ectodermal dysplasia: retrospective study of 16 cases and literature review. *Cleft Palate Craniofac J.* 38, 504-518.
- Russ JC (2002). *The Image processing handbook*, 4th ed, CRC press : Boca Raton.
- Schmittbuhl M, Allenbach B, Le Minor JM et Schaaf A (2003). Elliptical descriptors: some simplified morphometric parameters for the quantification of complex outlines. *Math Geol.* 35, 853-872.
- Schmittbuhl M, Rieger J, Le Minor JM, Schaaf A, et Guy F (2007). Variations of the mandibular shape in extant hominoids: Generic, specific, et subspecific quantification using elliptical Fourier analysis in lateral view. *Am J Phys Anthropol.* 132, 119-131.
- Smahi A, Courtois G, Rabia SH, Döffinger R, Bodemer C, Munnich A, Casanova JL et Israël A (2002). The NF- $\kappa$ B signalling pathway in human diseases : from incontinentia pigmenti to ectodermal dysplasias et immune-deficiency syndromes. *Hum Mol Genet.* 11, 2371-2375.
- Sofaer JA (1969). Aspects of the tabby- crinkled et downless syndrome. I. The development of tabby teeth. *J Embryol Exp Morphol.* 22, 181-205.
- Srivastava AK, Pispis J, Hartung AJ, Du Y, Ezer S, Jenks T, Shimada T, Pekkanen M, Mikkola M L, Ko MS, Thesleff I, Kere J et Schlessinger D (1997). The tabby phenotype is caused by mutation in a mouse homologue of the EDA gene that reveals novel mouse et human exons et encodes a protein (ectodysplasin-A) with collagenous domains. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94, 13069-13074.
- Tucker AS, Headon DJ, Schneider P, Ferguson BM, Overbeek P, Tschopp J et Sharpe PT (2000). Edar/Eda interactions regulate enamel knot formation in tooth morphogenesis. *Development.* 127, 4691-4700.
- Zhang D et Lu G (2002). Shape-based image retrieval using generic Fourier descriptors. *Signal Processing : Image Commun.* 17, 825-848.

## ANNEXES

**Annexe 1.** Comparaisons inter-observateurs des mesures mandibulaires (surface, longueur, hauteur).

Résultats du test de Wilcoxon. Même si une erreur de mesure significative a été observée au niveau de la longueur mandibulaire, cette erreur reste inférieure à 2%.

	Surface (mm <sup>2</sup> )		Longueur (mm)		Hauteur (mm)	
	Obs1	Obs2	Obs1	Obs2	Obs1	Obs2
FG20Ta	32,0	32,4	10,8	10,7	5,4	5,5
FG25Ta	34,0	34,0	11,5	11,3	5,7	5,7
FG28Ta	32,0	32,9	11,1	10,9	5,4	5,4
FG30Ta	36,8	36,6	11,4	11,2	6,0	6,0
FG35Ta	36,2	36,5	11,6	11,4	5,8	5,8
FG37Ta	34,3	34,4	11,6	11,3	5,5	5,5
FG31WT	37,3	37,4	11,8	11,7	6,0	6,0
FG36WT	37,6	36,5	11,7	11,3	5,9	5,9
FG116WT	33,4	33,8	11,0	11,0	5,6	5,6
FG118WT	36,8	36,6	11,4	11,2	6,0	6,0
FG124WT	35,5	35,9	11,0	11,0	5,9	6,0
MG38Ta	32,6	31,6	11,4	10,9	5,5	5,4
MG40Ta	31,7	30,2	11,0	10,7	5,3	5,3
MG117Ta	27,0	25,9	10,2	9,8	5,0	4,9
MG126Ta	35,0	35,4	11,5	11,5	5,8	5,8
MG127Ta	31,8	32,4	11,2	11,0	5,6	5,8
MG26WT	38,5	37,7	11,5	11,2	6,1	6,1
MG27WT	36,1	35,1	11,3	11,1	6,0	5,9
MG29WT	35,7	35,3	11,3	11,1	5,8	5,8
MG32WT	37,9	37,8	11,6	11,5	5,9	6,0
MG34WT	35,4	35,7	11,5	11,2	5,8	5,9
MG39WT	39,1	37,7	11,5	11,5	6,3	6,2
MG125WT	38,6	38,6	11,6	11,4	6,2	6,3
<b>Moyenne</b>	35,0	34,8	11,3	11,1	5,8	5,8
<b>Ecart-type</b>	2,9	2,9	0,4	0,4	0,3	0,3
<b>Test de Wilcoxon</b>	p = 0,3		p < 0,01		p = 0,2	

**Annexe 2.** Comparaison droite-gauche d'hémi-mandibules. Résultats des comparaisons droite-gauche (test de Wilcoxon) pour chaque groupe de souris étudié (WT mâles et femelles, hémizygotes  $Eda^{Ta/Y}$  et hétérozygotes  $Eda^{Ta/+}$ )

Mâles WT (n=7)					
	Droite		Gauche		p
	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type	
surface 5	32,8	1,3	33,0	1,1	n.s.
longueur 5	10,9	0,2	10,8	0,2	n.s.
hauteur 5	5,6	0,2	5,7	0,2	n.s.
surface 15	35,5	1,1	34,4	2,6	n.s.
longueur 15	11,3	0,2	11,1	0,3	n.s.
hauteur 15	5,9	0,2	5,8	0,3	n.s.
surface 20	38,4	1,8	38,1	1,4	n.s.
longueur 20	11,8	0,2	11,8	0,1	n.s.
hauteur 20	6,1	0,2	6,1	0,2	n.s.
Femelles Wt (n=5)					
	Droite		Gauche		p
	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type	
surface 5	29,0	2,4	29,5	2,5	n.s.
longueur 5	10,5	0,4	10,4	0,5	n.s.
hauteur 5	5,1	0,3	5,2	0,2	< 0,05*
surface 15	34,1	2,0	34,1	2,8	n.s.
longueur 15	11,1	0,4	11,1	0,5	n.s.
hauteur 15	5,7	0,2	5,7	0,3	n.s.
surface 20	38,5	0,9	39,0	1,0	n.s.
longueur 20	11,9	0,1	11,9	0,2	n.s.
hauteur 20	6,1	0,1	6,1	0,1	n.s.
Mâles Ta (n=5)					
	Droite		Gauche		p
	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type	
surface 5	27,4	2,9	27,5	2,9	n.s.
longueur 5	10,4	0,5	10,4	0,4	n.s.
hauteur 5	5,0	0,3	5,1	0,4	n.s.
surface 15	31,0	3,1	30,3	3,0	n.s.
longueur 15	10,9	0,5	10,9	0,5	n.s.
hauteur 15	5,4	0,3	5,3	0,3	n.s.
surface 20	34,6	1,9	35,4	1,0	n.s.
longueur 20	11,4	0,3	11,6	0,1	n.s.
hauteur 20	5,7	0,2	5,8	0,1	n.s.
Femelles Ta (n=6)					
	Droite		Gauche		p
	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type	
surface 5	30,2	2,5	31,3	2,2	< 0,05*
longueur 5	10,6	0,3	10,9	0,2	< 0,05*
hauteur 5	5,3	0,3	5,4	0,2	n.s.
surface 15	33,4	1,8	34,8	1,7	< 0,05*
longueur 15	11,1	0,2	11,4	0,3	< 0,05*
hauteur 15	5,6	0,2	5,7	0,2	n.s.
surface 20	36,2	2,3	36,4	2,3	n.s.
longueur 20	11,6	0,4	11,7	0,4	n.s.
hauteur 20	5,8	0,3	5,8	0,2	n.s.

*n.s.* : non significatif

### Annexe 3. Masse corporelle : résultats du suivi individuel au cours de la première année

Evolution de la masse au cours du temps (stades en semaines)																					
Groupes	Individus	M_6	M_7	M_8	M_9	M_10	M_11	M_12	M_13	M_14	M_15	M_16	M_17	M_18	M_20	M_22	M_26	M_30	M_39	M_58	
Mwt	MG26WT	21	23	23	25	26	26	26	27	27	28	28	28	28	29	29	31	30	31	37	
	MG27WT	22	21	23	23	24	24	24	25	26	26	26	26	28	28	27	27	28	31	29	
	MG29WT	23	26	25	26	27	27	28	28	29	30	31	33	30	30	31	35	33	34	34	
	MG32WT	18	20	21	22	21	23	25	24	24	25	26	26	26	26	30	30	33	34	40	
	MG34WT	21	20	21	21	22	23	22	24	24	26	28	29	27	28	29	32	33	33	39	
	MG39WT	24	24	25	25	26	28	29	29	30	32	32	34	36	36	36	40	43	-	-	
	MG125WT	21	21	22	24	22	24	25	27	28	28	29	30	29	29,5	32	-	35	40	-	
Fwt	FG31WT	19	18	17	20	18	18	19	19	20	19	20	20	21	22	25	27	28	33	48	
	FG36WT	18	19	19	20	20	20	20	21	22	22	22	22	23	23	26	26	29	34	43	
	FG116WT	13	14	14	16	17	-	17	-	17	17	18	18	20	19,5	19	20	-	24	28	
	FG118WT	15	14	17	18	19	-	18	-	19	18	19	20	21	22,5	-	28	-	25	26	
	FG124WT	14	16	16	17	19	-	19	-	21	19	19	20	24	20,5	21	24	-	42	-	
FTa	FG20Ta	19	20	21	20	21	23	22	22	21	22	22	22	22	22	23	25	25	-	-	
	FG25Ta	15	17	18	24	22	22	24	32	26	25	21	24	25	23	21	23	23	23	33	
	FG28Ta	17	17	18	17	16	19	19	19	18	19	20	20	20	20	21	21	22	24	27	
	FG30Ta	19	20	20	19	20	24	24	23	21	22	23	23	25	26	25	27	28	34	39	
	FG35Ta	20	19	19	21	19	22	23	23	24	26	29	27	28	29	33	37	35,4	44	48	
	FG37Ta	19	21	21	20	19	23	23	21	23	24	24	25	26	25	27	29	30	33	40	
MTa	MG38Ta	17	17	20	20	20	21	21	22	22	23	24	22	25	25	25	23	25	27		
	MG40Ta	18	19	19	19	21	22	24	23	24	23	23	23	25	25	26	26	26	30	27	
	MG117Ta	8	9	8	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	MG126Ta	18	19	20	20	21	21	22	21	21	22	23	23	23	23	22	23	-	25	28	-
	MG127Ta	16	17	18	19	20	20	20	21	22	22	23	23	22	23	24	-	26	29	-	

