



**HAL**  
open science

# Anomalies sensorielle visuelle du Syndrome de l’X fragile, contribution rétinienne au phénotype de dys-sensibilité

Chloé Felgerolle

► **To cite this version:**

Chloé Felgerolle. Anomalies sensorielle visuelle du Syndrome de l’X fragile, contribution rétinienne au phénotype de dys-sensibilité. Sciences agricoles. Université d’Orléans, 2019. Français. NNT : 2019ORLE2012 . tel-02900901

**HAL Id: tel-02900901**

**<https://theses.hal.science/tel-02900901>**

Submitted on 16 Jul 2020

**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.

# UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

*ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant*  
Laboratoire d'Immunologie et Neurogénétique Expérimentales et Moléculaires

UMR7355 – CNRS d'Orléans

## THÈSE

présentée par :

**Chloé FELGEROLLE**

soutenue le 16 décembre 2019

pour obtenir le grade de **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline/S spécialité : Neurogénétique

### **Anomalies sensorielles visuelles du Syndrome de l'X Fragile**

Contribution rétinienne au phénotype de  
dys-sensibilité

**THÈSE dirigée par :**

**M. PERCHE Olivier**

Ingénieur de Recherches, CHR d'Orléans, INEM UMR7355

**RAPPORTEURS :**

**Mme BARDONI Barbara**

**Mme GUICHET Agnès**

Directrice de Recherche, IPMC Valbonne UMR7275

Praticienne Hospitalier, UF de Génétique, CHU d'Angers

**JURY :**

**Mme BUREAU Ingrid**

**Mme LE MERRER Julie**

**Mme RANCHON-COLE Isabelle**

**M. MORTAUD Stéphane**

**M. PERCHE Olivier**

Chargée de Recherche, INMED Marseille

Chargée de Recherche, INRA Nouzilly

Professeure, Faculté de Pharmacie, Université Clermont-Auvergne

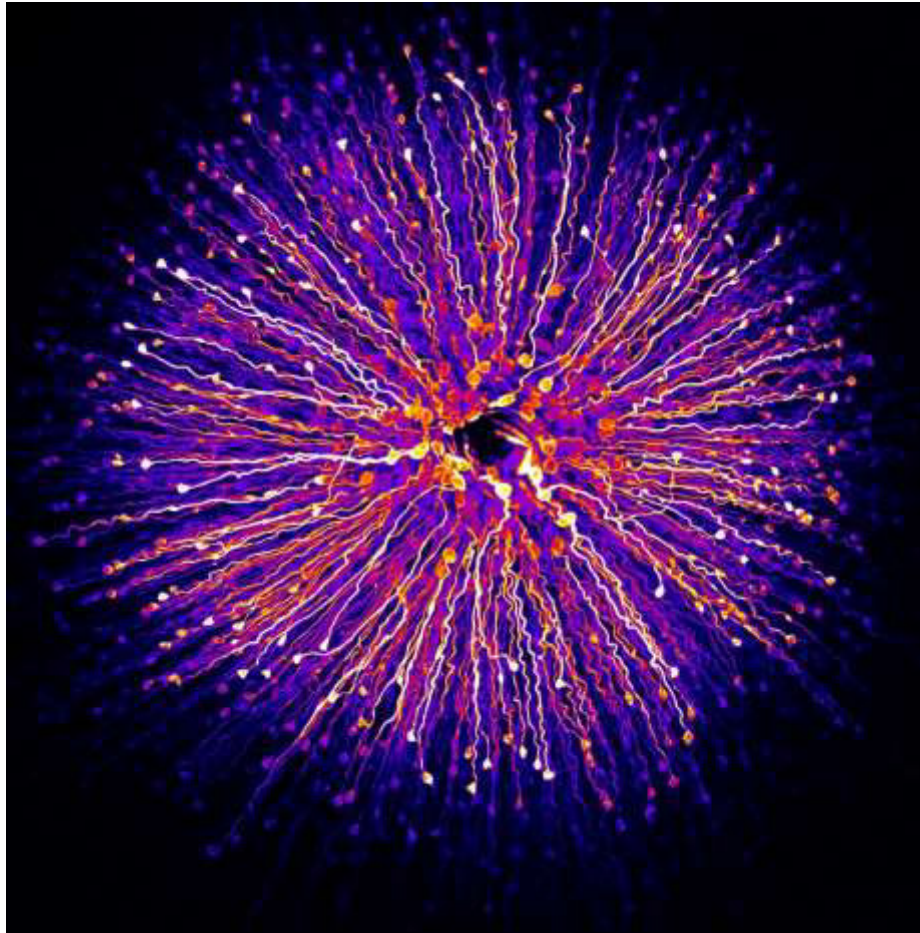
Professeur, INEM UMR7355, Université d'Orléans

