



**HAL**  
open science

**Modèles animaux et pathologies humaines :  
caractérisation de 3 lignées murines ENU présentant des  
anomalies du système vestibulaire ou locomoteur**

Carole El Hakam

► **To cite this version:**

Carole El Hakam. Modèles animaux et pathologies humaines : caractérisation de 3 lignées murines ENU présentant des anomalies du système vestibulaire ou locomoteur. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2016. Français. NNT : 2016LIMO0004 . tel-01701634

**HAL Id: tel-01701634**

**<https://theses.hal.science/tel-01701634>**

Submitted on 6 Feb 2018

**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.

# UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE 524 BIOLOGIE, SANTE

FACULTE DES SCIENCE ET TECHNIQUES

Laboratoire : Unité de Génétique Moléculaire Animale-UMR INRA 1061

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline / Spécialité : Génomique et Génétique Moléculaire

Présentée et soutenue par

**Carole El Hakam**

le 5 Février 2016

**Modèles animaux et pathologies humaines :  
caractérisation de 3 lignées murines ENU présentant  
des anomalies du système vestibulaire ou locomoteur**

Thèse dirigée par le Professeur Véronique Blanquet

JURY :

Président du jury	<b>Ahmad OULMOUDEN</b> , Professeur des Universités, Limoges
Rapporteurs	<b>Marie LEFRANCOIS MARTINEZ</b> , Professeur des Universités, Clermont-Ferrand <b>Jean-Luc VILOTTE</b> , Directeur de Recherche INRA, Jouy-en-Josas
Examineurs	<b>Samar EL-HAMOUI</b> , Professeur associé, Université Libanaise <b>Christophe SIRAC</b> , Maître de Conférences, Limoges <b>Véronique BLANQUET</b> , Professeur des Universités, Limoges

*“You do not really understand something  
unless  
you can explain it to your **grandmother**”*

**-Albert Einstein-**

# Remerciements

*Je tiens en premier lieu à remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir pris le temps d'examiner mon travail.*

*J'adresse mes plus sincères remerciements à Mme Marie LEFRANCOIS MARTINEZ et Mr Jean-Luc VILLOTE de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de ma thèse et de prendre du temps sur la période de fêtes de fin d'année pour évaluer mes travaux.*

*Je tiens aussi à remercier Mme Samar HAMOUI, Mrs Christophe SIRAC et Ahmad OULMOUDEN d'avoir été les examinateurs de ma thèse. Dr Samar, un grand merci d'avoir fait le déplacement jusqu'en France pour assister à ma soutenance et de m'avoir fait confiance durant mes études universitaires et plus particulièrement mon année de M2. Ahmad, merci de m'avoir donné l'accès à votre « caverne d'Ali baba »... ceci a facilité et accéléré mes expériences.*

*Un Grand merci à ma directrice de thèse, Professeur Véronique BLANQUET, de m'avoir acceptée dans son laboratoire. Les années passées à vous côtoyer m'ont permis de me développer tant du côté scientifique que du côté humain. Votre rigueur scientifique m'a permis de m'améliorer et de devenir un meilleur « apprenti-chercheur ». Je suis touchée de la confiance que vous m'avez accordée et vous m'avez rendue encore plus autonome que je ne l'étais déjà. Votre patience et votre gentillesse m'ont été précieuses autant dans mon développement scientifique que personnel.*

*Je souhaiterais exprimer ma gratitude au Dr Kabbara, qui m'a présenté à Mme Blanquet, et qui m'a offert la chance de la rencontrer et avoir notre première discussion scientifique au Liban.*

*Je remercie l'ensemble des membres de l'Unité de Génétique Moléculaire Animale, sans qui ces trois années n'auraient pas été aussi intenses et fructueuses. Merci Anne, Daniel, Déborah, Didier, Emilie, Fabienne, François, Karine V et Karine P, Khaled, Laetitia, Laure, Lionel, Mélanie, Nathalie, Odile, Patrick, Sébastien. J'espère n'avoir oublié personne. Je vous remercie pour votre bonne humeur, votre soutien et vos conseils inestimables tout au long de cette thèse. Une petite pensée aux doctorants, Bilal, et Victor, Luce qui vient de finir, et les « anciens nouveaux » qui viennent de commencer Alexis et Florian. Bonne continuation à tous !*

*Ces années m'ont permis d'avoir de nouveaux amis, Amel, Claire, Mélanie, Caroline, Jessica et Rayan, avec qui j'ai partagé des bons moments et de belles sorties et vous étiez toujours là pour me soutenir dans mes périodes difficiles. Merci les filles, je vous souhaite tout le bonheur !!!*

*Je tiens à remercier Monsieur Fabrice LALLOUE de m'avoir accueillie, au sein de son équipe pour mes quelques manips qui ne sont toujours pas finies... Merci Thomas, toi qui prend le relais avec Fabienne pour ton temps et tes conseils précieux. Je remercie aussi Sylvie et ses interventions de dernières minutes.*

*En fin, je remercie mon cher époux pour son soutien quotidien indéfectible bien qu'il était loin de moi et dans un autre pays. Notre couple a grandi en même temps que mon projet scientifique, il était toujours là pour m'entendre, me plaindre ou pour partager mes bonnes nouvelles. Sans ses encouragements et sa confiance en moi et en mes capacités, j'aurais rangé mes valises et serais rentrée depuis les premiers jours de mon arrivée.*

*Mes remerciements vont aussi à mon frère que j'adore, l'ensemble de ma famille, ma belle-famille et mes amis qui, avec cette question récurrente, « quand finis tu cette thèse et tu viens nous rejoindre ? », bien qu'angoissante en période fréquente de doutes, m'ont permis de ne jamais dévier de mon objectif. Je remercie aussi mon oncle pour son soutien.*

*Ma tante, au Canada et avec 8 heures de décalage horaire, quand tout le monde dormait et j'avais absolument besoin de parler avec quelqu'un après minuit, elle était toujours à l'écoute, on a passé des soirées de fou rire qui m'ont fait oublier tout le stress de la journée.*

*Papa, comme je t'avais promis, je t'adresse un remerciement spécial, ta petite fille est, ou va finalement être, Docteur. Tu pourras officiellement m'appeler Dr Carole Fidaa El Hakam, comme tu le souhaitais depuis longtemps.*

*Ces remerciements ne peuvent s'achever, sans une pensée pour ma première « fan » : ma mère. Ses encouragements sont pour moi les piliers fondateurs de ce que je suis et de ce que je fais. J'espère que vous êtes fiers de moi.*

*Merci à tous !*

*الحمد لله*

# Publications, Communications & Prix

## Publications

**Carole EL HAKAM KAMAREDDIN**, Laetitia MAGNOL and Véronique BLANQUET. *A new Otogelin ENU mouse model for autosomal recessive nonsyndromic moderate hearing impairment*. SpringerPlus (2015) 4:730 DOI 10.1186/s40064-015-1537-y.

**Carole EL HAKAM KAMAREDDIN**, Laetitia MAGNOL, Fabienne BARAIGE, Lionel FORESTIER and Véronique BLANQUET. *Phex<sup>L222P</sup> mutation increases Phex expression in a new ENU mouse model for XLH disease*. (En préparation pour soumission à *Mammalian Genome*)

## Communications

### *Communications Orales*

**2014** **Carole EL HAKAM**, Laetitia MAGNOL, Lionel FORESTIER and Véronique BLANQUET. *Characterization of two ENU mouse models having defects in the musculoskeletal system*. 17<sup>th</sup> PhD Student Seminar - Department of Animal Genetics-INRA, Jouy-en-Josas, France

### *Communications Affichées*

**2015** **Carole EL HAKAM**, Laetitia MAGNOL, Fabienne BARAIGE and Véronique BLANQUET. *A novel Phex mutation in an ENU mouse model of XLH disease*. Phenomin 2015 Ecole supérieure européenne pour la pheno-génomique de la souris, Strasbourg. Juin 2015

**2014** **Carole EL HAKAM**, Laetitia MAGNOL and Véronique BLANQUET. *Analysis of a novel Phex mutation in an ENU mouse model of XLH disease*. Young Life Scientists' Symposium 2014, Rennes, France

**2014**      **Carole EL HAKAM**, Laetitia MAGNOL and Véronique BLANQUET.  
*Analysis of a novel Phex mutation in an ENU mouse model of XLH disease.*  
Journée GEIST 2014, Limoges, France

**2013**      **Carole EL HAKAM**, Laetitia MAGNOL, Lionel FORESTIER and Véronique  
BLANQUET. *Characterization of two ENU mouse models having defects in  
the musculoskeletal system.* 16th PhD Student Seminar - Department of Animal  
Genetics-INRA, Amboise, France

### *Prix*

**2014**      **Prix de la meilleure communication orale** du 17ème Séminaire des thésards -  
Département de génétique animale-INRA, Jouy-en-Josas, France

**2014**      **Prix du meilleur poster** de la Journée GEIST 2014, Limoges, France

# Abréviations

<b>ATP</b>	Adénosine Triphosphate
<b>B6</b>	C57BL/6
<b>BMPs</b>	Bone morphogenetic proteins
<b>BSP</b>	Bone sialoprotein
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Ion Calcium
<b>CE</b>	Commission européenne
<b>Cotransporteur Na-Pi IIa</b>	Cotransporteur rénal sodium/phosphate de type IIa
<b>dB</b>	Décibel
<b>DEN</b>	Diéthylnitrosamine
<b>DMP-1</b>	Dentin Matrix acidic Phosphoprotein 1
<b>EMS</b>	Ethylméthanesulfonate
<b>ENU</b>	N-ethyl-N-nitrosourée
<b>ES(m)</b>	Embryonic stem cell (murine)
<b>EUCOMM</b>	European Conditional Mouse Mutagenesis Programme
<b>FGF23</b>	Fibroblast Growth Factor 23
<b>FIMRe</b>	The Federation of International Mouse Resources
<b>GDF(8)</b>	Growth Differentiation Factor (8)
<b>HEK 293</b>	Human Embryonic Kidney 293 cells
<b>HHL</b>	Hereditary Hearing Loss
<b>HL</b>	Hearing Loss
<b>HRM</b>	High Resolution Melt
<b>FIV</b>	Fécondation In Vitro
<b>KI</b>	Knock In



<b>KO</b>	Knock Out
<b>KOMP</b>	Knock Out Mouse Project
<b>MEC</b>	Matrice Extra Cellulaire
<b>MEPE</b>	Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein
<b>MGP</b>	Matrix Gla Protein
<b>MIT</b>	Microsatellite
<b>MSTN</b>	Myostatine
<b>MyHC</b>	Myosin heavy chain (Chaine lourde de myosine)
<b>NGS</b>	Next Generation Sequencing
<b>NorCOMM</b>	North American Conditional Mouse Mutagenesis Programme
<b>NSHL</b>	Non Syndromic Hearing Loss
<b>Ocn</b>	Osteocalcine
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PHEX</b>	Phosphate regulating gene with Homologies to Endopeptidases on the X-chromosome
<b>rpm</b>	Rotation par minute
<b>RV</b>	Rétrovirus
<b>SHL</b>	Syndromic Hearing Loss
<b>SIBLINGs</b>	Small Integrin-Binding Ligand, N-Glycosylated proteins
<b>SMS</b>	Système Musculo-Squeletique
<b>TALEN</b>	Transcription Activator-Like Effecteur Nucléases
<b>TGFβ</b>	Transforming Growth Factor Beta
<b>TM</b>	Tissu musculaire
<b>XLH</b>	X- Linked Hypophosphatemic rickets
<b>ZFN</b>	Zinc finger nucleases (Nucléases à doigts de zinc)

# Droits d'auteurs



Cette création est mise à disposition selon le Contrat : « **Paternité-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** » disponible en ligne :

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

# Table de matière

Préambule .....	14
Introduction générale.....	16
I. La souris comme organisme modèle et son intérêt pour la recherche biomédicale ....	17
Aperçu historique de l'utilisation de la souris en génétique.....	17
Intérêt du modèle murin pour la recherche biomédicale.....	18
Stratégie de mutagenèse chez la souris.....	19
i. Avancées technologiques majeures dans la création de souris transgéniques ....	20
II. L'agent mutagène, N-Ethyl-N-Nitrosourée (ENU), outil de la génétique classique....	26
Un bref historique des agents mutagènes chez la souris .....	26
Mode d'action de l'ENU.....	27
Effet-dose de l'ENU sur des souris mâles traitées.....	30
La conception des cribles ENU.....	31
i. Le crible génome entier classique.....	33
Le crible dominant.....	34
Le crible récessif.....	34
ii. Le crible génome entier sensibilisé.....	36
Les analyses phénotypiques des souris mutées.....	37
L'identification du gène muté.....	39
III. Objectifs de la thèse .....	41
Résultats - Chapitre 1.....	43
Chapitre 1 : Déficience auditive .....	44
I. Anatomie de l'oreille.....	44
II. Déficience auditive.....	46
Quelques chiffres.....	46
Types de déficiences auditives.....	47
Avantages des modèles murins pour étudier les déficiences auditives .....	49
III. Publication 1: la lignée vbd.....	51
IV. Conclusion.....	52
Résultats - Chapitre 2.....	54
Chapitre 2 : Le système locomoteur.....	55
I. Le tissu squelettique .....	55
Le tissu cartilagineux.....	55
L'os et le tissu osseux.....	56
II. Le tissu musculaire squelettique .....	61
III. Publication 2: la lignée GMA24 .....	66
IV. Conclusion de l'analyse des souris GMA24 .....	67
V. Résultats de l'analyse des souris de la lignée GMA06 .....	69
Analyse phénotypique des souris GMA06.....	71
Analyse moléculaire des souris GMA06 .....	73
Discussion .....	79
Références .....	87
Annexes.....	96
Annexe 1 .....	97
Quatre classes de nucléases de l'ingénierie du génome.....	97

<i>Annexe 2</i> .....	98
<i>Gènes de surdité recessive non syndromique chez l'homme et leurs correspondants chez la souris</i> .....	98
<i>Annexe 3</i> .....	103
<i>Extraction de l'ADN par le kit « QIAamp DNA Blood Mini Kit »</i> .....	103
<i>Les tests biochimiques</i> .....	103
<i>Amplification des MITs pour la cartographie</i> .....	103
<i>Amplification des échantillons et programme HRM</i> .....	104
<i>Annexe 4</i> .....	105
<i>Marqueurs génétiques pour la cartographie des souris GMA06</i> .....	105
<i>Annexe 5</i> .....	107
<i>Amorces des SNPs utilisées pour le crible des souris GMA06</i> .....	107
<i>Résumé</i> .....	111

# Index des Figures

Figure 1. Arbre phylogénétique représentant les relations entre 28 espèces de vertébrés .....	17
Figure 2. Les approches d'investigation fonctionnelle en génétique.....	20
Figure 3. L'histoire de la manipulation génétique chez la souris .....	21
Figure 4. Action biochimique du N-Ethyl-Nitrosourée (ENU) .....	28
Figure 5. Etapes d'un crible de mutagenèse à l'ENU .....	31
Figure 6. Classification des cribles génétiques .....	32
Figure 7. Représentation de cribles conventionnels pour l'isolement de mutations dominantes et récessives induites par l'ENU .....	35
Figure 8. Exemples de domaines biologiques étudiés pour l'analyse phénotypique de souris mutées.....	38
Figure 9. Représentation schématique du principe de cartographie d'une mutation dominante .....	40
Figure 10. Représentation schématique de l'oreille.....	45
Figure 11. Types de déficiences auditives.....	48
Figure 12. La composition générale d'un os long humain et d'une plaque de croissance.....	58
Figure 13. Remaniement et remodelage osseux.....	60
Figure 14. Organisation du muscle squelettique .....	62
Figure 15. Phénotype des souris GMA06 .....	70
Figure 16. Poids des animaux GMA06 et leurs différents types de muscles squelettiques comparés à des souris contrôles .....	72
Figure 17. Exemples de MITs génotypés polymorphes entre FVB et B6.....	74
Figure 18. Exemple d'analyse de données HRM.....	76
Figure 19. Représentation schématique de la mutagenèse reverse induite par l'ENU chez la souris.....	82
Figure 20. Les différents membres de l'IKMC.....	84
Figure 21. Schémas de quatre classes de nucléases spécifiques d'une séquence d'ADN.....	97

# Index des Tableaux

<i>Tableau 1. Types d'allèles génétiquement modifiés</i> .....	24
<i>Tableau 2. Types de cellules présentes dans le tissu osseux</i> .....	57
<i>Tableau 3. Caractéristiques des différents types de fibres musculaires squelettiques</i> .....	64

# Préambule

---

Au cours de ces dernières décennies, les différentes approches de mutagenèse chez la souris ont permis d'élaborer et de valider des modèles animaux pertinents pour mieux appréhender les mécanismes d'action des gènes. L'identification des gènes orthologues et la conservation des génomes (séquences et fonctions) entre les espèces permettent d'envisager des études phénotypiques et fonctionnelles sur un gène d'intérêt dans une espèce modèle comme la souris, modèle de référence des mammifères. L'objectif de ma thèse était de caractériser au niveau phénotypique et moléculaire, 3 lignées murines indépendantes issues de deux cribles de mutagenèse à l'éthyl-nitroso-urée (ENU), un crible récessif et un crible dominant sensibilisé. Le premier crible visait à développer des modèles de pathologies humaines, le deuxième avait été mis en place dans le laboratoire dans le but d'approfondir nos connaissances fondamentales sur le développement du système squeletto-musculaire chez les mammifères, plus particulièrement l'homme et le bovin. Les mécanismes génétiques grâce auxquels se forment les muscles squelettiques font l'objet de nombreuses recherches dont les objectifs principaux chez l'homme sont la découverte de thérapies destinées à corriger les défauts générateurs de maladies connues globalement sous le nom de myopathies. Chez le bovin, une maîtrise accrue du développement musculaire constitue un enjeu essentiel dans le contrôle de la production de viande.

L'exposé bibliographique de ce manuscrit se divise en deux grandes parties : la première présentant la pertinence de la modélisation animale, et plus particulièrement la souris comme organisme « modèle » avec la création de modèles souris par des approches de génétique reverse, la seconde, la production de modèles souris par une approche de génétique classique, la mutagenèse aléatoire à l'ENU. Les résultats obtenus au cours de ma thèse sont présentés en deux chapitres, sous forme de deux articles commentés après une introduction du système physiologique étudié. Le premier chapitre décrit la caractérisation d'une lignée murine, la lignée *vbd*, présentant des défauts du système vestibulaire, le deuxième présente les analyses phénotypiques et moléculaires de deux lignées, GMA24 et GM06. L'ensemble de la stratégie utilisée est ensuite replacée lors de la discussion dans le contexte actuel d'élaboration de modèles souris génétiquement modifiées.

# *Exposé bibliographique*

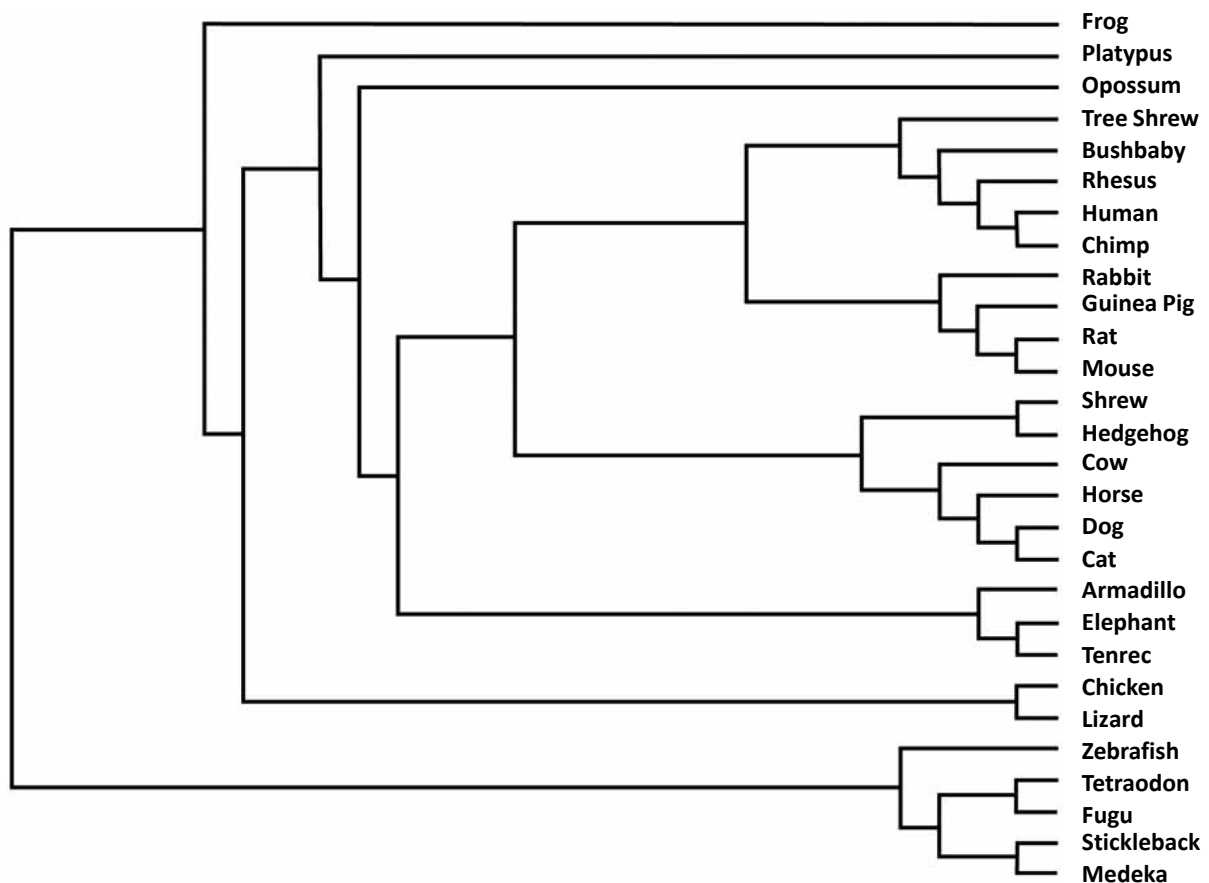


# Introduction générale

---

La première utilisation des animaux dans la recherche biomédicale remonte au IV<sup>e</sup> siècle avant J.-C. quand Aristote a étudié les différences anatomiques entre les différentes espèces animales en les disséquant. Au cours des siècles qui ont suivi, la recherche sur les animaux en tant que modèles d'étude a connu des avancées spectaculaires et abouti à des significatifs progrès dans tous les domaines de la médecine. Le choix des animaux comme modèles de la physiologie et la pathologie humaine est basé sur le fait que tous les vertébrés sont si étroitement liés par des liens de parenté évolutive et génétique (figure 1) que l'information tirée de l'un est transposable à d'autres. Toutefois, quand nous examinons la grande hétérogénéité qui existe dans le règne animal, de l'anatomie brute aux niveaux moléculaires, une telle assertion doit être considérée avec précaution. En 1929, le physiologiste danois August Krogh, un pionnier des études comparatives sur les animaux, écrit : *" Pour un grand nombre de problèmes, il y aura un certain animal de choix, ou un petit nombre d'animaux, dans lesquels ils peuvent être le plus convenablement étudiés"*. Le "Principe d'August Krogh" est ainsi défini, il a dès lors servi de justification pour l'utilisation des modèles animaux en recherche biomédicale.

Le choix d'un modèle animal pour la recherche biomédicale est basé sur de nombreux critères englobant une grande variété de facteurs. Les premières considérations comprennent la pertinence (analogie) du modèle par rapport au processus physiologique étudié chez l'homme, les données de base disponibles sur le modèle, le degré de généralisation des données obtenues, la faisabilité et la facilité de manipulation expérimentale, les complications possibles et la morbidité, le coût et la disponibilité de l'animal spécifique, sans omettre les implications éthiques associées à l'utilisation des animaux dans la recherche biomédicale (Arnoczky et al. 2010).



**Figure 1. Arbre phylogénétique représentant les relations entre 28 espèces de vertébrés**

*La longueur des branches est proportionnelle au nombre d'insertions et de délétions au niveau de site spécifiques (adaptée de Fan et al. 2007). Une phylogénie similaire a été construite par Guénet et al. 2014, basée sur le nombre de substitutions de paires de bases. Le temps de divergence entre la souris et l'homme est estimé à 70-80 millions d'années.*

## **I. La souris comme organisme modèle et son intérêt pour la recherche biomédicale**

### *Aperçu historique de l'utilisation de la souris en génétique*

Au début du 20<sup>ème</sup> siècle, les travaux de Mendel sur l'hérédité des végétaux venaient juste d'être vérifiés chez les mammifères. En effet, en 1902, le biologiste français Lucien Cuénot, vérifie grâce à son étude portant sur l'hérédité de la pigmentation du pelage chez la souris, pour la première fois les lois de Mendel chez les mammifères (Paigen 2003; Hickman and Cairns 2003). A la même période, William Castle, déjà connu pour l'étude de la

génétique chez la drosophile, a également étudié la transmission de la couleur du pelage chez la souris. Depuis, des centaines de souches murines consanguines ont été développées, chaque lignée ayant été obtenue par croisements entre frères/sœurs afin d'obtenir des lignées génétiquement pures de souris. Après un minimum d'une vingtaine de générations (le plus souvent 40 ou 60), les souris qui naissent sont « des clones » puisque homozygotes à tous les loci et donc génétiquement identiques. Chaque lignée consanguine définit un fond génétique qui lui est propre. Il est alors possible de comparer les différentes lignées, de les croiser, et de déterminer ensuite différents paramètres génétiques sous-tendant les variations observées, par exemple neurobiologiques ou comportementales (Logan et al. 2013). L'étude des lignées consanguines est aussi utile pour détecter des effets de l'environnement sur le phénotype.

En 1915, le rapport de Haldane sur le calcul des distances génétiques a conduit à la première cartographie génétique chez la souris (Paigen 2003) qui a été complétée régulièrement au cours des 50 années suivantes. Les principales avancées dans la cartographie de la souris ont été permises grâce au développement de la technologie de l'ADN recombinant et l'étude de polymorphismes basés sur le séquençage d'ADN. Ces techniques révèlent facilement les polymorphismes entre les souches de laboratoire (Geoff 2002). En 2002, la souche murine C57BL/6J (B6), créée par C. Little en 1921, correspond au premier mammifère (non humain) dont le génome fut séquencé (Waterston et al. 2002). La version complète est établie en 2009 (Church et al. 2009) et sa séquence est utilisée comme séquence référence pour la souris. En 2011, l'Institut Sanger a terminé le séquençage des génomes complets de 17 souches de souris consanguines (Keane et al. 2011).

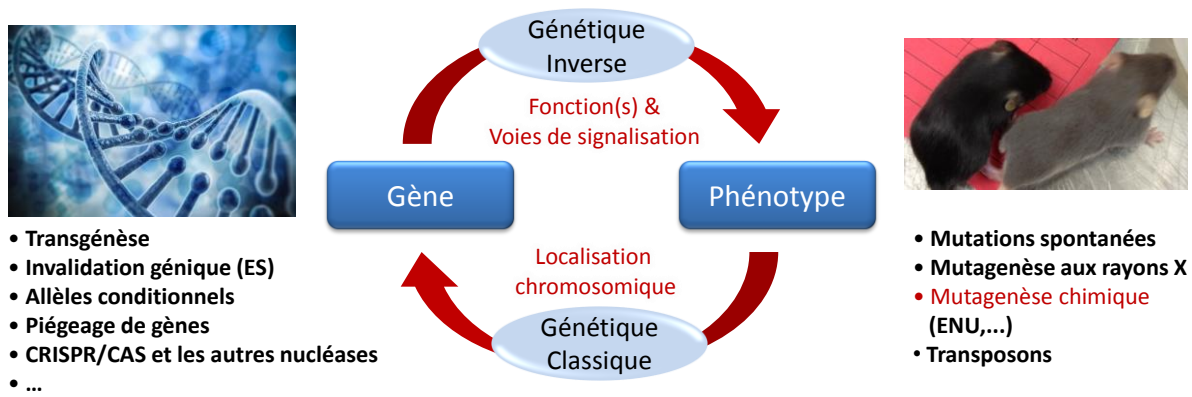
### ***Intérêt du modèle murin pour la recherche biomédicale***

Depuis le 19<sup>e</sup> siècle, la souris est le modèle le plus utilisé pour la recherche génétique chez les mammifères. Bien que la levure (*Caenorhabditis elegans*), le nématode (*Caenorhabditis elegans*) ou la drosophile puissent être de bons modèles pour certaines études comme celles du cycle cellulaire et du développement, la souris est un meilleur modèle pour l'étude des systèmes complexes comme les systèmes immunitaire, musculaire, endocrinien, nerveux, cardio-vasculaire, squelettiques et d'autres systèmes physiologiques complexes communs aux mammifères. Et ce, principalement en raison de ses étroites similitudes génétiques, physiologiques et pathologiques avec l'homme. Le génome de la souris est environ 14% plus petit que le génome humain (2,5 gigabase (Gb) comparativement à 2,9 Gb) mais les deux génomes contiennent chacun environ 24000 à 25000 gènes codant pour des

protéines. En effet, 75-80% des gènes de la souris possèdent un orthologue unique et identifiable chez l'homme et moins de 1% des gènes semblent n'avoir aucun homologue entre les deux génomes (Waterston et al. 2002). On peut donc penser que les génomes murin et humain sont issus d'un ancêtre commun datant ~85 millions d'années (figure 1). Les évolutions technologiques, et en particulier de génie-génétique ont permis de manipuler le génome de la souris pour produire tous types de mutation et ainsi faciliter son analyse. Il est ainsi possible de créer des souris «modèles» de nombreuses pathologies humaines, permettant d'évaluer et valider de nouveaux traitements pour ces maladies.

### *Stratégie de mutagenèse chez la souris*

Si le séquençage des génomes de l'homme et de la souris a constitué une étape déterminante et a apporté d'importantes informations, la connaissance de la (les) fonction(s) d'un gène et à fortiori de l'ensemble des gènes nécessite le développement d'autres stratégies. Il existe deux approches d'investigation fonctionnelle en génétique (figure 2): la génétique reverse, où un ou plusieurs gènes d'intérêt sont modifiés et le phénotype résultant est étudié ; et la génétique classique, où un phénotype d'intérêt est d'abord choisi et un ensemble de mutants générés aléatoirement est soumis à un crible pour le phénotype d'intérêt (Ermann and Glimcher 2012). La principale limitation des approches de la génétique reverse est la production de mutants sans connaître le phénotype induit et ainsi la possibilité d'obtenir des allèles létaux au stade embryonnaire ne permettant pas de dévoiler toutes les fonctions associées à un gène. Ce problème a été partiellement résolu par la possibilité de créer des mutations conditionnelles. En revanche, la génétique classique qui vise à comprendre l'origine génétique des altérations observées reflète plus le type d'événements mutationnels identifiés dans des maladies humaines. Si nous sommes passés de stratégies de mutagenèse « gène par gène » à du haut débit, les années 2000 se caractérisent par la mise en place de consortium internationaux dont les objectifs sont de générer pour chaque gène, une lignée murine mutante, avec comme finalité l'annotation fonctionnelle du génome de la souris.



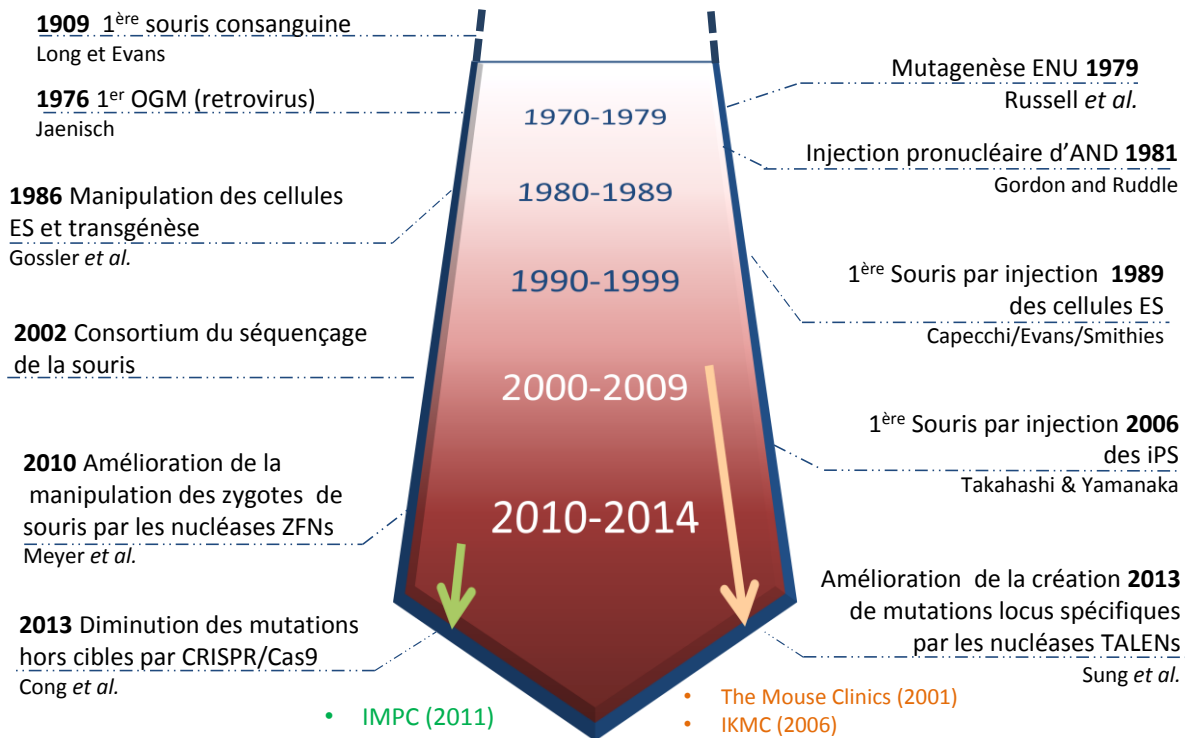
**Figure 2. Les approches d’investigation fonctionnelle en génétique**

*Les approches de la génétique inverse commencent par la mutagenèse d'une séquence du gène ou d'un marqueur connu par transgénèse, invalidation génétique, piégeage ou ciblage d'un gène, des nucléase, etc. La mutation du gène est suivie par l'analyse du phénotype mutant. Cette approche, basée sur une hypothèse concernant une fonction potentielle du gène ciblé, permet ainsi de dévoiler la fonction du gène muté et les voies de signalisation impliquées. Les approches de la génétique classique commencent par l'identification d'un phénotype mutant causé par une mutation aléatoire dans le génome qui peut être due soit à une mutation spontanée, soit à une mutagenèse chimique ou aux rayons X ou par transposons,... L'identification du gène ou du marqueur muté par localisation chromosomique est postérieure à l'identification de la lignée de souris mutante par criblage phénotypique. Cette approche ne fait aucune hypothèse concernant les gènes qui peuvent causer le phénotype aberrant. Photo des souris d'après <http://www.informatics.jax.org/image/pheno/MGI:5609710>*

### ***i. Avancées technologiques majeures dans la création de souris transgéniques***

Depuis 1976, les souris génétiquement modifiées sont générées grâce à des grandes étapes de production de souris transgéniques qui ont été optimisées au fil du temps (figure 3). En effet, les premières souris transgéniques ont été produites en infectant des embryons par des rétrovirus (RV) (Jaenisch et al. 1976; Jaenisch 1976) qui permettent un transfert de gènes efficace et stable dans des cellules de mammifères. A l'époque, la production à grande échelle de rétrovirus pour les applications cliniques s'est confrontée à plusieurs difficultés telles que la production du vecteur à grande échelle, la production de particules de réplication, l'amélioration de la construction du vecteur, trouver des stratégies pour le ciblage cellulaire, atteindre une expression régulée et tissu-spécifique, moduler les facteurs déterminant ou inhibant l'expression du transgène, et contrôler les réponses immunitaires aux produits transgéniques (Barquinero et al. 2004). Vers la fin des années 1970, Russell WL. et al ont

débuté la manipulation du génome de la souris par injection de mutagènes chimiques essentiellement le N-nitroso-N-éthylurée (ENU) chez des souris adultes (Russell et al. 1979). Cette étape sera développée ultérieurement dans le manuscrit.



**Figure 3. L'histoire de la manipulation génétique chez la souris**

*ES: Embryonic Stem cells; OGM: Organisme Génétiquement Modifié; iPS induced Pluripotent Stem cells; ZFN: Zinc Finger Nuclease; TALE: Transcription Activator-Like Effector*

Quelques années plus tard, Gordon JW et Ruddle FH ont créé des souris transgéniques par micro-injection d'ADN dans le pronucléus mâle d'un zygote (Gordon and Ruddle 1981). Même si cette approche, aussi appelée transgénèse additive, est la méthode la plus largement utilisée en transgénèse chez les mammifères, elle présente un certain nombre d'inconvénients, comme l'intégration du transgène en une ou plusieurs copies au hasard dans le génome, les séquences voisines du site d'intégration peuvent interférer avec l'expression du transgène et conduire à un effet de position. Ce dernier peut se traduire soit par un niveau d'expression du transgène qui varie d'une lignée transgénique à une autre sans que le nombre de copies du transgène en soit la cause, soit le transgène peut être exprimé de manière ectopique ou être

silencieux. Ce risque d'effet de position impose à l'expérimentateur de produire et d'analyser plusieurs lignées transgéniques indépendantes.

A la fin des années 80, Capecchi, Evans et Smithies contribuent ensemble à la production de la première souris Knock-Out (KO ; mutation nulle par invalidation d'un gène) grâce à l'utilisation des cellules souches embryonnaires (ES) mutées par ciblage du gène reposant sur une recombinaison homologue entre des séquences d'ADN du chromosome et des séquences d'ADN d'intérêt nouvellement introduites (Smithies et al. 1985; Wong and Capecchi 1986; Thomas and Capecchi 1987; Doetschman et al. 1987; Mansour et al. 1988; Capecchi 1989). C'est en 1989 que les premières souris mutantes obtenues par recombinaison homologue dans les cellules ES sont publiées (Thompson et al. 1989; Koller et al. 1989; Zijlstra et al. 1989; Capecchi 2001; Capecchi 2005). Grâce à la recombinaison homologue, un allèle inactivé peut être introduit (ou modifié) dans des cellules souches embryonnaires ES en culture, cellules qui sont capables de se différencier et de donner naissance à tous les tissus de l'animal. Après sélection des cellules ES qui ont intégré la mutation au bon endroit, implantation dans un jeune embryon de souris au stade blastocyste et transfert dans une mère porteuse, des souriceaux dits chimères ou mosaïques sont obtenus. Ces souris chimériques sont croisées avec une lignée sauvage pour donner en première génération d'animaux hétérozygotes dont certains possèdent l'allèle inactivé. La dernière étape consiste à croiser des animaux hétérozygotes mutants pour obtenir des individus homozygotes pour le gène invalidé dont le(s) phénotype(s) est(sont) analysé(s) plus précisément. Ainsi, l'analyse des phénotypes engendrés par la mutation introduite contribue à la connaissance sur la (les) fonction(s) du gène concerné. Ces remarquables travaux ont marqué une étape essentielle et ont conduit les trois chercheurs Capecchi, Evans et Smithies à partager en 2007 le prix Nobel de physiologie et médecine (Zielinska 2007). Plusieurs variantes à la stratégie de knock-out (tableau 1) ont été développées afin de répondre à différentes problématiques. Ainsi, si les mutations nulles sont un outil génétique puissant, les maladies génétiques humaines sont rarement provoquées par des mutations nulles. La possibilité d'introduire de courtes délétions constitue une avancée dans ces études ainsi que dans l'analyse de la fonction de protéines. De même, le fait que la mutation soit dans toutes les cellules de la souris peut limiter un grand nombre d'études, en particulier si la mutation entraîne la létalité. L'utilisation du système CRE/loxP (Kilby et al. 1993) a permis de développer des approches de survenue conditionnelle de la mutation au cours du développement ou chez l'adulte (Gu et al. 1994; Kellendonk et al. 1996; Feil et al. 1996). A ce jour, 17 000 gènes murins ont été ciblés conduisant à des allèles



modifiés et environ 1500 maladies humaines ont été modélisées chez la souris (<http://www.informatics.jax.org/phenotypes.shtml>).

Si cette technologie de transgénèse par recombinaison homologue constitue un remarquable outil, celui-ci présente quelques inconvénients, en particulier le temps et les efforts nécessaires pour produire des souris génétiquement modifiées à partir de cellules ES. La sélection des cellules recombinantes homologues reste longue, coûteuse et stressante pour les cellules. Toutes les lignées ES ne sont pas robustes, en particulier celles issues de souris consanguines autre que la souche 129 ; en outre, l'instabilité du génome des cellules ES en culture est une des raisons de l'échec de la transmission de la lignée germinale (Skarnes 2015). Cependant, l'élément le plus déterminant reste la fréquence du mécanisme de recombinaison homologue qui est variable d'un locus à un autre et qui ne se produit que dans 1 cellule ES sur  $10^5$  à  $10^8$  environ, ce mécanisme étant quasi inexistant dans les autres types cellulaires chez les mammifères. C'est pourquoi, d'autres stratégies ont été mises en œuvre reposant sur l'introduction d'une cassure double brin unique au niveau du gène cible pour augmenter la fréquence de recombinaison à cet endroit. L'utilisation de nucléases a permis de générer des mutations à un site génomique de choix dans divers types cellulaires et différents organismes (Kim et al. 1996; Bibikova et al. 2001; Bibikova et al. 2002; Bibikova et al. 2003; Porteus and Baltimore 2003; Urnov et al. 2010). Les trois classes de nucléases les plus utilisées chez la souris sont: les nucléases à doigts de zinc (ZFN) (Meyer et al. 2010), les Transcription Activator-Like effecteur nucléases (TALENs) (Sung et al. 2013) et Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats (CRISPR)/Cas (Cheng et al. 2013) (annexe 1). Les TALENs sont plus spécifiques que les ZFNs puisqu'elles sont capables de reconnaître une séquence cible d'ADN plus longue. Cependant, ces deux nucléases peuvent induire des mutations hors cible et donc une potentielle cytotoxicité (Koo et al. 2015). En outre, les ZFNs ont une gamme limitée de ciblage, elles ciblent plus particulièrement des séquences riches en guanine, avec un site cible potentiel tous les 500 pb environ. De plus, le génome adopte naturellement plusieurs niveaux d'enroulement lors de la différenciation, ce qui laisse seuls les gènes actifs prêts à la manipulation par les ZFNs (Mussolino and Cathomen 2012; Jabalameli et al. 2015); les CRISPR peuvent aussi induire une certaine cytotoxicité dans les système cellulaire et un mosaïsme des souris fondateurs (Singh et al. 2015).



**Tableau 1. Types d'allèles génétiquement modifiés**

Type d'allèle/mutation	Type de production	Description	Utilisations les plus courantes
<b>Knock-out (nulle)</b>	Ciblé (recombinaison homologue)	Remplace la région codante d'un gène connu (gène complet ou exons spécifiques) par une cassette de ciblage. La perte de fonction est complète	Etudier la fonction du gène ciblé
<b>Knock-in (Substitution de nucléotide)</b>	Ciblé (recombinaison homologue)	Remplace la région codante d'un gène connu avec une variante de la séquence du même gène contenant une mutation spécifique	Etudier l'impact phénotypique de cette variation, souvent tiré à partir d'observations cliniques humaines. L'impact fonctionnel est allèle spécifique
<b>Knock-in (insertion)</b>	Ciblé (recombinaison homologue)	Un vecteur de ciblage est utilisé pour introduire une nouvelle variante dans un locus spécifique. Il peut apporter une variante alternative du gène ciblé ou un nouvel ADNc complet	Etudier le rôle de la variante : exprimer la variante désirée ou le produit du nouveau gène.
<b>Floxed (conditionnelle)</b>	Ciblé (recombinaison homologue)	Des sites LoxP, séquences de reconnaissance de la recombinaise CRE, sont introduits et flanquent un gène cible, un exon ou une partie d'une construction	La co-expression de la recombinaise CRE dans la même cellule va remodeler la région flanquée en fonction de la direction des sites LoxP. Cela permet soit une inactivation soit une expression tissu spécifique d'un gène. En l'absence de CRE, l'allèle floxed fonctionne comme le type sauvage.
<b>FRT (conditionnelle)</b>	Ciblé (recombinaison homologue)	Des sites FRT, séquences de reconnaissance de la recombinaise FLP, sont introduits et flanquent un gène cible, un exon ou une partie d'une construction	Similaire aux allèles floxés, mais sensible à la co-expression avec la recombinaise FLP (flippase).

Type d'allèle	Type de production	Description	Utilisations les plus courantes
<b>Rapporteur ciblé</b>	Ciblé (recombinaison homologue)	Insertion d'un gène rapporteur (GFP, LacZ, la luciférase, etc) dans le sens du cadre de lecture dans un locus connu, en aval à une séquence régulatrice. Susceptible de perturber un gène endogène	Etudier/suivre l'activité transcriptionnelle d'un promoteur endogène <i>in vivo</i> . Si elle est utilisée comme étiquette sur une protéine fonctionnelle, elle permet d'étudier la localisation de la protéine ou le trafic cellulaire du produit du gène
<b>Gene trap (piégeage de gène)</b>	Insertion aléatoire	Cassette connue avec un marqueur de sélection, incorporée de façon aléatoire dans les cellules ES.	Invalidation génique à haut débit. Souvent les cassettes ont une fonction de gène rapporteur permettant de déterminer l'activation transcriptionnelle du promoteur endogène une fois que le site d'insertion a été déterminé
<b>Transgénique (exprimés)</b>	Insertion aléatoire, peut être ciblée	Introduction d'un gène d'origine étrangère pour l'exprimer chez la souris	Expression d'une protéine non-murine d'intérêt.
<b>Transgénique (rapporteur, CRE)</b>	Insertion aléatoire, peut être ciblée	Introduction d'un gène rapporteur avec un codon STOP flanqué par loxP avant la séquence codante	Permet aux chercheurs d'évaluer l'activité du transgène d'une lignée transgénique exprimant la recombinase CRE. La co-expression avec la CRE supprime le codon STOP et active le gène rapporteur, marquant ainsi les tissus où l'activité de CRE est présente.

Plusieurs allèles génétiquement modifiés les plus couramment utilisés par la communauté de la recherche. Adapté du site <http://www.informatics.jax.org>

## II. L'agent mutagène, N-Ethyl-N-Nitrosourée (ENU), outil de la génétique classique

### *Un bref historique des agents mutagènes chez la souris*

L'analyse d'une mutation chez la souris par les approches classiques, pour rappel, consiste à cribler l'échantillon afin de sélectionner les individus ayant des phénotypes anormaux. L'analyse résultante se concentre sur l'identification et l'étude des changements génétiques sous-jacents qui sont responsables de ces anomalies. Ceci débute par une étape de mutagenèse afin d'augmenter le nombre de lésions de l'ADN dans la population criblée.