#### Annexe 4. Surface mandibulaire : résultats du suivi individuel au cours de la première année

Evolution de la surface au cours du temps (stades en semaines)																					
Groupes	Individus	S_5	S_6	S_7	S_8	S_9	S_10	S_11	S_12	S_13	S_14	S_15	S_16	S_17	S_18	S_20	S_22	S_26	S_30	S_39	S_58
Mwt	MG26WT	32,7	34,4	36,4	37,1	36,3	37,7	38,5	39,4	39,4	38,8	39,5	38,9	39,6	39,5	39,1	38,8	39,8	41,6	39,6	43,3
	MG27WT	31,9	32,9	34,5	35,2	34,5	35,1	36,6	36,8	36,7	36,0	37,0	36,6	36,7	36,6	36,9	37,3	37,9	38,4	37,7	41,7
	MG29WT	31,5	33,1	33,9	33,7	33,7	35,3	36,3	36,1	36,2	35,9	37,0	36,2	37,4	35,7	36,1	39,3	37,0	38,8	38,5	39,4
	MG32WT	31,6	33,3	35,1	36,1	36,2	37,8	37,5	38,1	39,8	38,0	39,1	37,8	38,6	39,1	39,2	39,7	39,6	41,3	40,1	44,5
	MG34WT	33,4	32,9	34,4	34,9	34,9	35,7	36,2	36,2	37,0	35,9	36,8	37,0	37,0	37,4	36,8	37,6	38,4	40,1	38,7	42,2
	MG39WT	33,7	33,5	36,1	36,6	36,0	37,7	38,3	36,0	39,3	35,9	40,4	40,0	39,7	39,6	40,9	40,6	42,3	42,5	-	-
	MG125WT	35,5	35,9	37,3	36,5	38,6	39,0	39,3	38,8	38,5	40,4	40,2	38,7	39,0	39,8	40,1	40,0	36,6	38,3	42,2	43,4
Fwt	FG31WT	31,8	34,3	35,9	35,5	36,2	37,4	37,4	36,5	38,3	37,9	37,0	37,0	38,5	37,8	37,2	38,1	37,8	37,8	37,8	37,0
	FG36WT	31,4	32,9	35,3	34,3	35,3	36,5	36,7	37,4	38,9	37,3	38,0	37,8	36,6	38,0	39,1	38,6	39,5	39,5	39,5	42,5
	FG116WT	26,9	30,3	32,5	31,1	33,8	34,4	35,4	35,7	36,2	36,2	36,6	35,8	37,4	37,4	37,4	38,1	39,2	39,2	40,7	42,2
	FG118WT	29,7	34,0	34,7	34,7	36,6	36,8	36,5	37,7	38,2	38,2	38,8	38,4	37,5	39,3	39,8	40,2	42,3	42,3	44,6	47,7
	FG124WT	29,7	31,7	32,9	33,2	35,9	36,7	37,5	37,1	37,6	37,6	38,1	37,5	36,5	38,9	38,9	38,6	39,4	39,4	41,5	-
FTa	FG20Ta	29,3	29,9	33,1	32,1	32,2	32,4	32,9	32,8	33,0	31,5	33,8	32,7	32,8	32,6	32,5	33,3	33,1	35,9	-	-
	FG25Ta	26,7	27,5	30,5	30,8	33,3	34,0	34,5	35,0	36,6	34,5	37,1	35,8	37,3	36,6	37,3	37,3	37,3	37,5	36,4	39,9
	FG28Ta	28,3	28,4	30,5	31,4	30,9	32,9	32,3	32,4	33,6	33,2	33,5	33,3	33,9	32,5	34,6	33,5	33,5	33,6	34,7	36,7
	FG30Ta	32,3	32,5	34,8	35,2	35,9	36,6	36,1	37,2	37,9	36,4	37,8	36,8	37,2	37,3	36,9	38,3	38,3	39,6	38,6	42,0
	FG35Ta	33,2	32,5	32,3	35,3	34,8	36,5	36,8	37,0	37,7	35,9	38,5	38,0	38,4	38,5	39,2	39,4	38,4	39,2	39,1	43,2
	FG37Ta	31,4	32,9	33,8	34,2	33,4	34,4	35,4	35,3	35,6	34,4	36,9	35,5	37,2	36,5	36,5	36,2	37,5	37,5	38,2	41,3
MTa	MG38Ta	27,9	27,6	28,9	30,9	31,9	31,6	32,5	32,0	32,4	31,6	33,1	34,1	34,0	33,2	34,1	33,8	35,0	35,1	34,9	34,4
	MG40Ta	28,5	27,8	29,4	29,5	31,0	30,2	32,3	31,3	31,3	30,8	32,3	32,3	32,7	32,3	32,1	32,9	33,8	35,0	34,9	35,8
	MG117Ta	23,7	24,4	26,0	25,4	25,9	25,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MG126Ta	30,2	32,3	34,3	34,7	35,4	34,8	36,0	37,0	36,2	37,0	37,6	37,5	37,5	37,4	37,0	36,7	38,7	36,3	38,8	41,4
	MG127Ta	27,3	28,9	30,5	32,1	32,4	32,6	33,2	33,5	33,4	34,8	35,4	35,0	35,8	36,2	36,2	33,5	36,9	35,3	40,5	42,4

## Annexe 5. Hauteur mandibulaire : résultats du suivi individuel au cours de la première année

Evolution de la hauteur au cours du temps (stades en semaines)																						
Groupes	Individus	H_5	H_6	H_7	H_8	H_9	H_10	H_11	H_12	H_13	H_14	H_15	H_16	H_17	H_18	H_20	H_22	H_26	H_30	H_39	H_58	
Mwt	MG26WT	5,6	5,8	6,0	6,1	6,0	6,1	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2	6,1	6,2	6,3	6,1	6,4	
	MG27WT	5,5	5,7	5,9	5,9	5,8	5,9	6,0	6,0	6,1	6,0	6,1	6,1	6,0	6,1	6,0	6,1	6,1	6,2	6,1	6,4	
	MG29WT	5,4	5,6	5,7	5,6	5,6	5,8	5,8	5,8	5,8	5,9	5,9	5,8	6,0	5,7	5,8	6,0	5,9	6,1	6,0	6,2	
	MG32WT	5,4	5,6	5,8	5,8	5,8	6,0	5,9	6,0	6,1	6,0	6,0	5,9	6,0	6,0	6,1	6,0	6,1	6,2	6,1	6,4	
	MG34WT	5,6	5,6	5,8	5,8	5,7	5,9	5,8	5,8	5,9	5,8	5,9	5,9	5,9	6,0	5,9	5,9	6,1	6,2	6,1	6,5	
	MG39WT	5,8	5,9	6,0	6,1	6,0	6,2	6,3	5,8	6,3	5,8	6,4	6,4	6,4	6,4	6,5	6,5	6,6	6,6	-	-	
	MG125WT	6,0	6,0	6,1	6,0	6,3	6,3	6,3	6,2	6,3	6,4	6,3	6,3	6,3	6,3	6,4	6,3	6,1	6,3	6,5	6,7	
Fwt	FG31WT	5,4	5,7	5,8	5,7	5,8	6,0	6,0	5,8	6,0	6,0	5,9	5,9	6,0	6,0	5,9	6,0	5,9	6,1	6,0	6,0	
	FG36WT	5,4	5,6	5,8	5,5	5,7	5,9	5,8	5,9	6,0	5,9	5,9	6,0	5,8	6,0	6,0	6,0	6,1	6,2	6,1	6,3	
	FG116WT	4,9	5,2	5,5	5,3	5,6	5,7	5,7	5,8	5,8	5,8	5,9	5,8	5,9	5,9	5,9	5,9	6,0	6,1	6,2	6,5	
	FG118WT	5,4	5,8	5,9	5,9	6,0	6,0	6,0	6,1	6,2	6,2	6,2	6,2	5,9	6,2	6,3	6,3	6,4	6,4	6,5	6,8	
	FG124WT	5,5	5,7	5,8	5,8	6,0	6,1	6,2	6,1	6,1	6,1	6,2	6,1	6,1	6,2	6,2	6,3	6,3	6,5	6,6	-	
FTa	FG20Ta	5,1	5,3	5,5	5,4	5,4	5,5	5,5	5,5	5,5	5,4	5,5	5,4	5,5	5,5	5,4	5,5	5,5	5,7	-	-	
	FG25Ta	5,1	5,1	5,4	5,4	5,5	5,7	5,7	5,8	5,9	5,7	6,0	5,8	6,0	5,9	6,0	5,9	5,9	5,9	5,9	6,2	
	FG28Ta	5,1	5,1	5,3	5,4	5,3	5,4	5,4	5,4	5,5	5,6	5,5	5,5	5,6	5,4	5,6	5,5	5,5	5,5	5,6	5,9	
	FG30Ta	5,7	5,7	5,9	5,9	5,9	6,0	6,0	6,0	6,1	6,0	6,1	6,0	6,1	6,1	6,0	6,2	6,1	6,3	6,2	6,5	
	FG35Ta	5,6	5,5	5,4	5,7	5,7	5,8	5,9	5,8	5,9	5,8	6,0	6,0	6,1	6,1	6,1	6,2	6,0	6,1	6,1	6,4	
	FG37Ta	5,3	5,4	5,6	5,6	5,5	5,5	5,6	5,6	5,6	5,6	5,8	5,7	5,8	5,7	5,7	5,7	5,8	5,8	5,8	6,1	
MTa	MG38Ta	5,0	5,0	5,1	5,3	5,3	5,4	5,4	5,4	5,4	5,4	5,5	5,6	5,6	5,5	5,6	5,6	5,6	5,7	5,7	5,8	
	MG40Ta	5,1	5,1	5,2	5,2	5,3	5,3	5,4	5,4	5,3	5,3	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,6	5,8	5,8	5,8	
	MG117Ta	4,7	4,8	5,0	4,8	4,9	4,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	MG126Ta	5,4	5,5	5,8	5,8	5,8	5,8	5,9	6,0	5,9	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	0,0	5,9	6,0	6,0	6,1	6,3
	MG127Ta	5,1	5,3	5,5	5,6	5,8	5,7	5,7	5,8	5,8	5,9	5,9	6,0	6,0	6,0	6,0	0,0	5,7	6,1	6,0	6,5	6,4