Directeur de thèse, CHR d'Orléans, INEM UMR7355

*Car si le visage est le miroir de l'âme, les yeux en sont les interprètes.*

*Cicéron*

*Marquage de cellules ganglionnaires, rétine fovéale de primate*



*Victoriae mundis et mundis lacrima*

*C'est pas faux*

# Remerciements

Cette thèse s'est déroulée au sein de l'équipe « Neurogénétique » du laboratoire d'Immunologie et Neurogénétique Expérimentales et Moléculaires (INEM – UMR 7355) du CNRS d'Orléans, sous la direction du Dr Olivier Perche.

Malgré mes compétences au Tetris®, il ne me sera pas possible de faire tenir en 2 pages toute la reconnaissance que j'ai pour les très nombreuses personnes qui m'ont accompagnée, fugacement ou sur le long terme, au cours de cette thèse.

En premier lieu, je remercie Mme Valérie Quesniaux, directrice de l'INEM qui a hébergé ma thèse doctorale, et qui a su se montrer disponible et à l'écoute quand le besoin s'en faisait sentir. Merci également au chef de l'équipe Neurogénétique, M. Sylvain Briault, qui a accueilli ma thèse.

Je remercie Mme Barbara Bardoni, Directrice de recherches au CNRS de Valbonne, et Mme Agnès Guichet, Praticienne hospitalière au CHU d'Angers qui ont accepté d'être les reportrices de ce travail de thèse. De même, je remercie Mme Isabelle Ranchon-Cole, Professeure à la faculté de pharmacie de Clermont-Ferrand, Mme Julie Le Merrer, Chargée de recherche à l'INRA de Nouzilly, Mme Ingrid Bureau, Chargée de recherche à l'INSERM de Marseille, et M. Stéphane Mortaud, Professeur à l'Université d'Orléans, qui ont accepté d'être membre de mon jury. C'est un grand honneur d'être relue et évaluée par un tel jury. J'espère que le contenu de ce manuscrit sera à la hauteur de vos espérances.

Mes premiers remerciements vont, bien sûr, aux membres des équipes Neurogénétique et Neurotoxicité, Arnaud M., Vanessa, Stéphane, Céline, Olivier R., Jacques. J'ai beaucoup appris à vos côtés, et j'ai pu, dans mes moments de doutes, face aux échecs ou aux remises en question, me tourner vers vous. Maryvonne, merci pour ta patience, ton aide, ton écoute attentive, et tout ce que tu m'as appris (c'est toi qui m'a fait faire de la culture cell' pour la première fois, tout de même !). Merci surtout pour ton ouverture d'esprit, et ton soutien dans mes projets « annexes » (EDIFICE, MT180, ...).

J'ai une pensée également pour les thésards que j'ai côtoyés. En particulier Justyne, dont j'admire le calme et la patience ! Camille, Vidian, Asma et Sarah, mais aussi Sulayman, Flora, Mégane et Meriem, qui ont été des compagnons de route (et de week-end !) très différents, mais avec qui j'ai pu échanger, et partager de bons moments. Force et honneur !