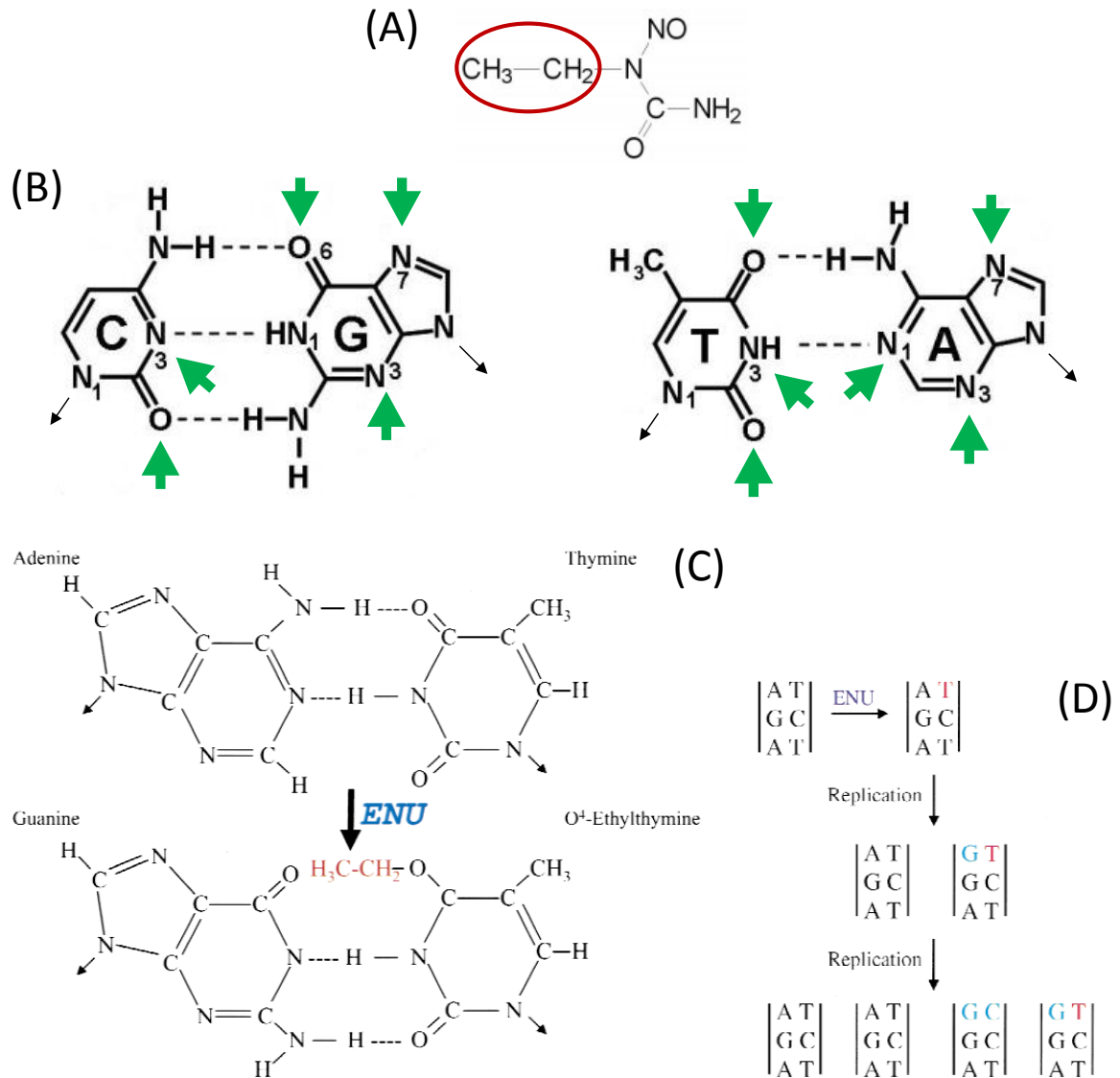
Dans les années 1950, Russel a démontré que l'irradiation de souris mâles aux rayons X peut augmenter le taux de mutation (de 13 à 50 x 10<sup>-6</sup> par locus) observé dans la descendance, de plus de 20 à 100 fois par rapport à des souris non irradiées, avec une fréquence de mutations spontanées faible (~5 x 10<sup>-6</sup> par locus) ; cette augmentation était plus que prévisible, aux vues des travaux antérieurs menés chez la drosophile. Les rayons X provoquent une grande variété de remaniements chromosomiques, tels que des délétions, des inversions et des translocations qui affectent généralement plusieurs gènes. En outre, il a été démontré chez la souris, contrairement à ce qu'il a été trouvé chez la drosophile, l'irradiation appliquée à une dose aiguë et unique est beaucoup plus mutagène qu'une exposition chronique aux rayons X, même lorsque la dose totale du rayonnement est identique (résumé par Cordes 2005; Probst and Justice 2010).

Concernant les mutagènes chimiques, les premières expériences effectuées par Ehling et al. (1979), Russell et Kelly (1979), entre autres ont été un peu décevantes. La plupart des produits chimiques injectés à des souris mâles n'ont pas entraîné une augmentation importante de mutations locus spécifique chez les descendants. La procarbazine, par exemple, agent chimiothérapeutique puissant utilisé pour traiter le cancer, était capable d'induire seulement 1/3 des mutations induites par les rayons X. L'éthylméthanesulfonate (EMS) et le diéthylnitrosamine (DEN), agents mutagènes puissants chez la drosophile, étaient incapables de provoquer une augmentation significative du taux de mutations locus-spécifiques chez la souris (résumé par Probst and Justice 2010). Par contre, l'utilisation du mutagène chimique ENU a conduit à des résultats spectaculaires (Russell et al. 1979). Lorsque des souris mâles reçoivent une dose unique d'ENU de ~200 mg/Kg, ils présentent dans un premier temps une

stérilité temporaire (période entre la dernière injection de l'ENU et le temps calculé de la conception) en raison de l'épuisement des spermatogonies dans les testicules, pour après 2-3 mois récupérer leur fertilité. Les descendants de ces animaux ont un taux de mutation ( $150 \times 10^{-6}$  par locus) cinq fois supérieur à celui induit par des rayons X (Russell et al. 1979). Des doses fragmentées d'ENU sont plus efficaces qu'une unique dose et aboutissent à un taux de mutation 12 fois plus élevé que les rayons X, 36 fois plus élevé que le taux de mutations induits par la procarbazine et 200 fois plus que des mutations spontanées (Russell et al. 1982; Hitotsumachi et al. 1985). L'ENU est donc considéré comme un " super-mutagène " de choix pour générer de nouvelles mutations aléatoires chez la souris.

### *Mode d'action de l'ENU*

L'ENU est un composé synthétisé en laboratoire qui provoque des mutations aléatoires et ponctuelles chez une grande variété d'organismes. L'ENU provoque directement des mutations par alkylation de l'ADN sans aucune transformation métabolique nécessaire à son activation. Le groupement éthylique d'ENU (figure 4) peut être transféré à différents atomes d'oxygène (O) et d'azote (N) cibles dans l'ADN, y compris l'extrémité des groupes N-1, N-3, et N-7 de l'adénine; O-2 et N-3 de la cytosine; le N-3, N-7, et O-6 de la guanine; les groupes O-2, O-4, et N-3 de thymine; et les groupes phosphate du squelette de l'ADN (Justice et al. 1999; Noveroske et al. 2000). Ces groupements éthyl transférés à l'ADN, seuls, ne constituent pas une mutation; toutefois, leur présence peut provoquer une erreur d'identification de la base éthylée lors de la réplication de l'ADN, ce qui entraîne le mésappariement. Après deux cycles de réplication, une seule substitution de paire de bases existe et est non identifiable aux systèmes de réparation cellulaire. Bien que l'ENU induisent principalement des mutations ponctuelles de l'ordre d'une mutation toutes les 700-1000 pb/génome, quelques petites délétions ont été rapportées (Noveroske et al. 2000; Concepcion et al. 2004).



### Figure 4. Action biochimique du N-Ethyl-Nitrosourée (ENU)

Le groupe Ethyl (entouré en rouge) (A) de l'ENU induit une mutation aléatoire par l'alkylation de l'ADN. Il est transféré à différents atomes d'oxygène (O) et d'azote (N) cibles (flèches verts) des acides nucléiques (C : Cytosine ; G : Guanine ; A : Adénine ; T : Thymine). Par exemple, l'ENU induit la formation de l'O4 éthylthymine (C) à partir de la thymine qui, après une réplication, sera mésappariée avec une guanine (D) à la place de l'adénine. La réplication suivante va induire le remplacement de la thymine de départ par une nouvelle cytosine. La mutation est ainsi créée par l'ENU.

Les flèches noires dans les figures B et C indiquent les sites de fixation du désoxyribose de l'ADN. Dans la figure D, la thymine est en rouge pour indiquer la présence du produit d'addition O4-éthyle, et les lettres en bleu indiquent les substitutions de base.

Adaptée de Noveroske et al. 2000; Nay and O'Connor 2013

Le spectre de mutation de l'ENU est organisme dépendant : chez la souris, les mutations les plus fréquemment rapportées sont les transitions AT-à-TA ou les transversions AT-à-GC : 44% de transversions de A/T à T/A, 38% de transitions de A/T à G/C, 8% de transitions de G/C à A/T, 5 % de transitions de A/T à C/G 3% de transversions de G/C à C/G, et 2% de transitions de G/C à T/A. Lorsqu'ils sont traduits en un produit protéique, ces changements conduisent à 64% de mutations faux-sens, 26% d'erreurs d'épissage, et 10% de mutations non-sens. Contrairement à l'approche « ciblage de gène » (Knock-Out), le fait que l'ENU induise des mutations ponctuelles signifie qu'il ne génère pas seulement des mutations nulles (aucune protéine fonctionnelle produite- allèle amorphe) mais aussi de nombreux types d'allèles d'un même gène (série allélique) et ainsi des protéines et phénotypes différents, allèles hypomorphes (faible quantité ou perte de fonction partielle du produit du gène), antimorphes ou dominant négatif (fonction antagoniste du produit muté comparé au produit sauvage), néomorphes (le produit muté est fonctionnellement différent du sauvage ou bien il est équivalent au produit sauvage mais il est délivré au mauvais moment au cours du développement ou au mauvais endroit) et hypermorphes ou gain de fonction (le produit du gène muté est synthétisé en plus grande quantité ou il est plus actif) (Justice et al. 1999; Noveroske et al. 2000; Cordes 2005; Takahasi et al. 2007). Ces séries alléliques peuvent fournir beaucoup plus d'informations sur la fonction d'un gène qu'un simple KO induisant une inactivation de la protéine (Davis and Justice 1998; Horner and Caspary 2011) .

En raison de la difficulté de l'identification des loci mutés à la suite d'un changement d'une base unique par l'ENU, ce dernier a peiné à s'imposer, malgré la démonstration très claire de son efficacité. La technique a été maintenue et appliquée dans les années 1990 dans un nombre limité de laboratoires. Puis, le développement des outils d'analyse génomique a permis de poursuivre le clonage positionnel des loci mutants induits par l'ENU, et ainsi, d'obtenir une plus grande appréciation de l'utilité potentielle de cette approche d'analyse classique de la biologie de la souris (Stottmann and Beier 2010). Plusieurs cribles ENU à grande échelle ont été menés dans le monde entier (Hrabé de Angelis et al. 2000; Nolan et al. 2000; Nelms and Goodnow 2001; Clark et al. 2004; Hoyne and Goodnow 2006). Ces programmes ont été fondés sur la forte conviction que la production systématique de mutations dans presque tous les gènes de la souris était faisable, ce qui induirait des retombées scientifiques inestimables, non seulement pour les généticiens de la souris, mais aussi pour les communautés scientifiques et médicales.

Actuellement, la nouvelle génération de séquençage (NGS), appelée aussi le séquençage très haut débit aide à surmonter les contraintes de temps et de travail laborieux pour affiner l'intervalle contenant la mutation causale, l'analyse de liaison et la détection de la mutation (Beckers et al. 2009; Caruana et al. 2013; Simon et al. 2015).

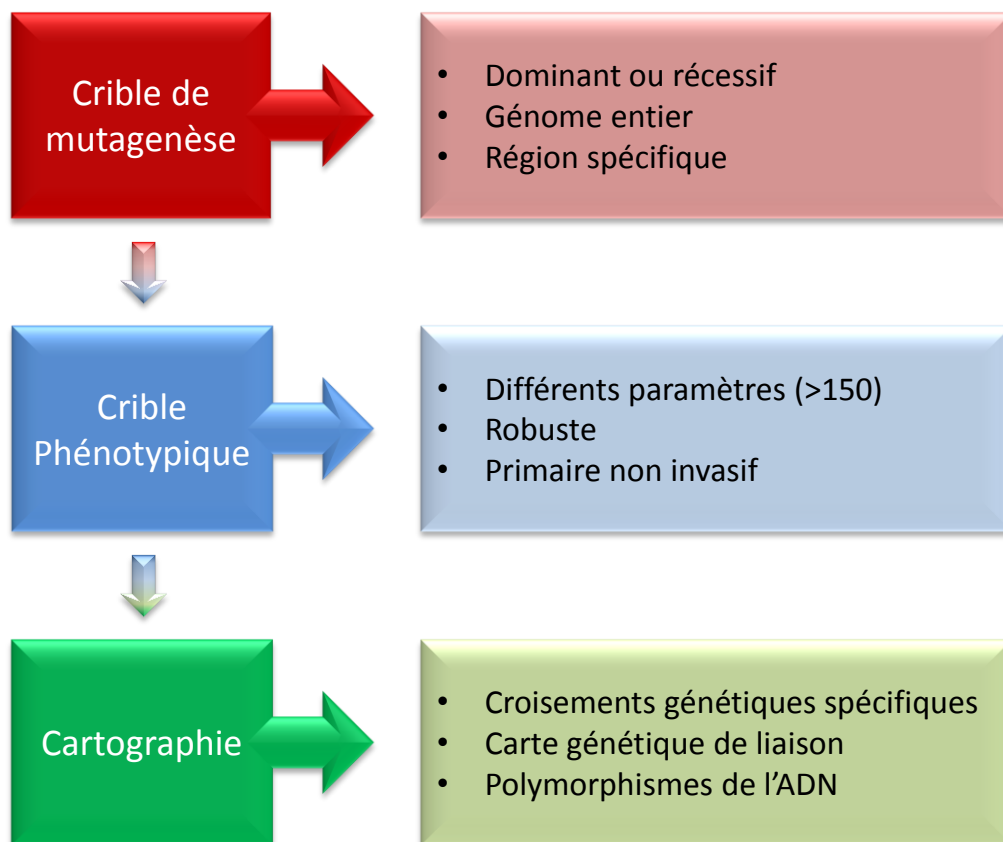
### *Effet-dose de l'ENU sur des souris mâles traitées*

Les spermatogonies mutées, qui survivent au traitement à l'ENU, colonisent les testicules et subissent des mitoses et méioses dans les tubules séminifères, donnant finalement naissance à des clones de spermatozoïdes mutés. Le taux de mutations observé dépend de la fréquence et de la dose d'ENU administrée, du fond génétique des souris traitées, ainsi que du type de crible génétique utilisé pour identifier les mutations. Les doses optimales ont déjà été déterminées pour un certain nombre de souches de souris consanguines. En général, 250 à 300 mg d'ENU par kg de poids corporel sont administrés en série de trois doses à un intervalle d'une semaine - car une série maximise l'effet mutagène et minimise la létalité des animaux - ou, moins fréquemment, une dose unique de 150 à 200 mg/kg. Une dose supérieure à 450 mg/kg est létale (Weber et al. 2000; Justice et al. 2000).

Jusqu'à présent, de nombreuses souches de souris ont pu être utilisées dans les expériences de mutagenèse ENU, bien que certaines souches survivent au traitement nettement mieux que d'autres. Les trois souches A/J, BALB/CJ et C57BL/6J sont capables de tolérer des doses élevées, jusqu'à 300 mg/kg de poids corporel, et sont fortement recommandées pour les études de mutagenèse. En effet, ces trois souches sont susceptibles de générer rapidement un nombre important de descendants mutés (Weber et al. 2000) avant que les souris traitées à l'ENU décèdent. Il faut noter que les mâles ayant subi la mutagenèse par ENU auront une durée de vie réduite suite aux complications engendrées par des mutations somatiques induites par l'agent mutagène et qui apparaissent après 4-8 mois environ (durée pouvant varier selon les souches de souris). Parmi celles-ci, les souris traitées présentent des cancers ou une sensibilité accrue aux agents pathogènes (Caspary 2010; Probst and Justice 2010; Horner and Caspary 2011). L'efficacité de la mutagenèse *in vivo* est estimée par la période de stérilité qui suit le traitement à l'ENU et qui dure entre 8 et 12 semaines (Caspary 2010). L'absence de cette période de stérilité témoigne d'un problème expérimental.

## *La conception des cribles ENU*

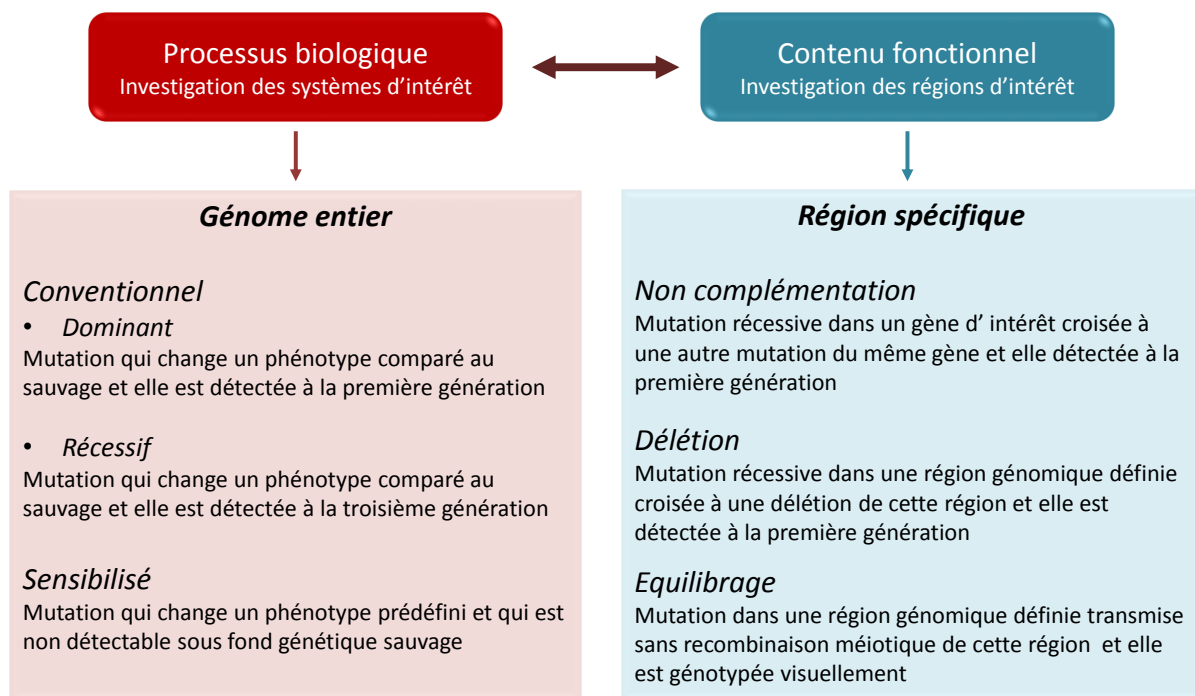
La mutagenèse chimique par ENU est une approche résolument fonctionnelle. Du fait qu'elle produit des mutations de façon aléatoire, on ne connaît pas par avance le gène muté mais la corrélation entre le phénotype observé et le gène impliqué lorsque celui-ci a été identifié permet d'élucider la fonction de ce gène si elle n'a pas encore été décrite ou bien d'approfondir nos connaissances fonctionnelles, voire de découvrir de nouvelles fonctions, pour un gène déjà connu. Cette approche systématique est basée sur le criblage simultané d'un grand nombre de souris au travers de cribles phénotypiques spécifiques, hiérarchisés et non-invasifs (Soewarto et al. 2003). L'identification du gène et de la mutation causale responsable du phénotype sont réalisés par un travail de cartographie génique en utilisant une série de marqueurs polymorphes. Un crible de mutagenèse à l'ENU comprend donc trois étapes : le crible de mutagenèse proprement dit, le crible phénotypique et la cartographie (figure 5).



**Figure 5. Etapes d'un crible de mutagenèse à l'ENU**



Après le regain de la fertilité suite au traitement ENU, les premiers croisements ont un double objectif : (1) la propagation des mutations de sorte qu'elles puissent être criblées et (2) l'initiation de la cartographie. Le schéma du croisement exact dépend du type de mutations (dominantes ou récessives) pour lesquelles le crible est effectué et du besoin d'incorporer ou non des lignées spécifiques pour sensibiliser le fond génétique et permettre ainsi d'observer un phénotype marqué. En fonction des objectifs du laboratoire, cela peut être réalisé soit par des cribles de régions spécifiques souvent utilisés pour générer des séries alléliques ou lors de l'examen du contenu fonctionnel d'un intervalle génomique particulier ; soit, par des cribles de l'ensemble du génome, favorisés lorsque l'objectif est de comprendre la régulation génétique d'un processus biologique spécifique (figure 6).



**Figure 6. Classification des cribles génétiques**

*Les stratégies actuelles peuvent être regroupées en fonction de leur orientation génomique : spécifique à une région ou de l'ensemble du génome. Au sein de ces grandes catégories, il existe plusieurs approches pour l'identification de nouvelles mutations. En général, les cribles spécifiques à une région sont conçus pour examiner le contenu fonctionnel d'un segment génomique, alors que les stratégies de l'ensemble du génome sont mieux adaptées à la dissection d'un processus biologique spécifique. Dans certains cas, un crible spécifique à une région pourrait être une méthode plus appropriée pour l'identification de mutations qui affectent un processus particulier - par exemple, le développement - dans laquelle un grand nombre de gènes ont des rôles essentiels. Une approche spécifique à une région, bien qu'elle puisse réduire le nombre de mutations potentielles qui pourraient être identifiées, elle peut augmenter considérablement la facilité avec laquelle le crible est réalisé ce qui permet de maintenir les mutations. Adaptée de Kile and Hilton, 2005*

D'autres critères doivent aussi être pris en compte lors de la conception du crible. Sur le plan pratique, (1) le crible lui-même doit être suffisamment simple et reproductible pour permettre une "uniformité répétitive", ce qui signifie que les différents intervenants du laboratoire doivent être en mesure d'effectuer le même test sur différentes lignées en suivant un protocole standardisé. La détection d'un phénotype doit aussi suivre des règles rigoureuses et définies pour tous les intervenants. D'autre part, (2) la viabilité et la fertilité des mutants déterminent la façon d'établir la lignée pour pouvoir récupérer la mutation d'intérêt. Si les mutants sont non viables ou stériles, les parents doivent être croisés pour propager la mutation afin qu'elle soit récupérée, soit en épargnant les souris susceptibles de porter la mutation, soit en préservant les gamètes des souris destinées à être criblées. Et finalement, (3) le phénotype d'intérêt doit être robuste, ce qui signifie qu'il ne peut pas être dans l'intervalle de variation normal observé chez les animaux sauvages. Les phénotypes qui n'atteignent pas un tel seuil mèneront à des faux positifs. D'autre part, plus le nombre d'animaux contrôles examinés est important et meilleure est la compréhension de la variation phénotypique. La robustesse du phénotype est particulièrement importante, elle oriente (4) le choix du fond génétique des souris subissant la mutagenèse, elle permet d'établir le crible et d'identifier les animaux utilisés dans les croisements type « backcross » ou « intercross » pour lancer la cartographie. Cette dernière a pour objectif d'identifier la région dans laquelle la mutation doit être située, en se basant sur les polymorphismes entre les deux souches utilisées. Ainsi, la souche utilisée pour la cartographie doit être choisie afin de maximiser la divergence génotypique tout en minimisant la variation phénotypique. (5) Le coût peut également influencer le choix de phénotype à analyser. Tout crible pouvant être effectué avant le sevrage des descendants réduit considérablement les coûts. Il apparaît particulièrement intéressant de rechercher des marqueurs permettant de prévoir les phénotypes adultes; ainsi, le crible peut être initié par la sélection des anomalies du marqueur, puis le criblage des lignées pour le phénotype d'intérêt uniquement (Kile and Hilton 2005; Caspary 2010).

Un aperçu des différents types du crible génome entier est développé ci-dessous.

### *i. Le crible génome entier classique*

L'histoire de la génétique illustre l'importance des mutations dans l'étude des voies de signalisation spécifiques, ainsi que celle des processus biologiques d'une grande complexité. Pour les chercheurs qui se sont intéressés aux processus biologiques spécifiques, les cribles à

l'échelle du génome représentent l'approche la plus efficace pour l'isolement de nouvelles mutations. L'argument avancé par les chercheurs en faveur de l'utilisation de ce type de crible est aussi simple qu'il est convaincant : « *si nous nous intéressons à des gènes contrôlant un processus donné, pourquoi restreindre nos recherches à une partie du génome?!* »

Les stratégies générales pour un criblage classique génome entier sont bien établies pour détecter les phénotypes dominants et récessifs.

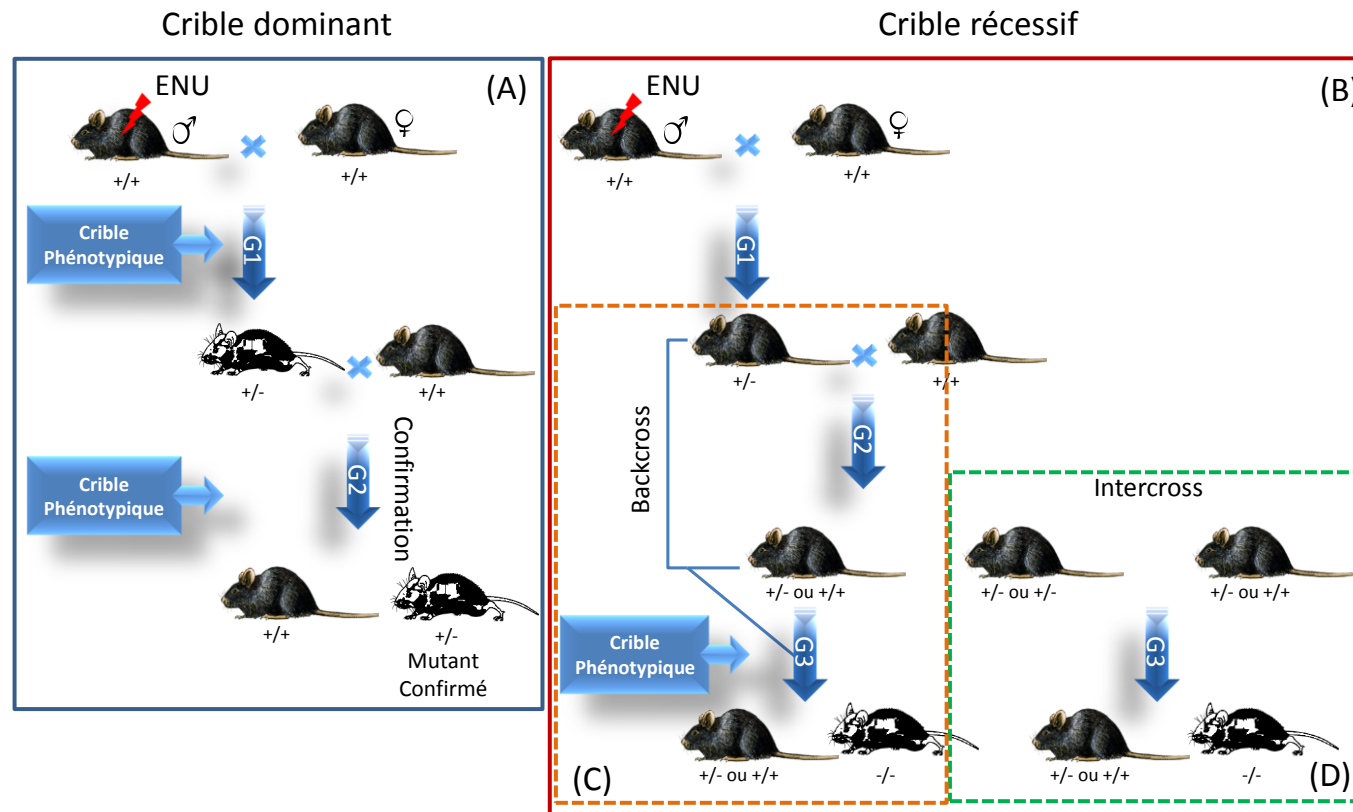
### ***Le crible dominant***

L'élaboration de ces cribles génétiques dominants est simple. Les mâles (G0) traités par l'ENU sont croisés avec des femelles normales, et par la suite, les descendants G1 sont analysés pour les phénotypes d'intérêt (figure 7 A). Un mâle G1 est considéré comme porteur d'une mutation si plusieurs petits dans une portée et dans plusieurs portées suivantes montrent le même phénotype (mutant confirmé) (Hrabé de Angelis et al. 2000; Nolan et al. 2000). Dans ce type de crible, 0,1 à 2% des animaux sont censés présenter un phénotype transmissible.

### ***Le crible récessif***

Partout dans le monde, de nombreux laboratoires ont mené des cribles dominants à haut débit mais peu travaillent sur les cribles récessifs. En effet, la gestion à grande échelle des cribles récessifs est une tâche logistique plus complexe qui nécessite d'avantage d'espace d'élevage de souris, du personnel et de moyens financiers. Néanmoins, quelques centres travaillent activement à l'établissement des cribles récessifs.

Pour le dépistage de mutations récessives, deux programmes d'élevage sont les plus couramment utilisés (Figure 7 B, C). Dans le (1) premier, chaque mâle G1 est utilisé pour créer un pedigree sur trois générations, dans lequel il est accouplé avec trois à six des descendants femelles (G2) (rétrocroisement ou backcross). Les descendances de chaque femelle G2 doivent être analysées afin d'assurer 80% d'efficacité du "balayage du génome."



**Figure 7. Représentation de cribles conventionnels pour l'isolement de mutations dominantes et récessives induites par l'ENU**

(A) Dans un crible autosomal dominant, une souris mâle est mutée avec l'ENU et est croisée à une souris femelle sauvage (la génération G0). Pour chaque souris, les génotypes sont indiqués sous l'animal. Une mutation de la lignée germinale chez le mâle muté est hétérozygote. Si cette mutation conduit à un phénotype dominant autosomal (dans cet exemple, un pelage de couleur noire et blanche), il peut être détecté, suite à un crible phénotypique, dans la progéniture de G0 (la génération G1). (B) Un crible autosomal récessif nécessite plus de croisement. Les souris G1 seront hétérozygotes pour des mutations induites par l'ENU et ne montreront pas de phéno-variation. Ainsi, des souris G1 seront croisées par à des souris sauvages pour produire des souris G2. La moitié des souris G2 aura hérité de la mutation induite dans la souris G1. Les souris G3 peuvent être produites de plusieurs façons, soit par backcross G1xG2(C), soit par intercross G2xG2 (D). Les souris G3 résultantes seront examinées pour le phénotype d'intérêt.

L'avantage de cette approche est que le génotype du mâle G1 reste « fixe » au cours du crible initial. Ici, dans une portée donnée, le quart présentera le phénotype d'intérêt, tandis que les descendances des femelles non-porteuses de la mutation ne présenteront pas du tout le déficit. Une stratégie alternative (2) implique un croisement « frère-sœur » (ou intercross) de la descendance G2. Dans ce cas, seulement le 1/16 de la descendance G3 montre le phénotype d'intérêt, et un plus grand nombre de cages d'accouplement doit être maintenu (Kile and Hilton 2005; Cordes 2005). Ces cribles ont été très utiles pour analyser les gènes et les voies de signalisation impliquées dans le développement embryonnaire (Herron et al. 2002; Fernandez et al. 2009).

## *ii. Le crible génome entier sensibilisé*

Un crible sensibilisé utilise un fond génétique modifié pour permettre la récupération des mutations qui seraient indétectables en utilisant des organismes de type sauvage. Dans de nombreux systèmes biologiques, la production d'un phénotype observable nécessite une réduction de plus de 50% de l'activité de ses composants clés; autrement dit, les gènes impliqués sont haplo-suffisants (ils ont la capacité de produire en quantité suffisante la protéine normale malgré la présence de l'allèle muté permettant le bon fonctionnement du gène concerné). Il en résulte que même des mutations entraînant une perte complète de la fonction ne seront pas détectées dans un crible dominant aléatoire, et nécessitent l'établissement d'un crible récessif plus long et coûteux pour les détecter. Il en est de même quand il existe une redondance, où plusieurs gènes homologues sont capables de remplir le même rôle biochimique ou bien lorsque deux voies biochimiques non homologues contribuent au même résultat biologique. Ainsi, la réduction de l'activité de l'un des homologues ou de l'une des voies biologiques avant de débiter le crible pour d'autres composants peut augmenter sa sensibilité (Kile and Hilton 2005). Le crible sensibilisé permet aussi de récupérer de nouveaux gènes qui suppriment ou augmentent un phénotype d'intérêt (un crible sensibilisé modificateur). Ces cribles sont effectués quand au moins un gène est connu pour être nécessaire à un processus biologique d'intérêt, le but étant de découvrir d'autres gènes impliqués dans la même voie ou le même processus.

Les cribles sensibilisés ne démarrant pas avec des souris sauvages G0 mais avec des souris ayant un phénotype préexistant ont l'avantage de permettre la découverte de nouveaux acteurs de voie de signalisation jusqu'alors inconnus ou de nouvelles voies de signalisation

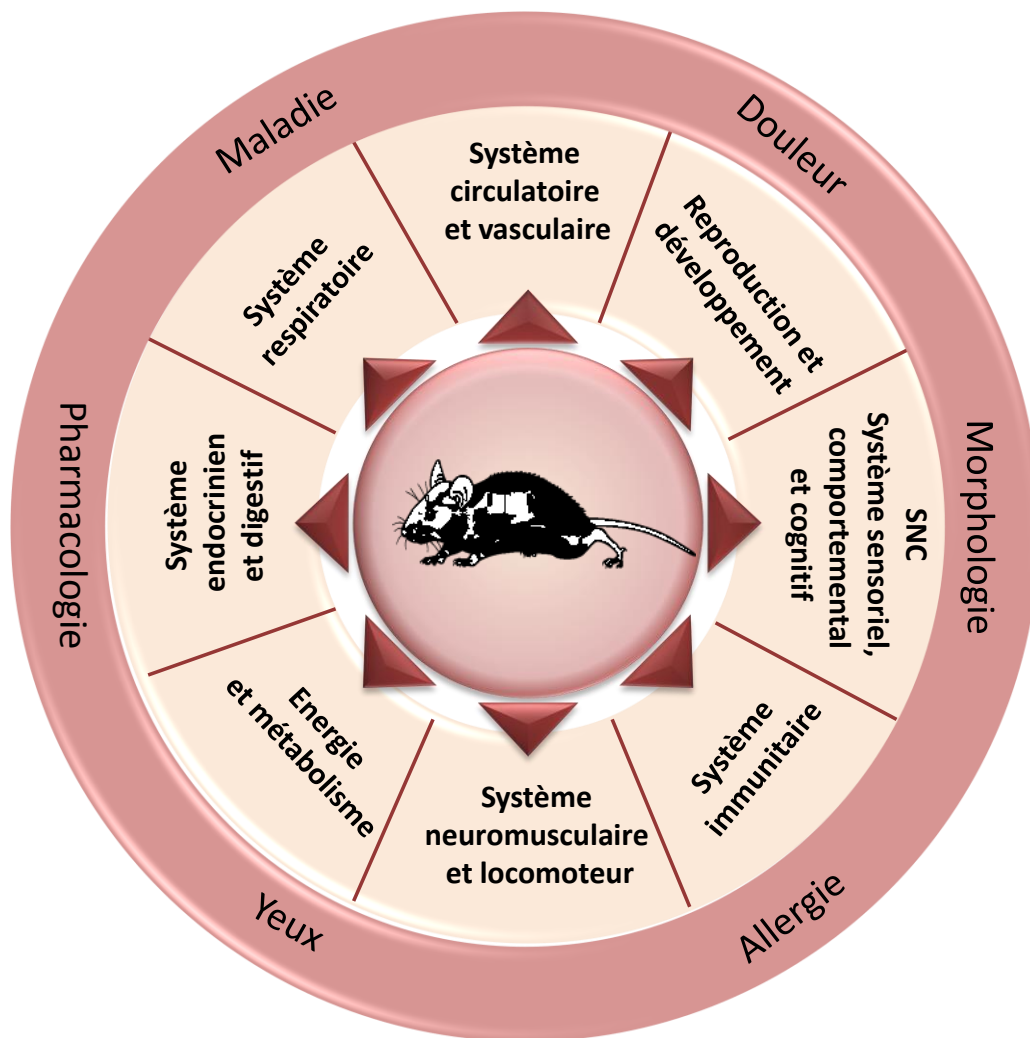
régulant un processus donné, de révéler de nouvelles interactions génétiques, et enfin d'identifier de nouvelles cibles médicamenteuses (Curtis 2004; Blewitt et al. 2005; Kile and Hilton 2005; Kauppi et al. 2008; Horner and Caspary 2011; Buchovecky et al. 2013).

La sensibilisation peut être produite non seulement par le biais d'un fond génétique spécifique mais aussi par des « challenges » environnementaux ou pharmaceutiques, comme soumettre les souris à des concentrations élevées de sels pour détecter la susceptibilité à l'hypertension, ou chercher les conditions environnementales qui conduisent au développement de la maladie d'Alzheimer chez des souris présentant une mutation génétique de prédisposition (Cordes 2005).

### *Les analyses phénotypiques des souris mutées*

Les souris générées par mutagenèse classique ou reverse doivent être soumises à un crible phénotypique afin de déceler l'effet de la mutation induite et donc la fonction du gène muté. Ainsi, une batterie de tests, parfois appelée un « pipeline d'analyses phénotypiques », composée d'une série d'essais analytiques, est exécutée dans un ordre et à un âge spécifique. Le « pipeline » a pour but de maximiser la quantité d'informations utiles provenant du même échantillon de souris testées. La composition en tests phénotypiques d'un « pipeline » doit viser à analyser autant de domaines biologiques (physiologiques, anatomiques, développementaux, comportementaux et cognitifs) et thérapeutiques (les médicaments et leurs effets secondaires) aussi différents que possible (figure 8) conservant une puissance statistique suffisante pour limiter le nombre de résultats faux positifs ou négatifs. Différents centres (appelés aussi « clinique de la souris ») mènent divers « pipelines » et les centres spécialisés dans un « pipeline » évoluent selon le nombre et l'apparition de nouveaux essais (Ramírez-Solis et al. 2012).

Les souris sont soumises tout d'abord à une batterie de tests primaires afin de déterminer le phénotype d'intérêt, puis ensuite à des tests plus sophistiqués, spécifiques et adaptés au domaine d'intérêt. Les tests du crible phénotypique primaire doivent bien sûr être efficaces, faciles à mettre en place, non invasifs, et applicables pour pouvoir analyser un grand nombre de souris.



**Figure 8. Exemples de domaines biologiques étudiés pour l'analyse phénotypique de souris mutées**

*SNC : Système nerveux central*



## *L'identification du gène muté*

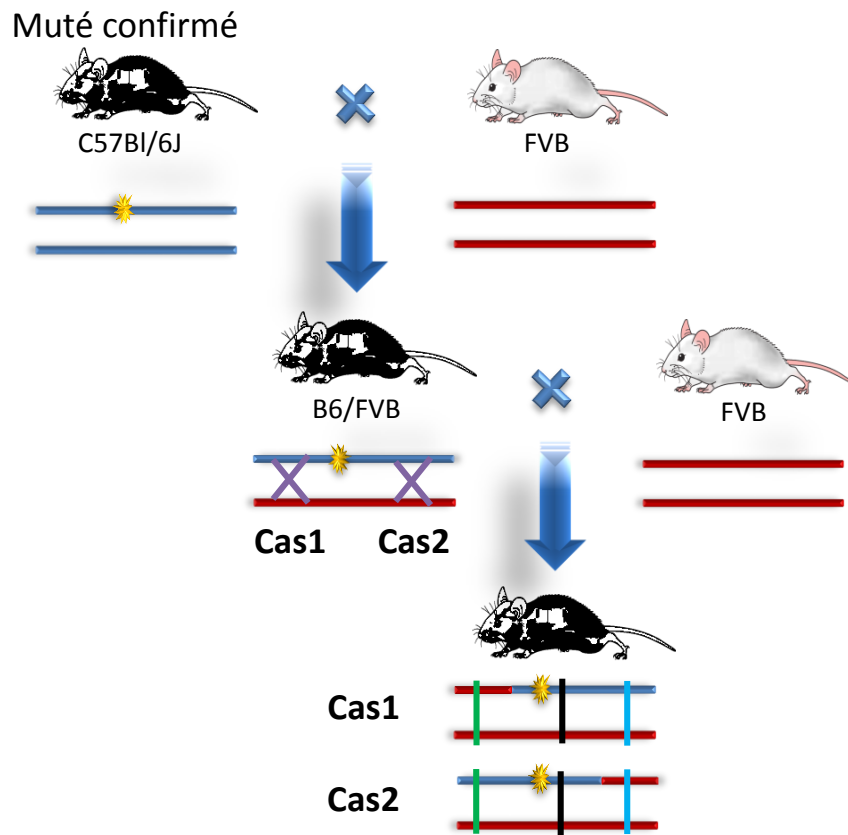
Après avoir sélectionné les souris phéno-variantes et vérifié la stabilité du phénotype dans leurs descendances, la mutation causale est recherchée, traditionnellement, par trois étapes principales : la cartographie des recombinaisons pour affiner l'intervalle génomique dans lequel la mutation existe, le séquençage des gènes candidats dans cet intervalle génomique, et la confirmation qu'une mutation particulière est en effet responsable du phénotype observé.

Pour lancer la cartographie (figure 9), les souris phéno-variantes issues du crible doivent être croisées avec des souris de fond génétique différent si le crible est établi en utilisant des souris G0 de fond génétique identique, sinon on utilise des souris du même fond génétique déjà utilisées pour identifier les phéno-variants afin de maintenir la lignée hybride. Des recombinaisons méiotiques sont possible lors du deuxième croisement ce qui permet de cartographier la mutation en se basant sur la liaison génétique entre la mutation et les marqueurs polymorphes (microsatellites et SNPs) entre les deux souches choisies. Les microsatellites (MITs) sont des répétitions de bases en tandem dont le nombre de répétitions peut varier selon la souche consanguine ; les SNPs (Single Nucleotide Polymorphism ou polymorphisme nucléotidique) sont des variations d'une seule paire de bases qui peuvent aussi varier selon la souche consanguine. Ces marqueurs permettent de balayer le génome et repérer un chromosome d'intérêt où la mutation peut être localisée.

Après l'identification de la région d'intérêt, le nombre de marqueurs est augmenté polymorphes pour affiner l'intervalle et sélectionner si possible des gènes candidats, dont la littérature montre un lien au phénotype aberrant observé. Ces gènes seront séquencés afin de rechercher la mutation causale. Ceci représentait auparavant un processus laborieux qui pouvait prendre des années mais le séquençage du génome de la souris, la disponibilité des panels de SNP et la baisse du coût du séquençage de l'ADN ont permis d'accélérer l'identification des mutations sur une période de plusieurs semaines à plusieurs mois de recherche ciblée. Dans l'hypothèse où il n'existe pas de gènes candidats, il est nécessaire de réduire au maximum l'intervalle d'intérêt en augmentant considérablement le nombre d'animaux et de marqueurs polymorphes.



Actuellement, avec le NGS, le séquençage gène par gène a été remplacé par le séquençage de tous les exons de la région d'intervalle, voire même celui du génome entier à la recherche de la mutation d'intérêt, et ainsi éviter l'étape de la cartographie.



**Figure 9. Représentation schématique du principe de cartographie d'une mutation dominante**

Les souris de souche consanguine C57Bl/6J (B6), par exemple, sont soumises à une mutagenèse, et croisées à la même souche consanguine B6 (voir la figure 7). Les souris phéno-variantes sont ensuite croisées avec des souris d'une autre souche (couleur blanche) consanguine FVB, par exemple, pour la mise en place et le maintien de lignées mutantes et pour débiter la cartographie en introduisant des polymorphismes. La descendance est de 50% B6 et 50% FVB. Les descendants phéno-variants sélectionnés sont à nouveau croisés à des souris de fond génétique FVB.

Le principe de la cartographie d'une mutation repose sur la liaison génétique entre la mutation et un marqueur donné du fond génétique B6 polymorphe entre les souches B6 et FVB. Le schéma illustre 2 événements de recombinaison méiotique (cas 1 et cas 2). Lorsque le marqueur polymorphe est loin (non lié) de la mutation recherchée, la proportion des génotypes FVB/FVB ou B6/FVB est quasi identique (environ 50%). Lorsque le marqueur polymorphe est proche (lié) de la mutation recherchée, la proportion du génotype B6/FVB est nettement supérieure au génotype FVB/FVB sachant que la mutation est créée sur le fond génétique B6. En bas de chaque souris une représentation schématique de leur chromosome, les chromosomes bleus représentent le fond génétique B6, les rouge le fond génétique FVB, l'étoile jaune correspond à la mutation induite par l'ENU, les traits en bleu, noir et vert représentent 3 marqueurs polymorphes entre les 2 souches FVB et B6.

### III. Objectifs de la thèse

Comme illustré dans les parties précédentes, la souris apparaît comme le modèle de choix dans l'étude fonctionnelle des gènes chez l'homme, mais aussi d'autres mammifères comme le bovin (Magnol et al. 2011).

Dans notre laboratoire, l'équipe du Pr. Véronique Blanquet a mis en place deux cribles indépendants ENU génome entier : un crible récessif conventionnel aléatoire et un crible dominant sensibilisé sous fond génétique  $Gdf8^{-/-}$  (Growth Differentiation Factor 8, ou myostatine MSTN). La myostatine est une protéine sécrétée qui appartient à la superfamille des TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor Beta) et elle est un régulateur majeur du développement squeletto-musculaire par l'inhibition de la prolifération et la différenciation des cellule musculaires (McPherron et al. 1997; McCroskery et al. 2003). Les souris  $Gdf8^{-/-}$  présentent une augmentation de la masse musculaire due à une hypertrophie et une hyperplasie des muscles striés, une adiposité réduite et une augmentation de la densité minérale osseuse. Un des objectifs de notre laboratoire est l'identification de nouveaux gènes impliqués dans le développement squeletto-musculaire, et qui interagissent directement ou indirectement avec la voie de signalisation de la myostatine.