## Annexe 6. Longueur mandibulaire : résultats du suivi individuel au cours de la première année

		Evolution de la longueur au cours du temps (stades en semaines)																			
Groupes	Individus	L_5	L_6	L_7	L_8	L_9	L_10	L_11	L_12	L_13	L_14	L_15	L_16	L_17	L_18	L_20	L_22	L_26	L_30	L_39	L_58
Mwt	MG26WT	10,9	11,0	11,3	11,1	11,3	11,2	11,4	11,6	11,7	11,6	11,6	11,6	11,7	11,8	11,7	11,8	11,9	11,9	11,8	12,6
	MG27WT	10,7	10,7	11,0	10,9	11,0	11,1	11,3	11,3	11,3	11,2	11,5	11,5	11,5	11,4	11,6	11,7	11,7	11,7	11,8	12,1
	MG29WT	10,8	10,9	11,1	11,1	11,1	11,1	11,5	11,2	11,5	11,2	11,6	11,5	11,6	11,6	11,6	12,0	11,7	11,8	12,0	11,9
	MG32WT	10,8	11,1	11,1	11,4	11,5	11,5	11,6	11,5	12,0	11,8	11,9	11,5	11,9	12,0	12,0	12,2	12,1	12,3	12,3	12,8
	MG34W	11,1	10,8	11,1	11,2	11,4	11,2	11,4	11,4	11,5	11,5	11,6	11,6	11,5	11,8	11,8	11,9	11,9	11,7	12,0	12,3
	MG39WT	11,1	10,8	11,3	11,3	11,4	11,5	11,7	11,4	11,7	11,5	12,0	11,8	11,9	11,9	12,0	12,1	12,2	12,3	-	-
	MG125WT	11,1	11,2	11,3	11,3	11,4	11,6	11,6	11,6	11,4	11,8	11,8	11,7	11,8	11,7	11,9	11,9	11,2	11,6	12,1	12,3
Fwt	FG31WT	11,0	11,3	11,4	11,5	11,6	11,7	11,8	11,6	11,9	12,0	11,9	11,9	12,0	12,1	12,1	12,0	12,2	12,3	12,1	11,9
	FG36WT	10,6	10,9	11,4	11,3	11,4	11,3	11,5	11,6	11,8	11,6	11,7	11,7	11,7	11,8	11,9	12,0	12,1	12,4	12,1	12,4
	FG116WT	10,1	10,7	10,7	10,6	11,0	11,2	11,4	11,2	11,4	11,4	11,5	11,4	11,6	11,7	11,7	11,9	11,9	12,0	12,1	12,3
	FG118WT	10,3	10,9	10,9	11,0	11,2	11,5	11,3	11,4	11,6	11,6	11,7	11,6	11,6	11,8	11,8	11,9	12,2	12,4	12,7	12,9
	FG124WT	10,2	10,5	10,4	10,7	11,0	11,2	11,1	11,3	11,4	11,4	11,5	11,4	11,2	11,7	11,7	11,6	11,9	11,9	11,9	-
FTa	FG20Ta	10,5	10,5	10,8	10,7	10,8	10,7	10,9	10,9	11,1	10,9	11,2	11,1	11,1	11,1	11,1	11,2	11,4	11,7	-	-
	FG25Ta	10,4	10,5	10,9	10,8	11,3	11,3	11,3	11,3	11,6	11,5	11,7	11,6	11,7	11,7	11,9	11,8	11,9	11,9	11,8	12,4
	FG28Ta	10,3	10,3	10,7	10,7	10,8	10,9	11,0	10,9	11,2	11,2	11,1	11,2	11,3	11,2	11,4	11,3	11,5	11,3	11,6	11,7
	FG30Ta	10,6	10,6	11,0	11,0	11,1	11,2	11,2	11,4	11,4	11,4	11,6	11,3	11,5	11,5	11,5	11,8	11,8	11,7	11,9	12,2
	FG35Ta	11,1	10,9	11,1	11,3	11,4	11,4	11,6	11,6	11,7	11,5	12,0	11,8	12,1	12,0	12,1	12,2	12,2	12,1	12,2	12,8
	FG37Ta	10,8	11,1	11,1	11,2	11,2	11,3	11,3	11,5	11,6	11,4	12,0	11,6	11,9	11,9	11,8	12,0	12,1	11,9	12,2	12,5
MTa	MG38Ta	10,4	10,5	10,8	11,0	11,0	10,9	11,1	11,1	11,1	11,0	11,4	11,4	11,4	11,4	11,3	11,4	11,5	11,4	11,4	11,4
	MG40Ta	10,6	10,6	10,7	10,7	10,8	10,7	11,0	10,9	10,9	10,9	10,9	11,0	11,2	11,2	11,1	11,2	11,4	10,9	11,0	11,2
	MG117Ta	9,9	9,7	10,0	10,0	9,8	10,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MG126Ta	10,8	11,2	11,3	11,4	11,5	11,4	11,4	11,7	11,5	11,6	11,8	11,8	11,8	11,9	11,8	12,0	11,8	11,8	11,8	11,8
	MG127Ta	10,4	10,7	10,8	11,0	11,0	11,2	11,1	11,2	11,2	11,4	11,6	11,6	11,8	11,9	11,9	11,4	11,7	11,6	11,6	11,8

**Annexe 7.** Largeur de la branche mandibulaire : résultats du suivi individuel au cours de la première année

		Stades évolutifs en semaines																			
Groupes	Individus	L_5	L_6	L_7	L_8	L_9	L_10	L_11	L_12	L_13	L_14	L_15	L_16	L_17	L_18	L_20	L_22	L_26	L_30	L_39	L_58
Mwt	MG26WT	5,7	5,8	6,0	6,1	6,0	6,0	6,0	6,1	6,2	6,2	6,1	6,1	6,1	6,2	6,1	6,2	6,3	6,1	6,2	6,5
	MG27WT	5,7	5,5	5,7	5,8	5,7	5,8	6,0	5,8	5,9	5,9	5,9	6,0	5,9	5,9	6,0	6,0	6,0	6,3	6,0	6,2
	MG29WT	5,6	5,6	5,6	5,6	5,6	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,9	5,8	5,9	5,9	5,9	6,2	5,9	6,0	5,9	6,1
	MG32WT	5,6	5,6	6,6	5,8	5,9	5,9	6,1	6,0	6,1	6,0	6,1	5,8	6,0	6,1	6,2	6,2	6,3	6,2	6,3	6,5
	MG34WT	5,9	5,6	5,7	5,9	5,8	5,9	6,0	5,9	5,9	5,9	6,0	5,9	6,0	6,0	6,1	6,0	6,0	6,0	6,1	5,9
	MG39WT	5,8	5,7	6,0	5,9	6,0	6,1	6,1	5,8	6,2	6,1	6,3	6,1	6,2	6,1	6,4	6,3	6,5	6,3	-	-
	MG125WT	5,8	5,7	5,9	6,0	6,1	6,1	6,1	6,0	6,1	6,1	6,2	6,2	6,1	6,2	6,3	6,2	5,8	6,1	6,4	6,5
Fwt	FG31WT	5,8	5,9	6,0	6,1	6,1	6,1	6,2	6,1	6,2	6,2	6,3	6,2	6,3	6,3	6,3	6,1	6,3	6,3	6,3	6,1
	FG36WT	5,5	5,5	5,7	5,9	5,8	5,9	5,9	5,9	6,1	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,1	6,0	6,2	6,3	6,1	6,3
	FG116WT	5,3	5,1	5,3	5,4	5,6	5,8	5,7	5,9	5,8	5,9	6,1	6,1	6,2	6,3	6,1	6,3	6,3	6,3	6,4	6,5
	FG118WT	5,2	5,3	5,7	5,6	5,8	5,9	6,0	6,0	6,1	6,1	6,2	6,3	6,1	6,2	6,2	6,2	6,3	6,4	6,7	7,0
	FG124WT	5,2	5,3	5,5	5,4	5,6	6,0	5,9	5,7	5,8	5,9	6,0	5,9	5,9	6,1	6,3	6,2	6,2	6,2	6,1	-
FTa	FG20Ta	5,4	5,5	5,6	5,6	5,7	5,6	5,7	5,7	5,7	5,5	5,8	5,7	5,7	5,8	5,8	5,8	5,9	6,0	-	-
	FG25Ta	5,5	5,6	5,8	5,8	5,9	6,1	6,1	5,6	6,3	6,1	6,2	6,2	6,3	6,3	6,3	6,3	6,4	6,3	6,3	6,4
	FG28Ta	5,2	5,3	5,4	5,5	5,4	5,7	5,6	5,6	5,8	5,7	5,7	5,8	5,8	5,8	5,9	5,8	5,9	5,8	5,9	6,0
	FG30Ta	5,5	5,6	5,8	5,9	5,9	6,0	5,9	6,0	6,0	6,0	6,1	6,0	6,1	6,1	6,1	6,1	6,2	6,1	6,1	6,3
	FG35Ta	5,7	5,8	5,8	6,0	6,0	6,1	6,2	6,1	6,3	6,1	6,4	6,3	6,4	6,4	6,5	6,4	6,5	6,3	6,3	6,6
	FG37Ta	6,0	5,9	5,9	6,1	5,8	6,1	6,2	6,2	6,2	6,1	6,3	6,2	6,3	6,3	6,4	6,3	6,4	6,2	6,5	6,7
MTa	MG38Ta	5,4	5,4	5,5	5,7	5,7	5,7	5,9	5,7	5,8	5,6	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9	5,9	5,8
	MG40Ta	5,6	5,3	5,5	5,5	5,6	5,5	5,8	5,6	5,6	5,6	5,7	5,7	5,7	5,8	5,7	5,8	5,9	5,9	5,8	5,9
	MG117Ta	4,9	5,2	5,0	5,1	5,2	5,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MG126Ta	5,6	6,0	5,8	6,0	6,1	6,0	6,0	6,1	6,0	6,1	6,1	6,2	6,1	6,2	6,2	6,1	6,2	6,1	6,2	6,5
	MG127Ta	5,2	5,4	5,4	5,7	5,6	5,8	5,8	5,9	5,7	5,9	5,9	5,9	6,0	6,0	6,1	5,8	6,0	6,1	6,5	6,7