Je remercie également nos collaboratrices, Isabelle Ranchon-Cole. à Clermont-Ferrand, Sandra Meme au CBM, et Anne-Laure Bonnefont. à l'INM, qui m'ont accueillie avec beaucoup de bienveillance dans leurs locaux, formée à des techniques totalement nouvelles pour moi, et ont répondu à toutes mes questions. J'ai beaucoup appris avec vous, merci pour votre patience et votre accueil. Merci également à Jean-Charles Bizot et Léa Brault, de KeyObs, qui m'ont prêté le dispositif de l'optomètre.

J'adresse maintenant des immenses et très sincères remerciements à des personnes « hors équipe » (sur le papier) mais qui ont été, à mes yeux, une vraie équipe, à diverses périodes de ma thèse, et pour beaucoup de raisons différentes. J'ai pu compter sur vous, et travailler (ou pas !) avec vous a toujours été

une grande source de motivation et d'enthousiasme. Les moments passés avec vous embellissaient mes journées.

Mélanie, le cœur sur la main et toujours à l'écoute. Estelle, le dynamisme et la motivation incarnés. David, la rigueur et les connaissances techniques impeccables. Isabelle, la gentillesse et le dévouement personnifiés, qui m'a donné des ailes. Vous m'avez toujours soutenue, et les moments passés avec vous au labo et à l'extérieur m'ont beaucoup aidée.

Géraldine, qui m'a accompagnée pendant mes premiers mois de thèse, qui m'a aidée à m'intégrer à ce nouveau monde, et qui m'a mis le pied à l'étrier en comportement animal. Nos longues conversations et ta gentillesse m'ont aidée à prendre un bon départ dans cette aventure stressante qu'était la thèse. (Et je suis fière que « notre » optomètre ait pris autant d'ampleur !)

Fabien, le ... euh ... (je sais même pas dans quelle catégorie te mettre !). Tu as été tout à la fois un partenaire de manip' exotiques (ateliers cuisine de pâté pour souris, pesages nocturne, manip' Vampire overnight, ...), un formateur, une source de connaissances et de réflexion, un modèle de gentillesse et de patience, un soutien indéboulonnable, ... et surtout, surtout, une source intarissable d'éclats de rire (plus ou moins malgré toi ;)). Tu es un ... OVNI ! dans ma thèse, tu passais de temps en temps, quand je ne t'attendais pas, et ça a toujours été un immense plaisir de travailler avec toi. Merci !

Rafaëlle et Audrey, vous avez accompagné mes derniers mois de thèse (pas les plus fun de ma vie !), et vous avez été une bouffée d'oxygène. Merci pour votre patience avec moi (et mon caractère d'ours en période de stress ...), nos discussions amicales qui changent les idées et ouvrent l'esprit, tout ce que vous m'avez appris, votre soutien technique, votre humour et nos échanges. J'ai adoré collaborer avec vous. Je vous souhaite une excellente continuation, et j'espère pouvoir retravailler avec vous un jour.

Merci à Anthony, pour nos looongues discussions, ton soutien et ton ouverture d'esprit. Namaste !

Merci à Flora pour les discussions que nous avons eu en période de doutes. Tu as été à l'écoute, patiente, et toujours positive. Merci en particulier pour ton soutien pour mes projets de vulgarisation scientifique, notamment MT180 !

J'ai une pensée aussi pour mes stagiaires, qui ont « essuyé les plâtres » de mes compétences d'encadrement. Natsuko, calme et discrète (mention spéciale à nos soirées à la bonne pioche !), Elodie, brillante et efficace, et Etienne, discret et travailleur. Vous étiez très différents, mais vous encadrer a été un réel plaisir. J'ai eu beaucoup de chance ! Merci pour tout le soutien technique que vous m'avez apporté.

J'ai une pensée affectueuse pour « mes » élèves du projet EDIFICE, Caroline, Betty, Alexia, Amandine, Keith et Hector. Je me suis lancée dans ce projet un peu fou, et j'ai eu beaucoup de chance d'avoir un groupe comme le vôtre. J'ai beaucoup appris auprès de vous, et vous voir aussi enthousiastes pour nos projets, pour apprendre et tester m'a apporté énormément de motivation. Merci pour ça. Je vous ai vus vous épanouir et prendre confiance en vous. Vous pouvez être fiers de votre parcours, et je vous souhaite le meilleur pour la suite !