*Pendant ma thèse, j'ai participé à la caractérisation phénotypique et moléculaire de modèles murins provenant de ces deux cribles : (1) les souris de la lignée vbd (surnommées souris vbd, pour 'Vestibular Balance Defect), issues du crible récessif et présentant des problèmes auditif et d'équilibre ; (2) les souris de la lignée GMA24, présentant une courte taille et une hypophosphatémie (baisse du taux du phosphore dans le sang) ; (3) les souris de la lignée GMA06, présentant une hypermusculature avec une hypercréatinémie (augmentation du taux de la créatine dans le sang). Ces deux dernières lignées qui sont issues du crible dominant sensibilisé, présentent des phénotypes plus prononcés lorsqu'elles sont maintenues sous un fond génétique  $Gdf8^{-/-}$ , démontrant ainsi une potentielle interaction entre les mutations ENU générées et la myostatine.*

L'ensemble de ces résultats est présenté dans les deux chapitres suivants.

# *Résultats*

# Résultats - Chapitre 1

---



<http://topixgallery.com/ears-listening-clipart/>

## Déficiência auditive

Etude de la lignée murine *vbd*

# Chapitre 1 : Déficience auditive

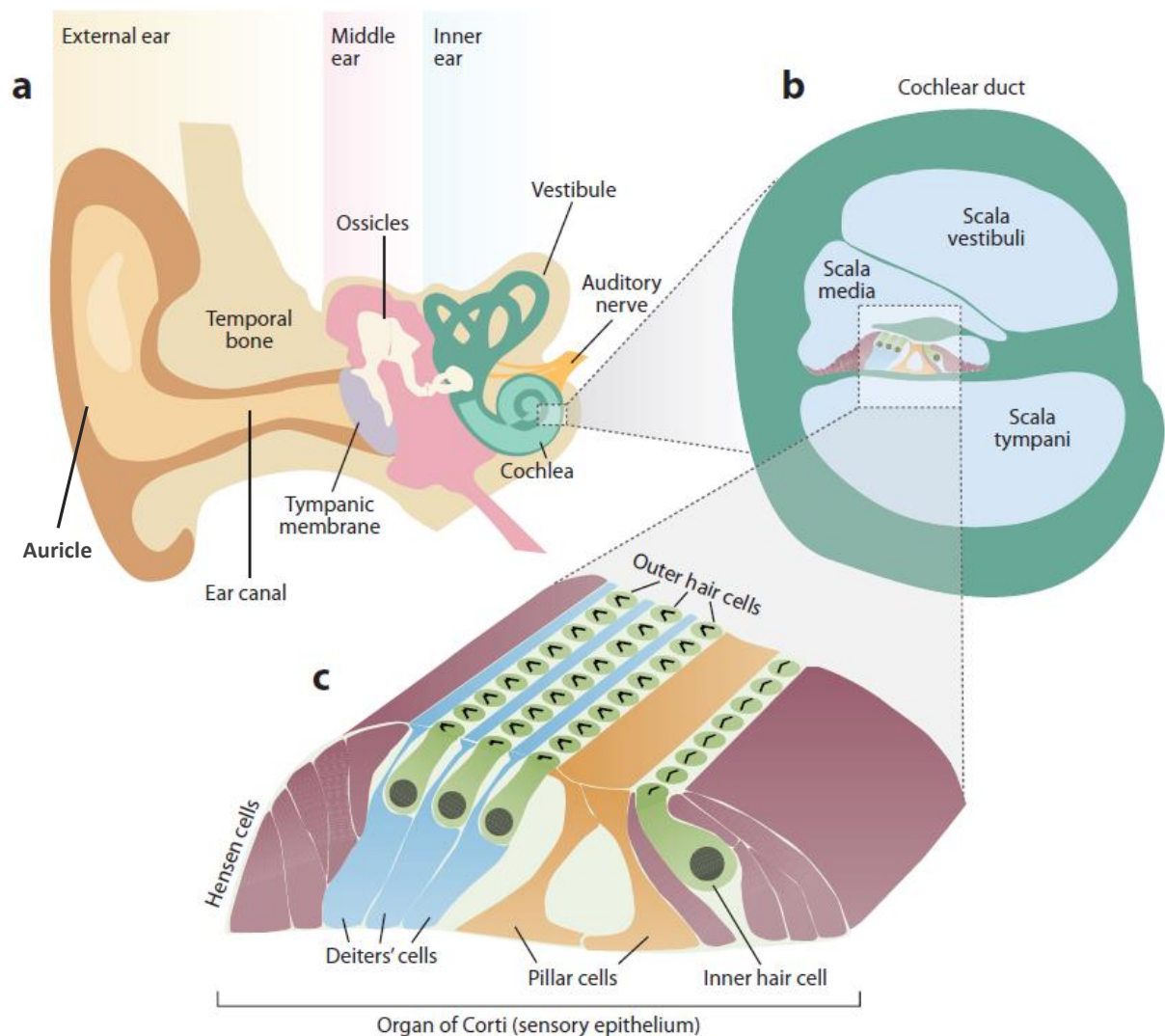
---

Le système auditif est le sens qui porte l'un des mécanismes les plus complexes chez l'homme.

## I. Anatomie de l'oreille

L'oreille est divisée en trois compartiments anatomiques: l'oreille externe, moyenne, et l'oreille interne (figure 10). Le rôle principal de l'oreille externe et de l'oreille moyenne est de conduire les ondes sonores provenant de l'environnement jusqu'à l'oreille interne. Les ondes sonores sont captées par le pavillon de l'oreille externe et menées par le canal auditif pour atteindre la membrane du tympan. L'oreille moyenne est composée de trois petits os, les osselets, qui sont assemblés ensemble et servent de lien entre le tympan et la fenêtre ovale de l'oreille interne remplie de liquide. Lors d'un stimulus sonore, les vibrations du tympan vont créer un mouvement des osselets de l'oreille moyenne, suivi de celui du fluide à l'intérieur de l'oreille interne, la partie sensorielle de l'oreille.

L'oreille interne est responsable de la transformation de l'énergie mécanique des ondes sonores en des stimuli électriques, qui seront par la suite convertis dans le cerveau. Anatomiquement, l'oreille interne est composée de deux organes, la cochlée pour l'audition et le vestibule pour l'équilibre. Les défauts dans ces deux systèmes conduisent souvent à des troubles de l'équilibre chez les personnes malentendantes (Donkelaar 2011).



**Figure 10. Représentation schématique de l'oreille**

(A) L'oreille externe est constituée du pavillon, du canal auditif externe et de la couche externe de la membrane tympanique. L'oreille moyenne est formée par la cavité du tympan, la couche interne de la membrane tympanique, et les osselets. L'oreille interne comprend le labyrinthe, une série d'espaces remplis de fluide dans la partie pétreuse de l'os temporal. La cochlée, un organe en forme d'escargot entouré par l'os temporal, est la partie auditive de l'oreille interne, tandis que le vestibule est responsable de l'équilibre. (B) une coupe à travers le conduit cochléaire illustre les compartiments (scala vestibuli, scala media et scala tympani) remplis de liquide de l'oreille interne. (C) L'organe de Corti constitue l'épithélium sensoriel, il est situé dans la scala media, avec des cellules ciliées sensorielles internes et externes entourées de cellules de soutien qui incluent les cellules de Deiters, de Hensen, et de Pillar. Adaptée de Dror and Avraham 2009

## II. Déficience auditive

La surdité (ou hypoacousie) est un terme générique désignant la diminution de l'acuité auditive. Elle présente l'un des problèmes de santé publique les plus courants et vient à la troisième place après l'arthrite et les maladies cardiaques. Elle est l'un des handicaps les plus communs, mais aussi l'un des plus mal compris et sous-estimé. Elle a été appelée la condition "invisible", car il est impossible de «voir» directement une perte auditive (HL pour Hearing Loss), mais seulement ses effets sur le comportement et la communication. (Hearing Loss Association of America ; <http://www.hearingloss.org/content/education>). En fonction de la gravité dépendante de l'intensité du son entendu, on parle de surdité :

- Légères (perte de 16 à 40 décibels ou dB chez l'enfant ou 20 à 40 dB chez l'adulte) : la parole est perçue à voix normale, difficilement à voix basse ou dans des situations bruyantes
- Moyennes (perte de 40 à 70 dB) : la parole est difficile à comprendre, la personne comprend mieux si elle regarde son interlocuteur
- Sévères (perte de 70 à 90 dB) : le handicap est important. Seuls les bruits forts et les voix proches sont perçus
- Profondes (perte de 90 à 120 dB) : la parole n'est plus du tout perçue et seuls les bruits très puissants sont entendus sans être nécessairement identifiés
- Totale (>120 dB) : pas d'audition mesurable

Les HL ont des conséquences psychiques (honte, problèmes de concentration, dépression, faible estime de soi), physiques (maux de tête, tensions musculaires, stress, hypertension artérielle) et sociales (isolement et problèmes de communication, impact négatif sur les apprentissages scolaires, le développement cognitif, problème d'adaptation sociale et d'acquisition du langage oral...), principalement chez les enfants (Troubles auditifs ; <http://www.inserm.fr>).

### *Quelques chiffres*

Environ 2 à 3 enfants sur 1000 aux États-Unis sont nés avec un niveau détectable de HL dans l'une ou les deux oreilles et plus de 90 % d'entre eux naissent de parents à audition normale (Quick Statistics ; <http://www.nidcd.nih.gov/>). En France, la surdité touche chaque

année près d'un millier de nouveau-nés avec environ 40% de surdités sévères et profondes et dont 75% sont d'origine génétique (Troubles auditifs ; <http://www.inserm.fr/>). Plus de 5% de la population mondiale - 360 millions de personnes – souffrent de déficience auditive incapacitante (328 millions d'adultes et 32 millions d'enfants), ce qui correspond à un degré de perte d'audition supérieure à 40 dB pour la meilleure oreille chez l'adulte et supérieure à 30dB pour la meilleure oreille chez l'enfant (Deafness and hearing loss ; <http://www.who.int/>). Une grande partie de la population connaîtra une perte auditive liée à l'âge ou presbyacousie, avec 30-35% des adultes âgés entre 65 et 75 présentant une HL et 40-45% des adultes ayant une déficience auditive significative à partir 75 ans (Gates and Mills 2005; Yamasoba et al. 2013).

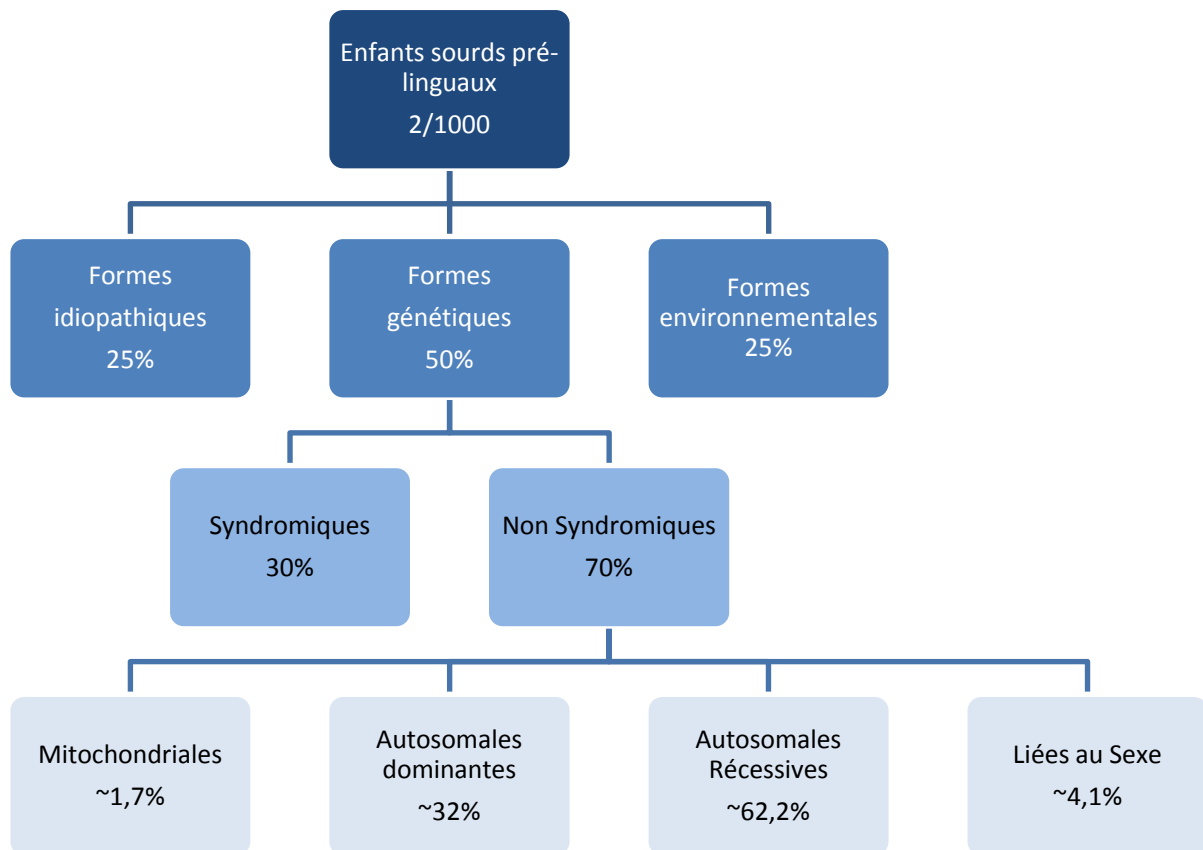
### *Types de déficiences auditives*

Deux types de déficience auditive sont communément connus basés sur la partie défectueuse de l'organe d'audition. Ils sont traditionnellement classés comme surdité de transmission ou de perception (encore appelées neurosensorielles). La surdité de transmission se réfère à des défauts de l'oreille externe ou moyenne. Une telle déficience auditive produit une surdité légère à modérée et qui est habituellement traitée avec une intervention médicale ou chirurgicale. Elle est caractérisée par une activité normale de l'oreille interne. En revanche, une surdité neurosensorielle se réfère à un problème de l'oreille interne ou durant le trajet de la voie auditive. Une telle perte d'audition donne une surdité légère à profonde et ne pourra pas être complètement résolue. Il existe également une surdité mixte; elle se définit comme une combinaison des deux types de surdité (de transmission et de perception) se produisant en même temps. Bien que la surdité de transmission puisse être traitée, celle de perception reste permanente. Quelques rares surdités ont aussi pour origine les centres auditifs cérébraux.

Une HL peut être due à des causes génétiques ou environnementales (le bruit, le cérumen excessif, le vieillissement, certains médicaments, des infections, certaines pathologies telles que le diabète) ou une combinaison des deux. La majorité des cas des HL héréditaires (HHL pour Hereditary Hearing Loss) chez l'homme sont isolées ou associées avec uniquement un dysfonctionnement vestibulaire et ainsi classées comme une HL non syndromique (NSHL pour Non Syndromic Hearing Loss); mais la HHL peut également être accompagnée d'autres anomalies (perte auditive syndromique; SHL pour Syndromic Hearing Loss). Plus de 50% des cas de NSHL sont hérités de façon autosomale récessive (figure 11).



Jusqu'à présent, plus de 80 loci ont été détectés comme cause pour une NSHL autosomale récessive, et pour 60 d'entre eux, les gènes mutés ont été identifiés (Annexe 2) (Hereditary Hearing loss Homepage ; <http://hereditaryhearingloss.org/>).



**Figure 11. Types de déficiences auditives**

*2 enfants sur 1000 présentent une surdité prélinguale. Les surdités génétiques représentent 50% des surdités congénitales. Elles peuvent être syndromiques, c'est-à-dire associées à d'autres anomalies congénitales liées à une anomalie génétique. Elles représentent 30% des surdités génétiques. Elles peuvent aussi être non-syndromiques et représentent les 70% restants. La majorité des surdités non-syndromiques ont un mode de transmission autosomique récessif (62.2%). Les mutations autosomiques dominantes ont des phénotypes cliniques plus variés avec des âges de survenue plus variables (32%). Les surdités non-génétiques ou environnementales représentent 25% des étiologies de l'enfant. Parmi elles, l'infection congénitale au cytomégalo virus (CMV), une prématurité, un séjour en réanimation néo-natale... Les surdités idiopathiques représentent 25% des étiologies de l'enfant. Leurs causes sont inconnues, elles pourraient être environnementales ou liées à des causes non-génétiques comme des toxines.*

## *Avantages des modèles murins pour étudier les déficiences auditives*

L'étude de la HHL de perception chez l'homme est limitée à cause de l'incapacité de suivre le développement de l'oreille interne et l'absence de signes cliniques caractéristiques de personnes sourdes. L'analyse de liaison génétique de la HHL chez l'homme est possible seulement dans les grandes familles qui contiennent plusieurs membres ayant des problèmes auditifs. La recherche du gène responsable de la HHL chez les patients peut être plus compliquée que l'analyse d'autres caractères héréditaires. Dès lors, les personnes malentendantes de familles différentes ont tendance à se marier entre eux. De plus, les mariages entre enfants entendants ayant des parents sourds et malentendants ne sont également pas rares. En conséquence, une famille peut porter deux ou plusieurs mutations liées à la surdité (Ahituv and Avraham 2000; Petit 2006). En raison de l'absence d'une lignée cellulaire humaine satisfaisante avec des caractéristiques similaires au développement de l'oreille interne, il n'y a que les cultures primaires ou les modèles animaux, la souris en particulier, qui peuvent être utilisés pour étudier les interactions entre les protéines exprimées dans l'oreille interne, leurs configurations spatiales, leurs expressions temporelles, leur fonctions et pour toute autre étude biologique (Friedman et al. 2007). Cependant, les différentes étapes du processus pathologique sont sans doute analysées d'une façon plus appropriée dans un modèle *in vivo*. Ainsi le modèle murin fournit un outil précieux pour l'étude des mécanismes auditifs.

La plupart des informations concernant la fonction des protéines dans l'audition proviennent de l'étude de modèles murins portant sur des altérations dans les gènes codant pour ces protéines. Ces modèles sont été obtenus à partir de mutations spontanées, chimiques, radio-induites, ainsi que des mutations produites en utilisant des techniques de *ciblage de gène* (Ahituv and Avraham 2000; Friedman et al. 2007; Kikkawa et al. 2012).

En particulier, une mutagenèse induite par l'ENU est un outil puissant pour générer de nouveaux mutants de souris afin d'étudier les déficiences auditives (Brown et al. 2008, <https://www.har.mrc.ac.uk/research/lifetime-studies/genetics-and-pathobiology-deafness>). En effet, dans la plupart des cas de HHL, une seule mutation dans un seul gène est responsable de HL. De plus, différentes mutations dans le même gène peuvent conduire à la fois à la NSHL et à la SHL (Syndromic Hearing Loss) ainsi que les âges de survenue de la pathologie qui

peuvent varier de la naissance à la vieillesse (<http://hereditaryhearingloss.org>, Friedman and Griffith 2003; Friedman et al. 2007).

### **III. Publication 1: la lignée *vbd***

## **A new Otogelin ENU mouse model for autosomal-recessive nonsyndromic moderate hearing impairment**

Carole El Hakam Kamareddin, Laetitia Magnol and Veronique Blanquet

SpringerPlus (2015) 4:730  
DOI 10.1186/s40064-015-1537-y

RESEARCH

Open Access



# A new Otogelin ENU mouse model for autosomal-recessive nonsyndromic moderate hearing impairment

Carole El Hakam Kamareddin, Laetitia Magnol and Veronique Blanquet\* 

## Abstract

Approximately 10 % of the population worldwide suffers from hearing loss (HL) and about 60 % of persons with early onset HL have hereditary hearing loss due to genetic mutations. Highly efficient mutagenesis in mice with the chemical mutagen, ethylnitrosourea (ENU), associated with relevant phenotypic tools represents a powerful approach in producing mouse models for hearing impairment. A benefit of this strategy is to generate alleles to form a series revealing the full spectrum of gene function in vivo. It can also mimic the range of human mutations and polymorphisms for HL. In the course of a genome ENU mutagenesis program, we selected a new mouse model for hearing defect based on a dysmorphological screen. We identified by gene mapping the mutation responsible for this phenotype and characterized it at the histological level of the inner ear and evaluated the vestibule by following the recommendations of the standard operating procedures, IMPReSS. We have identified and characterized a new recessive allele of the otogelin gene, *Otog*<sup>vbd/vbd</sup>, due to a homozygous one base pair substitution at the splice donor site of intron 29. This mutation leads to a frame-shift and a premature stop codon. We observed a decrease in the amount of sensory cells in the maculae of *Otog*<sup>vbd/vbd</sup> mice as well as an apparent drastically decreased density to almost absence of the otoconial membrane. Compared to *Otog*<sup>tm1Prs</sup> and *twister*, the two other existing otogelin alleles, the detailed analysis of *Otog*<sup>vbd/vbd</sup> revealed that these mice share some common behavioural characteristics either with *Otog*<sup>tm1Prs</sup> or *twister* whereas the fine vestibular phenotype and the hearing defect are different. Our results emphasize the importance of detecting and characterizing a new allele of a gene in order to get comprehensive information about the gene function.

**Keywords:** Animal model, *N*-ethyl-*N*-nitrosourea mutagenesis, Otogelin, Vestibular balance defect, Deafness, Hearing impairment

## Background

Hearing loss is one of the most common public health issues and comes in the third place for the major physical condition after the arthritis and heart disease. About 2–3 of every 1000 children have hearing difficulties or deafness (<http://www.hearingloss.org>). Two types of hearing impairment (HI) are commonly known based on the defective part of the hearing organ. They are traditionally classified as conductive or

sensorineural HI. The conductive HI refers to defects in the outer or middle ear. Such a loss yields a mild to moderate HI and it is usually treated with either medical or surgical intervention. It also indicates a normal inner ear activity. In the other hand, sensorineural HI refers to a problem in the inner ear or along the auditory pathway; it's also known as nerve-related hearing loss. In contrast, such loss of hearing yields a mild to profound HI and could not be completely solved. There is also the mixed HI; it refers to a conductive and a sensorineural loss occurring at the same time. While the conductive component may be treated, the sensorineural one remains permanent.

\*Correspondence: veronique.blanquet@unilim.fr  
Univ. Limoges, INRA, UMR 1061, Unité de Génétique Moléculaire Animale, Faculté des Sciences et Techniques, 123, Avenue Albert Thomas, 87060 Limoges, France

Hearing loss (HL) can be due to genetic or environmental causes or a combination of both. The majority of human hereditary HL (HHL) cases are isolated or associated with only a vestibular dysfunction and so classified as non-syndromic HL (NSHL); but HHL may be also accompanied with other abnormalities (syndromic hearing loss; SHL). More than 50 % of NSHL cases are inherited in an autosomal recessive manner. So far, more than 80 loci have been described, and for 60 of these, the mutated genes have been identified (Van Camp and Smith 2015 in <http://hereditaryhearingloss.org>).

Model organisms such as the mouse whose genes, regulatory regions, and genome structure are remarkably similar to those of humans provide powerful tools to unravel the functional and evolutionary complexities of the human genome (Brown and Hardisty 2003; Oliver et al. 2007; Nguyen and Xu 2008), and so for the understanding of the molecular mechanisms of hearing. In the most of HHL cases, a single mutation in a single gene is responsible for HL. In addition, different mutations in the same gene may lead to both syndromic and non-syndromic HHL as well as different onset times which may vary from birth to old age (<http://hereditaryhearingloss.org>), these occurring human mutations could be more closely modelled by mutants identified through ENU-based screens (Nolan et al. 2002; Aigner et al. 2007). ENU (*N*-ethyl *N*-nitrosourea) is one of the most effective alkylating mutagens in mice and it is known to randomly induce single-point mutations at a rate of ~ 100-fold higher than the rate of spontaneous mutations (Justice et al. 1999; Balling 2001; Concepcion et al. 2004; Cordes 2005; Gondo 2009). Such chemical mutagenesis induces different pedigrees of mice, each one is potentially harbouring a different DNA mutation for one of many genes contained in a chromosome region which are subjected to a broad range of tests to identify the mutant phenotype (Hrabé de Angelis et al. 2000; Soewarto et al. 2003; Davisson et al. 2012). A wide genome screening based on polymorphic markers followed by DNA sequencing allows the identification of the causal mutation responsible for the detectable phenotype. Furthermore, ENU mutagenesis is particularly a valuable methodology to recover an allelic series of point mutations for any gene enabling a more acute analysis of gene function (Graw et al. 2004; Quwailid et al. 2004; Augustin et al. 2005; Sachs et al. 2007; Gondo 2009, 2010). Thus ENU with the other transgenic methods are able to create an allelic series of different types of mutations.

In this report, we describe the characterization of a new ENU mouse model for autosomal-recessive nonsyndromic hearing impairment presenting a mutation in the *Otog* gene (DFNB18B, MIM 614945). Otogelin is one of the non-collagenous N-glycosylated proteins specific to

the acellular membranes covering the six sensory epithelial patches of the inner ear (Cohen-Salmon et al. 1997). In the vestibule, *Otog* is required for the anchoring of the otoconial membrane and the cupula to the neuroepithelia. In the cochlea, *Otog* appears to be involved in organizing the fibrillar network of the tectorial membrane and it likely has a role in determining the resistance of this membrane to sound stimulation (Simmler et al. 2000a; El-Amraoui et al. 2001). We called the new allele *vbd* for vestibular balance defect. This mouse model displays a behavioural and hearing phenotype. This third allele after twister (*tw*) and *Otog*<sup>*tm1Prs*</sup> previously characterised in literature, showed partly characteristics of the two previous one. Our results highlight the importance of mutations allelic series in the functional analysis of a specific gene.

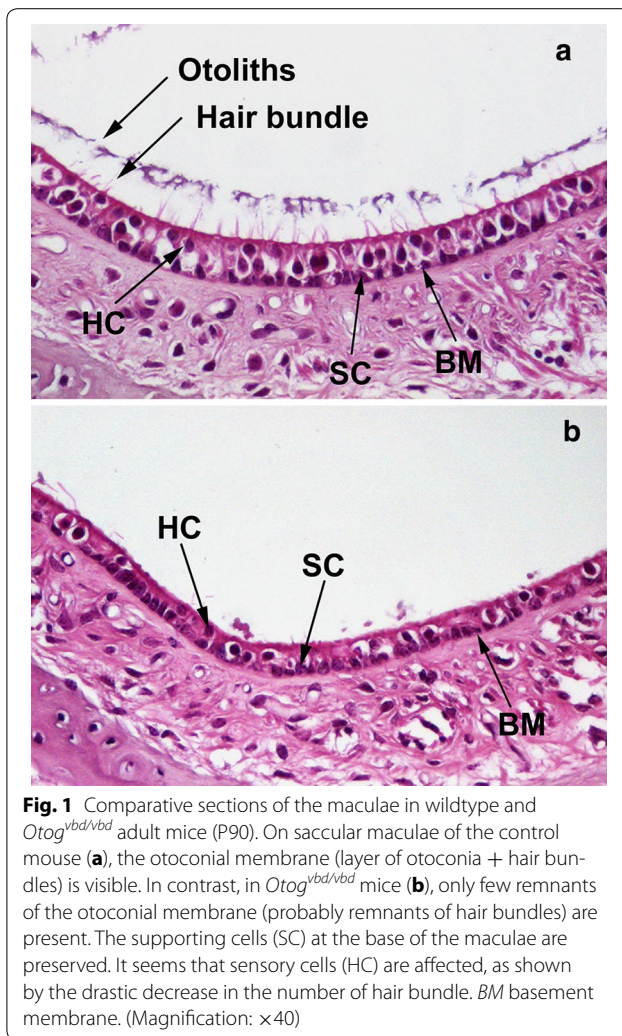
## Results

### Both vestibular and auditory functions are impaired in *Otog*<sup>*vbd/vbd*</sup> mice

Mutant offspring are clearly identifiable at 4 days of age by their uncontrolled postural response. When placed on their backs (righting reflex), *Otog*<sup>*vbd/vbd*</sup> mutants stayed supine without trying to rotate to an upright position unlike wild-type mice which recovered their posture within 10 s. After 2 weeks of age, more than 90 % of *Otog*<sup>*vbd/vbd*</sup> mice had a one side tilted head and showed an impaired balance. Balance problems were more obvious when animals were held by the tail and dropped onto a soft surface. Whereas wild-type animals always land on their feet, mutants fell on their back or on their sides. Such behaviour indicated a saccular defect (Sondag et al. 1998). Mutants showed also abnormal response for the elevated platform test. Moreover, about 10 % of *Otog*<sup>*vbd/vbd*</sup> mutants showed a circling behaviour since the post-natal day 10 (P10) that persists throughout adulthood. When tested in the swimming test, none of the mutant mice are able to swim or float properly, but they remain submerged, completely disoriented, while turning under water. They were rapidly removed from water to prevent drowning. This severe vestibular phenotype was fully penetrant. On contrary, wild-type mice came immediately to the water surface and maintained a horizontal bodyline at the surface. *Otog*<sup>*vbd/+*</sup> animals responded normally to all the tests.

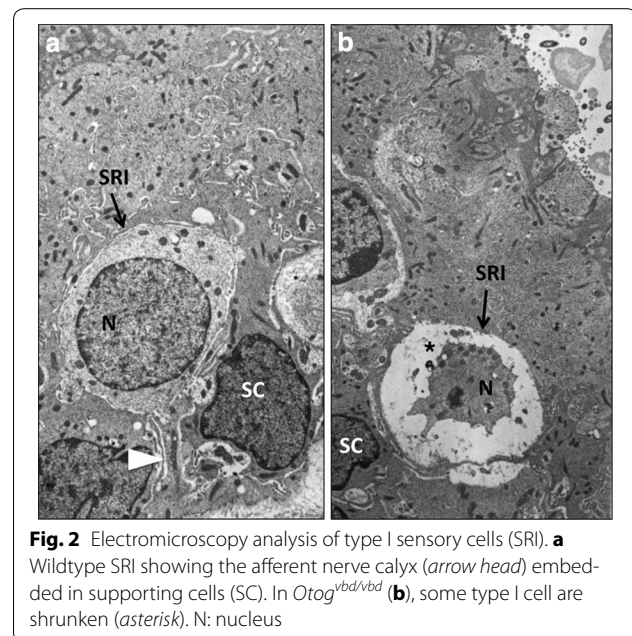
In order to a further characterization of the developmental defect induced in *Otog*<sup>*vbd/vbd*</sup> mice, histological analysis of the inner ear morphology was performed on P4 mutants and wild-type mice. Constantly, anomalies in the macula were revealed in mutants. This latter presented a drastically decreased density to almost an absence of the otoconial membrane, which recovers the macula (Fig. 1). Only very few remnants of the





membrane were visible. The stereocilia of the sensory hair cells were much less numerous, consistent with a decreased number of sensory hair cells (Fig. 1). Electronmicroscopy (EM) allowed us to confirm these data. In mutants, it was also noticeable that numerous type I hair cells of the maculae have a shrunken nucleus (Fig. 2). The biominerals themselves, otoconia, were preserved as well as the supporting cells in the expected density. In the crista ampullaris, the cupula was normally present as in the control and mutants, except in older *Otog<sup>ybd/ybd</sup>* mice (>P100) where the cupula were detached. The cochlea histological analysis of *Otog<sup>ybd/ybd</sup>* mice did not reveal any gross morphological anomaly. We observed the three normal compartments of the cochlea as well as the organ of Corti (data not shown).

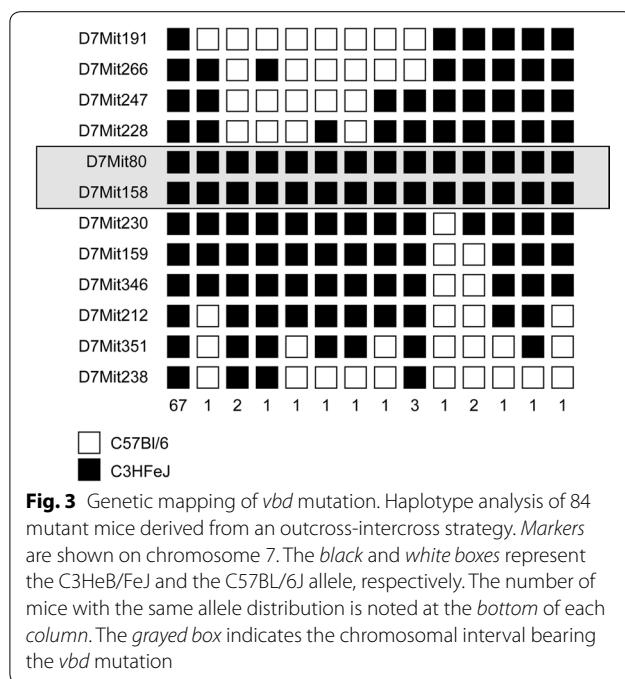
We verified the auditory function of *Otog<sup>ybd/ybd</sup>* mice compared to their wildtype littermates at various ages, ranging from 3–18 weeks by the Preyer reflex. At the weaning age, out of 20 *Otog<sup>ybd/ybd</sup>* mutants, two animals



did not react to the test, exhibiting an abnormal Preyer reflex, while a normal response was observed in the 18 remaining tested mice. All the mice were tested again between 8 and 12 weeks of age, 10 more mutants became progressively unresponsive. Finally, at 16 weeks of age, none of the mutant mice reacted anymore. All controls or heterozygous mice always exhibited a normal Preyer reflex.

#### Genetic mapping and sequencing

The *ybd* mutation was mapped by PCR based microsatellite analysis of 85 *Otog<sup>ybd/ybd</sup>* mutant mice produced by an outcross-intercross breeding strategy. Linkage was obtained with markers on mouse chromosome 7 in an interval of 16.85 cM, between the markers D7Mit266 (16.67 cM) and D7Mit159 (33.52 cM). There was no evidence of any linkage elsewhere in the genome. To further narrow the region, additional markers were used allowing us to define a critical region of 5.83 cM between markers D7Mit228 (25.61 cM) and D7Mit230 (31.44 cM) (Fig. 3). Based upon these mapping results and the known genes in this genomic region, we selected the *otogelin* gene as a good candidate gene for the *ybd* mutation. Sequence analysis of *Otog* in *Otog<sup>ybd/ybd</sup>* mutant mice revealed no change in the coding region but a T36351 > C36351 transition at the splice donor site of intron 29 (numbering from the first base of the translation codon at the genomic level) (Fig. 4a). By RT-PCR and sequencing, we showed that this splice site mutation led to an activation of a downstream cryptic splice-site within intron 29, causing an insertion of 17 bases of intron 29 sequences



into the mature RNA (Fig. 4b). This led to a frame-shift of translation inducing an addition of 16 new amino acids at the carboxyl-terminus, before an encountered in-frame stop translation codon, and truncating the otogelin protein (Fig. 4c). Genotyping all mice by sequencing has verified the mutation. This mutation was not detected in various stocks of inbred strains including C3HeB/FeJ, C57Bl/6J, 129S2, BALB/cJ and DBA/2J (data not shown). The *vbd* phenotype resulted from a recessive mutation in the *otogelin* gene giving rise to a new chemically induced allele that we named *Otog<sup>vbd/vbd</sup>*.

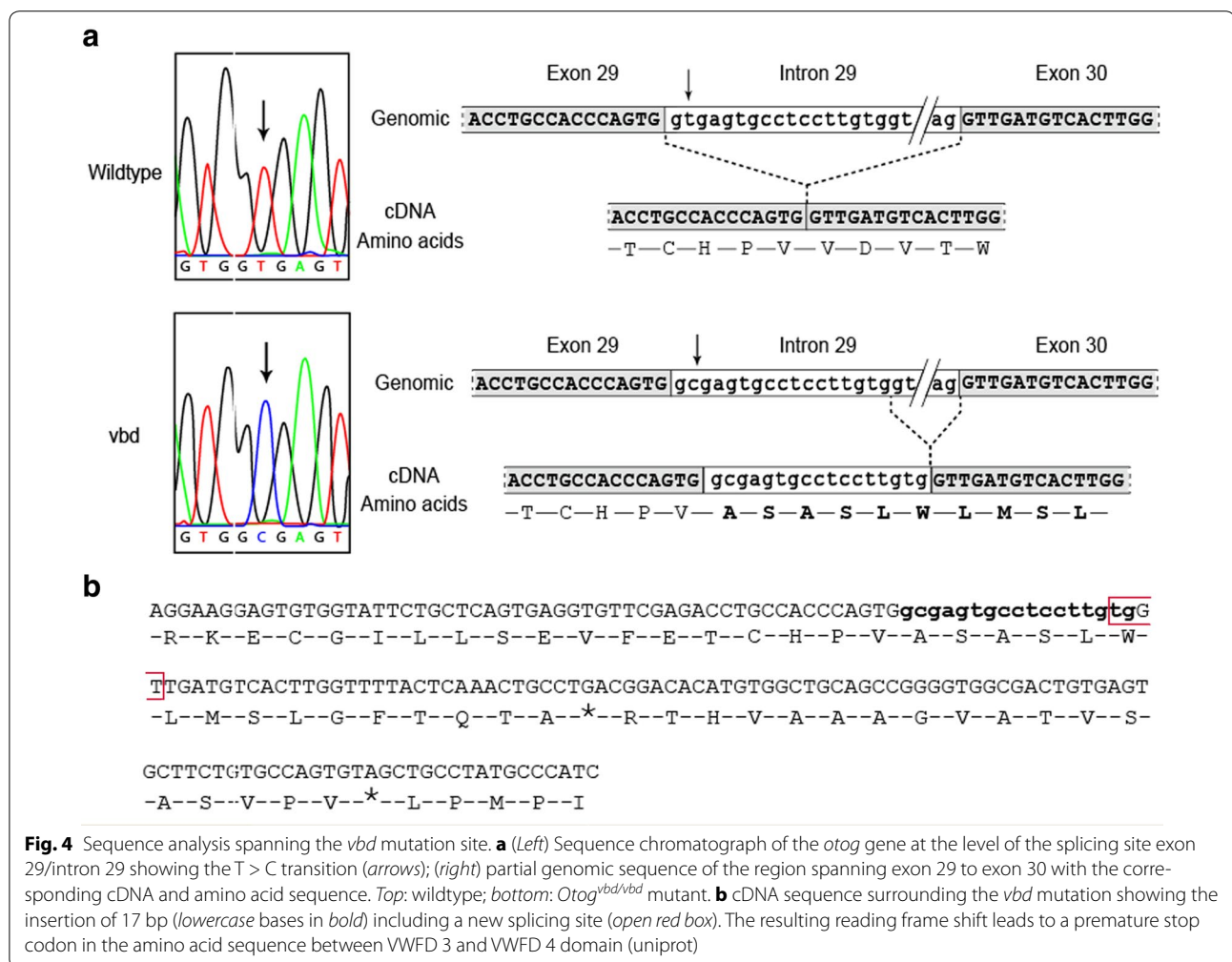
## Discussion

In this present study, we have identified and characterised a new recessive ENU-induced mutation in the otogelin gene, named *Otog<sup>vbd/vbd</sup>*, inducing a moderate hearing impairment. *Otog<sup>vbd/vbd</sup>* could be added to the two other existing otogelin alleles twister (tw) and *Otog<sup>tm1Prs</sup>*. Tw mice (B6/C3H background) have a spontaneous recessive mutation in *Otog* gene showing a discrete rearrangement within the 3' part of the *Otog* locus, between exons 38 and 44 not precisely identified leading to the absence of *Otog* transcript whereas *Otog<sup>tm1Prs</sup>* mice (129S2 background) present a null mutation with a complete gene inactivation due to the replacement of the majority of exon 1 and all of exons 2 and 3 by the lacZ gene fused in frame with the translation initiation codon of *Otog* using gene targeting (Lane 1981; Simmler et al. 2000a, b). The exact location of the three mutations is shown on Fig. 5.

Whilst some full loss of function mutations do have such a GT to GC change, it is worth noting that 0.5–1 % of introns have GC as normal splice donor. Using RT-PCR followed by electrophoresis on WT and *vbd* total RNA from inner ear to amplify the region between exon 28 and exon 30, we did not observe any normal splicing in *vbd* mice (data not shown). Protein expression was not carried out because the only antibodies available and working on Western blot are directed against the Threonine, Serine and Proline rich region TSP domain (position 1451–2036a.a) of the otogelin protein. Unfortunately, this area is absent in our *Otog<sup>vbd/vbd</sup>* mutant as well as in the *Otog<sup>tm1Prs</sup>* mice, making impossible to test the presence of a functional truncated protein in these mutants. El-Amraoui et al. (2001) have described the expression of otogelin in the cochlea and the vestibular apparatus, in all the neuroepithelial supporting cells. These acellular structures play a crucial role in the auditory and balance mechanotransduction processes.

The detailed analyses of *Otog<sup>vbd/vbd</sup>* mice reveal that they share some common behavioural characteristics either with *Otog<sup>tm1Prs</sup>* or twister mice at the same age. Firstly, the circling behaviour observed in twister mice is also present in *Otog<sup>vbd/vbd</sup>* mutants since P10 whereas it is not observed in *Otog<sup>tm1Prs</sup>* mice. Secondly, *Otog<sup>vbd/vbd</sup>* mutant mice as well as *Otog<sup>tm1Prs</sup>* animals are unable to swim properly and remain submerged unlike twister mice which do not sink. However, the three of them adopt an underwater circling behaviour. Finally, the new allele described here shows a typical waltzing behaviour, i.e. a circling and an abnormal swimming behaviour. This observation suggests a more pronounced behavioural phenotype in *Otog<sup>vbd/vbd</sup>* than in *Otog<sup>tm1Prs</sup>* and twt. For the vestibular phenotype, the three mutants show abnormal otolithic membrane morphology at P4: in twt and *Otog<sup>tm1Prs</sup>*, the otoconial membrane is present but partially or fully detached from the sensory epithelium in the saccule and the utricle (Simmler et al. 2000a, b); however, *Otog<sup>vbd/vbd</sup>* mutant show a drastically decreased density to almost absence of the otoconial membrane in the maculae. The analysis of the three mutants shows the importance of the C-terminal part of the protein in the anchoring of the otoconial membranes and the cupula to the underlying neuroepithelia in the vestibule. By their inability to swim, the *Otog<sup>vbd/vbd</sup>* and *Otog<sup>tm1Prs</sup>* mice seem to have a more severe behavioural phenotype than the twister mutant. As histological analyses do not reveal any morphological differences between *Otog<sup>vbd/vbd</sup>* and twt, in addition, as shown in Fig. 5, the region encompassing exons 30–37 is present in twt but absent in the other two mutants, thus the loss of this region could play a role in the underwater behaviour.

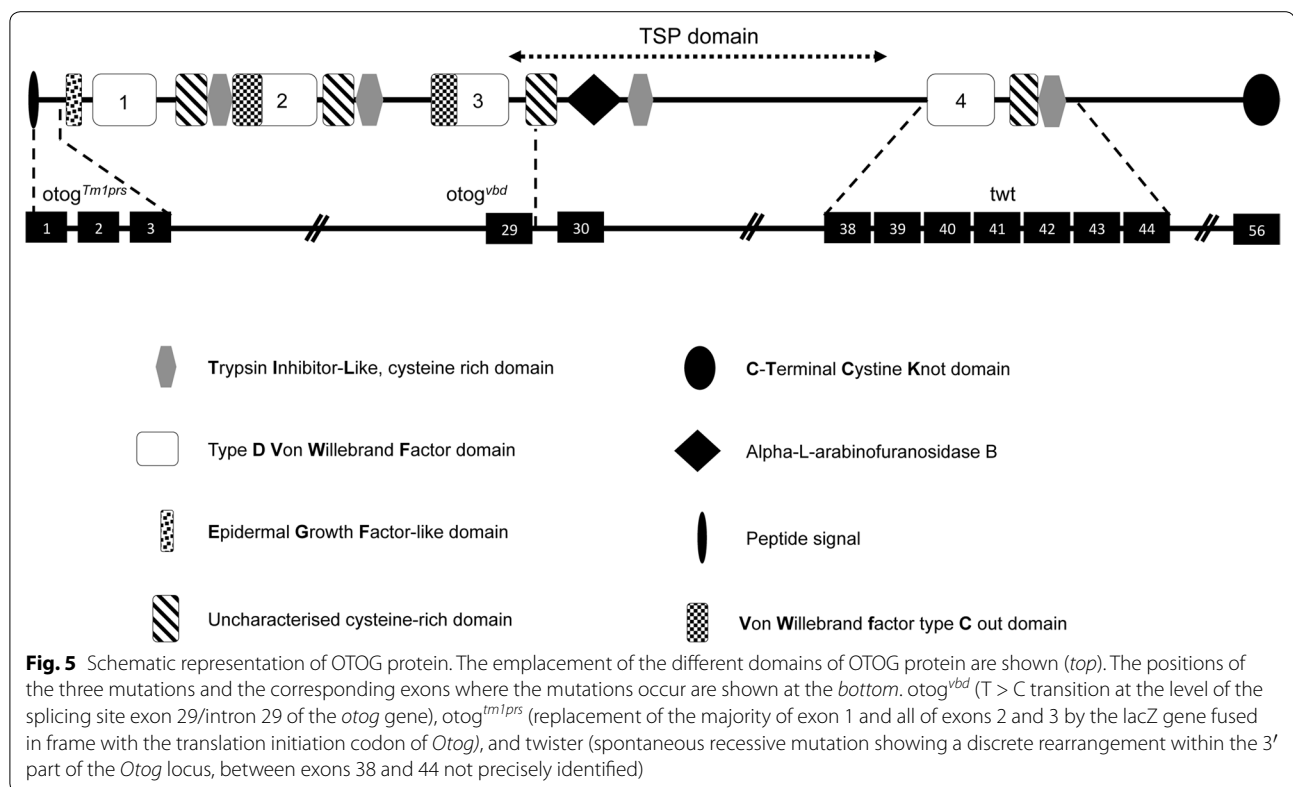




The identification of novel mutant alleles is important for understanding critical functional domains of a protein and establishing genotype—phenotype correlations. Additional alleles, apart from the null alleles obtained by homologous recombination are invaluable in revealing previously unknown aspects of the gene function. *Otog*-like (*Otogl*) is similar to *otogelin* in structure (40 % of amino acid sequence identity in conserved regions) and localization. It is found in the acellular membranes of the inner ear, and the mutations of this gene result in moderate hearing loss with no difference in phenotype based on *Otog* mutations (Cohen-Salmon et al. 1999; Yariz et al. 2012; Bonnet et al. 2013).