**Annexe 8.** Surface de la branche mandibulaire : résultats du suivi individuel au cours de la première année

		Stades évolutifs en semaines																			
Groupes	Individus	S_5	S_6	S_7	S_8	S_9	S_10	S_11	S_12	S_13	S_14	S_15	S_16	S_17	S_18	S_20	S_22	S_26	S_30	S_39	S_58
Mwt	MG26WT	20,8	21,8	23,3	24,3	23,9	24,6	24,8	25,5	25,4	25,2	25,4	24,8	25,5	25,7	25,6	25,4	26,3	25,9	24,8	26,8
	MG27WT	20,2	20,5	21,7	22,3	21,4	22,6	23,1	22,7	23,1	22,6	23,2	23,1	22,9	23,2	23,3	23,7	23,9	24,9	23,1	25,8
	MG29WT	19,6	20,6	20,9	20,8	20,5	22,1	22,5	22,5	22,2	22,3	22,8	22,1	23,1	22,2	22,7	24,4	23,2	24,0	23,0	24,1
	MG32WT	19,6	20,4	27,4	22,1	22,2	23,3	23,5	23,3	24,4	23,0	24,2	22,8	23,2	23,9	24,8	24,4	24,4	25,2	24,0	26,0
	MG34WT	21,2	20,6	21,8	22,3	22,1	22,7	22,8	22,5	23,2	22,2	23,3	23,4	23,2	23,7	23,7	23,7	24,1	25,2	24,7	25,0
	MG39WT	20,8	20,9	22,9	22,8	23,0	24,2	23,8	22,5	24,6	24,2	25,2	24,8	24,7	24,8	26,7	25,7	27,5	26,9	-	-
	MG125WT	22,6	20,8	23,8	24,1	25,1	25,3	25,1	24,7	24,9	25,8	26,0	25,9	25,4	26,0	26,3	25,5	22,9	25,2	27,2	28,4
Fwt	FG31WT	19,7	21,5	22,4	22,2	22,2	23,4	23,1	22,5	23,5	23,0	23,7	22,5	23,5	23,6	23,7	23,8	23,7	24,2	23,0	23,2
	FG36WT	19,3	19,9	21,3	21,2	22,1	22,6	22,4	22,9	23,8	22,6	23,1	23,0	23,1	23,2	24,1	23,9	24,6	25,0	23,7	26,2
	FG116WT	16,3	16,1	18,1	19,4	19,4	21,2	21,0	21,7	22,0	22,5	23,1	22,5	23,9	24,1	24,0	24,2	24,5	24,9	25,5	27,6
	FG118WT	15,9	18,8	21,6	21,5	22,2	23,3	23,3	23,7	24,1	24,4	24,8	24,8	23,5	25,3	24,1	25,7	26,5	27,3	28,2	31,0
	FG124WT	17,2	18,8	20,2	20,6	21,4	23,4	23,1	23,5	23,1	23,4	23,8	23,4	24,2	24,7	26,0	25,0	25,1	25,1	25,4	-
FTa	FG20Ta	18,1	19,0	20,4	20,1	20,4	20,4	20,5	20,9	20,5	19,1	20,9	20,3	20,4	20,8	20,7	21,3	21,1	22,2	-	-
	FG25Ta	16,7	17,5	19,4	19,8	21,1	22,0	22,3	19,8	23,5	21,8	23,6	22,7	23,7	23,7	24,2	24,0	24,5	23,6	23,0	25,3
	FG28Ta	16,9	17,5	18,6	19,6	18,9	20,3	19,9	19,8	20,6	20,5	20,5	20,6	20,8	20,6	21,6	20,9	21,1	20,6	20,9	22,9
	FG30Ta	20,3	20,9	22,2	22,7	23,5	23,6	23,2	23,9	24,0	23,2	24,1	23,4	23,7	24,0	23,8	24,6	24,7	24,9	23,6	26,5
	FG35Ta	20,6	20,3	20,6	22,6	22,0	23,0	23,3	23,1	23,8	22,4	24,4	24,1	24,1	24,5	25,3	25,3	24,9	24,5	24,0	26,8
	FG37Ta	20,3	20,6	21,4	22,1	21,0	22,0	22,9	22,4	22,5	21,6	23,4	22,3	23,3	23,0	23,6	23,2	23,8	23,3	23,6	26,4
MTa	MG38Ta	17,3	17,2	18,1	19,6	19,8	20,1	20,7	20,1	20,4	19,5	20,9	21,2	21,2	21,0	21,8	21,4	21,9	21,8	21,5	21,4
	MG40Ta	17,7	16,7	17,9	18,0	18,7	18,5	19,7	18,9	18,9	18,6	19,9	19,7	20,0	20,1	20,3	20,4	21,1	21,6	20,8	22,2
	MG117Ta	14,3	15,6	15,6	15,4	16,2	16,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MG126Ta	19,0	20,6	21,7	23,0	23,1	22,5	23,1	23,8	23,1	23,7	23,9	23,9	23,9	24,6	24,2	23,2	24,4	23,4	25,1	26,6
	MG127Ta	16,7	17,5	18,6	20,5	20,1	20,5	20,4	21,3	20,6	21,7	21,6	21,9	22,4	22,4	23,0	20,7	22,6	22,8	25,6	26,4

## **Annexe 9. Microscanner X : eXplore CZT 120 Vision**

Le microscanner utilisé dans le cadre de ce travail se situe au laboratoire " Imagerie Préclinique UF 6237 ", responsable Dr Philippe Choquet, service de Biophysique et de Médecine Nucléaire de l'hôpital de Hautepierre à Strasbourg. Les caractéristiques du microscanner-X eXplore speCZT 120 Vision sont issues de la documentation technique fournie par GE Healthcare. Ce scanner est constitué de 4 modules principaux.

### **Le statif rotatif du CT**

Le statif porte le tube radiogène ainsi qu'un détecteur de rayons X associé à des composants électroniques d'acquisition des données. Il est entièrement blindé. Les rayons X sont détectés par un capteur plan matriciel CSI (Iodure de Césium 75 X 75 mm<sup>2</sup>) relié à un capteur CCD (Charge Coupled Devices) par un faisceau de fibres optiques. Ce capteur CSI est constitué de 9 millions de pixels de 25 microns de côtés. Trois modes d'acquisition sont proposés :

- haute résolution ; les projections de l'image ont le même nombre de pixels que le capteur
- moyenne résolution ; l'image contient 4 fois moins de pixels que le capteur. Ils sont regroupés, et le signal mesuré est celui de 4 pixels voisins (binning 2X2)
- basse résolution ; binning 4X4.

Les possibilités techniques de l'appareil permettent une résolution maximale d'un voxel reconstruit de 25 microns d'arête.

### **Générateur de rayons X**

Le générateur est constitué d'un tube radiogène PX1483 (DUNLEE<sup>®</sup>) délivrant une tension maximale de 150 kV.