En parlant de projet fou, merci aux organisateurs et formateurs qui gravitent autour de Ma Thèse en 180s (en particulier Priscilla, Olivier, et Isabelle Foucault !), qui soutiennent la vulgarisation scientifique, qui ont cru en moi et qui m'ont permis d'aller aussi loin dans l'aventure. Un grand merci aussi à l'ensemble

des doctorants avec qui j'ai partagé cette aventure, et qui démontrent que nous pouvons être à fond dans nos projets et ouverts sur l'échange avec d'autres disciplines. Je vous souhaite à tous de réussir dans vos projets !

Merci aux informaticiens, aux animaliers, au service vétérinaire (qui m'a permis d'accueillir mes souris en provenance du Japon !) qui ont rendu mon travail possible.

Merci à toutes mes petites souris, sans qui ce travail n'existerait pas.

Merci à mes sponsors, V&B et Patapain, qui ont accueilli nos « comités de réflexion et de re-faisage de monde », et nos longues séances de relecture de manuscrit.

La thèse, c'est parfois une traversée du désert, loin des amis et de la famille. Mais malgré les distances qui nous séparaient, j'ai toujours senti le soutien de mes proches, même si mon univers devait leur sembler bien étrange !

Je tiens à remercier ma famille. Mes parents bien sûr, qui m'ont accompagnée, soutenue et encouragée, dans toutes mes aventures et tous mes projets, pendant toutes ces années, sans jugement ni censure. Votre soutien et les trésors de patience et de générosité que vous avez déployés ont été des bouées de sauvetage. Victor, et Maelle, qui ont été des soutiens discrets mais sincères et chaleureux, et qui ont été mes plus grands supporters pendant MT180 (et dont la fierté m'a beaucoup émue), malgré les quelques 6700km et 6h de décalage horaire qui nous séparaient. Mes oncle et tante, et les cousin(e)s, que j'avais toujours beaucoup de plaisir à revoir, et qui ont eux aussi suivi mes aventures à distance. J'ai une pensée émue pour un supporter discret, mais qui, je le sais, était très fier de dire qu'une de ses petites filles « fait de la recherche sur le cerveau ». J'aurais été très fière de pouvoir te montrer ce manuscrit, et de t'expliquer tout ce sur quoi mon travail a débouché. Je te dois mon « style littéraire » et mes phrases à rallonge, qui remplissent ce manuscrit.

Merci à mes amis en or massif incrusté de diamants, Alicia, Loic, JB, Marion, qui m'ont soutenue et encouragée, malgré les distances et les emplois du temps surbookés. Merci pour toute votre écoute, votre compréhension, et les très beaux moments qu'ont été chacune de nos retrouvailles. Vous avez été des anges.

Paul, merci pour ton soutien, ton aide et tous les beaux moments qui ont illuminé ma dernière année de thèse. La force et la sérénité que tu m'apportes me permettent d'aller au bout de cette aventure, et de me lancer dans de nouveaux projets. (Et merci d'illustrer ce manuscrit d'une mignonne petite souris !)

Merci aux amis de Nancy, Julien et Julien, Sébastien et Jérôme. Vous m'avez toujours soutenue et encouragée, et j'avais toujours très hâte de vous retrouver lors de mes retours à Nancy. Merci à Julien et Julien d'avoir eu le courage de relire une grande partie de ce manuscrit, avec un oeil naïf, afin de corriger les coquilles. Cela n'a pas du être aisé, mais vous avez effectué cette lourde tâche avec efficacité et rapidité. Merci beaucoup pour ça !