So far, there is an increasing number of multiple mutant alleles in a wide variety of genes due to spontaneous or chemically induced mutations allowing not only the discovery of deafness genes mutation but also the molecular mechanisms of hearing and the pathogenesis of deafness as for the protein tyrosine phosphatase receptor type Q gene (*PTPRQ*; MIM 603317) (Goodyear et al. 2003)

and lipoxygenase homology domains 1 gene (*LOXHD1*; MIM 613072) (Grillet et al. 2009), and cadherin-23 gene (*CDH23*; MIM 605516) (Schwander et al. 2007; Manji et al. 2011). Another example is for the transmembrane cochlear-expressed gene 1 (*TMC1*; MIM 606706). A dominant or a recessive mutation of the human ortholog, *TMC1* causes a progressive hearing loss (*DFNA36*) or a profound congenital deafness (*DFNB7/B11*), for which Beethoven (*Bth*) and deafness (*dn*) are mouse models, respectively (Kurima et al. 2002; Vreugde et al. 2002). These examples and more others highlight the importance of mutant mouse in this process (Rhodes et al. 2004; Longo-Guess et al. 2007; Lewis et al. 2009; Carpinelli et al. 2013; Miller et al. 2013), providing valuable insight into gene functions. Identifying an allelic series is an efficient tool to generate clinically relevant mouse models (Vernersson Lindahl et al. 2013). The vertebrate inner ear is an organ of extraordinary functional characteristics and structural intricacy. Mutant mice have been instrumental in elucidating the function and mechanisms



of the inner ear (Friedman et al. 2007; Hardisty-Hughes et al. 2010).

## Conclusion

*Vbd* is a new recessive ENU mutation of *Otog* gene characterized by a typical waltzing behaviour and a hearing impairment sharing some common behavioural characteristics either with *Otog*<sup>tm1prs</sup> or *twister*, the other two allele of *Otog*. Our results emphasize the importance of detecting and characterizing a new allele of a gene in order to get comprehensive information about the gene function. After the international efforts to generate conditional alleles for every protein coding gene in the mouse genome by high throughput conditional gene targeting and trapping (the International Knockout Mouse Consortium (IKMC); <http://www.mousephenotype.org/about-ikmc>), the ongoing International Mouse Phenotyping Consortium (IMPC; <http://www.mousephenotype.org>) will undoubtedly discover and ascribe biological function to new genes/alleles involved in hearing impairment.

## Methods

### Mice

The ENU induced-*Otog*<sup>vbd</sup> line was generated and maintained on pure C3HeB/FeJ (C3Fe) genetic background

as previously described in the Munich genome wide ENU recessive mutagenesis program (Hrabé de Angelis et al. 2000; Soewarto et al. 2003). The *vbd* mutation was also outcrossed with C57BL/6J (B6) mice then maintained by intercrosses. B6C3Fe F2 animals were used for the genetic mapping, the phenotypic and histological analyses. All mice were bred and housed under controlled conditions (21 °C, 12-h light/12-h dark cycle) with free access to standard mouse chow (RM1 (P) 801151, Special diets services) and tap water. All animal experiments were performed according to European directives (86/609/CEE and 2010/63/UE) and approved by the Committee on Ethics of Animal Experiments from the Author's Institution, "Comité Régional d'Ethique de l'Expérimentation Animale" of the Limousin region (n° 10-2014-10). According to the European Directive 210-63-EU, mice were observed daily for the general health status and mortality scoring. We carried out all tests on mice between 3 and 18 weeks of age, using 5 animals of each genotype: Wildtype (*Otog*<sup>+/+</sup>), heterozygous (*Otog*<sup>vbd/+</sup>) and homozygous (*Otog*<sup>vbd/vbd</sup>).

### Vestibular evaluations

All protocols follow the recommendations of the standard operating procedures EMPReSS, actually IMPReSS (<http://www.mousephenotype.org/impres>). Mice were

subjected to a battery of vestibular evaluations, including observation of their circling behavior and head-tilting, the righting reflex, the elevated platform test, the Preyer reflex and the swim ability test. The Preyer reflex, a startle reflex of the pinna, was evaluated by using a supra-threshold sound burst delivered from a calibrated clickbox (20 kHz, 96 dB SPL, MRC Institute of Hearing of Research). The reflex was considered positive when a rapid movement of the whole body of the animal was clearly noticed. For the swimming ability test, mice were placed individually in a large mouse cage filled with at least 15 cm depth of water (25 °C) for a maximum of 60 s, and were scored for the time spent with their nose and tail maintained above the water surface.

### Histological analyses

Histological characterization of *Otog*<sup>bd/vbd</sup> mice was conducted by Frimorpho, Inc. (Fribourg, Switzerland). Briefly, after anaesthesia, each mouse was perfused with Karnovsky-fixative. The inner ears were isolated, decalcified in EDTA, and then dehydrated through graded alcohol series. For a global analysis, organs were embedded in paraffin and subjected to classical procedures for hematoxylin-eosin staining. Pictures were taken with a Leica digital camera. For electron microscopy, the inner ears were embedded in epon 812. Semithin sections were cut with a Reichert Ultramicrotome mounted on glass slides and stained with Toluidine Blue. Ultrathin-sectioning was performed on the same instrument, followed by lead citrate contrasting and uranyl acetate staining. Transmission electron-microscopy was made on a Philips EM-10. Photographic plates were from Ilford.

### Genetic and comparative gene sequence analysis

A genome-wide linkage analysis was performed on 84 B6C3Fe *Otog*<sup>bd/vbd</sup> mice using a panel of 60 MIT polymorphic markers between C3HeB/FeJ and C57Bl/6 as described previously (Besson et al. 2005). Centimorgan positions for markers were determined based on MGI database (<http://www.informatics.jax.org>). For sequencing, specific primer pairs were designed in the flanking region of each *Otog* gene exon. The amplicons were generated from the DNA of two *Otog*<sup>bd/vbd</sup> mutants as well as two controls (parental C3HeB/FeJ strain). They were sequenced using ABI Big Dye terminator chemistry and analysed on an ABI 310 automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). After the identification of the mutation, all animals were then genotyped by sequencing.

### Isolation of total RNA, RT-PCR and sequencing of the transcripts

Total RNA was extracted from the inner ear of 2 weeks old mice using Trizol reagent (Life Technologies)

and Qiagen RNeasy columns. RT-PCR was carried out using two primers set: otog1-fw: (5'-GTGG GCCTCTGTGGGAACCTT-3'); otog1-rev: (5'-GGGGTG TCCGCCAGTCAATG-3') otog2-fw: (5'-ATGCGGACC CCAGAGAACCT-3'); otog2-rev: (5'-TGTCCGTCAGG CAGTTTGAG-3'). cDNA products were sequenced using ABI Big Dye terminator chemistry.

### Authors' contributions

CHK, LM and VB contributed to the data analysis, manuscript preparation, manuscript editing, and review. CHK did the major contribution to carry out the experiments. LM participated in the phenotypic ENU screen and helped preparing the figures. VB conceptualized this study. All authors read and approved the final manuscript.

### Acknowledgements

This work was supported by the French National Institute of Agricultural Research and by the Limousin Regional Council. CHK was supported by a PhD fellowship from the Lebanese University and the Azm & Saade Association from Lebanon.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interest.

Received: 20 September 2015 Accepted: 13 November 2015

Published online: 25 November 2015

### References

- Aigner B, Rathkolb B, Herbach N et al (2007) Screening for increased plasma urea levels in a large-scale ENU mouse mutagenesis project reveals kidney disease models. *Am J Physiol Renal Physiol* 292:F1560–F1567. doi:10.1152/ajprenal.00213.2006
- Augustin M, Sedlmeier R, Peters T et al (2005) Efficient and fast targeted production of murine models based on ENU mutagenesis. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* 16:405–413. doi:10.1007/s00335-004-3028-2
- Balling R (2001) ENU mutagenesis: analyzing gene function in mice. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2:463–492. doi:10.1146/annurev.genom.2.1.463
- Bonnet C, Louha M, Loundon N et al (2013) Biallelic nonsense mutations in the otogelin-like gene (OTOGL) in a child affected by mild to moderate hearing impairment. *Gene* 527:537–540. doi:10.1016/j.gene.2013.06.044
- Brown SDM, Hardisty RE (2003) Mutagenesis strategies for identifying novel loci associated with disease phenotypes. *Semin Cell Dev Biol* 14:19–24
- Carpinelli MR, Manning MG, Kile BT, Rachel AB (2013) Two ENU-induced alleles of *Atp2b2* cause deafness in Mice. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0067479
- Cohen-Salmon M, El-Amraoui A, Leibovici M, Petit C (1997) Otogelin: a glycoprotein specific to the acellular membranes of the inner ear. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:14450–14455
- Cohen-Salmon M, Mattei MG, Petit C (1999) Mapping of the otogelin gene (OTGN) to mouse chromosome 7 and human chromosome 11p14.3: a candidate for human autosomal recessive nonsyndromic deafness DFNB18. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* 10:520–522
- Conception D, Seburn KL, Wen G et al (2004) Mutation rate and predicted phenotypic target sizes in ethylnitrosourea-treated mice. *Genetics* 168:953–959. doi:10.1534/genetics.104.029843
- Cordes SP (2005) *N*-ethyl-*N*-nitrosourea mutagenesis: boarding the mouse mutant express. *Microbiol Mol Biol Rev* 69:426–439. doi:10.1128/MMBR.69.3.426-439.2005
- Davisson MT, Bergstrom DE, Reinholdt LG, Donahue LR (2012) Discovery genetics: the history and future of spontaneous mutation research. *Curr Protoc Mouse Biol* 2:103–118. doi:10.1002/9780470942390.mo110200
- El-Amraoui A, Cohen-Salmon M, Petit C, Simmler MC (2001) Spatiotemporal expression of otogelin in the developing and adult mouse inner ear. *Hear Res* 158:151–159

- Friedman LM, Dror AA, Avraham KB (2007) Mouse models to study inner ear development and hereditary hearing loss. *Int J Dev Biol* 51:609–631. doi:10.1387/jfdb.072365f
- Gondo Y (2009) Next-generation gene targeting in the mouse for functional genomics. *BMB reports* 42:315–323
- Gondo Y (2010) Now and future of mouse mutagenesis for human disease models. *J Genet Genomics* 37:559–572. doi:10.1016/S1673-8527(09)60076-X
- Goodyear RJ, Legan PK, Wright MB et al (2003) A receptor-like inositol lipid phosphatase is required for the maturation of developing cochlear hair bundles. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 23:9208–9219
- Graw J, Neuhäuser-Klaus A, Klopp N et al (2004) Genetic and allelic heterogeneity of Cryg mutations in eight distinct forms of dominant cataract in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:1202–1213
- Grillet N, Schwander M, Hildebrand MS et al (2009) Mutations in LOXHD1, an evolutionarily conserved stereociliary protein, disrupt hair cell function in mice and cause progressive hearing loss in humans. *Am J Hum Genet* 85:328–337. doi:10.1016/j.ajhg.2009.07.017
- Hardisty-Hughes RE, Parker A, Brown SDM (2010) A hearing and vestibular phenotyping pipeline to identify mouse mutants with hearing impairment. *Nat Protoc* 5:177–190. doi:10.1038/nprot.2009.204
- Hrabě de Angelis MH, Flaswinkel H, Fuchs H et al (2000) Genome-wide, large-scale production of mutant mice by ENU mutagenesis. *Nat Genet* 25:444–447. doi:10.1038/78146
- Justice MJ, Noveroske JK, Weber JS et al (1999) Mouse ENU mutagenesis. *Hum Mol Genet* 8:1955–1963
- Kurima K, Peters LM, Yang Y et al (2002) Dominant and recessive deafness caused by mutations of a novel gene, TMC1, required for cochlear hair-cell function. *Nat Genet* 30:277–284. doi:10.1038/ng842
- Lane PW (1981) Twister (tw). *Mouse News Lett* 64:5
- Lewis MA, Quint E, Glazier AM et al (2009) An ENU-induced mutation of miR-96 associated with progressive hearing loss in mice. *Nat Genet* 41:614–618. doi:10.1038/ng.369
- Longo-Guess C, Gagnon LH, Bergstrom DE, Johnson KR (2007) A missense mutation in the conserved C2B domain of otoferlin causes deafness in a new mouse model of DFNB9. *Hear Res* 234:21–28. doi:10.1016/j.heares.2007.09.005
- Manji SSM, Miller KA, Williams LH et al (2011) An ENU-induced mutation of Cdh23 causes congenital hearing loss, but no vestibular dysfunction, in mice. *Am J Pathol* 179:903–914. doi:10.1016/j.ajpath.2011.04.002
- Miller KA, Williams LH, Dahl H-HM, Manji SSM (2013) Eeyore: a novel mouse model of hereditary deafness. *PLoS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0074243
- Nguyen D, Xu T (2008) The expanding role of mouse genetics for understanding human biology and disease. *Dis Model Mech* 1:56–66. doi:10.1242/dmm.000232
- Nolan PM, Hugill A, Cox RD (2002) ENU mutagenesis in the mouse: application to human genetic disease. *Brief Funct Genomic Proteomic* 1:278–289
- Oliver PL, Bitoun E, Davies KE (2007) Comparative genetic analysis: the utility of mouse genetic systems for studying human monogenic disease. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* 18:412–424. doi:10.1007/s00335-007-9014-8
- Quwailid MM, Hugill A, Dear N et al (2004) A gene-driven ENU-based approach to generating an allelic series in any gene. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* 15:585–591. doi:10.1007/s00335-004-2379-z
- Rhodes CR, Hertzano R, Fuchs H et al (2004) A Myo7a mutation cosegregates with stereocilia defects and low-frequency hearing impairment. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* 15:686–697. doi:10.1007/s00335-004-2344-x
- Sachs AJ, Schwendinger JK, Yang AW et al (2007) The mouse mutants recoil wobbler and nmf373 represent a series of Grm1 mutations. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* 18:749–756. doi:10.1007/s00335-007-9064-y
- Schwander M, Sczaniecka A, Grillet N et al (2007) A forward genetics screen in mice identifies recessive deafness traits and reveals that pejavkin is essential for outer hair cell function. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 27:2163–2175. doi:10.1523/JNEUROSCI.4975-06.2007
- Simmler MC, Cohen-Salmon M, El-Amraoui A et al (2000a) Targeted disruption of otog results in deafness and severe imbalance. *Nat Genet* 24:139–143. doi:10.1038/72793
- Simmler MC, Zwaenepoel I, Verpy E et al (2000b) Twister mutant mice are defective for otogelin, a component specific to inner ear acellular membranes. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* 11:960–966
- Soewarto D, Blanquet V, Hrabě de Angelis M (2003) Random ENU mutagenesis. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 209:249–266
- Sondag HN, de Jong HA, van Marle J et al (1998) Behavioural changes in hamsters with otoconial malformations. *Acta Otolaryngol* 118:86–89
- Van Camp G and Smith R (2015) Hereditary hearing loss homepage. <http://hereditaryhearingloss.org>. Accessed Feb 2015
- Vernersson Lindahl E, Garcia EL, Mills AA (2013) An allelic series of Trp63 mutations defines TAp63 as a modifier of EEC syndrome. *Am J Med Genet A* 161A:1961–1971. doi:10.1002/ajmg.a.36074
- Vreugde S, Erven A, Kros CJ et al (2002) Beethoven, a mouse model for dominant, progressive hearing loss DFNA36. *Nat Genet* 30:257–258. doi:10.1038/ng848
- Yariz KO, Duman D, Seco CZ et al (2012) Mutations in OTOGL, encoding the inner ear protein otogelin-like, cause moderate sensorineural hearing loss. *Am J Hum Genet* 91:872–882. doi:10.1016/j.ajhg.2012.09.011

**Submit your manuscript to a SpringerOpen® journal and benefit from:**

- Convenient online submission
- Rigorous peer review
- Immediate publication on acceptance
- Open access: articles freely available online
- High visibility within the field
- Retaining the copyright to your article

---

Submit your next manuscript at ► [springeropen.com](http://springeropen.com)

---

## IV. Conclusion

*Vbd* est une nouvelle mutation récessive du gène *Otog* créée par ENU. Le phénotype des souris *vbd* est caractérisé par des troubles de comportement type souris Waltzer (tourne en rond) et d'une déficience auditive. Les souris partagent certaines caractéristiques comportementales communes avec soit les souris *Otog<sup>tm1Prs</sup>* soit *twister*, deux autres allèles du gène *Otog*. Nos résultats soulignent l'importance de la détection et la caractérisation d'un nouvel allèle d'un gène afin d'obtenir des informations complètes sur ses différentes fonctions biologiques.

Le NGS du génome entier offre une seconde chance pour les nombreux loci liés à l'HL identifiés par l'analyse de liaison dans les grandes familles, et dont le gène et la mutation causale ne sont toujours pas identifiés. Le NGS permettra aussi d'identifier les mutations causales dans les petites familles, franchissant ainsi l'obstacle de l'analyse de liaison dans ces dernières (Vona et al. 2015).

La compréhension des voies génétiques qui régulent la fonction auditive a révélé de nouvelles cibles pour le traitement pharmacologique de la maladie mais aucune thérapie médicamenteuse n'a été approuvée par la FDA (Food and Drug Administration) jusqu'à présent pour être utilisée sur le marché. Les traitements actuels reposent essentiellement sur des dispositifs tels que les prothèses auditives et les implants cochléaires. Selon la FDA, jusqu'à Décembre 2012, environ 324 200 personnes dans le monde ont reçu des implants (Cochlear Implants ; <http://www.nidcd.nih.gov/>). En outre, les approches basées sur les cellules souches et la thérapie génique, qui peuvent avoir le potentiel pour rétablir ou maintenir la fonction auditive, commencent à émerger (Müller and Barr-Gillespie 2015). En effet, la régénération des cellules ciliées de la cochlée est possible à partir de cellules précurseurs qui sont déjà présentes dans l'oreille interne ou de cellules souches pluripotentes. Dans les deux cas, ces cellules souches sont introduites dans l'oreille endommagée, dans le but qu'elles se différencient en cellules ciliées une fois qu'elles sont dans le bon environnement (Hu and Ulfendahl 2013; Géléc and Holt 2014; Müller and Barr-Gillespie 2015). En revanche, il peut également être nécessaire de réparer ou de remplacer les gènes mutants dans les nouvelles cellules ciliées provenant de cellules souches autologues. Ainsi, la thérapie génique peut aussi être applicable à la perte auditive pour sauver la fonction des

gènes mutés par restauration, inhibition ou modification des gènes mutés. D'une part, dans la plupart des exemples de surdité héréditaire récessive, la restauration de l'audition nécessitera la livraison de la protéine ou gène manquant. D'autre part, comme de nombreuses formes de surdité héréditaire sont dominantes, une stratégie thérapeutique potentielle est d'inhiber sélectivement le produit du gène dominant pour permettre à la copie de type sauvage restante de restaurer la fonction. Concernant les surdités héréditaires dues à des erreurs d'épissage par exemple, l'administration systémique d'un oligonucléotide anti-sens qui corrige les défauts d'épissage conduit à une récupération partielle structurale et fonctionnelle dans la cochlée. Certains progrès ont été obtenus avec les deux stratégies, bien qu'aucune ne soit proche d'une application thérapeutique concrète (Müller and Barr-Gillespie 2015)



# Résultats - Chapitre 2

---



<http://modernhealthandfitness.com/build-lean-muscle-mass-expert-advice/>

## *Le système Locomoteur* *Etude des lignées murines* *GMA24 et GMA06*

# Chapitre 2 : Le système locomoteur

---

Le système locomoteur (SL) ou musculo-squelettique (SMS), comprend les os, les muscles, les tendons, les ligaments, les articulations, le cartilage et d'autres tissus conjonctifs. Ils fournissent ensemble la forme, la stabilité, et le mouvement au corps humain. L'introduction de ce chapitre abordera successivement:

- ✓ Le tissu squelettique
- ✓ Le muscle squelettique

## I. Le tissu squelettique

### *Le tissu cartilagineux*

Le tissu squelettique comprend le tissu osseux et cartilagineux. Le tissu cartilagineux, communément appelé « cartilage », est un tissu conjonctif spécialisé de consistance dure mais contrairement à l'os, le cartilage n'est pas minéralisé. Il est formé d'un seul type cellulaire, les chondrocytes, répartis dans une matrice extra cellulaire (MEC) abondante et complexe. Les chondrocytes assurent la synthèse et la dégradation de tous les composants de la MEC cartilagineuse.

La MEC a une haute teneur en eau (70 à 80 % de son poids) qui lui confère son élasticité c'est-à-dire sa capacité de reprendre sa forme initiale après avoir été comprimé. Le tissu cartilagineux est totalement dépourvu de vascularisation et d'innervation. La plupart des cartilages sont nourris par diffusion à travers la matrice, à partir des capillaires de la couche interne du *périchondre* (tissu conjonctif dense, irrégulier et vascularisé qui entoure la plupart du tissu cartilagineux et qui joue un rôle dans la nutrition, la croissance et la réparation du cartilage) (2008).

Selon la richesse de la MEC en fibres de collagène ou en fibres élastiques, on distingue 3 variétés histologiques de cartilage (Marieb 2005). Le *cartilage hyalin* est le plus répandu dans le corps humain, il est responsable de la croissance en longueur des os et contient un grand nombre de fibres de collagènes de petit calibre. Le *cartilage élastique*



compose le pavillon de l'oreille externe et l'épiglotte et renferme de nombreuses fibres d'élastine permettant sa déformation et la restitution de la forme initiale. Le cartilage fibreux (ou fibro-cartilage), contrairement aux précédents, sa MEC contient d'épais faisceaux de fibres de collagène de type I. Il se trouve à l'endroit où le cartilage hyalin s'unit à un tendon ou à un ligament et il permet de résister aux fortes pressions exercées par exemple au niveau des disques intervertébraux et les ménisques des genoux.

## *L'os et le tissu osseux*

Le squelette d'un adulte est composé de 206 os. Les nouveaux nés possèdent ~ 300 os, et la fusion se produit durant leur développement. Le squelette représente ~3% de la masse corporelle de l'embryon et des nouveaux nés et de ~ 6 à 7% de la masse corporelle chez l'adulte (Malina et al. 2004).

Le tissu osseux qui fait partie du tissu squelettique avec le tissu cartilagineux vient remplacer ce dernier au cours de la formation et de la croissance des os. C'est un tissu conjonctif spécialisé formé de cellules et d'une matrice extracellulaire regroupant des fibres de collagène et une substance fondamentale calcifiée.

Le squelette a 3 fonctions :

- **Fonction mécanique** : le tissu osseux est un des tissus les plus résistants de l'organisme, capable de supporter des contraintes mécaniques, donnant à l'os son rôle de soutien du corps et de protection des organes.
- **Fonction hématopoïétique** : les espaces médullaires des os renferment la moelle hématopoïétique (moelle rouge) dont les cellules hématopoïétiques souches, à l'origine des 3 lignées de cellules du sang (La lignée érythropoïétique, myélopoïétique et mégacaryocytaire)
- **Fonction métabolique** : le tissu osseux est un tissu dynamique, constamment remodelé sous l'effet des pressions mécaniques, entraînant la libération ou le stockage de sels minéraux, et assurant ainsi dans une large mesure (avec l'intestin et les reins) le contrôle du métabolisme phosphocalcique.

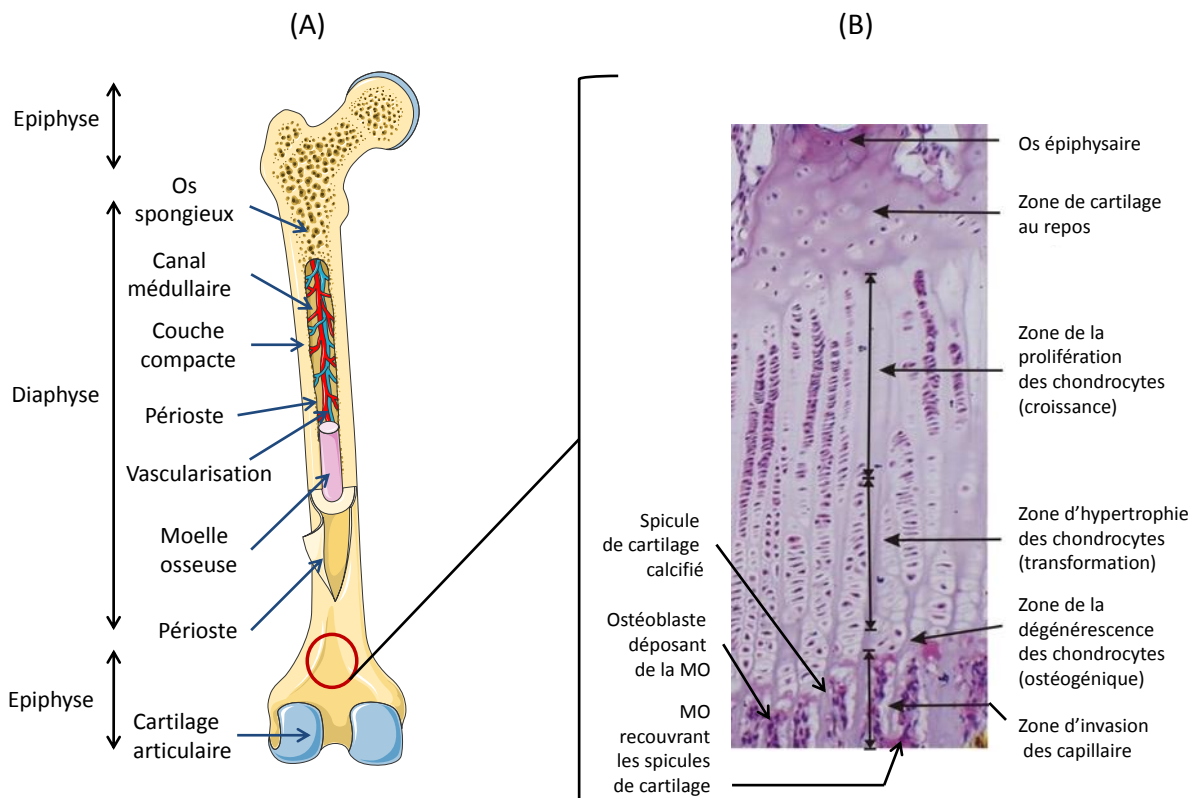
L'os, considéré comme le réservoir des minéraux dans le corps, contient environ 99% de nos réserves de calcium et 85% de nos réserves de phosphate sous forme de minéral appelé hydroxyapatite, mais aussi d'autres minéraux. Le tissu osseux contient 4 types de cellules : les cellules bordantes, les ostéoblastes, les ostéocytes considérés comme des cellules ostéoformatrices, et les ostéoclastes qui sont des cellules ostéorésorbantes (Tableau 2). Les ostéoblastes, les ostéoclastes et les cellules bordantes de l'os se trouvent à la surface du tissu osseux, alors que les ostéocytes sont situés à l'intérieur de la matrice osseuse.

**Tableau 2. Types de cellules présentes dans le tissu osseux**

Type de cellule	Localisation	Morphologie	Fonction	réf
<b>Ostéoblaste</b>	Surface osseuse (couche de périoste ou endoste)	Cuboïde	Production de la MEC, régulation de la différenciation et la fonction des ostéoclastes, rôle endocrinien affectant le métabolisme énergétique, la fertilité masculine et la cognition.	(a,b)
<b>Ostéocyte</b>	Lacune osseuse (ostéoplaste)	Stellité	Responsable de la communication intercellulaire, l'homéostasie calcique, participation au remodelage osseux en réponse à des stimuli mécano-hormonaux de ostéocytes	(a,c, d)
<b>Ostéoclaste</b>	Surface osseuse	Volumineuse et multinucléée	Résorption osseuse pour le remodelage osseux, régulation de l'activité et la différenciation des ostéoblastes	(e-g)
<b>Cellule bordante</b>	Surface osseuse	Aplatie et allongée	Ostéoblaste post mitotique quiescent qui peut se transformer en ostéoblaste actif par les hormones et les facteurs de croissance pour exprimer le phénotype des ostéoblastes. Rôle possible dans le remodelage osseux en empêchant l'interaction inappropriée des précurseurs d'ostéoclastes avec la surface osseuse	(h-j)

**Référence :** (a) (Jang et al. 2009), (b) (Capulli et al. 2014), (c) (Bonewald 2006), (d) (Tatsumi et al. 2007), (e) (Baron 1989), (f) (Davies et al. 1989), (g) (Matsuo and Irie 2008), (h) (Power et al. 2004), (i) (Kular et al. 2012), (j) (Turner et al. 2013).

Il existe 4 variétés anatomiques d'os : les os longs (comme le tibia, le fémur), courts (comme les os du carpe), plats (comme le sternum, les côtes) et sésamoïdes (petits os enfoncés dans une articulation ou un tendon comme l'os sésamoïde du pouce).



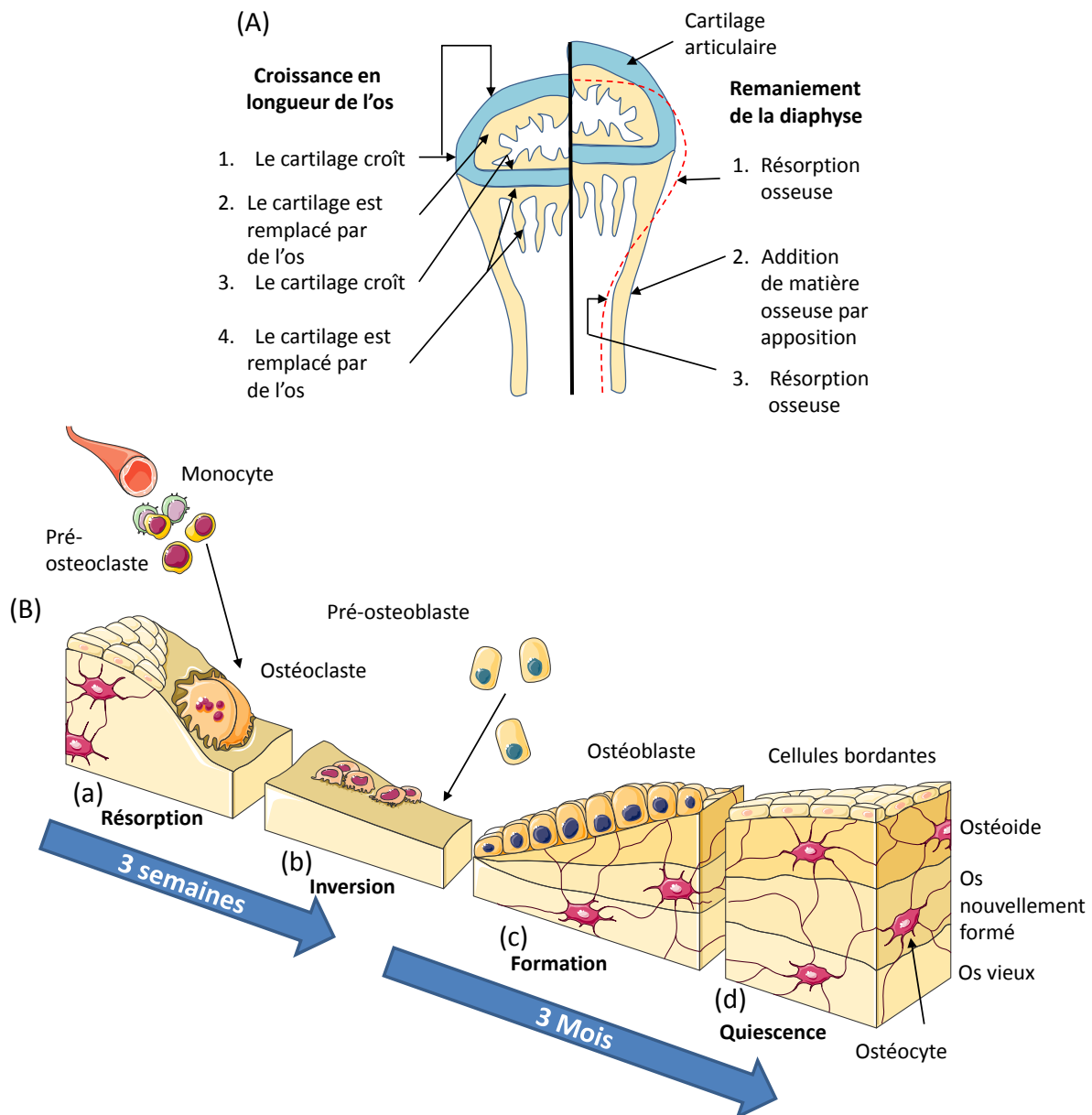
**Figure 12. La composition générale d'un os long humain et d'une plaque de croissance**

(A) Les os longs sont constitués de deux épiphyses à chaque extrémité et d'une diaphyse qui relie les deux épiphyses. La couche extérieure qui recouvre la surface de l'os cortical sauf au niveau des surfaces articulaires est le périoste. L'endoste borde la cavité médullaire centrale des os longs qui contient la moelle et la vascularisation (figure adaptée de <http://www.servier.fr/smart/banque-dimages-powerpoint>). (B) coloration HE d'une coupe de la plaque de croissance d'un os long qui assure sa croissance en longueur. Elle est située entre l'épiphyse et la diaphyse et est composée de trois zones (de repos, de prolifération, et d'hypertrophie). Chaque zone contient diverses chondrocytes à différents stades de différenciation. La zone de repos (cartilage hyalin) contient de petites chondrocytes agissant comme des cellules souches avec un taux de répllication lent. La zone proliférative est composée de chondrocytes plats bordant le long de l'axe longitudinal de l'os avec un taux de répllication élevé. La zone hypertrophique est la couche de chondrocytes subissant une différenciation terminale. Elle présente une épaisseur accrue, entourant la matrice calcifiée, et attirant les facteurs de formation osseuse et vasculaire. Adaptée de Clermont et al. 2013  
MO : Matrice osseuse

Les études de la lignée GMA24 sont plutôt concentrées sur les os longs. Les os longs sont constitués de deux épiphyses à chaque extrémité et d'une diaphyse qui relie les deux épiphyses. Entre les épiphyses et la diaphyse, se trouve la métaphyse, qui correspond à la plaque de croissance ou le cartilage épiphysaire (figure 12).

La MEC est produite par les ostéoblastes. Elle est un composite comprenant des composants organiques et inorganiques. La matrice organique ou ostéoïde représente ~ 20% du poids total de l'os et est composée essentiellement de collagène de type I (90%) qui donne aux os leur flexibilité. La matrice inorganique contribue à environ 65-70% du poids total de l'os et sert de réservoir d'ions. Elle est surtout formée des hydroxyapatites, cristaux de sels minéraux composés de phosphate et de calcium, qui entourent les fibres de collagène de la MEC. Ces cristaux serrés les uns sur les autres assurent la dureté et la rigidité de l'os. L'ostéoïde est composée de plusieurs protéines. A côté du collagène, se trouve la *fibronectine*, des *glycoprotéines* (comme l'ostéonectine et l'alkaline phosphatase), les *siblings* (SIBLINGs pour *Small Integrin-Binding Ligand, N-glycosylated proteins*) comme la BSP (Bone Sialoprotein), l'ostéopontine, DMP-1 (Dentin Matrix acidic Phosphoprotein-1) et MEPE (Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein) (Bellahcene et al. 2008); des *protéoglycane*s (comme la décorine, et biglycane), des *protéines  $\gamma$ -carboxylées* (comme la Matrix Gla Protein MGP et l'ostéocalcine). L'ostéocalcine représente jusqu'à 15% des protéines non collagéniques de l'os mature et son expression est largement limitée aux ostéoblastes de l'os (Price et al. 1976; McKee et al. 1992). Dans la MEC des protéases, des protéines morphogénétiques osseuses (BMPs) et des facteurs de croissance sont également présentes (Mottaghitalab et al. 2015).

L'os est constamment en remodelage (résorption et formation osseuse). Durant la croissance des os long au cours de l'enfance et de l'adolescence assurée par une croissance par apposition (en diamètre) et une croissance en longueur (assurée par le cartilage épiphysaire), l'os subit aussi un remaniement (résorption ou formation osseuse) pour conserver des proportions adéquates entre la diaphyse et les épiphyses (figure 13 )



**Figure 13. Remaniement et remodelage osseux**

(A) Le remaniement osseux. La croissance en longueur de l'os assurée par l'ossification endochondrale du cartilage épiphysaire (gauche) est accompagnée par un remaniement osseux (droite). Ici l'os subit une résorption au niveau du périoste de l'épiphyse (1) et l'endoste de la diaphyse (3), et une addition de la matière osseuse par apposition au niveau du périoste diaphysaire (2) ce qui assure l'équilibre de proportion entre l'épiphyse et la diaphyse (d'après Marieb 2005). (B) Cycle de remodelage osseux. Une micro-altération ou un stress mécanique (a) stimule le recrutement, la différenciation et l'activation des ostéoclastes, cellules d'origine myéloïde, qui résorbent l'os vieux ou endommagé. Les ostéoclastes meurent par apoptose (b). La phase entre l'activation des ostéoclastes et leur apoptose dure ~3 semaines. Les pré-ostéoblastes, cellules d'origine mésenchymateuse migrent ainsi vers la zone de l'os résorbé, se différencient en ostéoblastes (c) et le remplacent par l'ostéoïde non minéralisé. L'ostéoïde va ensuite se minéraliser et les ostéoblastes entrent en quiescence (d). Adaptée de <http://www.servier.fr/smart/banque-dimages-powerpoint>.

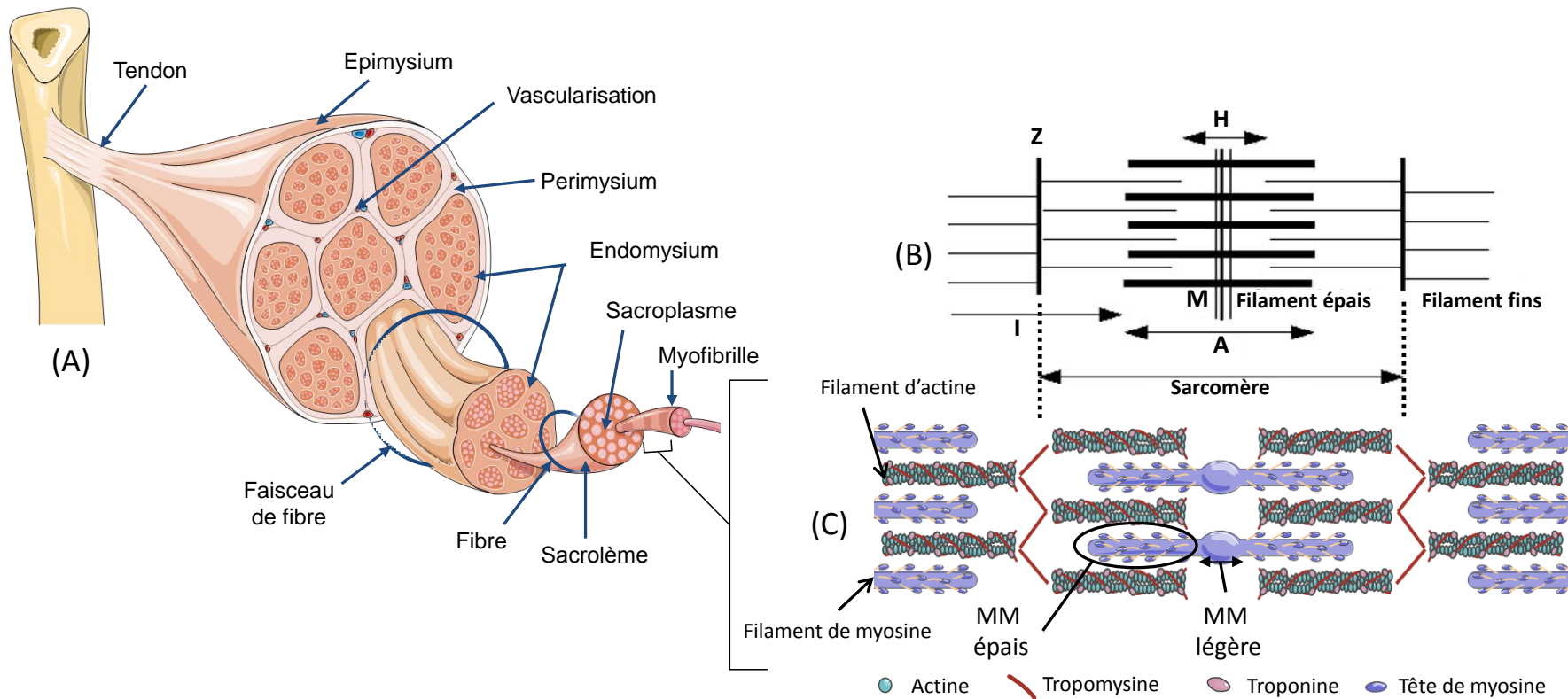
## II. Le tissu musculaire squelettique

Le tissu musculaire (TM) représente près de la moitié de la masse du corps. La principale caractéristique du TM, d'un point de vue fonctionnel, est son aptitude à transformer une énergie chimique, sous forme d'ATP, en énergie mécanique dirigée. Les muscles sont donc capables d'exercer une force. Ils sont considérés comme les « moteurs » de l'organisme et sont impliqués dans de nombreuses fonctions vitales, comme les battements cardiaques, la respiration, la locomotion, le maintien de la posture, la stabilisation des articulations et la thermorégulation.

La morphologie et l'anatomie fonctionnelle du muscle permet de distinguer 3 types de TM formé par les cellules musculaires ou myocytes nommées "fibres" musculaires qui constituent l'unité de base du muscle:

- *Le TM lisse* formé de léiomyocytes, d'origine mésenchymateuse, est localisé dans la paroi des viscères, des vaisseaux et de la peau. Ces cellules sont mononucléées, longues et fusiformes. La contraction des muscles lisses est involontaire, lente et continue.
- *Le TM cardiaque* est composé de cardiomyocytes provenant du mésenchyme. On ne le trouve chez l'homme qu'au niveau du cœur. Les cellules cardiaques portent des bandes bien visibles nommées stries. Ce sont des cellules contenant un à deux noyaux, séparées par des disques intercalaires permettant la communication cellulaire et se caractérisent par leur aptitude à se contracter rythmiquement et harmonieusement de façon spontanée.
- *Le TM squelettique* qui sera l'objet de cette partie, se présente sous forme de muscles squelettiques qui recouvrent le squelette osseux et s'y attachent. Il dérive des myotomes et est composé de cellules (rhabdomyocytes) longues, multinucléées et striées. Bien qu'ils soient parfois activés par des réflexes, les muscles squelettiques ont une contraction volontaire. Ils se contractent rapidement et vigoureusement, mais ils se fatiguent facilement. Ils sont capables d'exercer une force considérable. Le muscle squelettique est également doté de remarquables facultés d'adaptation (figure 14).





### Figure 14. Organisation du muscle squelettique

(A) Le muscle squelettique contient un grand nombre de myofibrilles organisées en faisceaux et entourées de tissus conjonctifs. Les myofibrilles sont des cellules multinucléées constituées de filaments fins (actine) et filaments épais (myosine) formant la myofibrille, véritable unité contractile du muscle (modifiée d'après <http://www.servier.fr/smart/banque-dimages-powerpoint>) (B) Schématisation de l'aspect d'une fibre musculaire par microscopie électronique. (C) Représentation schématique du sarcomère (adaptée de <http://www.servier.fr/smart/banque-dimages-powerpoint>). La **strie Z** relie les filaments d'actine de chaque sarcomère (1 sarcomère : partie comprise entre 2 stries Z) ; autour de la strie Z, la zone claire comprenant uniquement des filaments fins d'actine est appelée **bande I** ; la zone sombre constituée par toute la longueur des filaments épais de myosine est appelée **bande A** ; la zone au centre constituée uniquement par les méromyosines (MM) légères est appelée **bande H**. Exactement au milieu, se trouve la **bande M** qui correspond aux microfibrilles reliant entre eux les filaments de myosine. MM : Méromyosines.

Le tissu musculaire a des propriétés particulières qui lui permettent de remplir différentes fonctions. Ces propriétés sont l'excitabilité, la contractilité, l'extensibilité, l'élasticité et la plasticité. L'excitabilité du muscle est sa faculté de percevoir un stimulus et d'y répondre soit par une contraction (raccourcissement des fibres musculaires par rapport à leur longueur de repos) soit par une extension (étirement au-delà de leur longueur de repos) ; cependant l'élasticité du TM permet aux fibres musculaires de reprendre leur longueur de repos lorsqu'on les relâche. En outre, le muscle a la propriété de modifier sa structure selon le travail qu'il effectue reflétant sa plasticité. En ce qui concerne la contraction des muscles, le stimulus est habituellement de nature chimique, par exemple une hormone, une modification locale du pH ou un neurotransmetteur libéré par une cellule nerveuse, et la réponse est la production et la propagation, le long du sarcolemme, d'un courant électrique qui est à l'origine de la contraction musculaire.

Le recrutement sélectif des unités motrices musculaires permet au muscle de répondre de la meilleure manière aux exigences fonctionnelles. L'hétérogénéité des fibres musculaires est la base de la flexibilité qui permet au muscle d'être utilisé pour diverses tâches allant de l'activité continue de faible intensité (maintien de la posture) à des contractions répétées (locomotion, respiration...), et des contractions maximales rapides et fortes (les sauts). En outre, les propriétés structurelles et fonctionnelles des fibres peuvent changer en réponse aux effets hormonaux et neuronaux. Cette propriété est définie par la plasticité musculaire.