### **Table de l'échantillon et berceau**

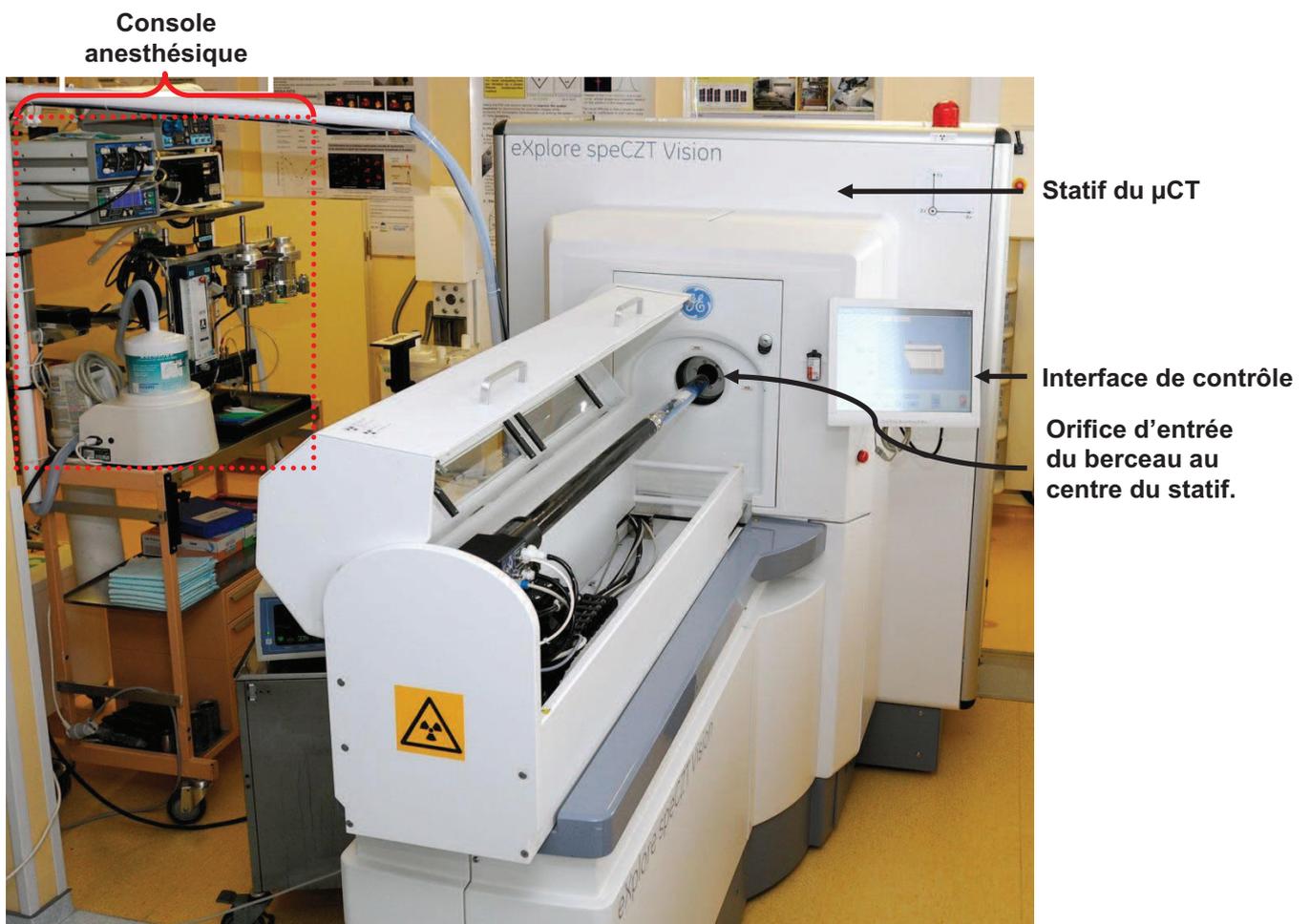
La table d'acquisition est motorisée et contrôlée par l'ordinateur. Des fonctions de positionnement précis de l'échantillon, y compris une vision fluoroscopique en direct (image 2D) sont disponibles via la console de l'opérateur. La table peut également être positionnée à l'aide du contrôleur de table (panneau tactile situé au dessus de la table). La table est équipée de 2 berceaux en fibre de carbone :

- un berceau de 75 mm de largeur utilisé pour l'examen des rats
- un berceau de 25 mm de largeur utilisé pour l'examen des souris

## Console de l'opérateur

La console de l'opérateur est composée de deux moniteurs LCD et d'un ordinateur hôte. L'interface de la console d'hôte est utilisée pour :

- la gestion des projets et des acquisitions,
- la conception des protocoles et des séquences,
- la réalisation des reconstructions,
- l'archivage et la restauration des données,
- le transfert des données vers une station de travail d'analyse.



**Annexe 10.** Communications affichées dans des congrès internationaux

Bornert F, Gros CI, Schmittbuhl M, Constantinesco A, Choquet P (2012). Follow-up of mandible growth in Tabby mouse. 11<sup>th</sup> congress of the European Academy of Paediatric Dentistry (EAPD). Strasbourg, France, 24-27 mai.

Gros CI, Bornert F, Schmittbuhl M, Constantinesco A, Choquet P (2012). Follow-up of skull growth in Tabby mouse. 11<sup>th</sup> congress of the European Academy of Paediatric Dentistry (EAPD). Strasbourg, France, 24-27 mai.

Bornert F, Schmittbuhl M, Gros CI, Constantinesco A, Choquet P (2012). Morphology quantification : Elliptical 2D Fourier analysis for craniofacial phenotyping in mouse based on micro-CT acquisitions. The 6<sup>th</sup> Winter Conference of the European Society for Molecular Imaging (ESMI). Ecole de Physique des Houches, France, 15-20 avril.

Bornert F, Gros CI, Schmittbuhl M, Constantinesco A, Choquet P (2011). Quantitative morphological study using micro-CT imaging and elliptical 2D Fourier analysis: application for craniofacial phenotyping. World Molecular Imaging Congress (WMIC), San Diego, California, USA. 7-10 septembre.

Gros CI, Bornert F, Constantinesco A, Schmittbuhl M, Choquet P (2011). Longitudinal study of bone growth by micro-CT: application in a model with bone malformation (Tabby mouse). World Molecular Imaging Congress (WMIC), San Diego, California, USA. 7-10 septembre.

## Introduction

Tabby (Ta) mouse is an animal model of the X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia (XLHED) which is a polymalformative syndrome mainly characterized by abnormal development of ectodermal structures with typical phenotypic signs: hypotrichosis, hypohidrosis, craniofacial and dental abnormalities (1). Few data were available about the mandibular growth at the human patients and even less at the mouse (2).

## Aim

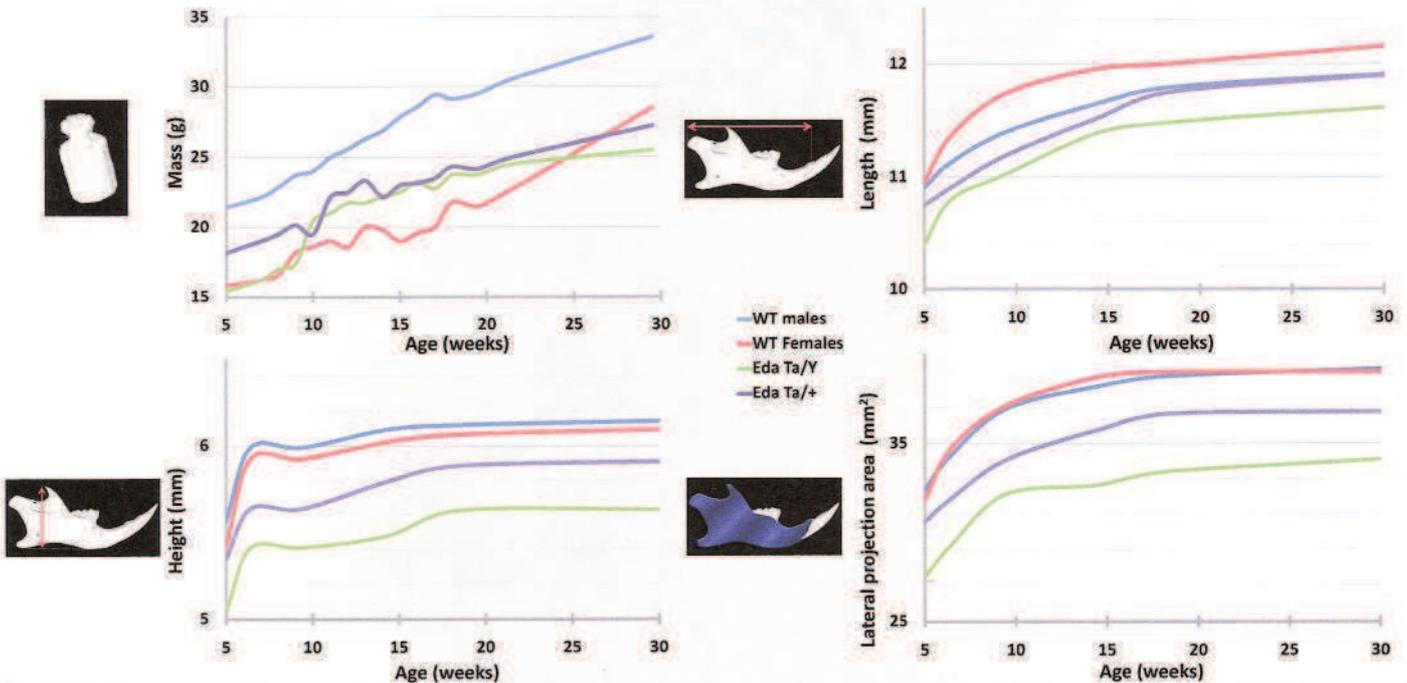
Providing a longitudinal in vivo study of mandible development on the Ta mouse.

## Materials and Methods



- Follow up of 23 mice during six month: 4 hemizygous males (*Eda<sup>Ta/Y</sup>*), 6 heterozygous females (*Eda<sup>Ta/+</sup>*), and 12 control WT (7 males, 6 females). Individuals dead during the experiment time: two *Eda<sup>Ta/Y</sup>* and one male WT.
- Each mouse was weighted and imaged weekly using  $\mu$ CT from 1 to 4 months-old, and then bi-monthly (Micro-CT system: eXplore CT 120, GE Healthcare, Waukesha, USA).
- Protocol acquisition: 360 views over 360°, at 80 kV, 32 mA, and exposure time of 16 ms with a total scan time of approximately 3 to 5 minutes according to the size of the mouse.
- Quantifications analyses were performed using MicroView® (GE Healthcare, Waukesha, USA). Each time, length, height and lateral surface area projection of the right hemimandible were measured on a 3D virtual reconstructed image.
- A statistical Wilcoxon-Mann-Whitney test was made between the mean of each strain at each measure (Statistica 7.1 software package, Statsoft Inc., Tulsa, USA).

## Results



## Conclusion

The study showed significant differences between the Ta males and WT males groups ( $p < 0,05$ ) at early stages of development. The Ta males group presents globally a mandibular hypodevelopment (2). This study suggests that the *Ta* gene and more widely the NF-kappa B pathway could play an important role in cranio-facial morphogenesis. Measurements before 1 month would be of interest but difficult due to practical limitations: small size of structures implies high resolution protocols eg more irradiation. The impact of radiation in very young mice should be then considered.