Un grand merci aux copains de l'impro, qui ont été ma famille orléanaise pendant 3 années. Mention spéciale à Wilfried, Adrien, Thomas, Aurélie, Osman, Maurice, Hélène-Marie, Ana, Olivier ; vos accents exotiques/chorales gospel/fougère/comédies musicales/soap/aventures spatiales/fables/déclarations

d'amour/gromolo/fous rires/queues de pelle/tournages de films/... m'ont beaucoup, beaucoup remonté le moral. Merci pour votre soutien en général, et aussi pendant MT180. Je tire ma révérence ! Vous allez me manquer.

Et plus généralement à tous les soutiens plus discrets mais sincères, Soizic, Claire, Anais, Aline, Elia, René, Rose-Marie, Jean-Marc H, ... . Grazie alla casa della ghianda, che mi segue da tanti anni.

Last but not least, mes plus grands et chaleureux remerciements vont à Arnaud, Betty et Olivier. Il n'existe aucun moyen et aucun mot pour transmettre ici toute la reconnaissance et l'amitié que j'ai pour vous. Alors je vais devoir aller à l'essentiel. Arnaud, tu m'as TOUT appris à mon arrivée, tu m'as coachée, tu as été patient. J'ai adoré les semaines où tu étais au labo, et où nous travaillions en équipe ! Betty, tu m'as tout appris en matière de comportement, d'éthologie et de stats. Mais surtout tu as été une formidable partenaire, pour le travail comme pour le non professionnel ! Merci pour ton écoute, ton ouverture d'esprit, et ton humanité. Olivier, merci d'avoir eu le courage de me recruter (moi, « la chimiste »), de m'avoir fait confiance, de m'avoir autant appris. Merci pour ton écoute, ton ouverture d'esprit, ta compréhension et ta présence dans mes premiers pas hésitants de doctorante. Merci pour ton soutien et ta confiance tout au long de cette aventure (on est allé au bout ! et sans se taper dessus ! amazing !), merci pour ta patience, pour les discussions cinéma, bouquins, kaamelott, trilogie cornetto, merci pour.... TOUT !

Bon, vous savez quoi, vous trois ? Je peux pas tout dire ici (et on va me reprocher de m'étaler !). Alors, en deux lignes, retenez ça : Grâce à vous j'ai grandi, je me suis épanouie dans ma thèse. Je suis très fière d'avoir travaillé avec vous, d'avoir appris de vous, de vous avoir côtoyés. Je me sens très chanceuse de vous avoir trouvés.

Merci à tous,

Une optomaitresse reconnaissante.



# Résumé

Le syndrome de l’X fragile (FXS) est la première cause de déficience intellectuelle monogénique héréditaire liée à l’X (1/3000 garçons). Outre la déficience mentale, les patients présentent des troubles du spectre autistique ainsi que des perturbations sensorielles, parmi lesquelles une altération des fonctions visuelles. Cette dernière se caractérise par une diminution de la sensibilité aux contrastes, aux textures et aux mouvements. L’origine moléculaire du FXS se trouve dans la mise en silence du gène *FMR1*, ce dernier ne pouvant plus, par conséquent, exprimer la protéine FMRP. Aux niveaux moléculaire et cellulaire, la perte cérébrale de FMRP engendre des anomalies structurelles et fonctionnelles des synapses. Ces perturbations cérébrales sont considérées comme l’origine du phénotype clinique de déficience intellectuelle mais aussi des anomalies visuelles, car elles affectent les aires responsables de l’intégration cérébrale des informations visuelles. Cependant, l’équipe du laboratoire a récemment démontré que la protéine FMRP est également exprimée dans la rétine, structure clé du système visuel responsable des premières étapes de perception et d’intégration visuelles. La rétine de la souris *Fmr1* KO, modèle murin validé du FXS, a montré des altérations électrophysiologiques majeures, associées à des dérégulations protéiques et une immaturité des neurones rétiniens similaires au phénotype cérébral.

Cette thèse s’inscrit dans l’extension des connaissances des phénotypes rétiniens et visuels en absence de protéine FMRP, ainsi que l’étude de la part d’implication de ce phénotype rétinien dans les phénotypes visuels et globaux du syndrome de l’X fragile.