En effet, les fibres musculaires sont classées en fonction de leurs vitesses maximales de raccourcissement : rapide ou lente, et en fonction de la voie métabolique principalement utilisée pour produire de l'ATP: oxydative ou glycolytique (Schiaffino and Reggiani 2011). La vitesse de contraction dépend de l'isoforme de la chaîne lourde de myosine (MyHC I, IIa, IIb, IIx) et de l'activité ATPasique. Ainsi, on distingue quatre types de fibres musculaires chez les mammifères résumés dans le tableau 3 (Westerblad et al. 2010; Schiaffino and Reggiani 2011)



**Tableau 3. Caractéristiques des différents types de fibres musculaires squelettiques**

<b>Caractéristiques</b>	<b>Type I</b>	<b>Type IIa</b>	<b>Type IIb/x</b>
<b><i>Caractéristiques structurales et forme</i></b>			
<i>Isoforme MyHC</i>	MyHC I	MyHC IIa	MyHC IIb/IIx
<i>Diamètre</i>	Petit	Intermédiaire	Grand
<i>Couleur</i>	Rouge	Rouge rosâtre	Blanc
<i>Densité capillaire</i>	Elevée	Elevée	Faible
<i>Mitochondrie</i>	Nombreuses	Nombreuses	Rares
<b><i>Caractéristiques métaboliques</i></b>			
<i>Métabolisme</i>	Oxydatif (aérobie)	Oxydatif/Glycolytique	Glycolytique (anaérobie)
<i>Activité ATPasique</i>	Faible	Elevée	Elevée
<i>Contenu en myoglobine</i>	Elevé	Elevé	Faible
<i>Contenu en glycogène</i>	Faible	Intermédiaire	Elevé
<i>Stocke énergétique</i>	Triglycéride	Créatine phosphatase, Glycogène	Créatine phosphatase, Glycogène
<b><i>Caractéristiques fonctionnelles</i></b>			
<i>Vitesse de contraction</i>	Lente	Rapide	Rapide
<i>Résistance à la fatigue</i>	Elevée	Intermédiaire	Faible

A côté des phénotypes d'atrophie ou d'hypertrophie musculaire, les maladies musculo-squelettiques proprement dites (maladies articulaires, arthrose, mal de dos, affections rachidiennes, traumatismes graves des membres et affections invalidantes des enfants, etc.) peuvent empêcher les personnes qui en sont atteintes de marcher, de s'asseoir, voire même de respirer, et ont un impact considérable en santé publique. Certaines d'entre elles sont le résultat de malformations congénitales du squelette tandis que d'autres sont dues à l'usure ou « au déchirement » au fil des ans.

Avant d'être accidentellement interrompu fin 2009, un crible sensibilisé avait été développé au sein du laboratoire. Ce crible était un crible dominant basé sur une sensibilisation du fond génétique grâce à l'utilisation des souris knockout pour la myostatine, membre de la superfamille des TGF $\beta$  (Magnol et al. 2011). Ces souris *Gdf8*<sup>-/-</sup>, qui présentent une augmentation de la masse musculaire due à une hypertrophie et une hyperplasie des muscles striés, une adiposité réduite et une augmentation de la densité minérale osseuse surtout au niveau de l'attachement des muscles à l'os (McPherron et al. 1997; McPherron and Lee 2002; Hamrick et al. 2002; Hamrick et al. 2006; Lee 2007; Elkasrawy and Hamrick 2010), ont été croisées avec des souris mâles traitées à l'ENU pour produire les animaux F1. En utilisant dans le crible la souris KO pour le gène *Gdf8* présentant une hypermusculature, nous entraînons un déséquilibre phénotypique pour cibler notre phénotype d'intérêt « fort développement musculaire ». En effet, les animaux F1 obtenus présentent tous un allèle muté pour *Gdf8* et les mutations ENU interagissant de façon directe ou non avec la voie de régulation de la myostatine entraînant un phénotype « hypermusclé » plus facilement identifiable. Parmi les 49 phénovariants identifiés, 7 lignées qui présentaient un phénotype de grand intérêt (taux de créatinine élevé associé à un fort développement musculaire ou anomalies du système squelette-musculaire) ont été établies : 6 présentant des défauts squelettiques plus ou moins sévères, dont GMA24 fait partie, et la dernière, nommée GMA06, présentant une hypermusculature.

Les parties suivantes présentent les résultats issus de l'analyse de la mutation GMA24 sous forme d'un article en préparation et l'étude GMA06.

### III. Publication 2: la lignée GMA24

## ***Phex*<sup>L222P</sup> mutation increases *Phex* expression in a new ENU mouse model for XLH disease**

*Carole El Hakam Kamareddin, Laetitia Magnol, Fabienne Baraige, Lionel Forestier and Véronique Blanquet*

(Article en préparation pour soumission à *Mammalian Genome*)

# ***Phex*<sup>L222P</sup> mutation increases *Phex* expression in a new ENU mouse model for XLH disease**

*Carole EL HAKAM KAMAREDDIN, Laetitia MAGNOL, Fabienne BARAIGE, Lionel FORESTIER and Veronique BLANQUET*

Unité de Génétique Moléculaire Animale, Faculté de Sciences et Techniques, UMR INRA 1061, 123, avenue Albert Thomas, 87060 Limoges – France

Carole.el-hakam@etu.unilim.fr, laetitia.magnol@unilim.fr, fabienne.baraige@unilim.fr, lionel.forestier@unilim.fr and veronique.blanquet@unilim.fr

\*Correspondence:

Pr. Véronique Blanquet  
Unité de Génétique Moléculaire Animale  
veronique.blanquet@unilim.fr  
Phone 0033555457664  
Fax 0033555457653

## **Keywords**

Phex, ENU, XLH, Hypophosphatemia, Bone, Skeletal developoment

## **Background**

Hypophosphatemic rickets (HR) is a heterogeneous renal phosphate wasting disorder with an average incidence of 3.9/100,000 in children between age 0 and 0.9 years, and a prevalence of 4.8/100,000 in those younger than 15 years with many inheritance types in human (Beck-Nielsen et al. 2009). We can find the common X-linked dominant form (XLH ; MIM 307800) caused by a mutation in the *Phosphate regulating gene with Homologies to Endopeptidases on the X-chromosome (PHEX; MIM 300550)* and the occasional autosomal dominant form (ADHR; MIM 193100) caused by a mutation in the gene encoding the *Fibroblast Growth Factor 23 gene (FGF23)* on the chromosome 12p13. HR could also be inherited in autosomal recessive forms, namely (ARHR) ARHR1 (MIM 241520), caused by a mutation in the *Dentin Matrix acidic Phosphoprotein 1 gene (DMP1)* on the chromosome 4q21 ; and ARHR2 (MIM 613312) caused by a mutation in the *Ecto-Nucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 1 gene (ENPP1)* on the chromosome 6q23.2; and a rare X-linked recessive form (XLRH; 300554) caused by a mutation in the *Chloride Channel 5 gene (CLCN5; MIM 300008)* on the chromosome Xp11.23-p11.22. *Klotho* gene (*KL*) could also be involved in HR which is observed in a child with a translocation causing an increase in  $\alpha$ -Klotho levels (Santos et al. 2013). However XLH is the

most common inherited HR in human affecting about 1 over 20,000 people worldwide (Sabbagh et al. 2000). It is characterized by rickets, hypophosphatemia, renal phosphate wasting, and growth retardation (Tenenhouse et al. 1994; The HYP Consortium 1995; Tenenhouse 1999) but some may have normal growth, normal or aberrant vitamin D metabolism and occasionally dental abscess (Murayama et al. 2000; Makras et al. 2008; Morey et al. 2011) induced by PHEX loss of function (Francis et al. 1997; Sabbagh et al. 2001; Sabbagh et al. 2003).

The human *PHEX* gene, formerly referred to as *PEX* gene, is located on chromosome Xp22.1–22.2 in humans and on X chromosome at 72.38 cM in mouse (The HYP Consortium 1995; Francis et al. 1997). The coding region spanning 2,250 bp (22 exons) encodes for a type II transmembrane endopeptidase of 749 amino acids. It is organized into three domains: a small amino-terminal intracellular tail (amino acid 1 to 15), a short transmembrane domain (amino acid 16 to 58), and a large carboxyterminal extracellular domain (amino acid 59 to 749) that contains 10 highly conserved cysteine residues and a zinc-binding motif required for its conformation and activity. This composition shows that PHEX has significant homologies with the members of the M13 zinc-metallopeptidases family which are involved in the degradation or activation of a variety of peptide hormones (namely Neutral Endopeptidase (NEP), Kell blood group antigen (KELL) and Endothelin Converting Enzyme 1 and 2 (ECE1 and 2)) (The HYP Consortium 1995). The gene is highly conserved between human and mouse. The mouse gene shows 91% of identity at the DNA level and 96% of identity at the protein level with 98% of similarity to the human gene product (Grieff et al. 1997; Strom et al. 1997; Guo and Quarles 1997).

PHEX is primarily expressed in the cells of bone lineage, such as osteoblasts, osteocytes and odontoblasts and its expression decreases with age (Ruchon et al. 1998; Meyer et al. 2000). PHEX was initially thought to directly inactivate FGF23, a suspected phosphaturic factor (Bowe et al. 2001; Yamazaki et al. 2002), to regulate bone and dentin mineralization and renal phosphate reabsorption. Later studies have shown that FGF23 is not a substrate of PHEX-encoded endopeptidase (Liu et al. 2003; Benet-Pagès et al. 2004) even if the decrease or absence of PHEX expression induce the increase of FGF23 expression (Liu et al. 2006; Owen et al. 2012). Indeed ASARM-peptides of the SIBLINGs (Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycosylated proteins) mineral-regulating proteins, that include proteins such as Dentin Matrix Protein-1 (DMP-1), Bone Sialoprotein (BSP), Osteopontin (OPN), Dentin Sialophosphoprotein (DSPP) and Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein (MEPE) (Fisher and Fedarko 2003), all of which bind strongly to hydroxyapatite mineral in the extracellular matrix of bone, are the only probably known physiological substrate for PHEX (Rowe et al. 2005; Rowe et al. 2006; Addison et al. 2008; Addison et al. 2010; Boukpepsi et al. 2010; Barros et al. 2013). Released ASARM peptides play roles in mineralization, bone turnover, mechanotransduction, phosphate regulation and energy metabolism. To date, 389 different *PHEX* mutations have been described

in patients with HR, which include 146 nonsense / missense mutations, 70 splicing site mutations, 51 insertions, and 111 deletions in different positions along the gene (HGMD professional 2015.3 releases). In parallel, 13 alleles are found in mice: 4 spontaneous (*Phex*<sup>Hyp-2J</sup>, *Phex*<sup>Hyp-Duk</sup> and *Phex*<sup>Hyp</sup>, *Phex*<sup>Kbus/Idr</sup>); 1 radiation (*Phex*<sup>Gy</sup> or Gy); 2 targeted (*Phex*<sup>tm1.1Mkd</sup> and *Phex*<sup>tm1.2Mkd</sup>); and 6 ENU (*Phex*<sup>Hpr</sup>, *Phex*<sup>m1Jrt</sup>, *Phex*<sup>Mhdabap012</sup>, *Phex*<sup>Mhdabap024</sup>, *Phex*<sup>Pug</sup> and *Phex*<sup>Ska1</sup>) alleles (<http://www.informatics.jax.org>, Moriyama et al. 2011). Although they share common symptoms of the disease, the different mouse models show different manifestation and gravity level of XLH disease (Gonzalez et al. 1992; Liu et al. 2002; Carpinelli et al. 2002; Lorenz-Depiereux et al. 2004; Karunaratne et al. 2012; Owen et al. 2012). It could be due to the carried allele (Sabbagh et al. 2003) or the genetic background (Gonzalez et al. 1992; Lorenz-Depiereux et al. 2004; Megerian et al. 2008). However, no single mutation is predominant in XLH disease (Ichikawa et al. 2008).

Here, we report a new ENU-induced mouse model for XLH disease presenting a *Phex*<sup>L222P</sup> mutation. Hemizygous male and heterozygous female *Phex*<sup>L222P</sup> mice exhibit the classic clinical manifestations of XLH, including growth retardation, hypophosphatemia, and skeletal abnormalities. However, a striking increase of *Phex*<sup>L222P</sup> expression in male mutant mice with the conservation of the same expression of several matrix proteins as in the case of PHEX loss of function, make *Phex*<sup>L222P</sup> mice a valuable new model for the study of PHEX interactions in XLH disease.

## Methods

### 1. Mice

*Phex*<sup>L222P</sup> (B6FVB) mice were derived from a sensitized dominant ENU mutagenesis program performed in our lab as described before (Magnol et al. 2011). Briefly, ENU males C57BL/6J mice were bred to Gdf8 knockout females (generated on FVB genetic background). Once the mutant mouse line had been established, it was first maintained by backcrosses to Gdf8 knockout females, then to wild type (WT) FVB mice to study the mutation manifestation alone. All Tests were done on hemizygous (*Phex*<sup>L222P</sup>/Y) males, heterozygous (*Phex*<sup>L222P</sup>/*Phex*) females and there their aged matched littermate controls. All the mice were bred and housed in the animal facility of Limoges University under controlled condition (21 °C, 12/12h light-dark cycle) with a free access to standard mouse chow (RM1 (P) 801151, Special diets services) and tap water. All animal experiments were performed according to European directives (86/609/CEE and 2010/63/UE) and approved by the Committee on Ethics of Animal Experiments from the Author's Institution, "Comité Régional d'Ethique de l'Expérimentation Animale" of the Limousin region (n° 10-2014-10). According to the European Directive 210-63-EU, mice were observed daily for the general health status and mortality scoring.

## 2. Plasma biochemistry

Blood samples (250  $\mu$ l) were obtained from 8-week-old nonfasted anesthetized mice by the puncture of the retro-orbital sinus. Plasma analyses of ALP (*Alkaline Phosphatases*), Ca (Calcium), and Pi (inorganic Phosphorus) were executed using kenolab 30 Clinical Chemistry Analyzer with the adapted test kits (Thermo Scientific).

## 3. Histological analyses

Left femurs were quickly dissected free of most adherent tissue from 3 months old mice then fixed, decalcified and cryoprotected as described before by Jiang et al. (Jiang et al. 2005). Cryosections of 10 $\mu$ m thickness were stained with HES staining procedure. The slides were scanned using Hamamatsu NanoZoomer RS 2.0 (Hamamatsu), and images were visualized using NDP view (v1.2.52).

## 4. Whole-mount skeletal preparations

Mice were sacrificed by CO<sub>2</sub> asphyxiation, skin and internal organs were removed as possible. Skeletons were fixed in ethanol 95% then in acetic acid 100%. Skeletal morphologies were stained by Alizarin Red (A-R) and Alcian Blue (A-B) staining, followed by tissue de-staining with 20% glycerol - 1% potassium hydroxide (KOH) and clarification with a glycerol series (50%, 70%) to finally preserve them in glycerol 100% for ulterior skeletal morphology analyses. To avoid fat de-staining problem, skeletons were kept in acetone for 2-3 days before starting the de-staining. To measure bone length, isolated bones were laid next to a ruler and photographed using a digital camera. Each step lasts for 4 to 7 days under agitation at room temperature. The staining solution is a mixture of 5% A-B (0.3% Alcian Blue in ethanol 70%, H<sub>2</sub>O), 5% A-R (0.1% Alizarin Red in ethanol 95%), 5% Acetic Acid (100%) and 85% ethanol (70%).

## 5. DNA, RNA and Protein extractions

DNA was extracted from mutant mice blood samples (200 $\mu$ l) according to the manufacturer's instructions (QIAamp DNA Blood Mini Kit, Qiagen), quantified by Nanodrop, and stored at -20°C. Total RNA and proteins were extracted from right femur and kidney of a minimum of 3 mice from each category at 3 months of age. Samples were frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C for later extraction, or they were directly homogenized into fine powder in liquid nitrogen using a mortar and pestle.

RNA was extracted using Tri reagents (Sigma-Aldrich) and treated with DNase I (Sigma-Aldrich) following manufacturer's instructions. The quality and quantity of RNA were evaluated by the Agilent 2000 bioanalyzer and conserved at -80°C until use.

Proteins were extracted by a protein extraction buffer: 50mM Tris-HCl pH7.4, 5mM EDTA pH8, 0.5% Sodium Desoxycolate, 0.5% Triton and Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablet (Roche

Diagnostics), under agitation at 4°C; collected by centrifugation (12000 x g, 4°C, 20min), then quantified at absorbance A595 using the Bradford assay (Bio-Rad).

## 6. Gene mapping

A panel of 56 MITs polymorphic markers between FVB and C57BL/6J was used for a genome-wide linkage analysis as previously described by Magnol et al. (2011). PCR cycles were performed as following: 94°C for 5 min, 35 cycles of 94°C for 30 s, 55°C for 45 s, and 72°C for 45 s, and a final extension of 72°C for 5 min. A further fine mapping was performed by HRM technology (High-Resolution Melting ; Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions using 4 SNPs, then we identified *Phex* as a candidate gene in the reduced linkage region leading to the mutant phenotype using JAX informatics (<http://www.informatics.jax.org/marker>).

## 7. Mutation analysis

First-strand cDNA was synthesized from femur total RNA using the high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems). cDNA of *Phex* gene was sequenced with overlaps primers. The mutation was confirmed by direct sequencing of the region of interest from amplified genomic DNA of many mutant mice which are then genotyped by RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) assays. All primer sequences are available upon request. Mice are later classified as WT or mutant based on their tail length.

## 8. RFLP-PCR assays

DNA was amplified using UptiTherm DNA Polymerase (Uptima INTERCHIM) across intron 5 and exon 6 to encompass the mutation site using the forward primer 5'-GCTGGTCTGCCAATGAGTCCG-3' and the reverse primer 5'-CACAAGGTCTCTGCTTCCTGCAC-3'. PCR cycles were performed as follows: 94°C for 5 min, 35 cycles of 94°C for 30 s, 58°C for 30 s, and 72°C for 40 s, and a final extension of 72°C for 5 min. PCR products were digested separately with MspI (digest the mutant fragment) and AluI (digest the wild type fragment) restriction enzymes (Biolabs) for greater certainty. Digested fragments were separated by agarose gel 3% electrophoresis before image acquisition using a Gel Doc™ UV transilluminator (Bio-Rad). Digestions with MspI and AluI were made over night using 10 ml unpurified PCR products, 2 ml enzyme buffer and 1 ml restriction enzyme.

## 9. Real Time PCR

Quantitative real-time RT-PCR assays were performed in triplicate for each sample using 20 ng cDNAs prepared as described above and Taqman probes (Applied Biosystems) to study the expression of *Phex* (Taqman prob Mm00448119\_m1) in femur and kidney and other genes that



could vary according to it in femur : *Fgf23* (Taqman prob Mm00445621\_m1) ; *Mepe* (Matrix extracellular phosphoglycoprotein, Taqman probMm02525159\_s1); *Dmp1* (Taqman prob Mm01208363\_m1); *Sost* (Sclerostin, Taqman prob Mm04208528\_m1); *Bglap3* (Bone gamma-carboxyglutamate protein 3 from the superfamily of the osteocalcin, Taqman prob Mm00649782\_gH) ; and in kidney : *Slc34a1* (Solute carrier family 34 member 1 = type II sodium/phosphate Na-Pi IIa cotransporter, Taqman prob Mm00441450\_m1) . Two genes, *Dffa* (DNA fragmentation factor subunit alpha, Taqman probe Mm01257835\_m1) and *Gapdh* (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Taqman probe Mm99999915\_g1) were used as internal control for more accurate normalization of expression data; cDNAs were amplified using an ABI PRISM\_7900 system (Applied Biosystems) according to manufacturer's instructions. Relative Quantification (RQ) of mRNA expression values were calculated by the  $\Delta\Delta C_t$  method with normalization of each sample to the average change in cycle thresholds of controls using DataAssit v3.01.

## 10. Immunoblotting analyses

50 $\mu$ g of extracted proteins were separated under denaturing and reducing conditions on a 10% polyacrylamide gel and then transferred to a Hybond C-Extra Nitrocellulose membrane (GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom). Nonspecific antibody binding was prevented using blocking buffer for 1 hour at room temperature with 5% bovine serum albumin in Tris-buffered saline (TBS: 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.6) for anti- $\beta$ -ACTIN antibody (C-11; Santa Cruz Biotechnology) or with 5% non-fat dry milk in 0.1% Tween 20-TBS (TBST) for anti-PHEX antibody (H-176; Santa Cruz Biotechnology) , followed by the incubation with the specific primary antibodies overnight at 4°C. Anti- $\beta$ -ACTIN and anti-PHEX antibodies were used at a dilution 1/2000 in 0.05% TBST and 1/1000 in 0.01% TSBT, respectively. After 3 washes of 10 min each, blots were incubated for 1 h at room temperature with the dilution 1/1000 of the corresponding horseradish peroxidase (HRP)-coupled secondary antibody (Dako): Anti-goat IgG (P0449) in 0.05% TBST and anti-Rabbit (P0399) in 2.5% non-fat dry milk in 0.1% TBST for  $\beta$ -ACTIN and PHEX, respectively. After 3 more washes, immunoblots were revealed by enhanced chemiluminescence using BM Chemiluminescence Western blotting substrate (peroxidase [POD]) (Roche Applied Science) and exposed to a film (Hyperfilm ECL; GE Healthcare). All washes were done with 0.05% and 0.1% TBST for  $\beta$ -ACTIN and PHEX immunoblotting, respectively. Films were scanned using LabScan 5 software and the expression was quantified using ImageQuant TL v2005 software.

## Results

### *Generation and phenotyping of $Phex^{L222P}$ mouse line*

$Phex^{L222P}$  mice were identified in our ENU mutagenesis screen by their smaller body size (**figure 1a**), shortened tail and reduced plasma phosphorus levels in males and in females. Mutant females were bred with WT FVB males and mutant males were bred with WT FVB females, to produce several generations of mice on the FVB background, of which all mutant mice carry the same traits. The mutation induced  $Phex^{L222P}$  mice with a smaller body size conserved along the generations.  $Phex^{L222P}$  mice skeleton measurement of the skeletal preparation showed reduced length of most bones throughout the skeleton, for examples: shorter limbs including tibiae and femurs (**figure 1c**) with an increased femur diameter; shorter and smaller vertebrae, in particular the tail vertebrae resulting in a reduced tail length (**figure 1b**).

Analysis of plasma biochemistry in 8-week-old mice revealed that mutant males and females had significantly reduced plasma phosphate concentration ( $p < 0.001$ ) (**figure 2a**) in association with elevated alkaline phosphatase activity ( $p < 0.001$ ) (**figure 2b**) compared to WT mice. Calcium level is also reduced significantly in mutant males ( $p < 0.001$ ) and females ( $p < 0.5$ ) (**figure 2c**) compared to controls.

Histological analysis of mutant mice femur showed the increase of their diameter with an enlarged and disorganized epiphyseal growth plate due to increased hypertrophic zones compared to controls (**figure 3**). In addition osteocyte lacunae are randomly organized compared to those in controls (data not shown).

### *An ENU-Induced, X-Linked dominant mutation affecting the skeleton in $Phex^{L222P}/Y$ mice*

To establish the colony, we mated affected females with WT males and reciprocally, affected males with WT females. During this process it became apparent that although affected females gave rise to approximately equal numbers of affected and unaffected male and female progeny, affected males sired only unaffected male and affected female progeny, suggesting that the skeletal abnormality was inherited in an X-linked dominant trait. To verify the absence of any other mutation, the genetic mapping of affected mice confirmed that the mutation is located on the X-chromosome within a 3cM interval containing *Phex* gene as candidate. Sequencing of *Phex* cDNA identified a thymine to cytosine replacement (**figure 4a**) in the second base pair of exon 6 (c.665T>C) inducing a missense mutation at amino acid 222 (Leu222Pro) (**figure 4b**). This mutation generated a replacement of an AluI by an MspI restriction enzyme site at the genomic level, used to confirm that mutant male and female mice were hemizygous ( $Phex^{L222P}/Y$ ) and heterozygous ( $Phex^{L222P}/Phex$ ), respectively. The Leucine residue at L222 is highly conserved

across different species (**figure 4c**). To evaluate the consequence of the mutation, we performed PolyPhen analysis used for the prediction of functional effects of human nsSNPs (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml>). This mutation is predicted to be probably damaging with a score of 1.000 (sensitivity: 0.00; specificity: 1.00) (data not shown). The secondary structure prediction of PHEX protein using PSIPRED database (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) shows a  $\beta$  sheet secondary structure at this region for both WT and mutated protein (data not shown).

### *Effect of $Phex^{L222P}$ mutation on $Phex$ mRNA and protein expression, some femoral bone and kidney markers mRNA expression*

Results are limited to hemizygous males, to avoid heterozygosity in females. In the femurs of 3 months mutant males,  $Phex^{L222P}$  mRNA was highly expressed (35.5%) compared to that in WT femur (**figure 5a**), this augmentation was also observed at the protein level and confirmed by immunoblotting using anti-PHEX antibody (**figure 5c, d**). However,  $Fgf23$  mRNA expression was still significantly increased in mutant male femur (**figure 6a**). The analyses of some SIBLING and other matrix proteins mRNA expression level, showed significant increase of  $Dmp1$  (**figure 6b**) and  $Mepe$  (**figure 6c**) mRNA expression in mutant male femurs compared to controls whereas  $Bglap3$  expression level reflecting osteocalcin expression (**figure 6d**) was slightly but not significantly increased.  $Sost$  expression was not significantly affected (**figure 6e**). In addition, mutant male kidneys (**figure 6f**) show a slight but not significant decrease in the expression of  $Na-Pi IIa$  cotransporter.

## **Discussion**

ENU mutagenesis is particularly a valuable methodology to recover an allelic series of point mutations for any gene enabling a more acute analysis of gene function (Graw et al. 2004; Quwailid et al. 2004; Augustin et al. 2005; Sachs et al. 2007; Gondo 2009; Gondo 2010; Kim et al. 2013; El Hakam Kamareddin et al. 2015). Mutant mice generated by our ENU mutagenized screen present a short body size, a hypophosphatemia with a consistent hypocalcemia and an increased ALP plasma level. Mutants are found to carry a L222P mutation in the  $Phex$  gene located on X chromosome. The same mutation is detected in one patient for XLH (Gaucher et al. 2009). Normal phosphate, calcium and ALP levels are necessary for bone formation, growth and mineralization. This dwarfism reflects the reduced bones length throughout mutants body and so a growth retardation. The increase thickness of femur growth plate due to increased hypertrophic chondrocyte zones compared to controls could be caused by the decrease in hypertrophic chondrocyte apoptosis compared to controls (Sabbagh et al. 2005) and thought to be secondary to rickets (Drezner 2000).

In mouse models, loss of PHEX function or increased FGF-23 production causes hypophosphatemia and decreased renal Pi reabsorption, secondary to the decreased abundance of the brush border membrane (BBM) associated Na/Pi cotransporter proteins (Tenenhouse and Murer 2003; Segawa et al. 2003; Tenenhouse 2005; Razzaque 2014). In addition, PHEX absence or loss of function induces an indirect increase of FGF23 in *Hyp* and *Jrt* (Liu et al. 2003; Liu et al. 2006; Owen et al. 2012) which inhibits mineralization indirectly through its effect on serum phosphorus levels via kidney function. Overexpression of FGF23 has been shown to directly inhibit the mineralization in rat calvaria cell culture (Wang et al. 2008) and a FGF23 treatment of primary calvarial osteoblast cultures from WT mice or from the osteoblastic MC3T3-E1 cell line leads to an inhibition of mineralization (Sitara et al. 2008; Shalhoub et al. 2011). In *Phex*<sup>L222P</sup> mice, an increasing *Fgf23* mRNA expression is observed, with a slight but not significant decrease in Na-Pi IIa cotransporter mRNA expression level which could be an indirect cause of hypophosphatemia and so could induce a probable mineralisation defect. Hypophosphatemia alone is insufficient to explain the bone defect seen in the *Hyp* mouse as correction of the hypophosphatemia failed to correct the mineralization defect observed (Rowe et al. 2006).

Another protein, MEPE, regulates bone mineralization. MEPE null osteoblasts in culture show a dramatically increase of the mineral apposition rate (MAR) (Gowen et al. 2003), however the overexpression of MEPE in mice, leads to a growth and mineralization defect, due to a decrease in bone remodeling. Mice overexpressing MEPE display wider epiphyseal growth plates, and expanded primary spongiosa and a significant decrease in the MAR (David et al. 2009). MEPE activity is dependent upon ASARM peptide cleavage product as MEPE-ASARM peptides inhibit mineralization both in vivo and in vitro (Rowe 2004; Rowe et al. 2005; Addison et al. 2008). Expression of *Mepe* has been shown to be elevated in *Hyp* osteoblasts (Argiro et al. 2001), *Jrt* bone (Owen et al. 2012) and it is similarly elevated in *Phex*<sup>L222P</sup> mice.

In *Phex*<sup>L222P</sup> mice, as in *Hyp*, *Dmp1* mRNA expression increases. DMP1 native form inhibits mineralization, but when cleaved into the N-terminal and C-terminal portion by bone morphogenetic protein-1(BMP-1)/Tolloid-like proteinases or when it is dephosphorylated, DMP1 initiates mineralization (Steiglitz et al. 2004; Tartaix et al. 2004). PHEX is proposed to interact with DMP1 by binding to the DMP1-ASARM motif located at the C-terminal region of DMP1. The PHEX-DMP1 binding initiates a signaling pathway that reduces FGF23 expression and induces mineralization of the growth plate of ossification zone (Maciejewska et al. 2009; Zhang et al. 2010; David et al. 2011). However, DMP1 N-terminal fragment localized at the resting, proliferation and pre-hypertrophic zones was demonstrated as biomineralization inhibitor in *Hyp* mice (Maciejewska et al. 2009; Zhang et al. 2010).

*Ocn* and *Sost* are involved in bone mineralization and their expressions are elevated in *hyp* mice (Gundberg et al. 1992; Carpenter and Gundberg 1996; Onishi et al. 2005; Atkins et al. 2011) but not in *Phex*<sup>L222P</sup> mice.

In contrast to other mouse model, *Phex*<sup>L222P</sup> expression (mRNA and protein) is increased in this mutant mice with a replacement of Leucine (with a branched side chain) by a proline (with side chain) which most probably change protein conformation. This augmentation of PHEX<sup>L222P</sup> expression induces almost the same phenotypes observed in other XLH mouse models (The HYP Consortium 1995; Carpinelli et al. 2002; Lorenz-Depiereux et al. 2004; Owen et al. 2012; Sabrautzki et al. 2012) which means that PHEX has probably lost its function although its increased expression. This could be the result of a protein trafficking or endopeptidase activity problem.

## Conclusion

*Phex*<sup>L222P</sup> mouse is a new ENU mouse model for XLH disease due to Leu to Pro amino acid modification at position 222. *Phex*<sup>L222P</sup> mouse is characterized by growth retardation, hypophosphatemia, hypocalcemia, reduced body bone length, increased epiphyseal growth plate thickness and femur diameter, although the increase of PHEX<sup>L222P</sup> expression. Actually, *Phex*<sup>L222P</sup> mice show an increase in *Fgf23*, *Dmp1*, and *Mepe* and *Na-Pi Ila cofactor* expression similar to those observed in *Hyp* mice. Femoral osteocalcin and sclerostin, and Na-Pi Ila renal cotransporter do not show any significant variation in *Phex*<sup>L222P</sup> mice. This model could be a valuable addition to the existing XLH model, for further comprehension of the disease occurrence and testing new therapies.

## References

- Addison WN, Masica DL, Gray JJ, McKee MD (2010) Phosphorylation-dependent inhibition of mineralization by osteopontin ASARM peptides is regulated by PHEX cleavage. *J Bone Miner Res* 25:695–705. doi: 10.1359/jbmr.090832
- Addison WN, Nakano Y, Loisel T, et al (2008) MEPE-ASARM Peptides Control Extracellular Matrix Mineralization by Binding to Hydroxyapatite: An Inhibition Regulated by PHEX Cleavage of ASARM. *J Bone Miner Res* 23:1638–1649. doi: 10.1359/jbmr.080601
- Argiro L, Desbarats M, Glorieux FH, Ecarot B (2001) Mepe, the gene encoding a tumor-secreted protein in oncogenic hypophosphatemic osteomalacia, is expressed in bone. *Genomics* 74:342–351. doi: 10.1006/geno.2001.6553
- Atkins GJ, Rowe PS, Lim HP, et al (2011) Sclerostin Is a Locally Acting Regulator of Late-Osteoblast/Preosteocyte Differentiation and Regulates Mineralization Through a MEPE-ASARM-Dependent Mechanism. *J Bone Miner Res* 26:1425–1436. doi: 10.1002/jbmr.345

- Augustin M, Sedlmeier R, Peters T, et al (2005) Efficient and fast targeted production of murine models based on ENU mutagenesis. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* 16:405–413. doi: 10.1007/s00335-004-3028-2
- Barros NM, Hoac B, Neves RL, et al (2013) Proteolytic processing of osteopontin by PHEX and accumulation of osteopontin fragments in Hyp mouse bone, the murine model of X-linked hypophosphatemia. *J Bone Miner Res* 28:688–699. doi: 10.1002/jbmr.1766
- Beck-Nielsen SS, Brock-Jacobsen B, Gram J, et al (2009) Incidence and prevalence of nutritional and hereditary rickets in southern Denmark. *Eur J Endocrinol Eur Fed Endocr Soc* 160:491–497. doi: 10.1530/EJE-08-0818
- Benet-Pagès A, Lorenz-Depiereux B, Zischka H, et al (2004) FGF23 is processed by proprotein convertases but not by PHEX. *Bone* 35:455–462. doi: 10.1016/j.bone.2004.04.002
- Boukpepsi T, Gaucher C, Léger T, et al (2010) Abnormal Presence of the Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein-Derived Acidic Serine- and Aspartate-Rich Motif Peptide in Human Hypophosphatemic Dentin. *Am J Pathol* 177:803–812. doi: 10.2353/ajpath.2010.091231
- Bowe AE, Finnegan R, Jan de Beur SM, et al (2001) FGF-23 inhibits renal tubular phosphate transport and is a PHEX substrate. *Biochem Biophys Res Commun* 284:977–981. doi: 10.1006/bbrc.2001.5084
- Carpenter TO, Gundberg CM (1996) Osteocalcin abnormalities in Hyp mice reflect altered genetic expression and are not due to altered clearance, affinity for mineral, or ambient phosphorus levels. *Endocrinology* 137:5213–5219. doi: 10.1210/endo.137.12.8940337
- Carpinelli MR, Wicks IP, Sims NA, et al (2002) An ethyl-nitrosourea-induced point mutation in phex causes exon skipping, x-linked hypophosphatemia, and rickets. *Am J Pathol* 161:1925–1933. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64468-9
- David V, Martin A, Hedge A-M, et al (2011) ASARM peptides: PHEX-dependent and -independent regulation of serum phosphate. *Am J Physiol Renal Physiol* 300:F783–791. doi: 10.1152/ajprenal.00304.2010
- David V, Martin A, Hedge A-M, Rowe PSN (2009) Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) is a new bone renal hormone and vascularization modulator. *Endocrinology* 150:4012–4023. doi: 10.1210/en.2009-0216
- Drezner MK (2000) PHEX gene and hypophosphatemia. *Kidney Int* 57:9–18. doi: 10.1046/j.1523-1755.2000.00807.x
- El Hakam Kamareddin C, Magnol L, Blanquet V (2015) A new Otogelin ENU mouse model for autosomal-recessive nonsyndromic moderate hearing impairment. *SpringerPlus* 4:730. doi: 10.1186/s40064-015-1537-y
- Ferron M, Lacombe J (2014) Regulation of energy metabolism by the skeleton: Osteocalcin and beyond. *Arch Biochem Biophys* 561:137–146. doi: 10.1016/j.abb.2014.05.022

- Fisher LW, Fedarko NS (2003) Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins. *Connect Tissue Res* 44 Suppl 1:33–40.
- Francis F, Strom TM, Hennig S, et al (1997) Genomic organization of the human PEX gene mutated in X-linked dominant hypophosphatemic rickets. *Genome Res* 7:573–585.
- Gaucher C, Walrant-Debray O, Nguyen T-M, et al (2009) PHEX analysis in 118 pedigrees reveals new genetic clues in hypophosphatemic rickets. *Hum Genet* 125:401–411. doi: 10.1007/s00439-009-0631-z
- Gondo Y (2009) Next-generation gene targeting in the mouse for functional genomics. *BMB reports* 42:315–323.
- Gondo Y (2010) Now and future of mouse mutagenesis for human disease models. *J Genet Genomics* 37:559–572. doi: 10.1016/S1673-8527(09)60076-X
- Gonzalez CD, Meyer RA, Iorio RJ (1992) Craniometric measurements of craniofacial malformations in the X-linked hypophosphatemic (Hyp) mouse on two different genetic backgrounds: C57BL/6J and B6C3H. *Teratology* 46:605–613. doi: 10.1002/tera.1420460610
- Gowen LC, Petersen DN, Mansolf AL, et al (2003) Targeted disruption of the osteoblast/osteocyte factor 45 gene (OF45) results in increased bone formation and bone mass. *J Biol Chem* 278:1998–2007. doi: 10.1074/jbc.M203250200
- Graw J, Neuhäuser-Klaus A, Klopp N, et al (2004) Genetic and allelic heterogeneity of Cryg mutations in eight distinct forms of dominant cataract in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:1202–1213.
- Grieff M, Mumm S, Waeltz P, et al (1997) Expression and Cloning of the Human X-Linked Hypophosphatemia Gene cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 231:635–639. doi: 10.1006/bbrc.1997.6153
- Gundberg CM, Clough ME, Carpenter TO (1992) Development and validation of a radioimmunoassay for mouse osteocalcin: paradoxical response in the Hyp mouse. *Endocrinology* 130:1909–1915. doi: 10.1210/endo.130.4.1547718
- Guo R, Quarles LD (1997) Cloning and sequencing of human PEX from a bone cDNA library: evidence for its developmental stage-specific regulation in osteoblasts. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 12:1009–1017. doi: 10.1359/jbmr.1997.12.7.1009
- Ichikawa S, Traxler EA, Estwick SA, et al (2008) Mutational Survey of the PHEX Gene in Patients with X-linked Hypophosphatemic Rickets. *Bone* 43:663–666. doi: 10.1016/j.bone.2008.06.002
- Jiang X, Kalajzic Z, Maye P, et al (2005) Histological Analysis of GFP Expression in Murine Bone. *J Histochem Cytochem* 53:593–602. doi: 10.1369/jhc.4A6401.2005
- Karsenty G, Oury F (2014) Regulation of male fertility by the bone-derived hormone osteocalcin. *Mol Cell Endocrinol* 382:521–526. doi: 10.1016/j.mce.2013.10.008



- Karunaratne A, Esapa CR, Hiller J, et al (2012) Significant deterioration in nanomechanical quality occurs through incomplete extrafibrillar mineralization in rachitic bone: evidence from in-situ synchrotron X-ray scattering and backscattered electron imaging. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 27:876–890. doi: 10.1002/jbmr.1495
- Kim BJ, Zaveri HP, Shchelochkov OA, et al (2013) An allelic series of mice reveals a role for RERE in the development of multiple organs affected in chromosome 1p36 deletions. *PLoS One* 8:e57460. doi: 10.1371/journal.pone.0057460
- Liu S, Guo R, Simpson LG, et al (2003) Regulation of fibroblastic growth factor 23 expression but not degradation by PHEX. *J Biol Chem* 278:37419–37426. doi: 10.1074/jbc.M304544200
- Liu S, Guo R, Tu Q, Quarles LD (2002) Overexpression of Phex in osteoblasts fails to rescue the Hyp mouse phenotype. *J Biol Chem* 277:3686–3697. doi: 10.1074/jbc.M107707200
- Liu S, Zhou J, Tang W, et al (2006) Pathogenic role of Fgf23 in Hyp mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291:E38–49. doi: 10.1152/ajpendo.00008.2006
- Lorenz-Depiereux B, Guido VE, Johnson KR, et al (2004) New intragenic deletions in the Phex gene clarify X-linked hypophosphatemia-related abnormalities in mice. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* 15:151–161.
- Maciejewska I, Qin D, Huang B, et al (2009) Distinct compartmentalization of dentin matrix protein 1 fragments in mineralized tissues and cells. *Cells Tissues Organs* 189:186–191. doi: 10.1159/000151372
- Magnol L, Monestier O, Vuillier-Devillers K, et al (2011) A sensitised mutagenesis screen in the mouse to explore the bovine genome: study of muscle characteristics. *animal* 5:663–671. doi: 10.1017/S1751731110002405
- Makras P, Hamdy NAT, Kant SG, Papapoulos SE (2008) Normal growth and muscle dysfunction in X-linked hypophosphatemic rickets associated with a novel mutation in the PHEX gene. *J Clin Endocrinol Metab* 93:1386–1389. doi: 10.1210/jc.2007-1296
- Megerian CA, Semaan MT, Aftab S, et al (2008) A mouse model with postnatal endolymphatic hydrops and hearing loss. *Hear Res* 237:90–105. doi: 10.1016/j.heares.2008.01.002
- Meyer RA Jr, Young CG, Meyer MH, et al (2000) Effect of age on the expression of Pex (Phex) in the mouse. *Calcif Tissue Int* 66:282–287.
- Morey M, Castro-Feijóo L, Barreiro J, et al (2011) Genetic diagnosis of X-linked dominant hypophosphatemic rickets in a cohort study: Tubular reabsorption of phosphate and 1,25(OH)<sub>2</sub>D serum levels are associated with PHEX mutation type. *BMC Med Genet* 12:116. doi: 10.1186/1471-2350-12-116
- Moriyama K, Hanai A, Mekada K, et al (2011) Kbus/ldr, a mutant mouse strain with skeletal abnormalities and hypophosphatemia: Identification as an allele of “Hyp.” *J Biomed Sci* 18:60. doi: 10.1186/1423-0127-18-60

- Murayama T, Iwatsubo R, Akiyama S, et al (2000) Familial hypophosphatemic vitamin D-resistant rickets: dental findings and histologic study of teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 90:310–316. doi: 10.1067/moe.2000.107522
- Onishi T, Ogawa T, Hayashibara T, et al (2005) Hyper-expression of osteocalcin mRNA in odontoblasts of Hyp mice. *J Dent Res* 84:84–88.
- Oury F, Khrimian L, Denny CA, et al (2013) Maternal and Offspring Pools of Osteocalcin Influence Brain Development and Functions. *Cell* 155:228–241. doi: 10.1016/j.cell.2013.08.042
- Oury F, Sumara G, Sumara O, et al (2011) Endocrine Regulation of Male Fertility by the Skeleton. *Cell* 144:796–809. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.004
- Owen C, Chen F, Flenniken AM, et al (2012) A novel Phex mutation in a new mouse model of hypophosphatemic rickets. *J Cell Biochem* 113:2432–2441. doi: 10.1002/jcb.24115
- Quwailid MM, Hugill A, Dear N, et al (2004) A gene-driven ENU-based approach to generating an allelic series in any gene. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* 15:585–591. doi: 10.1007/s00335-004-2379-z
- Razzaque MS (2014) Bone–kidney axis in systemic phosphate turnover. *Arch Biochem Biophys* 561:154–158. doi: 10.1016/j.abb.2014.06.031
- Rowe PSN (2004) The Wrickkened Pathways Of FGF23, MEPE and PHEX. *Crit Rev Oral Biol Med* 15:264–281.
- Rowe PSN, Garrett IR, Schwarz PM, et al (2005) Surface plasmon resonance (SPR) confirms that MEPE binds to PHEX via the MEPE-ASARM motif: a model for impaired mineralization in X-linked rickets (HYP). *Bone* 36:33–46. doi: 10.1016/j.bone.2004.09.015
- Rowe PSN, Matsumoto N, Jo OD, et al (2006) Correction of the mineralization defect in hyp mice treated with protease inhibitors CA074 and pepstatin. *Bone* 39:773–786. doi: 10.1016/j.bone.2006.04.012
- Ruchon AF, Marcinkiewicz M, Siegfried G, et al (1998) Pex mRNA is localized in developing mouse osteoblasts and odontoblasts. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc* 46:459–468.
- Sabbagh Y, Boileau G, Campos M, et al (2003) Structure and function of disease-causing missense mutations in the PHEX gene. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2213–2222. doi: 10.1210/jc.2002-021809
- Sabbagh Y, Boileau G, DesGroseillers L, Tenenhouse HS (2001) Disease-causing missense mutations in the PHEX gene interfere with membrane targeting of the recombinant protein. *Hum Mol Genet* 10:1539–1546.
- Sabbagh Y, Carpenter TO, Demay MB (2005) Hypophosphatemia leads to rickets by impairing caspase-mediated apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9637–9642. doi: 10.1073/pnas.0502249102

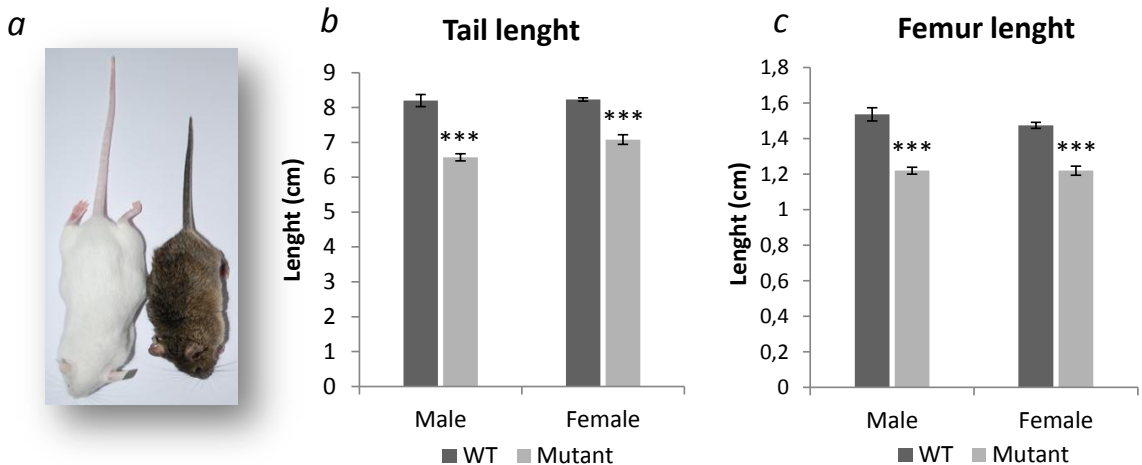
- Sabbagh Y, Jones AO, Tenenhouse HS (2000) PHEXdb, a locus-specific database for mutations causing X-linked hypophosphatemia. *Hum Mutat* 16:1–6. doi: 10.1002/1098-1004(200007)16:1<1::AID-HUMU1>3.0.CO;2-J
- Sabrautzki S, Rubio-Aliaga I, Hans W, et al (2012) New mouse models for metabolic bone diseases generated by genome-wide ENU mutagenesis. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* 23:416–430. doi: 10.1007/s00335-012-9397-z
- Sachs AJ, Schwendinger JK, Yang AW, et al (2007) The mouse mutants recoil wobbler and nmf373 represent a series of *Grm1* mutations. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* 18:749–756. doi: 10.1007/s00335-007-9064-y
- Santos F, Fuente R, Mejia N, et al (2013) Hypophosphatemia and growth. *Pediatr Nephrol Berl Ger* 28:595–603. doi: 10.1007/s00467-012-2364-9
- Segawa H, Kawakami E, Kaneko I, et al (2003) Effect of hydrolysis-resistant FGF23-R179Q on dietary phosphate regulation of the renal type-II Na/Pi transporter. *Pflüg Arch Eur J Physiol* 446:585–592. doi: 10.1007/s00424-003-1084-1
- Shalhoub V, Ward SC, Sun B, et al (2011) Fibroblast growth factor 23 (FGF23) and alpha-klotho stimulate osteoblastic MC3T3.E1 cell proliferation and inhibit mineralization. *Calcif Tissue Int* 89:140–150. doi: 10.1007/s00223-011-9501-5
- Sitara D, Kim S, Razzaque MS, et al (2008) Genetic evidence of serum phosphate-independent functions of FGF-23 on bone. *PLoS Genet* 4:e1000154. doi: 10.1371/journal.pgen.1000154
- Steiglitz BM, Ayala M, Narayanan K, et al (2004) Bone morphogenetic protein-1/Tolloid-like proteinases process dentin matrix protein-1. *J Biol Chem* 279:980–986. doi: 10.1074/jbc.M310179200
- Strom TM, Francis F, Lorenz B, et al (1997) Pex gene deletions in Gy and Hyp mice provide mouse models for X-linked hypophosphatemia. *Hum Mol Genet* 6:165–171.
- Tartaix PH, Doulaverakis M, George A, et al (2004) In vitro effects of dentin matrix protein-1 on hydroxyapatite formation provide insights into in vivo functions. *J Biol Chem* 279:18115–18120. doi: 10.1074/jbc.M314114200
- Tenenhouse HS (2005) Regulation of phosphorus homeostasis by the type iia na/phosphate cotransporter. *Annu Rev Nutr* 25:197–214. doi: 10.1146/annurev.nutr.25.050304.092642
- Tenenhouse HS (1999) X-linked hypophosphataemia: a homologous disorder in humans and mice. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc* 14:333–341.
- Tenenhouse HS, Murer H (2003) Disorders of renal tubular phosphate transport. *J Am Soc Nephrol JASN* 14:240–248.
- Tenenhouse HS, Werner A, Biber J, et al (1994) Renal Na(+)-phosphate cotransport in murine X-linked hypophosphatemic rickets. Molecular characterization. *J Clin Invest* 93:671–676. doi: 10.1172/JCI117019