(1) Claus F, Maniero M C, Obry F, Waltmann E, Hadj-Rabia S, Bedemer C, Alembik Y, Lesot H, and Schmittbuhl M. Dento-craniofacial phenotypes and underlying molecular mechanisms in hypohidrotic ectodermal dysplasia (HED): a review. (2008) J. Dent. Res. 87, 1089-1099.  
(2) Bornert F, Choquet P, Gros C-I, Aubertin G, Perrin-Schmitt F, Claus F, Lesot H, Constantinesco A, Schmittbuhl M. Subtle morphological changes in the mandible of Tabby mice revealed by micro CT imaging and elliptical Fourier quantification. (2011) Front. Physiol. 20, 2-15.



With the support of GE Healthcare



# Follow Up of skull growth in Tabby mice

Catherine-Isabelle GROS<sup>1</sup>, Fabien BORNERT<sup>1</sup>, André CONSTANTINESCO<sup>2</sup>, Matthieu SCHMITTBUHL<sup>1</sup>, Philippe CHOQUET<sup>2</sup>  
<sup>1</sup> INSERM UMR 977, Faculté de Chirurgie Dentaire, Université de Strasbourg, France  
<sup>2</sup> Preclinical Imaging Lab, Nuclear Medicine, Hôpitaux Universitaires, Strasbourg, France

## OBJECTIVES

- Longitudinal study of skull development in Tabby mouse model of XLHED, using micro-CT ( $\mu$ CT)

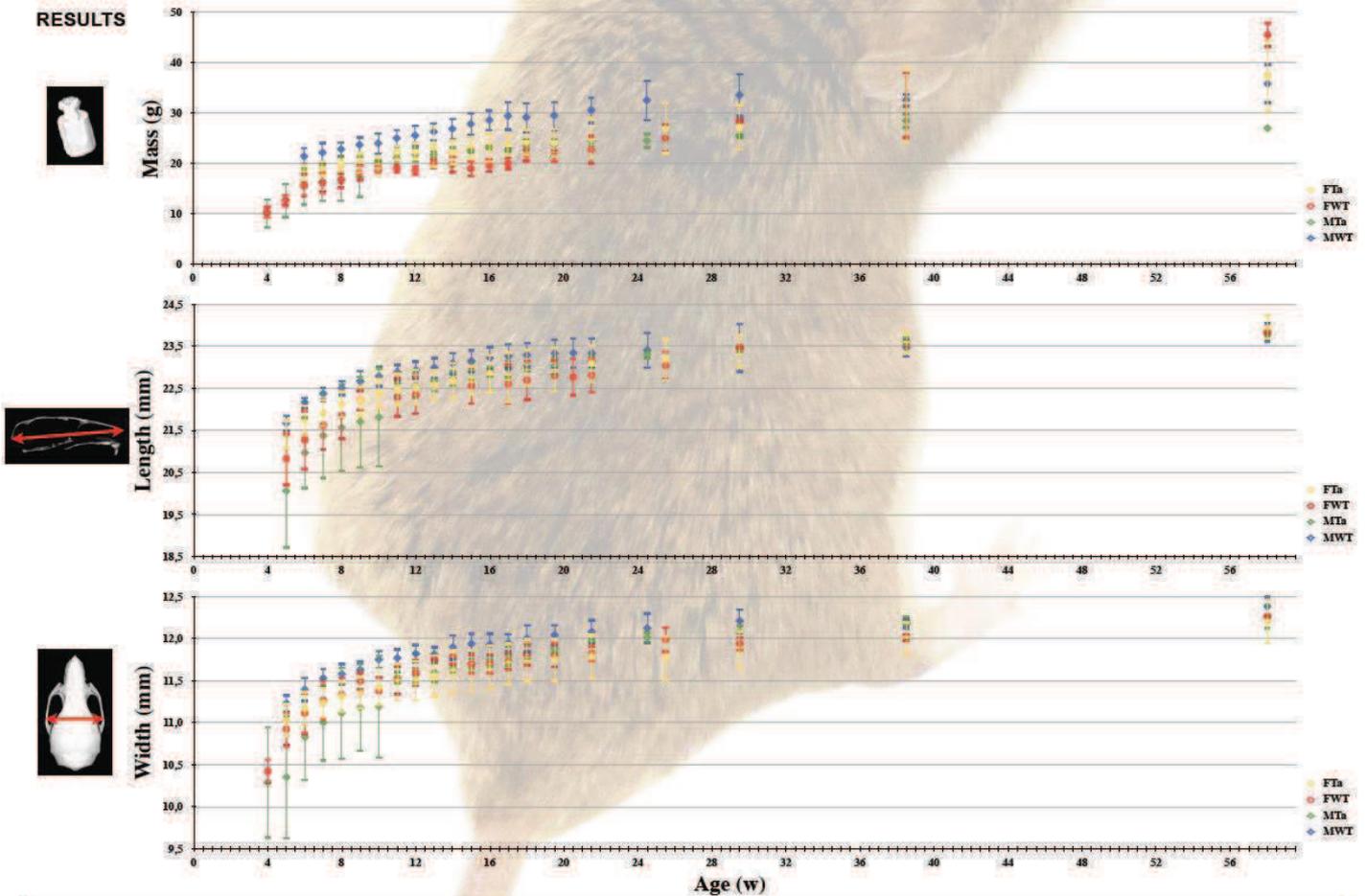
## XLHED (X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia)

- Polymalformative syndrome characterized by abnormal development of ectodermal structures
- Typical phenotypic signs: hypotrichosis, hypohidrosis, *craniofacial and dental abnormalities*

## MATERIAL & METHODS

- Follow up of 23 mice during one year: 4 hemizygous males ( $Eda^{Tm/Y}$ ), 6 heterozygous females ( $Eda^{Tm/+}$ ), and 12 control WT (7 males, 6 females). Each mice was weighted and imaged weekly using  $\mu$ CT from 1 to 4 months-old, then bi-monthly, monthly and quarterly finally. Individuals dead during the experiment time: two  $Eda^{Tm/Y}$  and one male WT.
- Micro-CT system: eXplore CT 120 (GE Healthcare, Waukesha, USA). Protocol: acquisition of 360 views over 360°, at 80 kV, 32 mA, and exposure time of 16 ms. Imaging of whole-body using 2 or 3 bed positions. Total scan time of approximately 3 to 5 minutes. Radiation doses estimated to 0.1 Gy according to manufacturer's data.
- Skull growth was assessed by measuring characteristic distances at specific locations: quantifications analyses performed using MicroView® (GE Healthcare, Waukesha, USA). Simple measurements performed on a 3D virtual reconstruction using anatomical landmarks: length and width of the skull. Statistical mean comparisons between each strain relative to the age at each measure.

## RESULTS



## CONCLUSION

- This is the first time that a follow-up study was conducted to observe growth rate differences between Tabby mice and wild-type controls.
- Tabby males show marked sub-development, but differences tend to be reduced with age.
- Measurements before 1 month would be of interest but difficult due to practical limitations: small size of structures implies high resolution protocols eg more irradiation. The impact of radiation in very young mice should be then considered.



With the support of GE Healthcare



Fabien Bornert<sup>1,2</sup>, Matthieu Schmittbuhl<sup>1,2</sup>, Catherine-Isabelle Gros<sup>1,2</sup>, André Constantinesco<sup>3,4</sup>, Philippe Choquet<sup>3,4</sup>

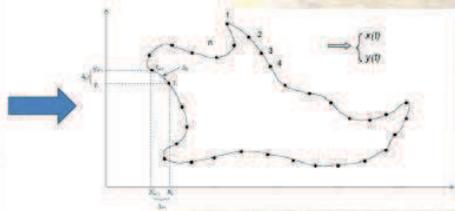
<sup>1</sup>INSERM-UMR 977, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg, France ; <sup>2</sup>Faculty of Dentistry, University of Strasbourg, 1 place de l'Hôpital, 67000 Strasbourg, France <sup>3</sup>Faculty of Medicine, University of Strasbourg, 4 rue Kirschleger, 67000 Strasbourg, France <sup>4</sup>UF 6237 Preclinical Imaging, Nuclear Medicine, University Hospital, 1 avenue Molière, 67098 Strasbourg, France

**Introduction**

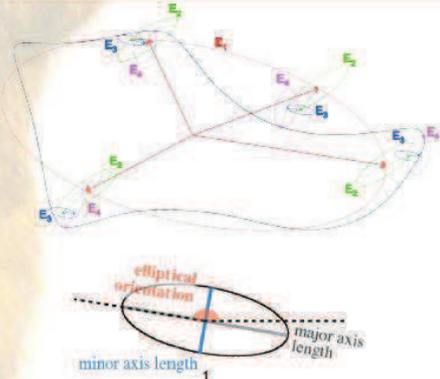
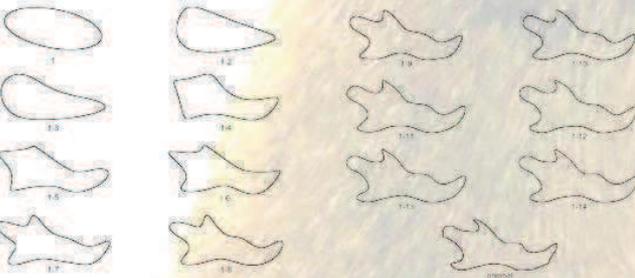
Extracting measurements or values from acquired medical images is highly desirable and nowadays a common goal. However for morphology, it is very challenging as studies in this field are essentially qualitative. Up to now, morphological quantitative analysis is mainly based on landmarks approaches which require the unbiased recognition of some singular points common in model and control individuals. A main drawback relies on the limited number of points used, reducing the accuracy of the form description. 2D Elliptical Fourier analysis (EFA) applied on outlines is another way to quantify differences in organs form (1) and had the advantage of working on the shape in a global manner.

We present here an example of EFA application on  $\mu$ CT images of mouse heads to characterize mandibular dysmorphoses in Tabby's mice, an animal model of the X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia (XLHED) (2,3).