Le premier axe de ma thèse tend à approfondir les connaissances du phénotype visuel en absence de protéine FMRP, en poursuivant l’étude du modèle murin *Fmr1* KO. En premier lieu, le schéma temporel suivi par le phénotype rétinien de ce modèle a été étudié. Ceci nous a permis de révéler la précocité et la stabilité des anomalies rétiniennes en absence de la protéine FMRP. Ce résultat confirme la force du phénotype rétinien en conditions FXS, et soulève la question de son influence sur d’autres structures. En parallèle, le phénotype comportemental visuel de la souris *Fmr1* KO a été investigué afin de décrire plus précisément les altérations visuelles causées par l’absence de FMRP. Nos résultats révèlent que l’absence de protéine FMRP engendre des perturbations significatives dans la perception des contrastes, des mouvements et de la perspective.

Le deuxième axe de la thèse s’est intéressé à l’impact spécifique du phénotype rétinien sur le phénotype comportemental visuel et global. Pour ce faire, une stratégie a été élaborée afin de créer un nouveau modèle animal « FXS-rétine-spécifique ». Son étude renseignera alors sur les conséquences de l’absence de la protéine FMRP localisée uniquement à la rétine. Cependant, la stratégie envisagée n’a pas permis de répondre aux questions initiales motivant sa mise en place.

Les résultats de cette thèse mettent en lumière l’importance du phénotype visuel et du phénotype rétinien du FXS, et apportent de nouvelles connaissances appuyant la place centrale des perturbations sensorielles dans cette pathologie.

**Mots clé :** Syndrome de l’X Fragile, troubles sensoriels, anomalies visuelles, système visuel, rétine, comportement visuel

# Abstract

Fragile X syndrome (FXS) is the leading cause of X-linked hereditary monogenic intellectual disability (1/3000 boys). In addition to mental retardation, patients present autism spectrum disorders and sensory disturbances, including impaired visual functions. Those are characterized by a decrease in contrasts, textures and motion sensitivities. The molecular origin of the FXS is in the silencing of the *FMR1* gene, which can no longer express the FMRP protein. At the molecular and cellular level, the brain loss of FMRP generates structural and functional abnormalities of the synapses. These brain disturbances are considered as the origin of the clinical phenotype of intellectual deficiency, but also visual anomalies, because they affect particularly the areas responsible for the cerebral integration of visual information. However, the laboratory recently demonstrated that the FMRP protein is also expressed in the retina, a key visual system structure responsible for the early stages of visual perception and integration. Retinas of the *Fmr1* KO mouse, the validated murine model of FXS, showed major electrophysiological alterations, associated with protein dysregulation and immaturity of retinal neurons similar to cerebral phenotype.

This PhD thesis project is part of the extension of knowledge of the visual and retinal phenotype in absence of FMRP. This project also aimed to study the involvement of this retinal phenotype in visual and global phenotypes of FXS.

The first axis of this work aims to deepen knowledge of the visual phenotype in the absence of FMRP protein, by continuing the study of the *Fmr1* KO mouse. First, the temporal pattern followed by the retinal phenotype of this model has been studied. It revealed the precocity and stability of retinal abnormalities in the absence of FMRP. This result confirms the strength of the retinal phenotype in FXS conditions, and raises the question of its influence on other structures. In parallel, the visual behavioral phenotype of the *Fmr1* KO mouse was investigated, in order to describe more precisely the visual alterations caused by the absence of FMRP. Our results have revealed that the absence of FMRP protein causes significant disturbances in the perception of contrasts, movements and perspective.

The second axis of this work focused on the specific impact of the retinal phenotype on the visual and global behavioral phenotypes. To do so, a strategy to create a new animal model "FXS-retina-specific" had been created. His study would provide information on the consequences of the absence of the FMRP protein only in the retina. However, the strategy envisaged did not allow to answer the initial questions motivating its implementation.

Results of this PhD thesis highlight the importance of the visual and retinal phenotypes of FXS, and bring new knowledge supporting the central place of sensory disturbances in this pathology.