The HYP Consortium (1995) A gene (PEX) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with X-linked hypophosphatemic rickets. *Nat Genet* 11:130–136. doi: 10.1038/ng1095-130

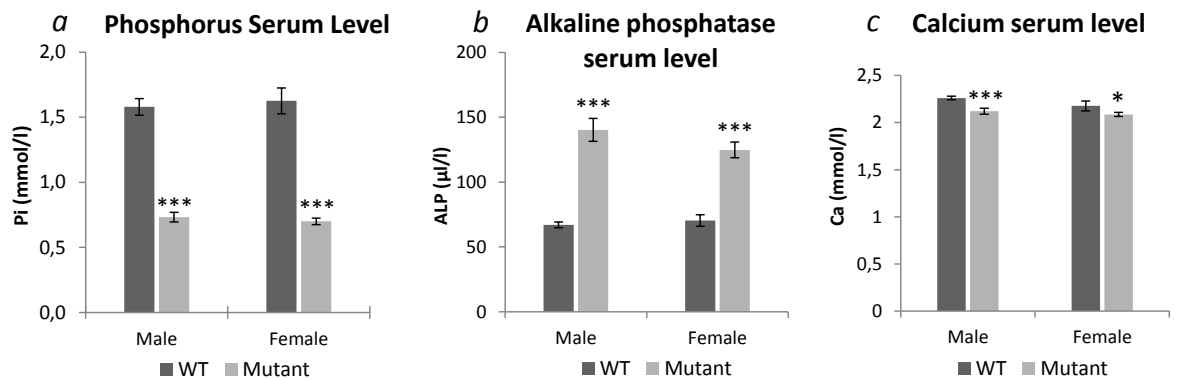
Wang H, Yoshiko Y, Yamamoto R, et al (2008) Overexpression of fibroblast growth factor 23 suppresses osteoblast differentiation and matrix mineralization in vitro. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 23:939–948. doi: 10.1359/jbmr.080220

Yamazaki Y, Okazaki R, Shibata M, et al (2002) Increased circulatory level of biologically active full-length FGF-23 in patients with hypophosphatemic rickets/osteomalacia. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4957–4960. doi: 10.1210/jc.2002-021105

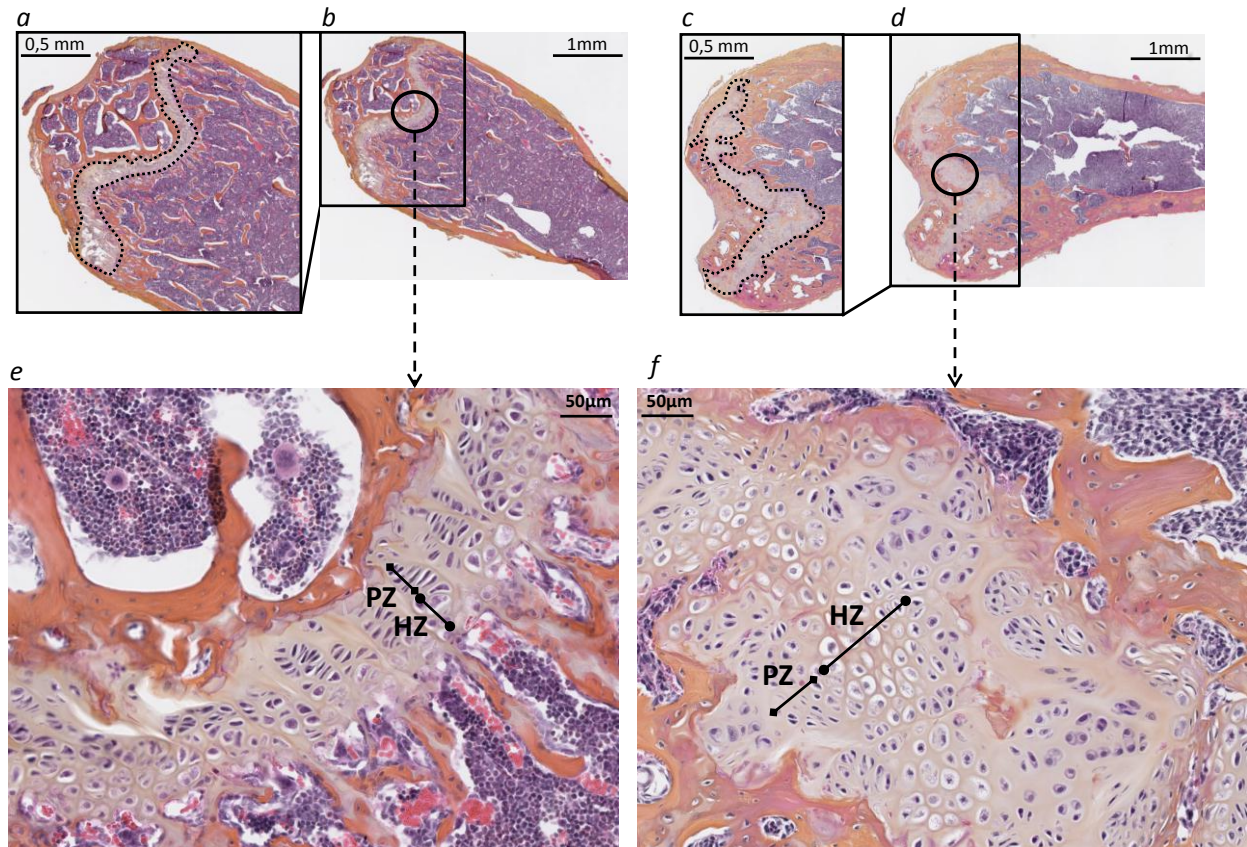
Zhang B, Sun Y, Chen L, et al (2010) Expression and distribution of SIBLING proteins in the predentin/dentin and mandible of hyp mice. *Oral Dis* 16:453–464. doi: 10.1111/j.1601-0825.2010.01656.x



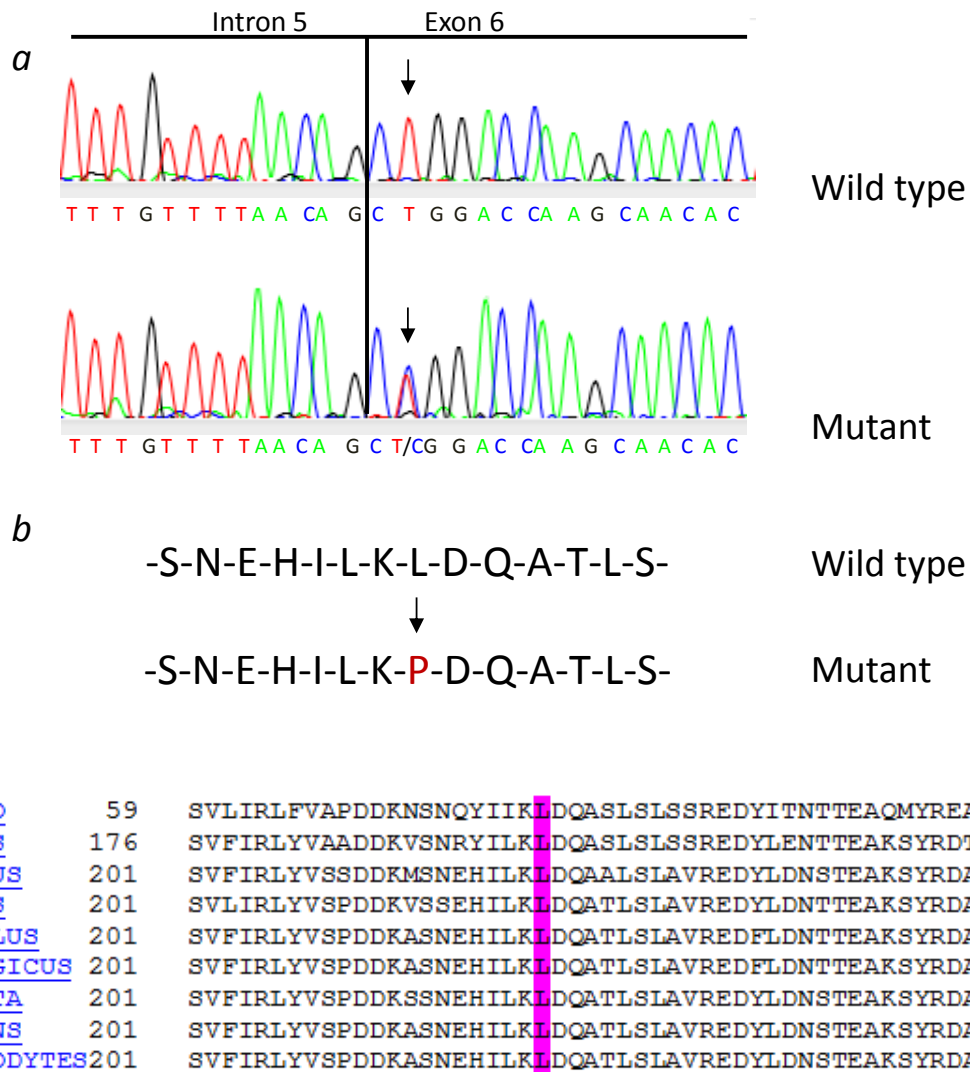
**Figure 1: Whole animal and skeletal characteristics of *Phex*<sup>L222P</sup> versus WT mice.** (a) *Phex*<sup>L222P</sup> (right) mice are smaller and have shorter body size than their WT littermates (left). Tail (b) and femoral (c) lengths of age-matched (3 months), sex-matched mutant (light grey bars) and WT (dark grey bars) mice. Error bars indicates standard deviation. Mutant male are hemizygous (*Phex*<sup>L222P</sup>/Y) and mutant female are heterozygous (*Phex*<sup>L222P</sup>/*Phex*). One-way ANOVA test was used to compute p-values, significance was indicated with asterisks (\*\*\*)P-value <0.001).



**Figure 2: Plasma biochemical analysis of mutant and WT mice.** Phosphorus [Pi mmol/l] (a), Alkaline Phosphatase [ALP U/l] (b) and Calcium [Ca mmol/l] (c) plasma level of sex-matched mutant (light grey bars) and WT (dark grey bars) mice. Mutant male are hemizygous (*Phex*<sup>L222P</sup>/Y) and mutant female are heterozygous (*Phex*<sup>L222P</sup>/*Phex*). Error bars indicates standard deviation. One-way ANOVA test was used to compute p-values, significance was indicated with asterisks (\*P-value <0.05; \*\*\*P-value <0.001).

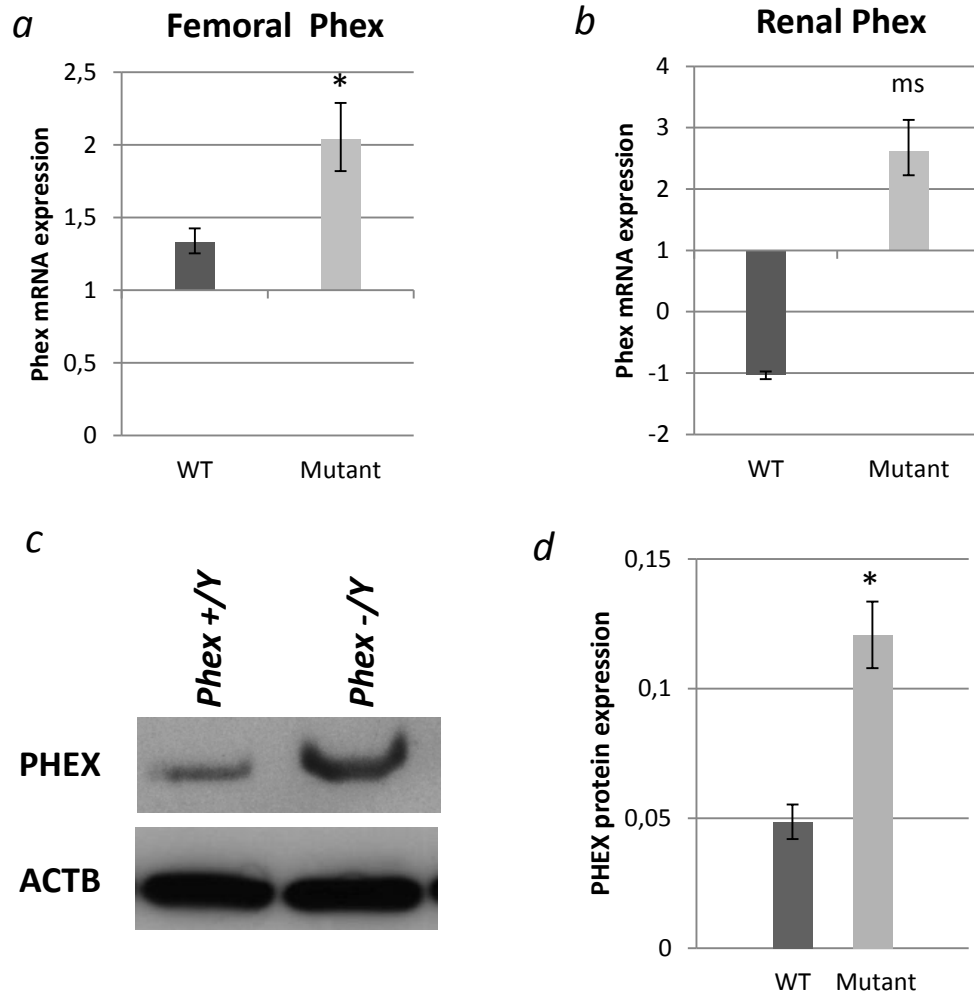


**Figure 3: Distal femur histology of *Phex*<sup>L222P</sup> and WT mice.** The Cross-section of the distal femurs of mutant males (*Phex*<sup>L222P</sup>/Y) (c,d) compared to littermate (*Phex*/Y) controls (a,b), at 3 months of age. The growth plate is outlined in the magnifications (a,c) of the boxed area (b,d) . e and c are a magnification of the circled area in b and d, respectively. Scale bars are presented on the figure. PZ: Proliferative Zone, HZ: Hypertrophic Zones

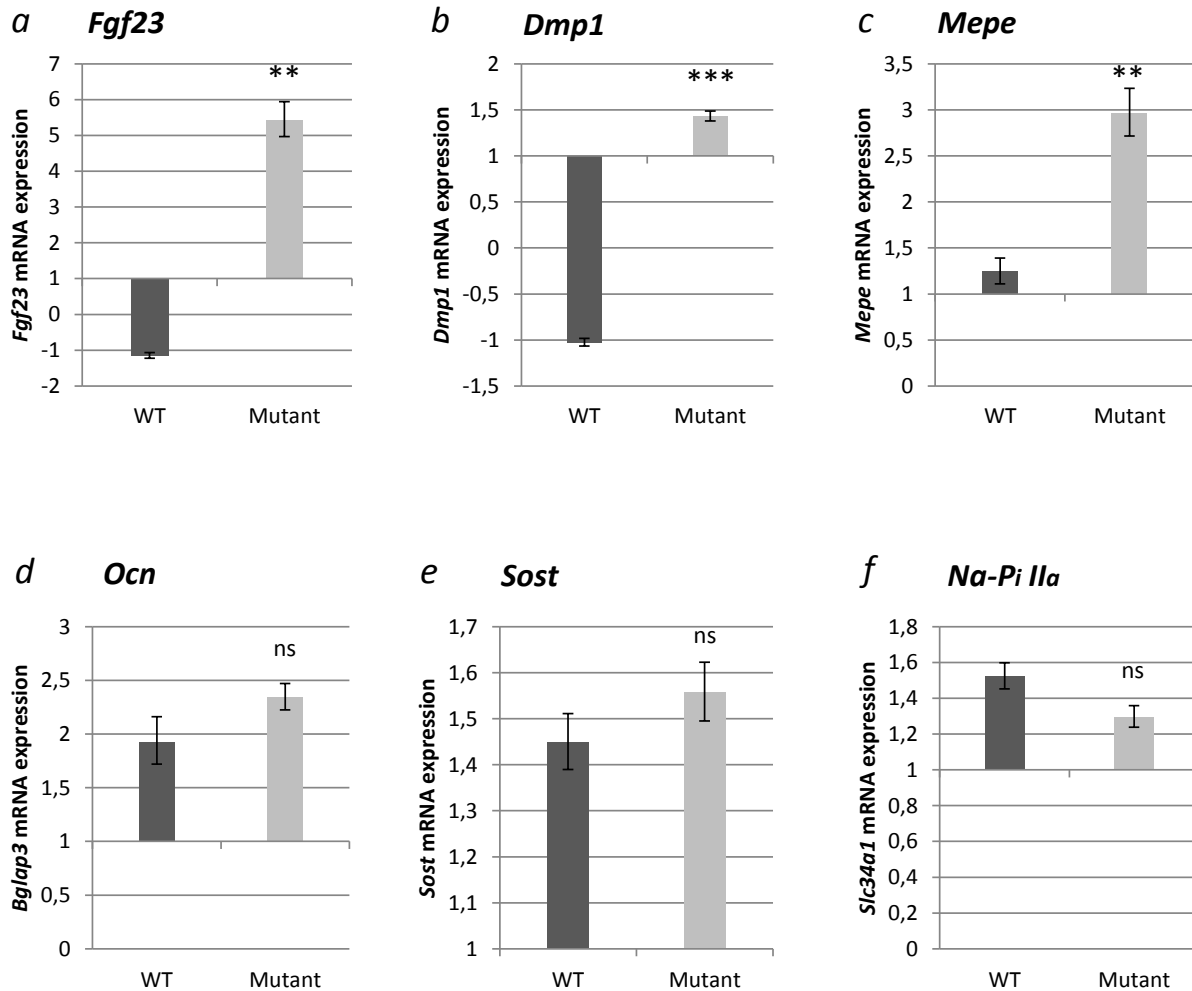


**Figure 4: Sequence analysis spanning *Phex*<sup>L222P</sup> mutation site in a female.** (a) Sequence chromatograph of the *Phex* gene at the level of the splicing site intron5/exon6 showing the T > C transition (arrows) with the corresponding amino acid sequence (b). (b) The resulting PHEX amino acids sequence with the changed amino acid coloured in red. (c) Partial protein alignment of PHEX gene from different species around the mutation position (amino acid 222 in mice) executed with Homologene database. The Leucine residue at position 222, colored in magenta, is highly conserved between the species.



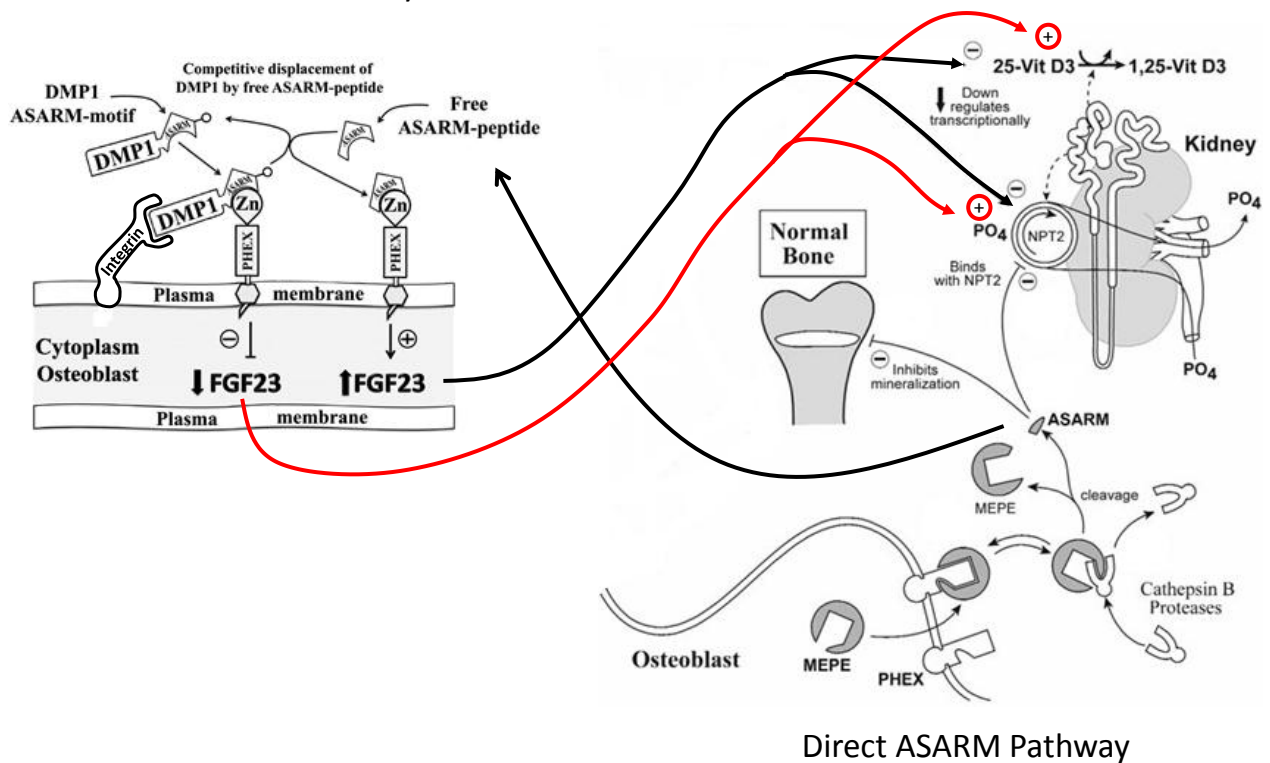


**Figure 5: *Phex* mRNA and protein expression.** A comparison between mutant (light grey bars) and WT (dark grey bars) femoral (a) and renal (b) *Phex* mRNA expression. (c) Immunoblot analysis of proteins from hemizygous mutant male femurs (*Phex*<sup>L222P</sup>/Y) and WT (*Phex*/Y) littermate using anti-PHEX antibody (c - top) and anti-β-ACTIN antibody (c - bottom). (d) Semi-quantification of PHEX expression after normalisation using anti-β-ACTIN antibody. Samples were taken from male age-matched (3 months old) mutated hemizygous (*Phex*<sup>L222P</sup>/Y) and WT (*Phex*/Y) mice femur. Error bars indicates standard deviation. One-way ANOVA test was used to compute *p*-value, significance was indicated with asterisks (\**P*-value <0.05; n=3 for each groupe), ms: marginally significant (*P*-value<0.07)



**Figure 6: mRNA expression of femoral bone markers and renal type IIa Sodium/Phosphate cotransporter.** A comparison between mutant (light grey bars) and WT (dark grey bars) femoral *Fgf23* (a), *Ocn* (d), and *Sost* (e) mRNA expression as well as SIBLINGS *Dmp1* (b) and *Mepe* (c) and the renal Na-Pi IIa cotransporter (f) mRNA expression level are shown. Samples were taken from male age-matched (3 months old) mutated hemizygous (*Phex*<sup>L222P</sup>/Y) and WT (*Phex*/Y) males. Error bars indicates standard deviation. One-way ANOVA test was used to compute p-values, significance was indicated with asterisks (\*P-value <0.05, \*\*P-value<0.01, and \*\*\*P-value<0.001; n >3 in each group); n.s.: not significant

## Indirect ASARM Pathway



**Figure 7: Predicted ASARM pathway in PHEX regulation of bone mineral and renal phosphate reabsorption.** Phosphorylation of DMP1-ASARM motif is requisite for the formation of a PHEX/DMP1/ $\alpha 5\beta 3$ -integrin complex on the surface of osteocytes or osteoblasts. This induces a down regulation of FGF23 and affects, in turn, renal PO<sub>4</sub> handling by increasing renal NPT2 (Na-Pi IIa renal cotransporter) and 1 $\alpha$  hydroxylase expression. 1 $\alpha$  hydroxylase is necessary for the transformation of 25-Vitamin D3 to its active form (1.25-Vit D3). PHEX also sequesters and, thus, transiently protects MEPE from extracellular-matrix Cathepsin B protease which cleaves MEPE and releases a free ASARM peptide. Free ASARM peptide could directly inhibit bone mineralization, by reducing renal phosphate reabsorption through a direct reduction of NPT2 expression or indirectly through the increasing of FGF23 expression by binding to PHEX. Thus, FGF23 increased level will decrease NPT2 and 1 $\alpha$  hydroxylase expression. Modified from Rowe 2004; David et al. 2011

## IV. Conclusion de l'analyse des souris GMA24

Les souris GMA24 que nous désignons *Phex*<sup>L222P</sup> depuis leur caractérisation plus fine, constituent un nouveau modèle ENU pour la maladie XLH. L'ENU a induit la transition d'une thymine en cystéine en position 665 (c.665 T>C) de l'ADNc de *Phex* qui se traduit par un remplacement de la leucine par une proline en position 222 (L222P) de la chaîne d'acides aminés. Les souris *Phex*<sup>L222P</sup> présentent un retard de croissance, une hypophosphatémie, une hypocalcémie, une diminution de la longueur des os du corps, une augmentation de l'épaisseur de la plaque de croissance épiphysaire et du diamètre du fémur. Bien que cette mutation de *Phex* induise une augmentation de son expression, les souris *Phex*<sup>L222P</sup> montrent toujours une augmentation des transcrits de *Fgf23*, *Dmp1*, et *Mepe* similaire à celle observée chez les souris *Hyp*, ce qui suggère la perte de fonction de PHEX due soit à un problème d'adressage de la protéine à la membrane cytoplasmique, ou des défauts de son activité enzymatique. Des tests d'expression et de localisation de PHEX<sup>L222P</sup> *in vitro* dans des cellules HEK 293 et MC3T3 (préostéoblastes dérivés de la voûte crânienne murine) sont en cours pour vérifier l'effet de la mutation sur la protéine. Il sera aussi intéressant d'étudier son effet sur la minéralisation osseuse soit par coloration von Kossa ou Trichrome sur des coupes d'os non déminéralisés, soit *in vitro* sur des cultures de MC3T3 ou à l'aide d'un pDEXA qui permet de mesurer la densité osseuse directement sur l'animal. La lignée *Phex*<sup>L222P</sup> constitue un précieux modèle qui peut s'ajouter aux modèles de la maladie XLH déjà existants, pour mieux appréhender les interactions de PHEX dans la maladie et de tester de nouvelles thérapies.

Comme notre crible de départ est sensibilisé pour *Gdf8*, on poursuivra l'étude des interactions entre *Phex* et *Gdf8*. En effet, des études chez la souris ont montré une augmentation du contenu et de la densité minérale de l'os en absence de la myostatine (Hamrick et al. 2002; Elkasrawy and Hamrick 2010). Dans notre étude, nous avons observé que les souris *Phex*<sup>L222P</sup> sous fond génétique *Gdf8*<sup>-/-</sup> présentent un retard de croissance plus marqué avec des os encore plus courts, comparées aux souris avec la mutation *Phex*<sup>L222P</sup> seule. De plus, une étude en 2008 associe pour la première fois une liaison entre différents polymorphismes de la myostatine et la variation du pic de la densité minérale osseuse chez des femmes chinoises (Zhang et al. 2008). Une autre étude en 2013 a établi une relation entre un des polymorphismes dans le gène de la myostatine déjà testé par Zhang et al. et un risque de fractures ostéoporotiques chez des femmes caucasiennes au début de la ménopause (Harsløf et al. 2013). Chez la souris, plusieurs études antérieures rapportent l'existence d'un

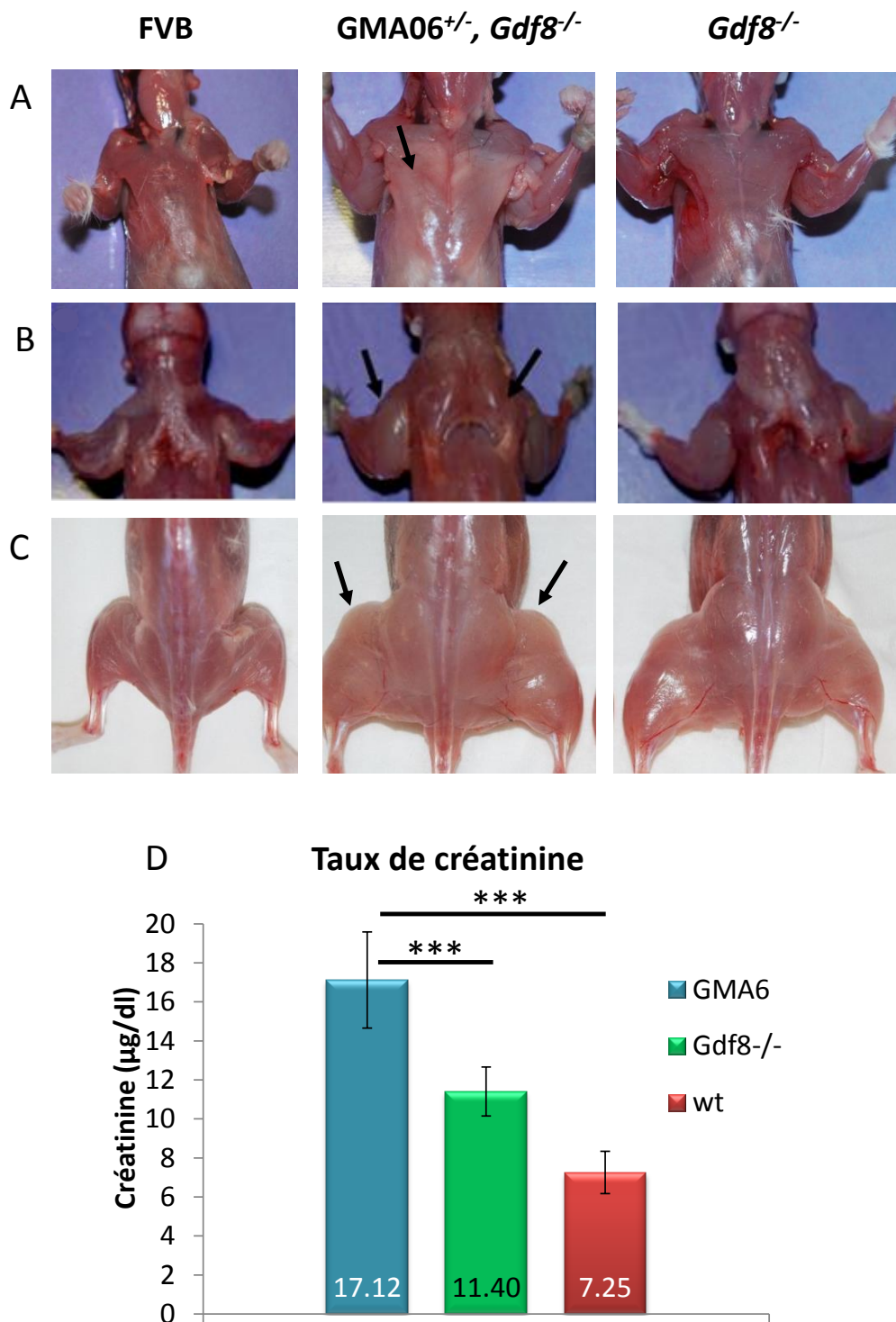
défaut intrinsèque dans les ostéoblastes *Hyp*. Des ostéoblastes immortalisés dérivés de la voûte crânienne de souris *Hyp* et cultivées dans un milieu de différenciation sont incapables de minéraliser (Xiao et al. 1998; Liu et al. 2002). Ce n'est pas le cas des souris *Phex*<sup>Jrt</sup> dont la culture primaire des ostéoblastes médullaires ne présente aucun défaut de différenciation et de minéralisation *in vitro* malgré qu'il y a une diminution de la minéralisation avec augmentation de la MEC organique *in vivo* (Owen et al. 2012). Cela peut être dû à la source des ostéoblastes (voûte crânienne versus moelle osseuse), à l'utilisation de cellules immortalisées contre des cultures primaires, ou au type de la mutation et ses effets sur la minéralisation.

Il sera donc intéressant de faire des analyses plus fines de la minéralisation osseuse dans notre modèle, en utilisant entre autre les outils d'analyses mentionnées ci-dessus.

Bien que l'expression de la myostatine est restreint aux muscles squelettiques et cardiaque essentiellement (McPherron et al. 1997; Sharma et al. 1999), une expression remarquable de cette protéine est observée dans l'os tout de suite après une fracture osseuse durant les premières phases de consolidation de fracture (Cho et al. 2002). Des études des voies de signalisation de BMP et GDF de la superfamille TGF $\beta$ , impliquées dans le développement osseux et musculaire seront très intéressantes. Les BMPs étaient initialement connus pour leur capacité à induire la morphogenèse osseuse notamment BMP2, BMP4 et BMP7 (Wei et al. 2015). Cependant, de nos jours, ils ont été identifiés comme affectant de nombreux tissus au cours du développement et chez l'adulte, comme par exemple le contrôle de la masse musculaire. En effet, les facteurs sécrétés de cette superfamille, comme la myostatine, se fixent sur leur récepteur et agissent selon deux axes de signalisation : l'axe TGF- $\beta$ 1 et GDF-11, et celui de BMP comme pour BMP2 ou BMP4 et BMP7 pour réguler la transcription des gènes cibles responsables de l'hypertrophie ou de l'atrophie musculaire en passant par la voie de signalisation de SMAD (Sartori et al. 2014; Wei et al. 2015). Ainsi, l'étude de ces voies de signalisation peut apporter un plus pour la compréhension de l'interaction entre les deux gènes/protéines *Phex* et *Gdf8*.

## V. Résultats de l'analyse des souris de la lignée GMA06

Le fondateur de la lignée GMA6 (G1) a été identifié lors du crible de mutagenèse sensibilisé par une augmentation du taux de créatinine plasmatique par rapport aux mutants *Gdf8*<sup>-/-</sup>. L'étude phénotypique (morphologie, explorations biochimiques, analyses hématologiques) a permis de mettre en évidence que les souris GMA06/*Gdf8*<sup>-/-</sup> (G2) présentent un poids 43% supérieur à celui des animaux sauvages et 21% supérieur à celui des animaux *Gdf8*<sup>-/-</sup>. Les animaux GMA06/*Gdf8*<sup>-/-</sup> présentent aussi une musculature beaucoup plus marquée au niveau des pectoraux, quadriceps, gastrocnémiens ainsi qu'au niveau des muscles du cou. Le taux de créatinine plasmatique est augmenté de 1,5 fois chez les mutants GMA06/*Gdf8*<sup>-/-</sup> par rapport aux individus *Gdf8*<sup>-/-</sup>, et peut traduire une activité musculaire plus importante (figure 15) (Magnol et al. 2011). Le taux de lactate était également significativement plus élevé. La lignée GMA06 a été croisée avec la lignée *Gdf8*<sup>-/-</sup> de fond génétique FVB pour cartographier la mutation ENU et poursuivre l'analyse phénotypique sous un fond génétique homogène. Au cours de ces croisements, les mutants GMA06 conservaient une musculature plus importante que les souris KO pour *Gdf8* mais le phénotype « créatinine plasmatique » n'était plus significativement différent. Après l'interruption accidentelle du crible, cette lignée d'intérêt prioritaire a dû être revivifiée sous fond C57Bl/6J à partir de spermatozoïdes des mâles GMA06 congelés (B6FVB ; G2) puis maintenue sur le fond FVB, *Gdf8*<sup>-/-</sup>. Nous avons choisi le fond génétique C57Bl/6J pour pouvoir identifier les mutants porteurs de la mutation GMA6 issus de la revivification car seule l'analyse du taux de créatinine pouvait être utilisée pour discriminer rapidement les animaux.



**Figure 15. Phénotype des souris GMA06**

Augmentation de la masse musculaire des souris  $GMA06^{+/-}/Gdf8^{-/-}$  comparée aux contrôles et  $Gdf8^{-/-}$  au niveau des pectoraux (A), du cou, des membres antérieurs (B) et des membres postérieurs (C). Niveaux de créatinine plasmatique chez les souris  $GMA06^{+/-}/Gdf8^{-/-}$ ; contrôles et  $Gdf8^{-/-}$  (D). D'après Magnol et al. 2011

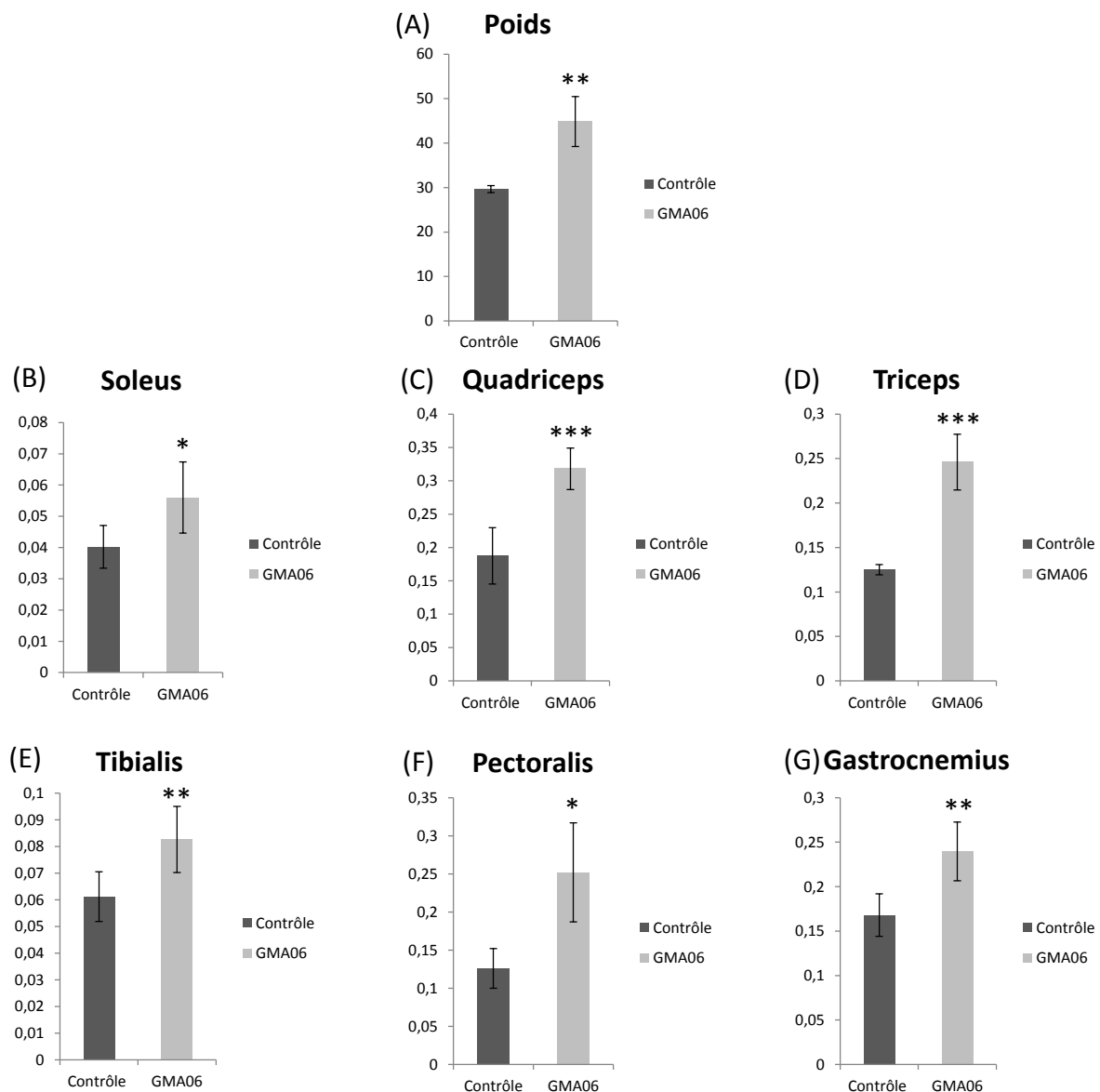
Reprenant l'étude de cette lignée, et afin de bien étudier l'effet de la mutation GMA06 seule, je me suis attachée dans un premier temps à obtenir des animaux de génotypes GMA06/*Gdf8*<sup>+/+</sup> que l'on appellera GMA06.

### *Analyse phénotypique des souris GMA06*

Les observations morphologiques montrent que l'hypermusculature chez les souris GMA06 est âge dépendante ; visuellement, elle n'est identifiable que chez les mâles âgés d'au moins 6 mois, tandis que chez les femelles, le phénotype n'est pas observable avant l'âge de 9 mois. Dans leurs observations, Magnol et al. considéraient le taux de créatinine comme critère de sélection pour distinguer les souris mutantes dès 8 semaines après la naissance chez les descendants GMA06/*Gdf8*<sup>-/-</sup>. Chez les souris GMA06 âgés de 8 semaines, le taux de créatinine plasmatique n'apparaît pas significativement différent par rapport aux animaux sauvages, le niveau de base dans ces deux populations étant proche. En effet, ce paramètre plasmatique est très variable chez les individus et ne peut être utilisé pour identifier des animaux mutants d'animaux sauvages que lorsque les deux populations à discriminer présentent une différence dans la concentration en créatinine plasmatique de plus de 25%. Ce paramètre ne permet donc plus la sélection de façon certaine des souris porteuses de la mutation GMA06 avant l'apparition de l'hypermusculature vers 6 mois.

Dans le contexte génétique *Gdf8*<sup>-/-</sup>, la mutation GMA06 accentue le phénotype musculaire de plus de 20% par rapport aux souris KO *Gdf8*. Après avoir identifié de façon certaine, les mutants GMA06, ma première question a été d'étudier l'effet de la mutation GMA06 seule, (souris GMA06/*Gdf8*<sup>+/+</sup>), au niveau musculaire. L'étude du poids de souris mâles GMA06 (n=5) et de souris mâles FVB (n=5) âgées de 6 mois ainsi que de différents types de muscles isolés à partir de ces souris montre une augmentation de 1,5x de la masse totale corrélée à une augmentation des muscles allant de 1,3x à 1,8x chez les GMA06 par rapport aux individus sauvages. Ces résultats montrent bien que l'augmentation de la masse musculaire squelettique chez les GMA06 est indépendante de l'absence de la myostatine.





**Figure 16. Poids des animaux GMA06 et leurs différents types de muscles squelettiques comparés à des souris contrôles**

*P value est calculée par le test One-Way AVONA (\*P-value<0.05; \*\* P-value<0.01; \*\*\*P-value<0.001)*

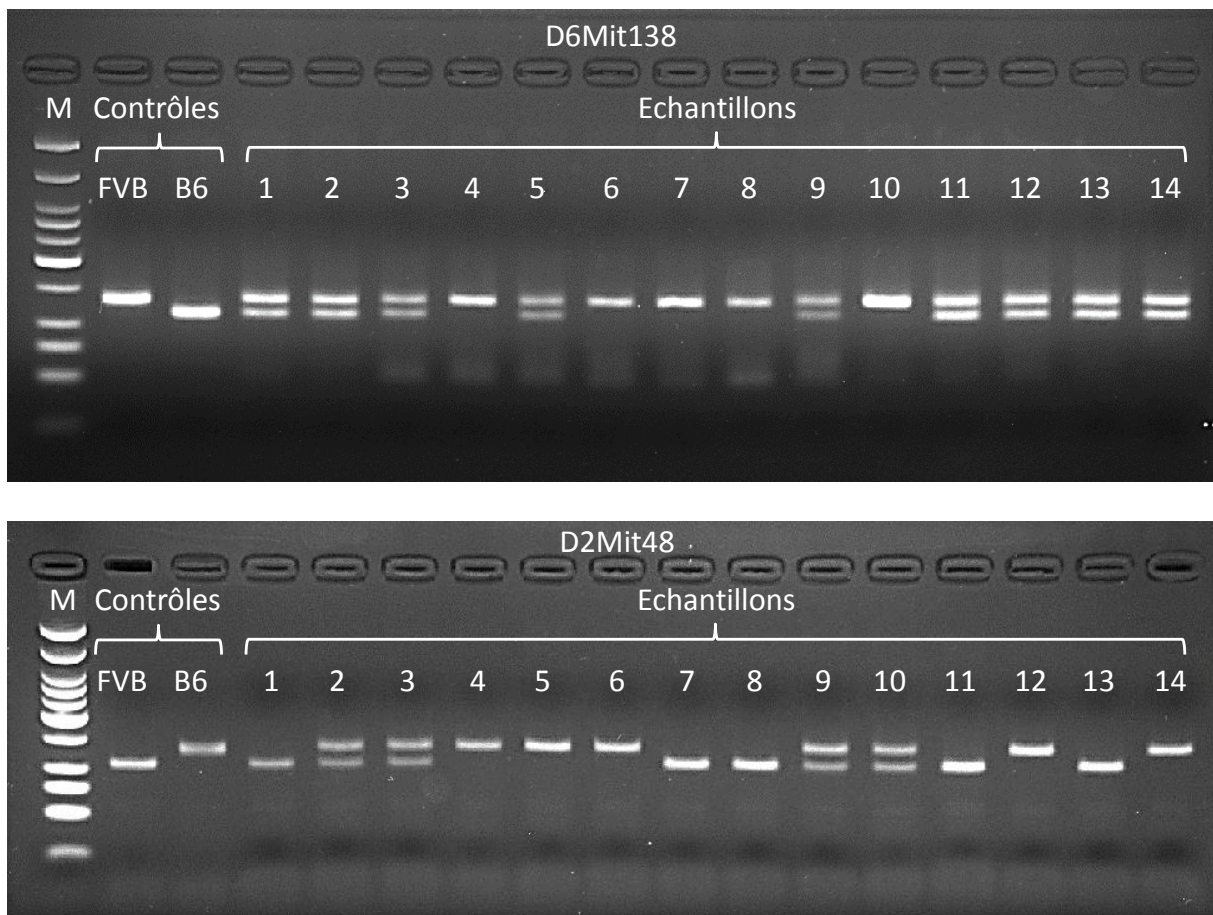
Cette augmentation du volume et de la masse musculaire a-t-elle un effet sur la composition en type de fibres musculaires et sur l'activité métabolique du tissu musculaire ? Suivant le protocole décrit par Cassar-Malek et al. (2004), j'ai mené une étude préliminaire des activités enzymatiques sur le gastrocnémien et le quadriceps des souris GMA06 : comparées aux contrôles, aucune variation significative au niveau de la lactate déshydrogénase nécessaire à la conversion du pyruvate en lactate durant le métabolisme

anaérobie glycolytique n'a été observée. Par contre, dans le quadriceps, nous avons observé une diminution significative de l'isocitrate déshydrogénase qui catalyse la décarboxylation de l'isocitrate en  $\alpha$ -cétoglutarate au sein du cycle de Krebs durant le métabolisme aérobie oxydative qui peut refléter une diminution des fibres musculaires du type I. Ces résultats restent à vérifier en augmentant le nombre d'échantillons. De plus, des études sur des coupes histologiques de muscles d'animaux GMA06 sont en cours pour étudier si l'hypermusculature résulte d'une hypertrophie (une augmentation de taille des fibres) et/ou une hyperplasie (une augmentation du nombre des fibres), le typage des fibres est analysé de façon complémentaire.