**Materials and Methods**

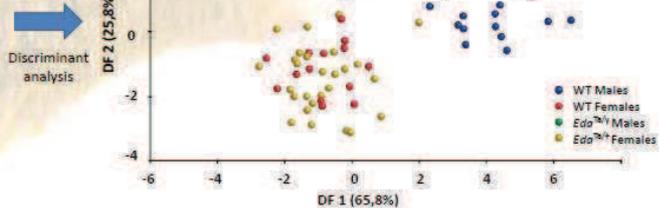


- 74 adults mice: 15 hemizygous males (*EdaTa/Y*), 24 heterozygous females (*EdaTa/+*), and 35 control WT (19 males, 16 females).
- Ex vivo micro-CT (eXplore CT 120, GE Healthcare, Waukesha, USA) imaging of full head: 360 views on 360°, 100 kV, 50 mA, exposition time of 20 ms ;
- Segmentation of hemimandibles and 3D isosurface rendering (MicroView®, GE Healthcare, Waukesha, USA).
- Extraction of 2D outlines from lateral view of each hemimandible (Visilog 5.4®, Noesis, Gif sur Yvette, France).
- EFA was performed to obtain a quantitative description of the mandibular outline based on the three main elliptical Fourier:
- descriptors (EFD: major and minor axis length, elliptical orientation)\*.
- Statistical discriminant analysis was applied on EFD for each group on the first 10 harmonics in order to highlight distinction among mouse strains (Statistica 7.1 software package, Statsoft Inc., Tulsa, USA).



**Results**

Fourier Harmonic	Elliptical descriptors	WildType		Tabby		Statist	
		Mean	S.D.	Mean	S.D.	Mean	S.D.
1	Major axis length	8.44	0.17	8.50	0.08	8.71	0.19
	Minor axis length	3.95	0.08	3.98	0.04	3.94	0.11
2	Major axis length	1.44	0.13	1.50	0.08	1.62	0.08
	Minor axis length	0.62	0.06	0.67	0.06	0.64	0.11
3	Major axis length	213.39	4.01	208.35	3.10	210.33	4.71
	Minor axis length	0.56	0.04	0.48	0.04	0.58	0.10
4	Major axis length	0.83	0.07	0.33	0.04	0.28	0.07
	Minor axis length	175.48	42.13	177.89	39.85	180.28	41.30
5	Major axis length	0.81	0.04	0.82	0.03	0.90	0.07
	Minor axis length	0.31	0.07	0.29	0.04	0.37	0.06
6	Major axis length	152.89	10.09	147.71	8.11	152.70	8.91
	Minor axis length	0.41	0.06	0.45	0.04	0.47	0.08
7	Major axis length	0.04	0.03	0.03	0.04	0.08	0.03
	Minor axis length	182.89	3.44	178.21	3.68	179.82	4.08
8	Major axis length	0.49	0.03	0.45	0.04	0.49	0.03
	Minor axis length	0.05	0.03	0.04	0.01	0.02	0.01
9	Major axis length	148.16	8.82	148.42	4.32	148.25	5.72
	Minor axis length	0.39	0.02	0.37	0.02	0.40	0.03
10	Major axis length	0.22	0.03	0.25	0.03	0.25	0.03
	Minor axis length	254.48	8.18	257.19	10.48	254.98	14.08
11	Major axis length	0.17	0.03	0.18	0.03	0.18	0.03
	Minor axis length	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01
12	Major axis length	200.64	24.45	202.81	9.38	207.71	11.38
	Minor axis length	0.16	0.03	0.18	0.03	0.20	0.02
13	Major axis length	0.07	0.04	0.09	0.04	0.09	0.02
	Minor axis length	182.44	12.48	200.92	11.74	188.07	8.90
14	Major axis length	0.14	0.02	0.16	0.02	0.12	0.02
	Minor axis length	0.03	0.02	0.03	0.01	0.03	0.02
15	Major axis length	291.49	13.96	288.04	8.51	284.48	10.91
	Minor axis length	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01



**Conclusion**

2D EFA enables the characterization of the shape as a whole, unlike other morphometric approaches based on anatomical landmarks and their associated measurements. 2D EFA is especially pertinent for planar objects. Micro-CT imaging is useful for studies involving mineralized tissues but as long as organs of interest can be segmented, results from other imaging modalities could also benefit from this technique. We show that 2D EFA is a very sensible biomedical imaging process for comparison between different phenotypes based on shape's quantification and adequate statistical analysis. This method could also be extended to the third dimension (4).

(1) Schmittbuhl, M., Allenbach, B., Le Minor, J. M., and Schaaf, A. Elliptical descriptors: some simplified morphometric parameters for the quantification of complex outlines. (2003). *Math. Geol.* 35, 853-872.  
 (2) Claus, F., Maniere, M. C., Obry, F., Waltmann, E., Hadj-Rabia, S., Bodemer, C., Alenbik, Y., Lesot, H., and Schmittbuhl, M. Dento-craniofacial phenotypes and underlying molecular mechanisms in hypohidrotic ectodermal dysplasia (HED): a review. (2008). *J. Dent. Res.* 87, 1099-1099.  
 (3) Bornert F, Choquet P, Gros C-I, Aubertin G, Perrin-Schmitt F, Claus F, Lesot H, Constantinesco A, Schmittbuhl M. Subtle morphological changes in the mandible of Tabby mice revealed by micro-CT imaging and elliptical Fourier quantification. (2011). *Front. Physiol.* 20, 2-15.  
 (4) Godtroy JE, Bornert F, Gros C-I, Constantinesco A. Elliptical Fourier descriptors for contours in three dimensions: A new tool for morphometrical analysis in biology. (2012). *C. R. Biol.* 335, 205-15.



With the support of GE Healthcare



**Quantitative morphological study using micro-CT imaging and elliptical 2D Fourier analysis:  
application for craniofacial phenotyping**

Fabien Bornert<sup>1</sup>, Catherine-Isabelle Gros<sup>1</sup>, André Constantinesco<sup>2</sup>, Matthieu Schmittbuhl<sup>1</sup>, Philippe Choquet<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>INSERM UMR 977, Faculty of Dentistry, University of Strasbourg, Strasbourg, France  
<sup>2</sup>Preclinical Imaging Lab, Nuclear Medicine, Hôpitaux Universitaires, Strasbourg, France

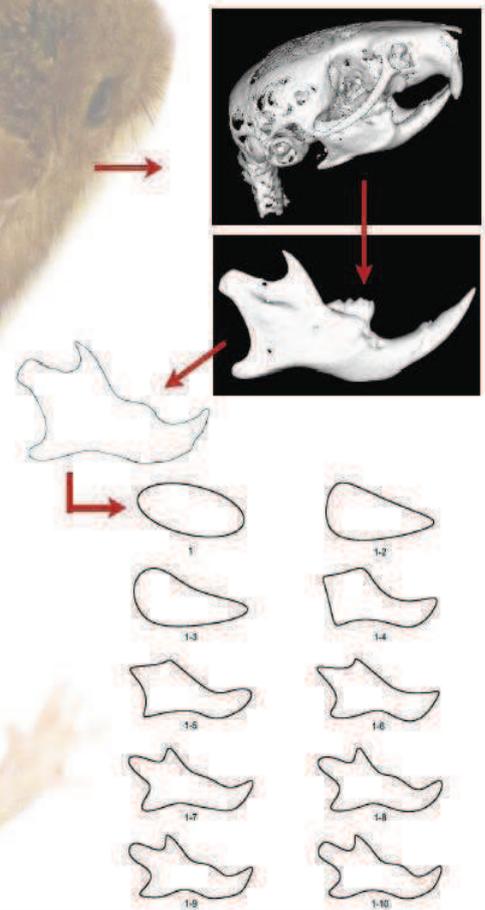
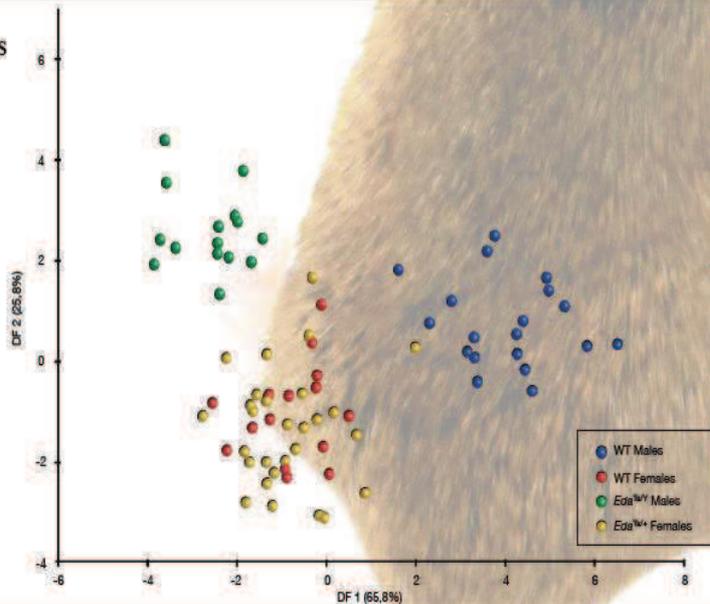
**OBJECTIVES**

- Quantitative analysis method are required to show subtle morphological differences between models and control individuals.
- 2D Elliptical Fourier analysis (EFA) applied on outlines is a way to quantify changes in organs form.
- Demonstration by an example of EFA on  $\mu$ CT images of mouse heads to characterize mandibular dysmorphoses in Tabby's mice, an animal model of the X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia.

**MATERIAL & METHODS**

- Mice: 74 adults specimens: 15 hemizygous males ( $Eda^{Tb/Y}$ ), 24 heterozygous females ( $Eda^{Tb/+}$ ), and 35 control WT mice (19 males, 16 females).
- Ex vivo imaging of full heads using a micro-CT: 360 views on 360°, 100 kV, 50 mA, exposition time of 20 ms (eXplore CT 120, GE Healthcare, Waukesha, USA).
- Segmentation of hemimandibles and 3D isosurface rendering (MicroView®, GE Healthcare, Waukesha, USA).
- Extraction of 2D outlines from lateral view of each hemimandible (Visilog 5.4®, Noesis, Gif sur Yvette, France).
- EFA was performed to obtain a quantitative description of the mandibular outline based on the three main elliptical Fourier descriptors (EFD: major and minor axis length, elliptical orientation)\*.
- Statistical discriminant analysis applied on EFD for each group on the first 10 harmonics in order to highlight distinction among mouse strains (Statistica 7.1 software package, Statsoft Inc., Tulsa, USA).