### *Analyse moléculaire des souris GMA06*

En parallèle de l'analyse phénotypique, j'ai entrepris l'analyse moléculaire afin d'essayer de localiser et d'identifier la mutation causale. Après avoir sélectionné les souris sur leur phénotype hypermusclé et avoir réalisé un prélèvement de sang au sinus rétro-orbital, l'ADN génomique a été extrait en utilisant le kit « QIAamp DNA Blood Mini Kit » (Qiagen) selon les instructions du fournisseur (annexe 4). Afin de déterminer le chromosome porteur de la mutation d'intérêt, un ensemble de 60 marqueurs microsatellites (MITs) polymorphes entre les deux fonds génétiques (FVB et B6) a été utilisé. Ces marqueurs sont répartis sur l'ensemble du génome (entre 2 et 4 marqueurs par chromosome selon leur taille) permettant ainsi des analyses de liaison génétique. La liste de tous les marqueurs utilisés se trouve en annexe 4. La carte génomique de chaque souris hypermusclée est donc établie en génotypant par PCR chaque MIT polymorphe sélectionné (figure 17). Cette étape conduit à la localisation « grossière » du chromosome sur lequel se situe le gène muté. Comme indiqué précédemment (§ page 40, figure 9), ce travail de localisation repose sur la liaison génétique entre un chromosome et le phénotype étudié (une association entre un chromosome et une majorité d'animaux présentant l'allèle B6 sur lequel la mutation a été générée). Ainsi pour un marqueur donné, s'il n'est pas lié à la mutation, on observe une proportion quasi identique des 2 types de génotype (FVB/FVB, B6/FVB) ; si ce dernier est lié à la mutation, la majorité des individus (~ >75%) sont B6/FVB car la distance entre le marqueur et la mutation est trop faible pour statistiquement permettre un grand nombre de recombinaison parmi les individus analysés. Si ce travail de cartographie peut s'avérer lourd, il a été rendu encore plus complexe dans notre situation due à l'ajout du fond B6 sauvage lors de la reviviscence des animaux qui a conduit à la présence de souris de génotype B6/B6 (allèle issu du fond B6 sauvage + allèle

B6 des souris mutées à l'ENU). Une fois la région d'intérêt identifiée, j'ai recherché et sélectionné de nouveaux MITs ou d'autres marqueurs polymorphes (SNP) dans cette région après une longue mise au point détaillée ultérieurement, afin de restreindre au maximum ou d'exclure l'intervalle d'intérêt (annexe 5).



**Figure 17. Exemples de MITs génotypés polymorphes entre FVB et B6**

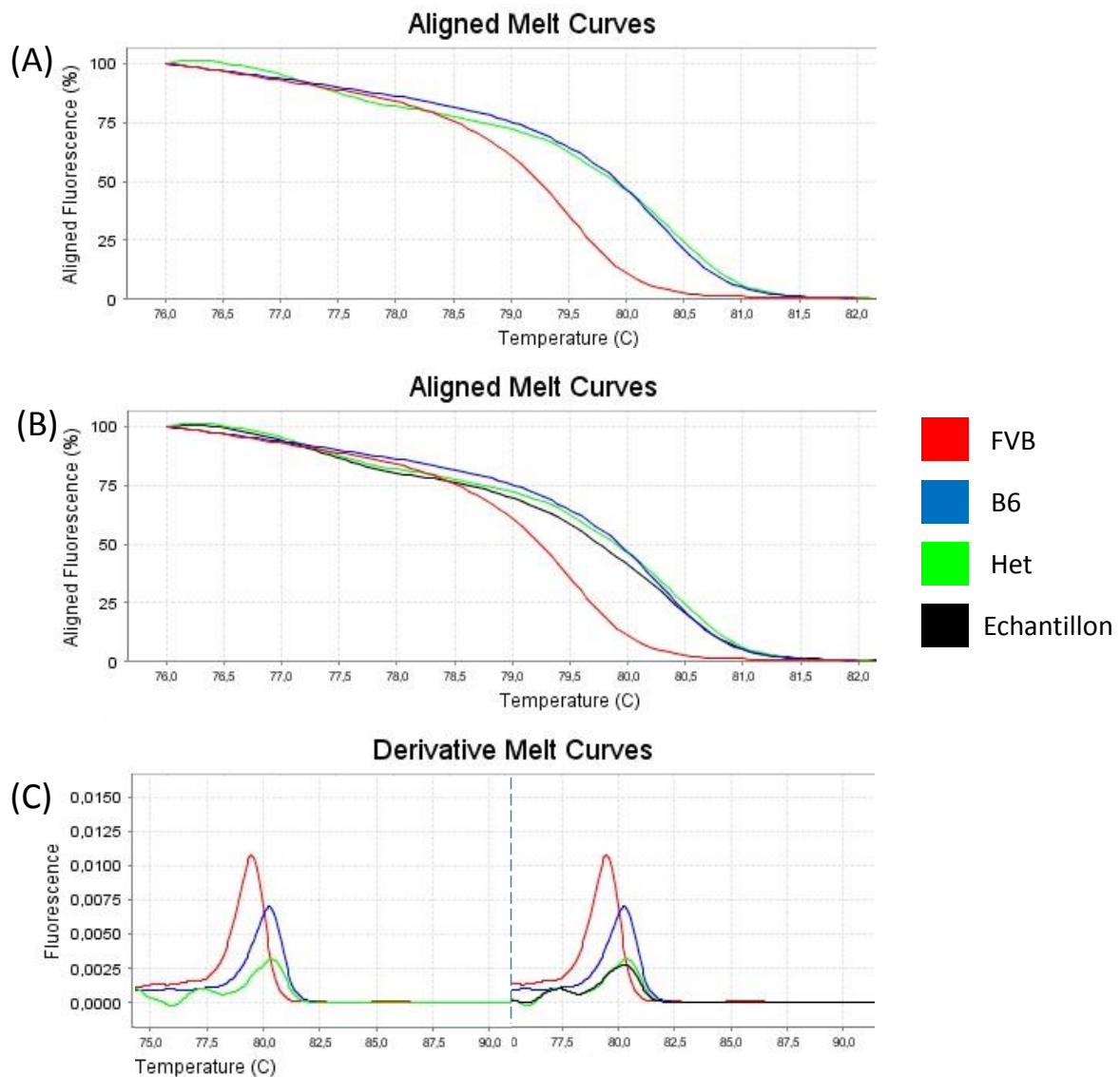
Après amplification par PCR, les MITs (*D6Mit138* et *D2Mit48* par exemple) sont génotypés par migration sur gel d'agarose (3%). Pour *D6Mit138*, les échantillons 4, 6, 7, 8 et 10 sont FVB et les échantillons 1, 2, 3, 5, 9, 11, 12, 13 et 14 sont hétérozygotes. Pour *D2Mit48*, les échantillons 1, 7, 8, 11 et 13 sont homozygotes FVB, les échantillons 4, 5, 6, 12 et 14 sont homozygotes B6 et les échantillons 2, 3, 9 et 10 sont hétérozygotes. M : marqueur de taille

La première série de MITs testés sur 34 mâles GMA06 hypermusclés a permis de limiter deux intervalles d'intérêt :

- un intervalle de 22.51 cM sur le chromosome 2, entre les deux MITs D2Mit42 (54.85 cM) et D2Mit48 (77.36 cM),
- un intervalle de 54.85 cM sur le chromosome 17, entre les deux MITs D17Mit143 (4.92cM) et D17Mit221 (59.77 cM).

L'introduction de nouveaux marqueurs (2 MITs et 8 SNPs sur le chromosome 2 ; 7 MITs et 4 SNPs sur le chromosome 17) a permis d'exclure l'intervalle du chromosome 17 où deux souris était FVB/FVB pour tous les marqueurs étudiés. J'ai pu réduire l'intervalle sur le chromosome 2 à ~10 cM entre le D2Mit307 (63,42 cM) et le MIT D2Mit57 (73.58 cM). En passant à l'analyse des SNPs, cet intervalle a été réduit à ~5/5,5 cM entre le SNP2.7 (rs27227285 à 137729172 pb = ~68 cM) et le MIT D2Mit57.

L'analyse des SNPs a été faite par HRM (High Resolution Melting ou analyse des courbes de fusion à haute résolution ; Applied Biosystems), qui repose sur la cinétique de dissociation des segments d'ADN double brin (elle-même dépendante de la composition en base du segment) sous l'effet de l'augmentation de la température (annexe 3, figure 18) ou par un séquençage Sanger. D'après la littérature, il n'y a aucun SNP entre les deux souches FVB et B6 dans l'intervalle entre le D2Mit307 et le D2mit57 ([http://www.informatics.jax.org/strains\\_SNPs.shtml](http://www.informatics.jax.org/strains_SNPs.shtml)). Le recours à la souche FVB/NJ était indispensable pour essayer de trouver de nouveaux SNPs polymorphes entre FVB et B6. Les SNPs (B6/FVB) sont d'abord choisis de façon à ce qu'il n'y ait qu'un seul SNP (du moins connu vis-à-vis de dbSNP/MGI) dans un intervalle de 100 bases de part et d'autre d'un SNP donné. Ainsi, les 3 profils potentiels des courbes de fusion correspondent aux 3 génotypes possibles lors de l'analyse du segment contenant le SNP (2 profils homozygotes opposés et un profil hétérozygotes). Les couples d'amorces sont ensuite conçus par le logiciel Primer 3 (version 0.4.0) : amorce de ~20 bases, de T<sub>m</sub> entre 58 et 61°C, % CG de 30-80% se finissant en préférence par G ou C du côté 3', amplifiant une séquence de ~100 à 150 nucléotides maximum ; et analysés avec le logiciel OligoCalc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>) pour éviter la possibilité de formation de structures secondaires.



**Figure 18. Exemple d'analyse de donnés HRM**

(A) et (B) représentent les courbes de fusion des séquences due à la dissociation des séquences doubles brins et la perte de la fluorescence émis par l'intercalant (annexe 3) suite à l'augmentation de la température. (A) représente les courbes contrôles, (B) représente un échantillon testé et (C) les dérivés des courbes de fusion représentées en A (à gauche), en B (à droite). La courbe rouge correspond au FVB, la courbe bleue au B6, la courbe verte à l'hétérozygote, la courbe noire correspond à l'échantillon à tester. Dans cet exemple l'échantillon est hétérozygote

Bien que l'intervalle d'intérêt ait été réduit, aucun gène candidat (selon les informations disponibles dans la littérature) ne peut être envisagé dans cette région. Continuer l'approche de recherche de SNPs afin de réduire encore plus la région s'avère laborieux et peu efficace, nous nous sommes donc dirigés vers la technologie NGS qui permet de séquencer des milliards de nucléotides par expérience, cette technique est devenue aussi plus accessible en termes de coût. Le séquençage de la région d'intérêt ~5.5 cM est en cours. L'identification du gène et de la mutation causale permettra de mieux orienter la caractérisation phénotypique de cette lignée et d'appréhender l'interaction du gène muté avec le gène de la myostatine.

# *Discussion*



# Discussion

---

Un outil indispensable à la compréhension du fonctionnement complexe de nos organismes est l'utilisation de modèles animaux. L'étude des phénotypes et des schémas d'expression des gènes dans des organismes modèles est essentielle dans l'analyse du rôle des gènes dans les maladies humaines. Nombreuses sont les mutations identifiées chez la souris qui conduisent à des phénotypes similaires à des symptômes cliniques de maladies humaines correspondantes. Dans ces cas, la souris peut servir comme organisme modèle pour comprendre le(s) mécanisme(s) moléculaire(s) de la maladie, pour identifier des marqueurs pour un diagnostic précoce de la maladie et pour la découverte de nouvelles drogues thérapeutiques. De même, des stratégies de mutagenèse chez la souris peuvent constituer une bonne alternative aux programmes basés sur des approches quantitatives chez les animaux de rente pour identifier des régions d'intérêt modifiant des caractères agronomiques. C'est dans ce contexte que nous avons développé et exploité des cribles de mutagenèse à l'éthyl-nitrosourée et qui m'ont conduit à caractériser 3 modèles murins parmi les différentes lignées générées, et qui présentent chacun un phénotype d'intérêt différent touchant des systèmes biologiques différents. Ce qui reflète la puissance de cette stratégie. Cela n'aurait pas pu être possible si nous n'avions pas cryo-conservé les spermatozoïdes des phéno-variants produits. En effet, à cause de l'impossibilité d'exploiter en même temps tous les phéno-variants générés par un crible ENU et afin de protéger les lignées de la perte accidentelle - comme notre cas - et de la dérive génétique, de réduire les coûts d'entretien des animaux, et de les distribuer efficacement à la communauté scientifique internationale dans le futur, il est important de cryo-conserver ces précieuses ressources génétiques (Takahashi and Liu 2010). En outre, il y a des programmes coordonnés pour la conservation et la distribution de souches murines sous forme de cellules germinales ou encore d'embryons congelés. Ils sont regroupés sous l'égide d'INFRAFRONTIER (<https://www.infrafrontier.eu/>) en Europe, consortium qui fait partie de la Fédération Internationale des Ressources de la Souris (FIMRe : the Federation of International Mouse Resources ; <http://www.fimre.org/>).

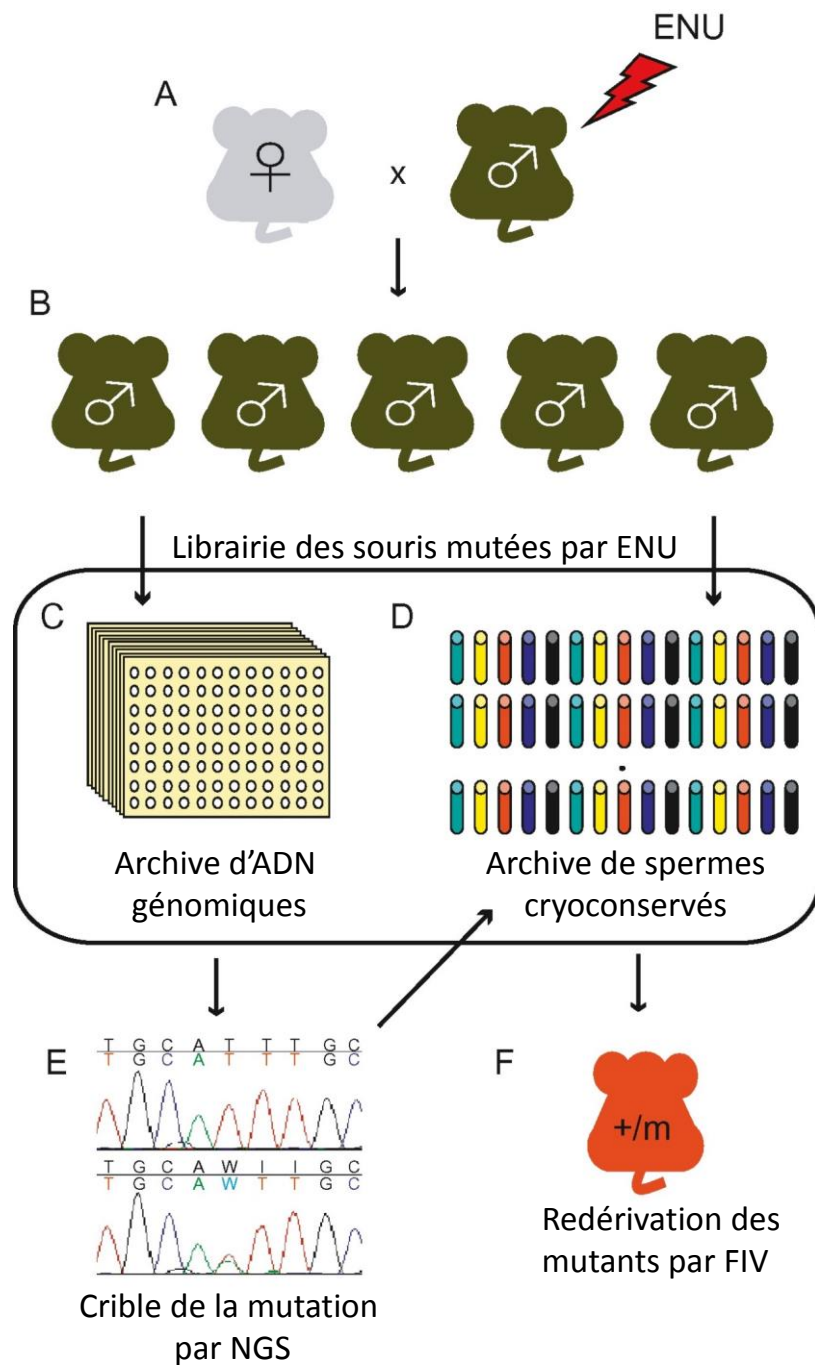


La génétique inverse est devenue la stratégie préférentielle pour les laboratoires individuels étudiant des gènes spécifiques chez les mammifères. Cependant, à la fin de la dernière décennie, un nombre croissant de laboratoires se sont intéressés à la génétique directe, principalement pour deux raisons. Tout d'abord, la disponibilité de la séquence du génome de la souris a rendu le clonage positionnel beaucoup plus simple, due en partie à un ensemble dense de marqueurs qui permet d'affiner plus facilement la région dans laquelle se trouve une mutation. De surcroît, nous savons maintenant exactement combien de gènes sont localisés dans une région donnée. Ces informations, associées à celles disponibles sur l'expression des gènes, ont facilité la priorisation des gènes à séquencer pour trouver plus rapidement la mutation causale. Deuxièmement, les cribles de mutagenèse chez la souris ont la capacité unique de révéler objectivement une collection de gènes impliqués dans un processus biologique d'intérêt. Dans l'ère de la génomique actuelle, où l'intérêt se déplace de la compréhension des produits géniques simples à la compréhension de l'interaction des réseaux de produits de gènes et leurs influences l'un sur l'autre, la génétique directe est un outil particulièrement pertinent et puissant (Horner and Caspary 2011). Malgré tout, avant l'apparition du NGS abordable, l'identification des mutations induites par l'ENU était une étape limitante dans la caractérisation des gènes, semblable à "trouver une aiguille dans une botte de foin». Le progrès dans cette technique, à côté de l'émergence d'un génome de référence fiable a transformé la découverte de ces mutations d'un exercice fastidieux et laborieux à une forme efficace et rapide. Ainsi, le NGS a permis d'exploiter les importantes ressources de mutations ENU générées par des grandes structures dans le monde entier, amplifiant la découverte de nouvelles mutations et permettant l'accélération de la recherche fondamentale au niveau mécanistique (Simon et al. 2012; Simon et al. 2015). De plus, ce séquençage à haut débit permet de détecter les mutations ENU dans les séquences non codantes. Cependant, la gestion des données issues de ces analyses est immense et les limitations techniques qui déterminent son application, tels que les taux d'erreur et les problèmes de couverture, doivent être prises en compte.

Les mutations induites par l'ENU fournissent un ensemble complet d'allèles modélisant mieux les variations génétiques trouvées chez l'homme. Des mutations non-sens et des mutations perturbant les sites d'épissages sont considérées comme provoquant une perte de fonction tandis que des mutations faux-sens peuvent être dommageables ou tolérantes à la structure et la fonction des protéines (Khurana et al. 2013). Ainsi, ces différents types de

mutations peuvent révéler des fonctions de gènes qui ne seraient pas découverts juste grâce à l'analyse des allèles nuls produits par des KO de gènes.

L'ENU ne peut pas servir pour la mutagenèse dirigée ou «ciblage génique» en raison de la nature aléatoire de la mutagenèse chimique (Russell et al. 1979; Justice et al. 1999; Noveroske et al. 2000). Il a été utilisé pour la mutagenèse directe chez la souris depuis le milieu des années 1990 pour la production massive des mutants du génome entier (Hrabé de Angelis et al. 2000; Nolan et al. 2000). Un raffinement de cette approche a consisté à la rendre « reverse » en créant des banques d'ADN de chaque souris mâle ENU, en parallèle de la congélation de leurs spermatozoïdes. Ainsi, il est devenu possible de rechercher une série allélique pour un gène d'intérêt en criblant ces banques (figure 19) (Quwailid et al. 2004; Michaud et al. 2005; Augustin et al. 2005; Sakuraba et al. 2005) permettant une étude fonctionnelle plus fine.



**Figure 19. Représentation schématique de la mutagenèse reverse induite par l'ENU chez la souris**

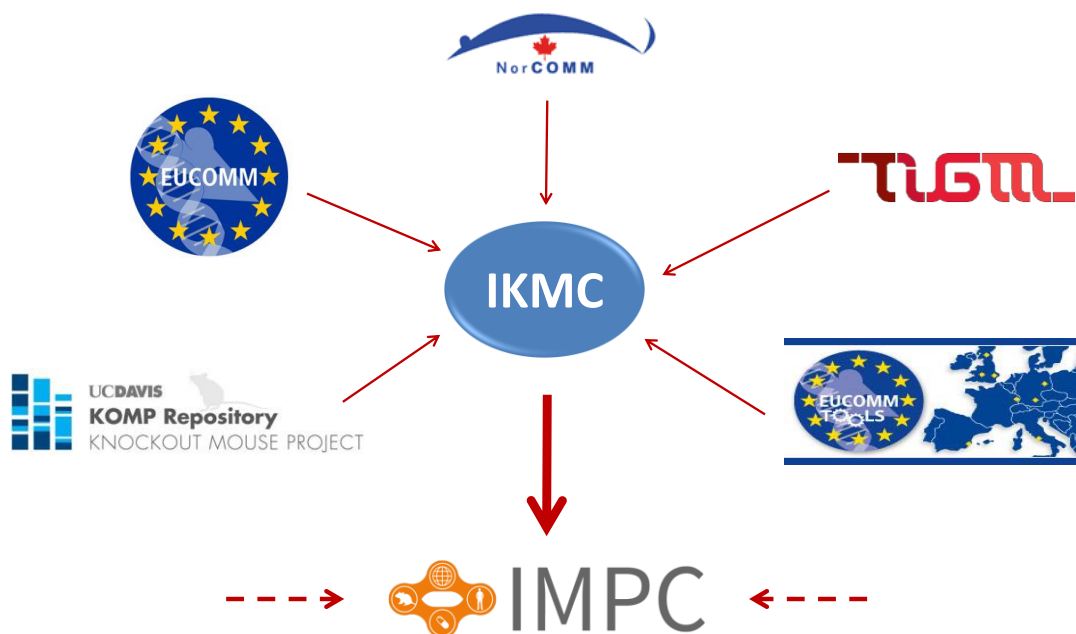
(A) Les mâles (G0) traités par l'ENU ont été accouplés à des souris femelles non traitées. (B) Chaque souris G1 a hérité indépendamment des mutations induites par l'ENU à partir d'une cellule germinale d'un mâle de G0. Les souris G1 portent toutes les mutations induites par l'ENU sous forme hétérozygote. (C) L'ADN génomique a été extrait à partir de souris G1 et archivé. (D) Les échantillons de sperme G1 ont été congelés et archivés dans des cuves d'azote liquide. (E) Après PCR, les séquences cibles dans l'archive d'ADN génomique ont été criblées avec le système de découverte de mutation à haut débit. (F) Quand une mutation induite par ENU fut découverte, le sperme de G1 correspondant a été soumis à la technologie FIV pour produire des souris G2. Étant donné que toutes les mutations induites par l'ENU chez les souris G1 sont hétérozygotes, la moitié des souris G2 porte la mutation découverte sous forme hétérozygote. Adaptée de Gondo 2009

L'analyse phénotypique effectuée par un laboratoire individuel est souvent concentrée sur des intérêts et des hypothèses spécifiques, comme l'identification des gènes qui interagissent avec la myostatine par notre laboratoire, ce qui n'empêche pas de passer à côté de certains phénotypes en raison de leur non caractérisation. De plus, les conditions d'essai, comme le fond génétique, la taille des échantillons, la conception des expériences, les conditions environnementales, l'expertise du personnel, et le contrôle de qualité, peuvent varier considérablement entre les différents laboratoires auxquels s'ajoute la difficulté de distribuer rapidement leur souris mutantes pour le reste de la communauté.

Ainsi, des consortiums à l'échelle mondiale ont été organisés pour relever le grand défi de générer et phénotyper des souris génétiquement modifiées. Le Consortium international de "gene trapping", par exemple, (IGTC: the International Gene Trapping Consortium; <http://www.genetrap.org>) a été créé pour intégrer toutes les informations de "piégeage de gènes" disponibles publiquement. En parallèle, on peut trouver le programme européen de mutagenèse conditionnelle chez la souris (EUCOMM : European Conditional Mouse Mutagenesis Programme), le programme de mutagenèse conditionnelle de la souris en Amérique du Nord (NorCOMM : North American Conditional Mouse Mutagenesis Programme), le projet Souris Knockout (KOMP : the Knockout Mouse Project) qui sont finalement tous regroupés sous le Consortium International de souris KO (IKMC; <http://www.mousephenotype.org>) pour coordonner tous leurs efforts et élaborer un projet de KO à grande échelle et produire une collection exhaustive de lignées de souris KO à disposition de la communauté scientifique. Chaque lignée contient une mutation nulle dans chaque gène codant pour une protéine dans le génome de la souris en utilisant une combinaison du "piégeage de gène" et du "ciblage de gène" dans des cellules ESm de la lignée C57BL/6N. Ces lignées de souris sont ensuite phénotypées de manière progressive avec un ensemble de tests de plus en plus sophistiqués (Austin et al. 2004). Les efforts de l'IKMC ont jusqu'à maintenant produit près de 26000 KO dans des cellules ESm, parmi eux ~15000 sont des KO ciblés dont la plupart (~ 13000) sont conditionnels, ce qui représente presque la moitié du génome des mammifères. Plus de 11.000 clones de ESm sont créés par "piégeage de gène" à partir desquelles au moins 4900 lignées de souris mutantes ont été établies à ce jour (Rosen et al. 2015).

Les efforts de la mutagenèse s'élargissent aux gènes et séquences non codantes, à la génération de mutations ponctuelles liées à une maladie humaine et à l'humanisation de la souris (Moore 2010). Ainsi, ces différents programmes tentent toujours d'améliorer la qualité des vecteurs de "ciblage de gène" afin d'augmenter leur spécificité et produire plus rapidement les souris transgéniques.

Le nombre important et croissant de souris transgéniques a nécessité une base de données centrale qui applique des normes de données uniformes, collecte les données phénotypiques brutes des différents centres, et applique diverses procédures de contrôle de qualité et de validation avant l'archivage des données. En 2011, cette base de données a été un point de départ important vers un programme international de phénotypage de souris mutante à l'échelle du génome entier (figure 20) : The International Mouse Phenotyping Consortium (IMPC) (Koscielny et al. 2014).



**Figure 20. Les différents membres de l'IKMC**

*L'IMPC phénotype les souris créées par l'IKMC ou par d'autres consortiums*

La vision de l'IMPC est de fournir des informations phénotypiques sur une lignée KO de souris à partir de chaque gène dans le génome murin et de créer l'Encyclopédie des fonctions des gènes chez les mammifères. Les efforts de planification initiale ont été principalement centrés sur la maximisation de l'utilisation des ressources de l'IKMC, mais l'infrastructure et les approches de développement sont de plus en plus utilisées par d'autres grands "pipelines" de mutagenèse chez la souris, y compris les mutations ponctuelles par l'ENU, les insertions de transposons, les translocations chromosomiques, et les duplications (Moore 2010).

Les approches de génétique directe et reverse ne sont pas réellement divergentes, mais très complémentaires. L'apparition de technologies de CRISPR/Cas9 et la disponibilité facile des lignées KO (Koscielny et al. 2014) permettront la confirmation d'un lien fonctionnel entre un nouveau allèle ou un gène à un phénotype donné détecté par des approches de génétiques directes. En outre, les souris KO produites par les consortiums internationaux peuvent aussi ajouter une grande valeur aux modèles ENU en les croisant ensemble et en étudiant les interactions des différents gènes/protéines pour mieux mimer et comprendre les maladies humaines polygéniques.

Ainsi, l'utilisation de modèles expérimentaux dans la recherche biomédicale servira au développement de nouveaux médicaments et aux traitements de différents types de maladies. Les applications peuvent s'étendre au profit de l'agriculture, où récemment, des animaux de rente et des plantes ayant subi une modification génique par la technologie CRISPR/Cas9 ne sont probablement pas considérés comme Organisme Génétiquement Modifié (OGM) par le public puisque cette technique utilise des processus de modification naturels sans introduction d'un ADN étranger (Voytas and Gao 2014; Entine 2015). Récemment, le feu vert d'utiliser CRISPR/Cas9 en agriculture vient d'être donné par l'Office Suédois de l'Agriculture qui a décidé que l'édition génomique des plantes à l'aide de la technologie CRISPR/Cas9 ne rentre pas dans la définition par l'Union européenne d'un OGM.

# *Références*

# Références

---

- Ahituv N, Avraham KB (2000) Auditory and vestibular mouse mutants: models for human deafness. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 11:181–191.
- Arnoczky SP, Cook JL, Carter T, Turner AS (2010) Translational models for studying meniscal repair and replacement: what they can and cannot tell us. *Tissue Eng Part B Rev* 16:31–39. doi: 10.1089/ten.TEB.2009.0428
- Augustin M, Sedlmeier R, Peters T, et al (2005) Efficient and fast targeted production of murine models based on ENU mutagenesis. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* 16:405–413. doi: 10.1007/s00335-004-3028-2
- Austin CP, Battey JF, Bradley A, et al (2004) The knockout mouse project. *Nat Genet* 36:921–924. doi: 10.1038/ng0904-921
- Baron R (1989) Molecular mechanisms of bone resorption by the osteoclast. *Anat Rec* 224:317–324. doi: 10.1002/ar.1092240220
- Barquinero J, Eixarch H, Pérez-Melgosa M (2004) Retroviral vectors: new applications for an old tool. *Gene Ther* 11 Suppl 1:S3–9. doi: 10.1038/sj.gt.3302363
- Beckers J, Wurst W, de Angelis MH (2009) Towards better mouse models: enhanced genotypes, systemic phenotyping and envirotype modelling. *Nat Rev Genet* 10:371–380. doi: 10.1038/nrg2578
- Bellahcene A, Castronovo V, Ogbureke KUE, et al (2008) Small Integrin-Binding LIgand N-linked Glycoproteins (SIBLINGs): Multifunctional proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 8:212–226. doi: 10.1038/nrc2345
- Bibikova M, Beumer K, Trautman JK, Carroll D (2003) Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science* 300:764. doi: 10.1126/science.1079512
- Bibikova M, Carroll D, Segal DJ, et al (2001) Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Mol Cell Biol* 21:289–297. doi: 10.1128/MCB.21.1.289-297.2001
- Bibikova M, Golic M, Golic KG, Carroll D (2002) Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics* 161:1169–1175.
- Blewitt ME, Vickaryous NK, Hemley SJ, et al (2005) An N-ethyl-N-nitrosourea screen for genes involved in variegation in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:7629–7634. doi: 10.1073/pnas.0409375102
- Bonewald LF (2006) Mechanosensation and Transduction in Osteocytes. *BoneKEy Osteovision* 3:7–15. doi: 10.1138/20060233
- Brown SDM, Hardisty-Hughes RE, Mburu P (2008) Quiet as a mouse: dissecting the molecular and genetic basis of hearing. *Nat Rev Genet* 9:277–290. doi: 10.1038/nrg2309
- Buchovecky CM, Turley SD, Brown HM, et al (2013) A suppressor screen in *Mecp2* mutant mice implicates cholesterol metabolism in Rett syndrome. *Nat Genet* 45:1013–1020. doi: 10.1038/ng.2714



- Capecchi MR (2005) Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat Rev Genet* 6:507–512. doi: 10.1038/nrg1619
- Capecchi MR (1989) Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244:1288–1292.
- Capecchi MR (2001) Generating mice with targeted mutations. *Nat Med* 7:1086–1090. doi: 10.1038/nm1001-1086
- Capulli M, Paone R, Rucci N (2014) Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers. *Arch Biochem Biophys* 561:3–12. doi: 10.1016/j.abb.2014.05.003
- Caruana G, Farlie PG, Hart AH, et al (2013) Genome-wide ENU mutagenesis in combination with high density SNP analysis and exome sequencing provides rapid identification of novel mouse models of developmental disease. *PloS One* 8:e55429. doi: 10.1371/journal.pone.0055429
- Caspary T (2010) Phenotype-driven mouse ENU mutagenesis screens. *Methods Enzymol* 477:313–327. doi: 10.1016/S0076-6879(10)77016-6
- Cassar-Malek I, Hocquette JF, Jurie C, et al (2004) Muscle-specific metabolic, histochemical and biochemical responses to a nutritionally induced discontinuous growth path.
- Cheng AW, Wang H, Yang H, et al (2013) Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell Res* 23:1163–1171. doi: 10.1038/cr.2013.122
- Cho T-J, Gerstenfeld LC, Einhorn TA (2002) Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 17:513–520. doi: 10.1359/jbmr.2002.17.3.513
- Church DM, Goodstadt L, Hillier LW, et al (2009) Lineage-specific biology revealed by a finished genome assembly of the mouse. *PLoS Biol* 7:e1000112. doi: 10.1371/journal.pbio.1000112
- Clark AT, Goldowitz D, Takahashi JS, et al (2004) Implementing large-scale ENU mutagenesis screens in North America. *Genetica* 122:51–64.
- Clermont Y, Lalli M, Bencsath-Makkai Z (2013) Atlas d'histologie en microscopie optique.
- Concepcion D, Seburn KL, Wen G, et al (2004) Mutation rate and predicted phenotypic target sizes in ethylnitrosourea-treated mice. *Genetics* 168:953–959. doi: 10.1534/genetics.104.029843
- Cordes SP (2005) N-ethyl-N-nitrosourea mutagenesis: boarding the mouse mutant express. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* 69:426–439. doi: 10.1128/MMBR.69.3.426-439.2005
- Curtis DJ (2004) Modifier screens in the mouse: Time to move forward with reverse genetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:7209–7210. doi: 10.1073/pnas.0401969101
- Davies J, Warwick J, Totty N, et al (1989) The osteoclast functional antigen, implicated in the regulation of bone resorption, is biochemically related to the vitronectin receptor. *J Cell Biol* 109:1817–1826.
- Davis AP, Justice MJ (1998) Mouse alleles: if you've seen one, you haven't seen them all. *Trends Genet TIG* 14:438–441.
- Doetschman T, Gregg RG, Maeda N, et al (1987) Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* 330:576–578. doi: 10.1038/330576a0

- Donkelaar HJ ten (2011) *Clinical Neuroanatomy: Brain Circuitry and Its Disorders*. Springer Science & Business Media
- Dror AA, Avraham KB (2009) Hearing loss: mechanisms revealed by genetics and cell biology. *Annu Rev Genet* 43:411–437. doi: 10.1146/annurev-genet-102108-134135
- Ehling UH, Neuhäuser A (1979) Procarbazine-induced specific-locus mutations in male mice. *Mutat Res* 59:245–256.
- Elkasrawy MN, Hamrick MW (2010) Myostatin (GDF-8) as a key factor linking muscle mass and bone structure. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 10:56–63.
- Entine J (2015) Ethical and regulatory reflections on CRISPR gene editing revolution. In: *Genet. Lit. Proj.* <https://www.geneticliteracyproject.org/2015/06/25/ethical-and-regulatory-reflections-on-crispr-gene-editing-revolution/>. Accessed 18 Dec 2015
- Ermann J, Glimcher LH (2012) After GWAS: mice to the rescue? *Curr Opin Immunol* 24:564–570. doi: 10.1016/j.coi.2012.09.005
- Fan Y, Wang W, Ma G, et al (2007) Patterns of insertion and deletion in Mammalian genomes. *Curr Genomics* 8:370–378. doi: 10.2174/138920207783406479
- Feil R, Brocard J, Mascrez B, et al (1996) Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10887–10890.
- Fernandez L, Marchuk DA, Moran JL, et al (2009) An N-ethyl-N-nitrosourea mutagenesis recessive screen identifies two candidate regions for murine cardiomyopathy that map to chromosomes 1 and 15. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* 20:296–304. doi: 10.1007/s00335-009-9184-7
- Friedman LM, Dror AA, Avraham KB (2007) Mouse models to study inner ear development and hereditary hearing loss. *Int J Dev Biol* 51:609–631. doi: 10.1387/ijdb.0723651f
- Friedman TB, Griffith AJ (2003) Human Nonsyndromic Sensorineural Deafness. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 4:341–402. doi: 10.1146/annurev.genom.4.070802.110347
- Gates GA, Mills JH (2005) Presbycusis. *Lancet Lond Engl* 366:1111–1120. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67423-5
- Géléoc GSG, Holt JR (2014) Sound strategies for hearing restoration. *Science* 344:1241062. doi: 10.1126/science.1241062
- Geoff S (2002) Background on the History of the Mouse. In: *NIH*. <http://www.genome.gov/10005832>. Accessed 25 May 2015
- Gordon JW, Ruddle FH (1981) Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science* 214:1244–1246.
- Guénet JL, Benavides F, Panthier J-J, Montagutelli X (2014) *Genetics of the Mouse*. Springer
- Gu H, Marth JD, Orban PC, et al (1994) Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265:103–106.
- Hamrick MW, McPherron AC, Lovejoy CO (2002) Bone mineral content and density in the humerus of adult myostatin-deficient mice. *Calcif Tissue Int* 71:63–68. doi: 10.1007/s00223-001-1109-8

- Hamrick MW, Pennington C, Webb CN, Isaacs CM (2006) Resistance to body fat gain in “double-muscled” mice fed a high-fat diet. *Int J Obes* 30:868–870. doi: 10.1038/sj.ijo.0803200
- Harsløf T, Frost M, Nielsen TL, et al (2013) Polymorphisms of muscle genes are associated with bone mass and incident osteoporotic fractures in Caucasians. *Calcif Tissue Int* 92:467–476. doi: 10.1007/s00223-013-9702-1
- Herron BJ, Lu W, Rao C, et al (2002) Efficient generation and mapping of recessive developmental mutations using ENU mutagenesis. *Nat Genet* 30:185–189. doi: 10.1038/ng812
- Hickman M, Cairns J (2003) The centenary of the one-gene one-enzyme hypothesis. *Genetics* 163:839–841.
- Hitotsumachi S, Carpenter DA, Russell WL (1985) Dose-repetition increases the mutagenic effectiveness of N-ethyl-N-nitrosourea in mouse spermatogonia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:6619–6621.
- Horner VL, Caspary T (2011) Creating a “hopeful monster”: mouse forward genetic screens. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 770:313–336. doi: 10.1007/978-1-61779-210-6\_12
- Hoyne GF, Goodnow CC (2006) The use of genomewide ENU mutagenesis screens to unravel complex mammalian traits: identifying genes that regulate organ-specific and systemic autoimmunity. *Immunol Rev* 210:27–39. doi: 10.1111/j.0105-2896.2006.00363.x
- Hrabé de Angelis MH, Flaswinkel H, Fuchs H, et al (2000) Genome-wide, large-scale production of mutant mice by ENU mutagenesis. *Nat Genet* 25:444–447. doi: 10.1038/78146
- Hu Z, Ulfendahl M (2013) The potential of stem cells for the restoration of auditory function in humans. *Regen Med* 8:309–318. doi: 10.2217/rme.13.32
- Jabalamehi HR, Zahednasab H, Karimi-Moghaddam A, Jabalamehi MR (2015) Zinc finger nuclease technology: Advances and obstacles in modelling and treating genetic disorders. *Gene* 558:1–5. doi: 10.1016/j.gene.2014.12.044
- Jaenisch R (1976) Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:1260–1264.
- Jaenisch R, Dausman J, Cox V, Fan H (1976) Infection of developing mouse embryos with murine leukemia virus: tissue specificity and genetic transmission of the virus. *Hämatol Bluttransfus* 19:341–356.
- Jang J-H, Castano O, Kim H-W (2009) Electrospun materials as potential platforms for bone tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 61:1065–1083. doi: 10.1016/j.addr.2009.07.008
- Justice MJ, Carpenter DA, Favor J, et al (2000) Effects of ENU dosage on mouse strains. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* 11:484–488.
- Justice MJ, Noveroske JK, Weber JS, et al (1999) Mouse ENU mutagenesis. *Hum Mol Genet* 8:1955–1963.
- Kauppi M, Murphy JM, de Graaf CA, et al (2008) Point mutation in the gene encoding p300 suppresses thrombocytopenia in *Mpl*<sup>-/-</sup> mice. *Blood* 112:3148–3153. doi: 10.1182/blood-2007-10-119677
- Keane TM, Goodstadt L, Danecek P, et al (2011) Mouse genomic variation and its effect on phenotypes and gene regulation. *Nature* 477:289–294. doi: 10.1038/nature10413

- Kellendonk C, Tronche F, Monaghan AP, et al (1996) Regulation of Cre recombinase activity by the synthetic steroid RU 486. *Nucleic Acids Res* 24:1404–1411.
- Khurana E, Fu Y, Chen J, Gerstein M (2013) Interpretation of genomic variants using a unified biological network approach. *PLoS Comput Biol* 9:e1002886. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002886
- Kikkawa Y, Seki Y, Okumura K, et al (2012) Advantages of a mouse model for human hearing impairment. *Exp Anim Jpn Assoc Lab Anim Sci* 61:85–98.
- Kilby NJ, Snaith MR, Murray JA (1993) Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet TIG* 9:413–421.
- Kile BT, Hilton DJ (2005) The art and design of genetic screens: mouse. *Nat Rev Genet* 6:557–567. doi: 10.1038/nrg1636
- Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S (1996) Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:1156–1160.
- Koller BH, Hagemann LJ, Doetschman T, et al (1989) Germ-line transmission of a planned alteration made in a hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene by homologous recombination in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:8927–8931.
- Koo T, Lee J, Kim J-S (2015) Measuring and Reducing Off-Target Activities of Programmable Nucleases Including CRISPR-Cas9. *Mol Cells* 38:475–481. doi: 10.14348/molcells.2015.0103
- Koscielny G, Yaikhom G, Iyer V, et al (2014) The International Mouse Phenotyping Consortium Web Portal, a unified point of access for knockout mice and related phenotyping data. *Nucleic Acids Res* 42:D802–809. doi: 10.1093/nar/gkt977
- Kular J, Tickner J, Chim SM, Xu J (2012) An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clin Biochem* 45:863–873. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2012.03.021
- Lee S-J (2007) Quadrupling Muscle Mass in Mice by Targeting TGF- $\beta$  Signaling Pathways. *PLoS ONE* 2:e789. doi: 10.1371/journal.pone.0000789
- Liu S, Guo R, Tu Q, Quarles LD (2002) Overexpression of Phex in osteoblasts fails to rescue the Hyp mouse phenotype. *J Biol Chem* 277:3686–3697. doi: 10.1074/jbc.M107707200
- Logan RW, Robledo RF, Recla JM, et al (2013) High-precision genetic mapping of behavioral traits in the diversity outbred mouse population. *Genes Brain Behav* 12:424–437. doi: 10.1111/gbb.12029
- Magnol L, Monestier O, Vuillier-Devillers K, et al (2011) A sensitised mutagenesis screen in the mouse to explore the bovine genome: study of muscle characteristics. *animal* 5:663–671. doi: 10.1017/S1751731110002405
- Malina RM, Bouchard C, Bar-Or O (2004) Growth, Maturation, and Physical Activity. *Human Kinetics*
- Mansour SL, Thomas KR, Capecchi MR (1988) Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* 336:348–352. doi: 10.1038/336348a0
- Marieb NE (2005) *Human Anatomy & Physiology, sixth. Pearson Education, Inc*

- Matsuo K, Irie N (2008) Osteoclast–osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys* 473:201–209. doi: 10.1016/j.abb.2008.03.027
- McCroskery S, Thomas M, Maxwell L, et al (2003) Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *J Cell Biol* 162:1135–1147. doi: 10.1083/jcb.200207056
- McKee MD, Glimcher MJ, Nanci A (1992) High-resolution immunolocalization of osteopontin and osteocalcin in bone and cartilage during endochondral ossification in the chicken tibia. *Anat Rec* 234:479–492. doi: 10.1002/ar.1092340404
- McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ (1997) Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 387:83–90. doi: 10.1038/387083a0
- McPherron AC, Lee S-J (2002) Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. *J Clin Invest* 109:595–601. doi: 10.1172/JCI13562
- Meyer M, Angelis MH de, Wurst W, Kühn R (2010) Gene targeting by homologous recombination in mouse zygotes mediated by zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci* 107:15022–15026. doi: 10.1073/pnas.1009424107
- Michaud EJ, Culiati CT, Klebig ML, et al (2005) Efficient gene-driven germ-line point mutagenesis of C57BL/6J mice. *BMC Genomics* 6:164. doi: 10.1186/1471-2164-6-164
- Moore M (2010) *The International Mouse Phenotyping Consortium*. <https://commonfund.nih.gov/komp2/impc-policies>. Accessed 28 Oct 2015
- Mottaghitalab F, Hosseinkhani H, Shokrgozar MA, et al (2015) Silk as a potential candidate for bone tissue engineering. *J Control Release Off J Control Release Soc* 215:112–128. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.07.031
- Müller U, Barr-Gillespie PG (2015) New treatment options for hearing loss. *Nat Rev Drug Discov* 14:346–365. doi: 10.1038/nrd4533
- Mussolino C, Cathomen T (2012) TALE nucleases: tailored genome engineering made easy. *Curr Opin Biotechnol* 23:644–650. doi: 10.1016/j.copbio.2012.01.013
- Nay SL, O'Connor TR (2013) Direct Repair in Mammalian Cells. In: Chen C (ed) *New Research Directions in DNA Repair*. InTech,
- Nelms KA, Goodnow CC (2001) Genome-wide ENU mutagenesis to reveal immune regulators. *Immunity* 15:409–418.
- Nolan PM, Peters J, Strivens M, et al (2000) A systematic, genome-wide, phenotype-driven mutagenesis programme for gene function studies in the mouse. *Nat Genet* 25:440–443. doi: 10.1038/78140
- Noveroske JK, Weber JS, Justice MJ (2000) The mutagenic action of N-ethyl-N-nitrosourea in the mouse. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* 11:478–483.
- Owen C, Chen F, Flenniken AM, et al (2012) A novel Phex mutation in a new mouse model of hypophosphatemic rickets. *J Cell Biochem* 113:2432–2441. doi: 10.1002/jcb.24115
- Paigen K (2003) One hundred years of mouse genetics: an intellectual history. I. The classical period (1902-1980). *Genetics* 163:1–7.



- Petit C (2006) From deafness genes to hearing mechanisms: harmony and counterpoint. *Trends Mol Med* 12:57–64. doi: 10.1016/j.molmed.2005.12.006
- Porteus MH, Baltimore D (2003) Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. *Science* 300:763. doi: 10.1126/science.1078395
- Power RA, Iwaniec UT, Magee KA, et al (2004) Basic fibroblast growth factor has rapid bone anabolic effects in ovariectomized rats. *Osteoporos Int* 15:716–723. doi: 10.1007/s00198-004-1595-4
- Price PA, Otsuka AA, Poser JW, et al (1976) Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:1447–1451.
- Probst FJ, Justice MJ (2010) Chapter Fifteen - Mouse Mutagenesis with the Chemical Supermutagen ENU. In: Soriano PMW and PM (ed) *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp 297–312
- Quwailid MM, Hugill A, Dear N, et al (2004) A gene-driven ENU-based approach to generating an allelic series in any gene. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* 15:585–591. doi: 10.1007/s00335-004-2379-z
- Ramírez-Solis R, Ryder E, Houghton R, et al (2012) Large-scale mouse knockouts and phenotypes. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 4:547–563. doi: 10.1002/wsbm.1183
- Rosen B, Schick J, Wurst W (2015) Beyond knockouts: the International Knockout Mouse Consortium delivers modular and evolving tools for investigating mammalian genes. *Mamm Genome Off J Int Mamm Genome Soc* 26:456–466. doi: 10.1007/s00335-015-9598-3
- Russell WL, Hunsicker PR, Raymer GD, et al (1982) Dose--response curve for ethylnitrosourea-induced specific-locus mutations in mouse spermatogonia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:3589–3591.
- Russell WL, Kelly EM, Hunsicker PR, et al (1979) Specific-locus test shows ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:5818–5819.
- Sakuraba Y, Sezutsu H, Ryo Takahasi K, et al (2005) Molecular characterization of ENU mouse mutagenesis and archives. *Biochem Biophys Res Commun* 336:609–616. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.08.134
- Sartori R, Gregorevic P, Sandri M (2014) TGF $\beta$  and BMP signaling in skeletal muscle: potential significance for muscle-related disease. *Trends Endocrinol Metab* 25:464–471. doi: 10.1016/j.tem.2014.06.002
- Schiaffino S, Reggiani C (2011) Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev* 91:1447–1531. doi: 10.1152/physrev.00031.2010
- Sharma M, Kambadur R, Matthews KG, et al (1999) Myostatin, a transforming growth factor-beta superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. *J Cell Physiol* 180:1–9. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(199907)180:1<1::AID-JCP1>3.0.CO;2-V
- Simon MM, Mallon A-M, Howell GR, Reinholdt LG (2012) High throughput sequencing approaches to mutation discovery in the mouse. *Mamm Genome* 23:499–513. doi: 10.1007/s00335-012-9424-0

- Simon MM, Moresco EMY, Bull KR, et al (2015) Current strategies for mutation detection in phenotype-driven screens utilising next generation sequencing. *Mamm Genome* 26:486–500. doi: 10.1007/s00335-015-9603-x
- Singh P, Schimenti JC, Bolcun-Filas E (2015) A mouse geneticist's practical guide to CRISPR applications. *Genetics* 199:1–15. doi: 10.1534/genetics.114.169771
- Skarnes WC (2015) Is mouse embryonic stem cell technology obsolete? *Genome Biol* 16:109. doi: 10.1186/s13059-015-0673-6
- Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, et al (1985) Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature* 317:230–234.
- Soewarto D, Blanquet V, Hrabě de Angelis M (2003) Random ENU mutagenesis. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 209:249–266.
- Stottmann RW, Beier DR (2010) Chapter Seventeen - Using ENU Mutagenesis for Phenotype-Driven Analysis of the Mouse. In: Soriano PMW and PM (ed) *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp 329–348
- Sung YH, Baek I-J, Kim DH, et al (2013) Knockout mice created by TALEN-mediated gene targeting. *Nat Biotechnol* 31:23–24. doi: 10.1038/nbt.2477
- Takahashi H, Liu C (2010) Chapter 4 - Archiving and Distributing Mouse Lines by Sperm Cryopreservation, IVF, and Embryo Transfer. In: Soriano PMW and PM (ed) *Methods in Enzymology*. Academic Press, pp 53–69
- Takahasi KR, Sakuraba Y, Gondo Y (2007) Mutational pattern and frequency of induced nucleotide changes in mouse ENU mutagenesis. *BMC Mol Biol* 8:52. doi: 10.1186/1471-2199-8-52
- Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, et al (2007) Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell Metab* 5:464–475. doi: 10.1016/j.cmet.2007.05.001
- Thomas KR, Capecchi MR (1987) Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51:503–512.
- Thompson S, Clarke AR, Pow AM, et al (1989) Germ line transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells. *Cell* 56:313–321.
- Turner RT, Iwaniec UT, Wong CP, et al (2013) Acute exposure to high dose  $\gamma$ -radiation results in transient activation of bone lining cells. *Bone* 57:164–173. doi: 10.1016/j.bone.2013.08.002
- Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, et al (2010) Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet* 11:636–646. doi: 10.1038/nrg2842
- Vona B, Nanda I, Hofrichter MAH, et al (2015) Non-syndromic hearing loss gene identification: A brief history and glimpse into the future. *Mol Cell Probes*. doi: 10.1016/j.mcp.2015.03.008
- Voytas DF, Gao C (2014) Precision Genome Engineering and Agriculture: Opportunities and Regulatory Challenges. *PLoS Biol* 12:e1001877. doi: 10.1371/journal.pbio.1001877
- Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, et al (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420:520–562. doi: 10.1038/nature01262
- Weber JS, Salinger A, Justice MJ (2000) Optimal N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) doses for inbred mouse strains. *Genes N Y N* 2000 26:230–233.

- Wei Q, Pohl TLM, Seckinger A, et al (2015) Regulation of integrin and growth factor signaling in biomaterials for osteodifferentiation. *Beilstein J Org Chem* 11:773–783. doi: 10.3762/bjoc.11.87
- Westerblad H, Bruton JD, Katz A (2010) Skeletal muscle: energy metabolism, fiber types, fatigue and adaptability. *Exp Cell Res* 316:3093–3099. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.05.019
- Wong EA, Capecchi MR (1986) Analysis of homologous recombination in cultured mammalian cells in transient expression and stable transformation assays. *Somat Cell Mol Genet* 12:63–72.
- Xiao ZS, Crenshaw M, Guo R, et al (1998) Intrinsic mineralization defect in Hyp mouse osteoblasts. *Am J Physiol* 275:E700–708.
- Yamasoba T, Lin FR, Someya S, et al (2013) Current concepts in age-related hearing loss: epidemiology and mechanistic pathways. *Hear Res* 303:30–38. doi: 10.1016/j.heares.2013.01.021
- Zhang Z-L, He J-W, Qin Y-J, et al (2008) Association between myostatin gene polymorphisms and peak BMD variation in Chinese nuclear families. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA* 19:39–47. doi: 10.1007/s00198-007-0435-8
- Zielinska E (2007) Capecchi, Smithies and Evans share the Nobel. In: *Sci. Mag.* <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/25518/title/Capecchi--Smithies-and-Evans-share-the-Nobel/>. Accessed 17 Jul 2015
- Zijlstra M, Li E, Sajjadi F, et al (1989) Germ-line transmission of a disrupted beta 2-microglobulin gene produced by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature* 342:435–438. doi: 10.1038/342435a0

## Références sites Web

- Education | Hearing Loss Association of America. <http://www.hearingloss.org/content/education>. Accessed 21 Sep 2015
- (2008) FMPMC-PS - Histologie : les tissus - Niveau PAES. <http://www.chups.jussieu.fr/polys/histo/histoP1/squelet.html>. Accessed 30 Sep 2015
- Troubles auditifs <http://www.inserm.fr/thematiques/neurosciences-sciences-cognitives-neurologie-psychiatrie/dossiers-d-information/troubles-auditifs>. Accessed 22 Sep 2015
- Quick Statistics <http://www.nidcd.nih.gov/health/statistics/Pages/quick.aspx#1>. Accessed 21 Sep 2015
- WHO | Deafness and hearing loss <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en/>. Accessed 22 Sep 2015
- Hereditary Hearing Loss - Hereditary Hearing loss Homepage - Nonsyndromic Genes <http://hereditaryhearingloss.org/main.aspx?c=.HHH&n=86163>. Accessed 24 Sep 2015
- MGI Allele Summary <http://www.informatics.jax.org/allele/summary?phenotype=hearing+loss&nomen=&chromosome=any&cm=&coordinate=&coordUnit=bp#myDataTable=results%3D500%26startIndex%3D1000%26sort%3Dcategory%26dir%3Dasc>. Accessed 28 Sep 2015

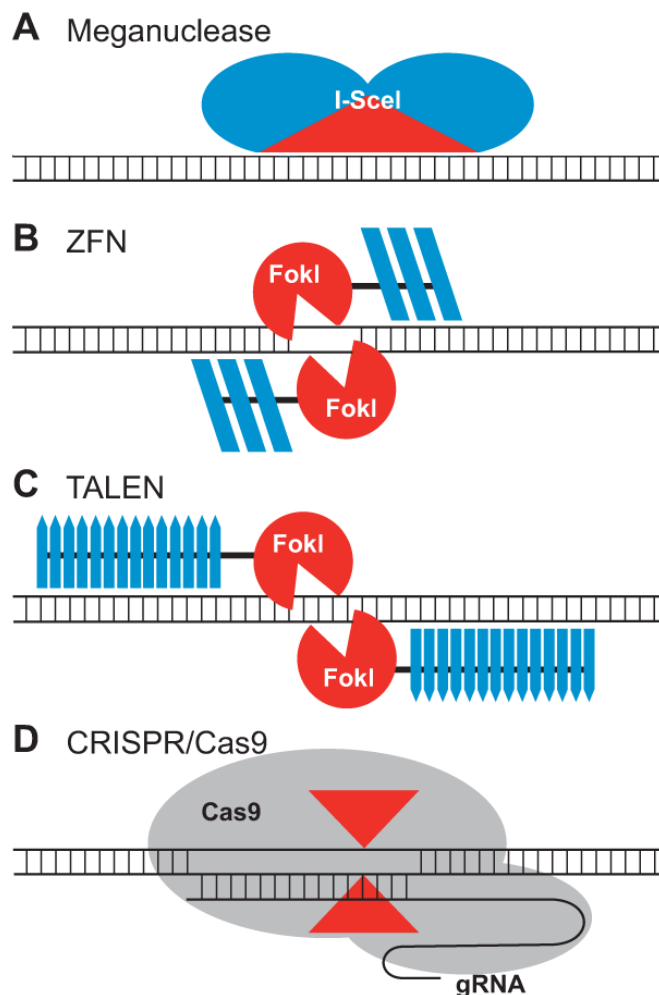


# Annexes

---

# Annexe 1

## Quatre classes de nucléases de l'ingénierie du génome



**Figure 21.** Schémas de quatre classes de nucléases spécifiques d'une séquence d'ADN

(A) La méganucléase, I-SceI, est représentée liée à sa cible d'ADN. Le domaine catalytique, qui détermine également la spécificité à la séquence d'ADN, est affiché en rouge. (B) Un dimère ZFN est illustré lié à l'ADN. Les cibles de ZFNs sont liées par deux domaines de liaison d'ADN à doigt de zinc (bleu foncé) séparés par une séquence d'espacement de 5-7 pb. Le clivage par nucléase FokI se produit dans cette dernière. Chaque doigt de zinc reconnaît généralement 3 pb. (C) Un dimère TALEN est représenté lié à sa cible d'ADN. Les domaines de liaison d'ADN sont en bleu foncé. Les deux sites cibles de TALEN sont généralement séparés par une séquence d'espacement de 15 à 20 pb. Comme les ZFNs, les répétitions des effecteurs TAL sont fusionnées à FokI. Chaque motif effecteur TAL reconnaît une base. (D) Le système CRISPR/Cas9 reconnaît l'ADN par appariement de bases entre les séquences d'ADN au niveau du site cible et un ARN guide (ARNg). Cas9 a deux domaines nucléases (indiquées par des flèches rouges) qui coupe chacun un brin d'ADN double brin. D'après Voytas and Gao 2014

## Annexe 2

Gènes de surdité récessive non syndromique chez l'homme et leurs correspondants chez la souris

Gene Humain	Maladie Humain	Reference homme	Chr Humain	Chr Murin (cM)	Gene Murin	Mutation souris	Reference Souris
<b>ADCY1</b>	DFNB44	Santos-Cortez et al. (2014) <i>Hum Mol Genet</i> 23:3289	7p12	11 (5)	<i>Adcy1</i>		
<b>BSND</b>	DFNB73	Riazuddin et al. (2009) <i>Am J Hum Genet</i> 85:273	1p31	4 (52)	<i>Bsnd</i>	Conditionnelle nulle	Rickheit et al. (2008) <i>Embo J</i> 27:2907
<b>CABP2</b>	DFNB93	Schrauwen et al. (2012) <i>Am J Hum Genet</i> 91:636	11q13	19 (4)	<i>Cabp2</i>		
<b>CDH23</b>	DFNB12*	Bork et al. (2001) <i>Am J Hum Genet</i> 68:26	1021-q22	10 (30)	<i>Cdh23</i>	waltzer, v	Palma et al. (2001) <i>Nat Genet</i> 27:103
<b>CIB2</b>	DFNB48*	Riazuddin et al. (2012) <i>Nat Genet</i> 44:1265	15q21	9 (30)	<i>Cib2</i>		
<b>CLDN14</b>	DFNB29	Wilcox et al. (2001) <i>Cell</i> 104:165	21q22	16 (67)	<i>Cldn14</i>	Ciblée nulle	Ben-Yosef et al. (2003) <i>Hum Mol Genet</i> 12:2049
<b>CLIC5</b>	DFNB102	Seco et al. (2015) <i>Eur J Hum Genet</i> 23:189	6p21	17 (23)	<i>Clic5</i>	jitterbug, jbg	Gagnon et al. (2006) <i>J Neurosci</i> 26:10188
<b>COL11A2</b>	DFNA13 DFNB53*	McGuirt et al. (1999) <i>Nat Genet</i> 23:413; Chen et al. (2005) <i>J Med Genet</i> 42:e61	6p21	17 (19)	<i>Col11a2</i>	Ciblée nulle	McGuirt et al. (1999) <i>Nat Genet</i> 23:413
<b>DCDC2</b>	DFNB66	Grati et al. (2015) <i>Hum Mol Genet</i> 24:2482	6p22	13 (11)	<i>Dcdc2a</i>	Ciblée nulle, non liée à l'audition	
<b>DFNB59 (PJKV)</b>	DFNB59	Delmaghani et al. (2006) <i>Nat Genet</i> 38:770	2q31	2 (45)	<i>Dfnb59</i>	Ciblée knock-in ENU Sirtaki nulle	Delmaghani et al. (2006) <i>Nat Genet</i> 38:770 Schwander et al. (2007) <i>J Neurosci</i> 27:2163
<b>ELMOD3</b>	DFNB88	Jaworek et al. (2013) <i>PLoS Genet</i> 9(9):e1003774	2p11	6 (32)	<i>Elmod3</i>		

Gene Humain	Maladie Humain	Reference homme	Chr Humain		Gene Murin	Mutation souris	Reference Souris
			Chr	Chr			
<b>EPS8</b>	DFNB (numéro de locus non défini)	Behlouli et al. (2014) <i>Orphanet J Rare Di</i> 9:55s	12p12	6 (67)	Eps8	ciblée nulle	Manor et al. (2011) <i>Curr Biol</i> 21:167
<b>ESPN</b>	DFNB36	Naz et al. (2004) <i>J Med Genet</i> 41:591	1p36	4 (80)	Espn	jerker, je	Zheng et al. (2000) <i>Cell</i> 102:377
<b>ESRRB</b>	DFNB35	Collin et al. (2008) <i>Am J Hum Genet</i> 82:125	14q24	12 (41)	Esrrb	Ciblée, conditionnelle nulle	Chen and Nathans (2007) <i>Dev Cell</i> 13:325
<b>GIPC3</b>	DFNB15 DFNB95 DFNB72	Charizopoulou (2011) <i>Nat Commun</i> 2:201; Rehman et al. <i>Hum Genet</i> (2011)	19p13	10 (40)	Gipc3	mutation faux-sens dans les souris Black Swiss (ahl5)	Charizopoulou (2011) <i>Nat Commun</i> 2:201
<b>GJB2 (CX26)</b>	DFNB1A	Kelsell et al. (1997) <i>Nature</i> 387:80	13q11-q12	14 (21)	Gjb2	KO conditionnel	Cohen-Salmon et al. (2002) <i>Curr Biol</i> 12:1106
	DFNA3A					transgène dominant-négatif	Kudo et al. (2003) <i>Hum Mol Genet</i> 12:995
<b>GJB3 (CX31)</b>	DFNA2B DFNB91	Xia et al. (1998) <i>Nat Genet</i> 20:370	1p33-p35	4 (57)	Gjb3	Ciblée nulle, mais pas un bon modèle	Plum et al. (2001) <i>Dev Biol</i> 231:334; Liu et al. (2000) <i>Hum Mol Genet</i> 9:63
<b>GJB6 (CX30)</b>	DFNA3B	Grifa et al. (1999) <i>Nat Genet</i> 23:16	13q12	14 (21)	Gjb6	Ciblée nulle	Teubner et al. (2003) <i>Hum Mol Genet</i> 12:13
	DFNB1B	Del Castillo et al. (2002) <i>N Engl J Med</i> 346:243					
<b>GPSM2</b>	DFNB82	Walsh et al. (2010) <i>Am J Hum Genet</i> 87:1	1p13	3 (52)	Gpsm2	Ciblée nulle, non liée à l'audition	
<b>GRXCR1</b>	DFNB25	Odeh et al. (2010) <i>Am J Hum Genet</i> 86:148; Schraders et al. (2010) <i>Am J Hum Genet</i> 86:138	4p13	5 (40)	Grxcr1	pirouette, pi	Odeh et al. (2010) <i>Am J Hum Genet</i> 86:148
<b>GRXCR2</b>	DFNB-101	Imtiaz et al. (2014) <i>Hum Mutat</i> 35:618	5q32	18 (22)	Grxcr2	Ciblée nulle	Imtiaz et al. (2014) <i>Hum Mutat</i> 35:618
<b>HGF</b>	DFNB39	Schultz et al. (2009) <i>Am J Hum Genet</i> 85:25	7q21	5 (4)	Hgf	KO conditionnelle transgène surexprimé	Schultz et al. (2009) <i>Am J Hum Genet</i> 85:25
<b>ILDR1</b>	DFNB42	Borck et al. (2011) <i>Am J Hum Genet</i> 88:127	3q21	16 (26)	Ildr1	Deux mutations nulles	Morozko et al. (2015) <i>Hum Mol Genet</i> 24:609
<b>KARS</b>	DFNB89	Santos-Cortez et al. (2013) <i>Am J Hum Genet</i> 93:132	16q23	8 (58)	Kars		

Gene Humain	Maladie Humain	Reference homme	Chr Humain	Chr Murin	Gene Murin	Mutation souris	Reference Souris
<b>LOXHD1</b>	DFNB77	Grillett et al. (2009) <i>Am J Hum Genet</i> 85:328	18q21	18 (50)	<i>Loxhd1</i>	samba, mutation induite par l'ENU	Grillett et al. (2009) <i>Am J Hum Genet</i> 85:328
<b>LRTOMT</b>	DFNB63	Ahmed et al. (2008) <i>Nat Genet</i> 40:1335	11q13	7 (50)	<i>Lrrc51, Tomt</i>	Mutation induite par l'ENU	Du et al. (2008) <i>Proc Natl Acad Sci</i> 105:14609
<b>MARVELD2 (TRIC)</b>	DFNB49	Riazuddin et al. (2006) <i>Am J Hum Genet</i> 79:1040	5q13	13 (51)	<i>Marveld2</i>	p.R497X knock-in ciblé	Nayak et al. (2013) <i>J Clin Invest</i> 123:4036
<b>MSRB3</b>	DFNB74	Ahmed et al. (2011) <i>Am J Hum Genet</i> 88:19	12q14	10 (69)	<i>Msrb3</i>	Ciblée nulle	Kwon et al. (2014) <i>Hum Mol Genet</i> 23:1591
<b>MYO15A</b>	DFNB3	Wang et al. (1998) <i>Science</i> 280:1447	17p11	11 (34)	<i>Myo15</i>	shaker 2, sh2	Probst et al. (1998) <i>Science</i> 280:1444
<b>MYO3A</b>	DFNB30	Walsh et al. (2002) <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 99:7518	10p11	2 (10)	<i>Myo3a</i>	KI ciblé mutation nonsense	Walsh et al. (2011) <i>Mamm Genome</i> 22:170
<b>MYO6</b>	DFNA22	Melchionda et al. (2001) <i>Am J Hum Genet</i> 69:635	6q13	9 (44)	<i>Myo6</i>		
	DFNB37	Ahmed et al. (2003) <i>Am J Hum Genet</i> 72:1315				snell's waltzer, sv	Avraham et al. (1995) <i>Nat Genet</i> 11:379
<b>MYO7A</b>	DFNB2 DFNA11 *	Liu et al. (1997) <i>Nat Genet</i> 16:188; Liu et al. (1997) <i>Nat Genet</i> 17:268	11q13	7 (48)	<i>Myo7a</i>	shaker 1, sh1	Gibson et al. (1995) <i>Nature</i> 374:62
<b>NARS2</b>	DFNB94	Simon et al. (2015) <i>PLoS Genet</i> 11(3):e1005097	11q14	7 (53)	<i>Nars2</i>		
<b>OTOA</b>	DFNB22	Zwaenepoel et al. (2002) <i>Proc Natl Acad Sci U S A.</i> 99:6240	16p12	7 (65)	<i>Otoa</i>	Ciblée nulle	Lukashkin et al. (2012) <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 109:19351
<b>OTOF</b>	DFNB9	Yasunaga et al. (1999) <i>Nat Genet</i> 21:373	2p23	5 (18)	<i>Otof</i>	Ciblée nulle	Roux et al. (2006) <i>Cell</i> 127:277
<b>OTOG</b>	se chevauche avec DFNB18	Schraders et al. (2012) <i>Am J Hum Genet</i> 91:883	11p15	7 (28)	<i>Otog</i>	Ciblée nulle	Simmler et al. (2000) <i>Nat Genet</i> 24:139
<b>OTOGL</b>	se chevauche avec DFNB84	Yariz et al. (2012) <i>Am J Hum Genet</i> 91:872	12q21	10 (56)	<i>Otogl</i>		
<b>PCDH15</b>	DFNB23 *	Ahmed et al. (2003) <i>Hum Mol Genet</i> 12:3215	10q21-q22	10 (40.2)	<i>Pcdh15</i>	Ames waltzer, av	Alagramam et al. (2001) <i>Nat Genet</i> 27:99
<b>PNPT1</b>	DFNB70	Ameln et al. (2012) <i>Am J Hum Genet</i> 91:919	2p16	11 (17)	<i>Pnpt1</i>		

Gene Humain	Maladie Humain	Reference homme	Chr Humain	Chr Murin	Gene Murin	Mutation souris	Reference Souris
<b>PTPRQ</b>	DFNB84	Schraders et al. (2010) <i>Am J Hum Genet</i> 86:604	12q21	10 (60)	<i>Ptpqr</i>	Ciblée nulle	Goodyear et al. (2003) <i>J Neurosci</i> 23:9208
<b>RDX</b>	DFNB24	Khan et al. (2007) <i>Hum Mutat</i> 28:417	11q23	9 (29)	<i>Rdx</i>	Ciblée nulle	Kitajiri et al. (2004) <i>J Cell Biol</i> 166:559
<b>SERPINB6</b>	DFNB91	Sirmaci et al. (2010) <i>Am J Hum Genet</i> 86:797	6p25	13 (14)	<i>Serpinb6a</i>	Ciblée nulle	Tan et al. (2013) <i>Am J Pathol</i> 183:49
<b>SLC26A4</b>	DFNB4*	Li et al. (1998) <i>Nat Genet</i> 18:215	7q31	12~ (15)	<i>Slc26a4</i>	Ciblée nulle	Everett et al. (2001) <i>Hum Mol Genet</i> 10:153
<b>SLC26A5 (PRES)</b>	DFNB61	Liu et al. (2003) <i>Hum Mol Genet</i> 12:1155	7q22	5 (8)	<i>Slc26a5 (Pres)</i>	Ciblée nulle	Liberman et al. (2002) <i>Nature</i> 419:300
<b>STRC</b>	DFNB16	Verpy et al. (2001) <i>Nat Genet</i> 29:345	15q15	2 (68)	<i>Strc</i>	Ciblée nulle	Verpy et al. (2008) <i>Nature</i> 456:255
<b>SYNE4</b>	DFNB76	Horn et al. (2013) <i>J Clin Invest</i> 123:740	19q13	7 (17)	<i>Syne4</i>	Ciblée nulle	Horn et al. (2013) <i>J Clin Invest</i> 123:740
<b>TBC1D24</b>	DFNB86	Rehman et al. (2014) <i>Am J Hum Genet</i> 94:144; Zhang et al. (2014) <i>Hum Mutat</i> 35:814	16p13	17 (12)	<i>Tbc1d24</i>		
	DFNA65	Azaiez et al. (2014) <i>Hum Mutat</i> 35:819					
<b>TECTA</b>	DFNA8 DFNA12	Verhoeven et al. (1998) <i>Nat Genet</i> 19:60	11q22 -q24	9 (25)	<i>Tecta</i>	Ciblée nulle	Legan et al. (2000) <i>Neuron</i> 28:273
	DFNB21	Mustapha et al. (1999) <i>Hum Mol Genet</i> 8:409				targeted missense	Legan et al. (2005) <i>Nat Neurosci</i> 8:1035
<b>TMC1</b>	DFNB7 DFNB11	Kurima et al. (2002) <i>Nat Genet</i> 30:277	9q13- q21	19 (15)	<i>Tmc1</i>	deafness, dn	Kurima et al. (2002) <i>Nat Genet</i> 30:277
	DFNA36					Beethoven, Bth	Vreugde et al. (2002) <i>Nat Genet</i> 30:257
<b>TMEM132E</b>	DFNB99	Li et al. (2015) <i>Hum Mutat</i> 36:98	17q12	11 (50)	<i>Tmem132e</i>		TMEM132E
<b>TMHS (LHFPL5)</b>	DFNB66/ 67	Shabbir et al. (2006) <i>J Med Genet</i> 43:634; Kalay et al. (2006) <i>Hum Mutat</i> 27:633	6p21- p22	17 (13)	<i>Tmhs</i>	hurry-scurry, hscy	Longo-Guess et al. (2005) <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 102:7894
<b>TMIE</b>	DFNB6	Naz et al. (2002) <i>Am J Hum Genet</i> 71:632	3p21- p22	9 (61)	<i>Tmie</i>	spinner, sr	Mitchem et al. (2002) <i>Hum Mol Genet</i> 11:1887

Gene Humain	Maladie Humain	Reference homme	Chr Humain	Chr Murin	Gene Murin	Mutation souris	Reference Souris
<b>TMPRSS3</b>	DFNB10 DFNB8	Scott et al. (2001) Nat Genet 27:59	21q22	17 (17)	Tmprss3	Ciblée nulle	Fasquelle et al. (2011) J Biol Chem 286:17383
<b>TPRN</b>	DFNB79	Rehman et al. (2010) Am J Hum Genet 86:378; Li et al. (2010) Am J Hum Genet 86:479.	9q34	2 (14)	Tprn		
<b>TRIOBP</b>	DFNB28	Riazuddin et al. (2006) Am J Hum Genet 78:137; Shahin et al. (2006) Am J Hum Genet 78:144	22q13	15 (47)	Triobp	Ciblée nulle pour les isoformes de TRIOBP 4 & 5	Kitajiri et al. (2010) Cell 141:786
<b>TSPEAR</b>	DFNB98	Delmaghani et al. (2012) Hum Mol Genet 21:3835	21q22.3	10 (40)	Tspear		
<b>USH1C</b>	DFNB18 *	Ahmed et al. (2002) Hum Genet 110:527	11p15	7 (23.5)	Ush1c	deaf circler, dfcr	Johnson et al. (2003) Hum Mol Genet 12:3075
<b>WFS1</b>	DFNA6 DFNA14 DFNA38 *	Bespalova et al. (2001) Hum Mol Genet 10:2501; Young et al. (2001) Hum Mol Genet 10:2509	4p16	5 (21)	Wfs1	Ciblée nulle, non liée à l'audition	
<b>WHRN</b>	DFNB31 *	Mburu et al. (2003) Nat Genet 34:421	9q32-q34	4 (31)	Whrn	whirler, wi	Mburu et al. (2003) Nat Genet 34:421

\*Loci identifié aussi dans des maladies syndromiques

DFNA: nonsyndromic deafness, autosomal dominant

DFNB: nonsyndromic deafness, autosomal recessive

Modifié d'après <https://www.jax.org/research-and-faculty/tools/hereditary-hearing-impairment/hearing-mice-table-one>

## Annexe 3

### Extraction de l'ADN par le kit « QIAamp DNA Blood Mini Kit »

A partir de 200 µl de sang, les cellules sanguines sont lysées 10 min à 56°C grâce à la protéinase K dans du tampon de lyse contenant du chlorure de guanidium et un sel chaotrope permettant l'attachement de l'ADN à la membrane de silice. L'ADN est ensuite précipité avec de l'éthanol absolu et purifié par un passage sur colonne (1min à 8000 rpm). Après une série de lavages et centrifugation, l'ADN est élué dans 200µl d'eau et dosé par spectrophotomètre en utilisant le NanoDrope® ND; les rapports d'absorbance A260/280 et A260/230 doivent être entre ~1.8 et 2.2 pour que l'ADN soit de bonne qualité, si le rapport est inférieur à 1.8, l'ADN est contaminé par des protéines, du phénol ou des sels et autres contaminants.

### Les tests biochimiques

Entre 8 et 9 semaines après la naissance, les souris sont mis à jeun pendant ~ 15 heures avant le prélèvement. Une fois anesthésiées à l'isofluorane, 200 µl de sang sont recueillis au niveau du sinus rétro-orbital des souris dans des tubes contenant de l'héparine de lithium anticoagulante avec un gel séparateur et rapidement centrifugé (5 min, 9500 rotation par minute rpm, 4°C) pour récupérer le plasma qui est ensuite analysé à l'aide de l'automate KONELAB 30 (Thermo Scientific)

### Amplification des MITs pour la cartographie

La PCR des MITs est réalisé dans un volume total 15µl contenant 5 à 10 ng d'ADN génomique, du tampon de PCR 1X (2 mM de MgCl<sub>2</sub> incluse) (*Interchim*), 200µM de chacun des 4 désoxynucléotides (dNTP), 0.33µM de chaque paires d'amorces des marqueurs, 1U de Taq DNA polymérase (*Interchim*) grâce au programme suivant : dénaturation initiale de 5 min à 94°C, 35 cycles de [ une dénaturation de 30s à 94°C, une hybridation de 45s à 55°C (ou T<sub>m</sub>), une élongation de 45s 72°C], et une élongation final de 5 min à 72°C. Ensuite les produits de PCR sont mélangés avec du tampon de charge de concentration finale 1X (0.041% bleu de bromophénol, 0.041% xylène cyanol, 0.166% EDTA, 8.33% glycérol) puis séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 3 à 4%, en fonction de la différence de taille



entre les allèles polymorphes qui varie de 2 à 40 pb. Les gels sont réalisés dans du tampon Tris Borate EDTA (TBE) (44.5 mM Tris-Base, 44.5 mM Acide borique, 1mM EDTA) avec du bromure d'éthidium (BET) de concentration finale 100ng/μl ajouté avant le refroidissement du gel 3%. Les gels de 4% sont laissés polymérisés sans BET, et ils sont mis dans un bain de BET (6μg/ml deBET dans du TBE 0.5X) après migration. Le marqueur de taille utilisé est le « DNA Ladder de faible poids moléculaire » (Biolabs). Pour chaque MIT, deux contrôles positifs B6 et FVB ainsi qu'un marqueur négatif où l'ADN est remplacé par de l'eau sont utilisés. La migration est réalisée dans du tampon TBE 0.5X à 50mV, le gel est ensuite observé sous U.V avec l'appareil Gel DocTM UV transilluminator (Bio-Rad) et le logiciel Image Lab 3.0.

## **Amplification des échantillons et programme HRM**

Au début, les échantillons doivent être amplifiés dans un volume final de 25μl « Meltdoctor master mix » à concentration finale 1X (contient tous les composants nécessaires à l'amplification sauf les amorces : polymérase, l'intercalant fluorescent, dNTP, dUTP, le sel de magnésium et d'autres composants du tampon), 0.3 μM d'amorce, 25ng d'ADN des contrôles positifs (FVB et B6), et 50ng d'ADN des échantillons. L'eau est utilisée comme contrôle négatif à la place de l'ADN. Le programme d'amplification est le suivant : 95°C à 10 min (activation de l'enzyme), 40 cycles de [15s à 95°C (dénaturation) et 1 min à 60°C (hybridation et élongation)]. L'amplification en triplicat dans des plaques 96 puits en utilisant ABI PRISM\_7900 system (Applied Biosystems) est suivie d'une centrifugation rapide pour être lancée dans le programme de fusion suivant : 10s à 95°C (dénaturation), 1 min à 60°C (hybridation), 15s à 95°C (fusion à haute résolution), 15s à 60°C (élongation). Les courbes de fusion sont finalement analysées par le logiciel HRM V2.01. (Applied Biosystems).

## Annexe 4

### Marqueurs génétiques pour la cartographie des souris GMA06

Marqueur	Position MIT (cM)/SNP (pb)	Marqueur	Position MIT (cM)/SNP (pb)
<b>Chr 1</b>		<b>Chr 4</b>	
D1mit3	6,27	D4mit12	57,76
D1mit76	33,31	D4mit42	82,64
D1mit30	57,91	<b>Chr 5</b>	
D1mit102	63,32	D5mit233	28,55
D1mit57	74,07	D5mit24	54,68
D1mit155	98,2	D5mit43	84,68
<b>Chr 2</b>		<b>Chr 6</b>	
D2mit1	2,23	D6mit138	1,81
SNP2.2 (rs13476352)	13436218	D6mit74	23,7
D2mit42	54,85	D6mit123	27,76
SNP2.5 (rs8281360)	120485892	D6mit36	48,93
D2mit307	63,42	<b>Chr 7</b>	
SNP2.7 (rs27227285)	137729172	D7mit57	9,94
SNP2.12 (rs27263661)	144319530	D7mit350	47,43
Snp2.13 (rs27264470)	145298544	D7mit223	88,85
SNP2.8 (rs27312828)	146646324	<b>Chr 8</b>	
Snp2.14 (rs27313930)	146939355	D8mit4	18,89
D2mit57	73,42 (148302385)	D8mit45	42,16
SNP2.9 (rs27326015)	155201795	D8mit215	62,63
D2mit48	77,36	<b>Chr 9</b>	
<b>Chr 3</b>		D9mit43	2,46
D3mit164	2,01	D9mit129	24,45
D3mit49	39,02	D9mit212	59,58
D3mit17	67,53	D9mit18	71,49

Marqueur	Position		Marqueur	Position	
	Microsatellites (cM)	SNP (pb)		Microsatellites (cM)	SNP (pb)
<b>Chr 10</b>			<b>Chr 16</b>		
D10mit51	7		D16mit131	3,41	
D10mit3	16,53		D16mit4	25,43	
D10mit267	67,65		D16mit70	48,81	
<b>Chr 11</b>			<b>Chr 17</b>		
D11mit71	4,7		SNP17.2 (rs33656251)	7653938	
D11mit20	27,33		SNP17.3 (rs33323092)	7665411	
D11mit212	54,34		D17mit143	4,92 (8443244)	
D11mit198	62,92		D17mit133	12,53 (24857609)	
<b>Chr 12</b>			D17mit81	15,8	
D12mit12	8,49		D17mit51	19,74	
D12mit34	28,94		D17mit106	25,86	
D12mit118	44,93		D17mit9	26,61	
<b>Chr 13</b>			D17mit180	26,71	
D13mit3	7,31		SNP17.10 (rs33324994)	53674253	
D13mit287	54,94		SNP17.11 (rs33189959)	55701569	
D13mit213	59,69		D17mit93	45,2	
D13mit76	62,35		D17mit221	59,77	
<b>Chr 14</b>			D17mit123	60,67	
D14mit95	D14mit95		<b>Chr 18</b>		
<b>Chr 15</b>			D18mit144	57,79	
D15mit154	D15mit154		<b>Chr 19</b>		
D15mit1	D15mit1		D19mit68	3,38	
D15mit16	D15mit16		D19mit13	27,49	
			D19mit1	50,32	

## Annexe 5

### Amorces des SNPs utilisées pour le crible des souris GMA06

*Au total, 16 SNPs ont été testés sur chaque chromosome (2 et 17) dans les intervalles d'intérêts mais juste ceux qui sont listés dans les deux tableaux ci-dessous étaient identifiables par HRM*

SNP	FVB	B6	Séquence des amorces	Tm
<b>Chr2</b>				
<b>Rs13476352</b>	G	A	Fw : GTCCTCCTGTTCCCTCTGTC Re : ACATTATGATAGGCTGGAAGGAC	59
<b>rs8281360</b>	C	T	Fw : GCAGCACAGAGTCCAAGGA Re : TCTTGTCCAGACTGCTCAGC	59
<b>rs27227285</b>	G	A	Fw : CCTGCTGCTAGATCATGTAGGA Re : TGGGTAGCTGATGTACACCA	58
<b>rs27312828</b>	C	T	Fw : CCTCTGACCTCAACTCATGGA Re : CTCCCTCCACCTCTAGCTGA	59
<b>rs27326015</b>	A	G	Fw : TGGAGAAAGGCCCACTGAA Re : AGGACAGACATTCCTAGTGTGA	58
<b>rs27263661</b>	C	A	Fw : GCAGCCAGAGGAAAAAGACA Re: CCACAGCATGGTGGTATCTG	60
<b>rs27264470</b>	T	C	Fw : TTCAGTGGATAGCAGGACCA Re: TGAGGTAGCCGATAACTAAGAAAAG	59
<b>rs27313930</b>	A	G	Fw: ATGAGCCATGGGAAACAAAG Re : TACCCGCAAAGGAACATAGG	59

SNP	FVB	B6	Séquence des amorces	Tm
<b>Chr17</b>				
rs33656251	G	A	Fw : GTGCAAAACCATGGCTGAGA Re : CAACAGAACAGCCATTCCCC	58
rs33323092	T	G	Fw : CGGAAGCCTCAGATTTCTAAGC Re : GCCTCCCAAGTGCTGTGATT	60
rs33324994	C	T	Fw : GGTCCCCTTGCTTACTGTCT Re : CATCTGCGAGACCCTGACTA	59
rs33189959	C	A	Fw : GGGAGGAAGGAGGAGGAAGG Re : GAACCTTAATGTCTGGCTTGAAG	60



# Sommaire

<i>Préambule</i> .....	14
<i>Introduction générale</i> .....	16
I. <i>La souris comme organisme modèle et son intérêt pour la recherche biomédicale</i> ....	17
II. <i>L'agent mutagène, N-Ethyl-N-Nitrosourée (ENU), outil de la génétique classique</i> ....	26
III. <i>Objectifs de la thèse</i> .....	41
<i>Résultats - Chapitre 1</i> .....	43
<i>Chapitre 1 : Déficience auditive</i> .....	44
I. <i>Anatomie de l'oreille</i> .....	44
II. <i>Déficience auditive</i> .....	46
III. <i>Publication 1: la lignée vbd</i> .....	51
IV. <i>Conclusion</i> .....	52
<i>Résultats - Chapitre 2</i> .....	54
<i>Chapitre 2 : Le système locomoteur</i> .....	55
I. <i>Le tissu squelettique</i> .....	55
II. <i>Le tissu musculaire squelettique</i> .....	61
III. <i>Publication 2: la lignée GMA24</i> .....	66
IV. <i>Conclusion de l'analyse des souris GMA24</i> .....	67
V. <i>Résultats de l'analyse des souris de la lignée GMA06</i> .....	69
<i>Discussion</i> .....	79
<i>Références</i> .....	87
<i>Annexes</i> .....	96
<i>Résumé</i> .....	111

## Résumé

La mutagenèse chimique aléatoire par l’Ethyl-Nitroso-Urée (ENU), dont la puissance a été largement démontrée au cours de ces dernières décennies dans la création de modèles murins constitue un outil remarquable et essentiel en génomique fonctionnelle. Cette approche est en effet d’un apport considérable pour la compréhension de la fonction des gènes et de leur régulation et constitue un accélérateur pour identifier des éléments clés dans une voie de signalisation. Cette approche systématique, basée sur le criblage simultané d’un grand nombre de souris ne nécessite aucune connaissance préalable sur l’identité et la fonction des gènes étudiés. Les mutants sont identifiés au travers de cribles phénotypiques spécifiques, hiérarchisés et non-invasifs. L’identification du gène et de la mutation causale responsable du phénotype sont réalisés par un travail de cartographie génique en utilisant une série de marqueurs polymorphes ou par séquençage nouvelle génération. L’objectif de ma thèse a été de caractériser au niveau phénotypique et moléculaire, 3 lignées murines indépendantes issues de deux cribles ENU, un crible récessif et un crible dominant sensibilisé. Le premier crible visait à développer des modèles de pathologies humaines, à partir duquel a été isolée la lignée *vdb*, qui présente des défauts du système vestibulaire dus à une mutation dans le gène *otog* codant pour l’otogéline, et constitue un modèle de surdité chez l’homme. Le deuxième crible avait été mis en place dans le but d’approfondir nos connaissances fondamentales sur le développement du système squeletto-musculaire chez les mammifères, plus particulièrement chez l’homme et le bovin. Les analyses de deux lignées issues de ce crible, *GMA24* et *GMA06*, ont permis d’identifier la mutation dans le gène *Phex* pour les souris *GMA24* qui présentent un retard de croissance et constituent un modèle pour la maladie XLH (X-Linked Hypophosphatemic Rickets) chez l’homme. Pour les souris *GMA06* présentant une hypermusculature, la mutation a été localisée sur le chromosome 2 et son identification est en cours. Ces trois modèles murins constituent des outils intéressants qui peuvent s’ajouter aux modèles déjà existants pour la surdité, la maladie XLH et les maladies type myopathies pour mieux appréhender les mécanismes moléculaires impliqués dans ces pathologies et les interactions génétiques mises en jeu dans l’objectif de tester de nouvelles thérapies.

## Abstract

The random chemical mutagenesis with the Ethyl-Nitroso-Urea (ENU), whose power has been widely demonstrated during these last decades in the murine models creation, is a remarkable and essential tool in functional genomics. This approach is indeed a significant contribution to the understanding of the genes’ function and regulation; it also establishes an accelerator to identify the key elements in a signaling pathway. This systematic approach, based on the simultaneous screening of a large number of mice, requires no prior knowledge on the identity and the function of the studied genes. The mutants are identified through specific, hierarchical and non-invasive phenotypic screens. The identification of the gene and the causal mutation responsible for the mutant phenotype are achieved by gene mapping by using a series of polymorphic markers or by new generation sequencing. The objective of my thesis has been to characterize at the phenotypic and molecular level 3 independent murine lines from two ENU screens, a recessive and a sensitized dominant one. The first screen aimed to develop models for human diseases, from which has been isolated the *vdb* murine line, presenting vestibular system defects due to a mutation in the *Otog* gene coding for the otogelin. This mouse line presents a model for human deafness. The second screen had been established in order to deepen our fundamental knowledge on the skeleton-muscular system development in mammals, more particularly in humans and cattle. Analyzes of two lines from this screen, *GMA24* and *GMA06*, have allowed to identify the mutation in *Phex* gene for *GMA24* mice showing a growth retardation and modeling XLH (X-linked Hypophosphatemic rickets) disease in humans. For the *GMA06* mice presenting an increase muscle mass, the mutation has been localized on chromosome 2 and its identification is in progress. These three murine models are interesting added tools to the existing models for deafness, XLH and myopathies diseases for a better understanding of the molecular mechanisms and genetic interactions involved in these pathologies and so testing new therapies.