**RESULTS**



**CONCLUSION**

2D EFA enables the characterization of the shape as a whole, unlike other morphometric approaches based on anatomical landmarks and their associated measurements. 2D EFA is especially pertinent for planar objects. Micro-CT imaging is useful for studies involving mineralized tissues but as long as organs of interest can be segmented, results from other imaging modalities could also benefit from this technique. We demonstrate that 2D EFA is a very sensible approach for comparison between different phenotypes based on shape's quantification and adequate statistical analysis.

\* Schmittbuhl, M., Allenbach, B., Le Minor, J. M., and Schauf, A. (2003). Math. Geol. 35, 853-872.



With the support of GE Healthcare



# Longitudinal quantitative study of bone growth by micro-CT: application in a model with bone abnormalities (Tabby mouse)

Catherine-Isabelle Gros <sup>1</sup>, Fabien Bornert <sup>1</sup>, André Constantinesco <sup>2</sup>, Matthieu Schmittbuhl <sup>1</sup>, Philippe Choquet <sup>2</sup>  
<sup>1</sup>INSERM UMR 977, Faculty of Dentistry, University of Strasbourg, Strasbourg, France  
<sup>2</sup>Preclinical Imaging Lab, Nuclear Medicine, Hôpitaux Universitaires, Strasbourg, France

**OBJECTIVES**

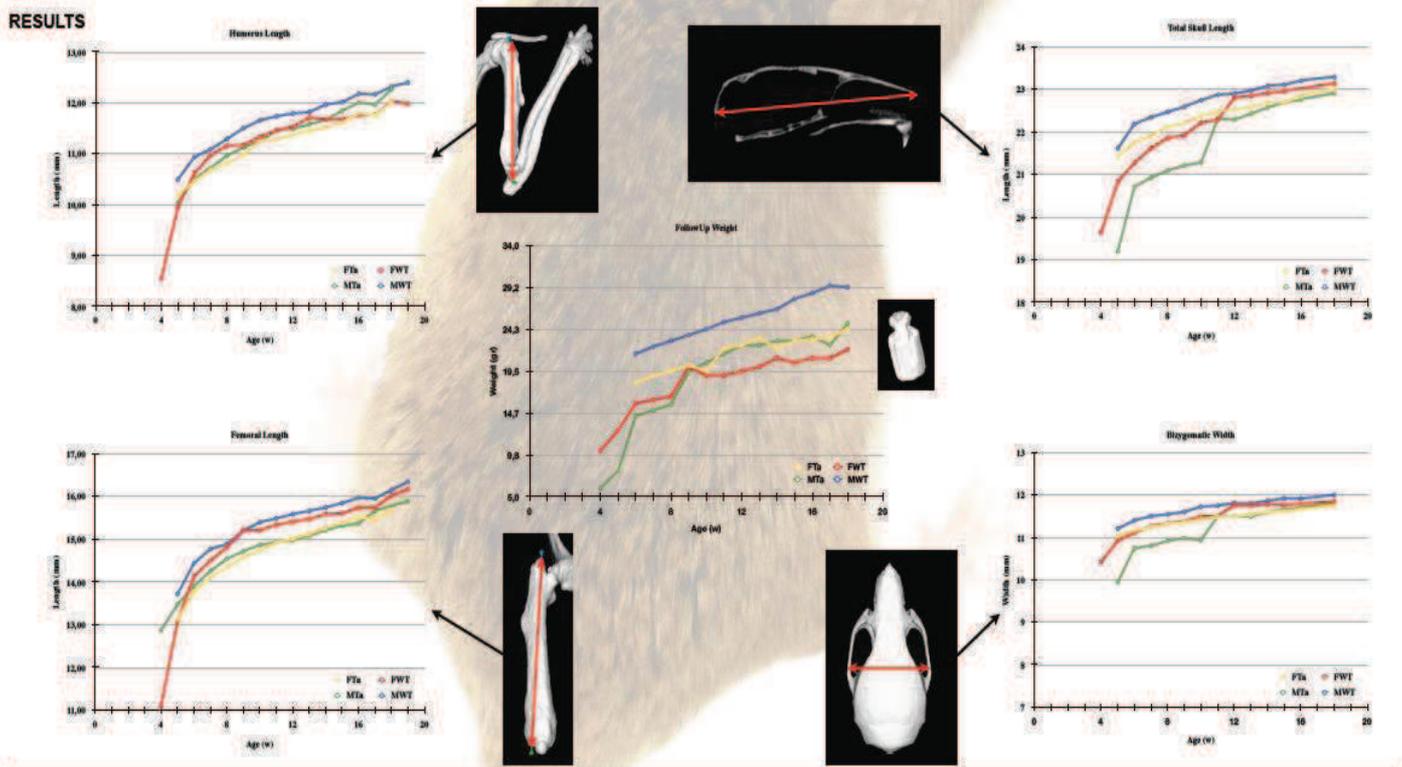
- In vivo study of skeletal growth using micro-CT ( $\mu$ CT).
- Application on the Tabby mouse model of XLHED.

**XLHED (X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia)**

- Polymalformative syndrome characterized by abnormal development of ectodermal structures.
- Typical phenotypic signs: hypotrichosis, hypohidrosis and *craniofacial and dental abnormalities*.

**MATERIAL & METHODS**

- Follow up of 21 mice during 5 months: 3 hemizygous males ( $Eda^{TmY}$ ), 6 heterozygous females ( $Eda^{Tm+}$ ), and 12 control WT (6 males, 6 females). Each mice was weighted and imaged weekly using micro-CT from 1 to 5 months-old. One individual ( $Eda^{TmY}$ ) dead during the experiment time.
- Micro-CT system: eXplore CT 120 (GE Healthcare, Waukesha, USA)
- Protocol: acquisition of 360 views in 360°, at 80 kV, 32 mA, and exposition time of 16 ms. Imaging of whole-body using 2 or 3 bed positions. Total scan time of approximately 3 to 5 minutes. Radiation doses estimated to 0.1 Gy according to manufacturer's data.
- Bone growth was assessed by measuring characteristic distances at specific locations: quantifications analyses performed using MicroView® (GE Healthcare, Waukesha, USA). Simple measurements performed on a 3D virtual reconstruction using anatomical landmarks: length, height and width of the skull, femur and humerus lengths. Statistical mean comparisons between each strain relative to the age at each measure.



**CONCLUSION**

- This is the first time that a follow-up study was conducted to observe growth rate differences between Tabby mice and wild-type controls.
- Tabby males show a marked sub-development, but differences tend to be reduced with age.
- Measurements before 1 month would be of interest but difficult due to practical limitations: small size of structures implies high resolution protocols eg more irradiation. The impact of radiation in very young mice should be then considered.



With the support of GE Healthcare



**Annexe 11.** Article publié

Bornert E, Choquet P, Gros C-I, Aubertin G, Perrin-Schmitt F, Clauss F, Lesot H, Constantinesco A, Schmittbuhl M (2011). Subtle morphological changes in the mandible of Tabby mice revealed by micro-CT imaging and elliptical Fourier quantification. *Front Physio.*2, 1-9. doi: 10.3389/fphys.2011.00015.

Cet article est soumis à des droits d'éditeurs

## Etude des dysmorphoses et de la croissance de la mandibule chez un modèle murin de dysplasie ectodermique hypohidrotique

La dysplasie ectodermique hypohidrotique liée à l'X (DEX) est consécutive à la mutation du gène *Eda*. Ce projet de recherche avait pour but d'étudier les dysmorphoses cranio-faciales chez le mutant murin Tabby représentant l'équivalent phénotypique de la DEX.

La forme des mandibules en vue latérale a été étudiée à partir d'approches quantitatives associant  $\mu$ -CT, traitement d'images, analyses de Fourier elliptique et analyses métriques.

Une première étude *ex vivo* menée sur 39 spécimens Tabby et 35 souris wild-type adultes a permis de mettre en évidence un hypo-développement mandibulaire chez Tabby. Deuxièmement, une étude longitudinale *in vivo* de la croissance mandibulaire mise en place sur une cohorte de 23 individus (12 WT et 11 Tabby) a montré que les individus Tabby présentaient cet hypodéveloppement dès le 1<sup>er</sup> mois et qu'il se maintenait à la fin de la première année de vie.

Les défauts du gène *Eda* affectent ainsi le développement de la mandibule en plus des dérivés ectodermiques.

### **Mots Clés :**

Dysplasie ectodermique hypohidrotique

Tabby

Mandibule

Analyse de Fourier elliptique

Traitement d'images

Croissance

The X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia (XLHED) is the result of *Eda* gene defect. This research project studied the cranio-facial dysmorphoses in Tabby murin mutant which having a similar phenotype to the XLHED.

A association of mutiple quantitive approachs ( $\mu$ -CT, images processing, elliptical Fourier analyse and metric analyses) permitted to study the mandible's shape in a lateral view.

A first *ex vivo* study led on 39 specimens Tabby and 35 WT mice allowed to highlight a mandibular hypo-development in Tabby. Secondly, a longitudinal *in vivo* study of mandibular growth, based on 23 specimen (12 WT and 11 Tabby), showed that Tabby presented this hypodevelopment from the 1st month and that it remained at the end of the first year of life.

The *Eda* gene affects the development of mandible and ectodermal structures.

### **Mesh :**

Hypohidrotic ectodermal dysplasia

Tabby mice

Mandible

Elliptical Fourier Analysis

Images Analysis

Growth