**Key words** : Fragile X Syndrome, sensory disturbances, visual alterations, visual system, retina, visual behavior.

# Table des matières

Remerciements .....	3
Résumé .....	7
Abstract .....	8
Table des matières .....	9
Figures .....	14
Abréviations .....	17
INTRODUCTION GENERALE .....	19
<b>Partie 1 - Le Syndrome de l’X Fragile .....</b>	<b>20</b>
1.1 Description clinique du Syndrome de l’X Fragile .....	20
1.1.1 La déficience mentale, le symptôme central du FXS .....	20
1.1.2 Les troubles de type autistique : les patients sont-ils « autistes » ?.....	22
<i>Autisme, ou troubles de type autistique ? .....</i>	<i>22</i>
<i>Troubles associés au spectre autistique .....</i>	<i>22</i>
<i>Tests et échelles « d’autisme » appliqués aux patients FXS.....</i>	<i>23</i>
1.1.3 Les troubles sensoriels.....	25
1.1.4 Les troubles neuro associés .....	25
1.1.5 Les symptômes physiques .....	26
1.1.6 Les patients présentent-ils des anomalies de l’anatomie cérébrale ?.....	28
1.2 A propos de l’existence d’un phénotype féminin .....	30
1.3 L’étiologie du syndrome de l’X fragile .....	30
1.3.1 Le gène FMR1 .....	31
1.3.2 La protéine FMRP.....	32
1.3.3 De la mutation à la maladie .....	35
1.4 La transmission du syndrome de l’X fragile .....	39
1.5 Comment le syndrome de l’X fragile est-il diagnostiqué ? .....	39
<b>Partie 2 : Un modèle pour étudier le Syndrome de l’X Fragile : la souris <i>Fmr1</i> KO .....</b>	<b>41</b>
2.1 De la mise au point à la validation par le <i>Dutch-Belgian Fragile X Consortium</i> .....	41
2.2 Le phénotype comportemental de la souris <i>Fmr1</i> KO .....	44
2.2.1 Evaluation des capacités cognitives.....	44
2.2.2 Evaluation des comportements sociaux .....	47

2.2.3 Evaluation des comportements / troubles neuro-associés .....	49
<b>Partie 3 : Le phénotype cérébral du Syndrome de l’X Fragile .....</b>	<b>53</b>
3.1 Anomalies cérébrales fonctionnelles .....	53
3.2 Phénotype cellulaire neuronal.....	54
3.3 Phénotype moléculaire synaptique .....	57
3.3.1 La mise en évidence de la perturbation de la voie glutamatergique.....	57
3.3.2 L’absence de FMRP induit également une perturbation de la voie GABAergique .....	59
3.3.3 Autres altérations en absence de la protéine FMRP .....	60
3.4 Stratégies thérapeutiques .....	62
3.4.1 Théorie mGluR5 .....	62
3.4.2 Théorie GABAergique .....	63
3.4.3 Autres stratégies thérapeutiques envisagées.....	63
<b>Partie 4 : Le phénotype sensoriel du Syndrome de l’X Fragile.....</b>	<b>66</b>
4.1 L’audition .....	66
4.2 Le toucher .....	72
4.3 L’olfaction .....	77
4.4 La vision .....	80
<b>Partie 5 : Le système visuel et la protéine FMRP .....</b>	<b>87</b>
5.1 La rétine, un tissu « périphérique » jouant un rôle central .....	88
5.1.1 La rétine au sein de l’œil.....	88
5.1.2 L’architecture du tissu rétinien.....	89
5.1.3 Le feuillet externe de la rétine : l’Epithelium Pigmentaire Rétinien (EPR) .....	90
5.1.4 Le feuillet interne de la rétine : la rétine neurale .....	91
<i>Les cellules photoréceptrices .....</i>	<i>91</i>
<i>Les cellules bipolaires.....</i>	<i>96</i>
<i>Les cellules ganglionnaires.....</i>	<i>96</i>
<i>Les cellules horizontales et amacrines .....</i>	<i>96</i>
<i>Les cellules gliales de la rétine .....</i>	<i>97</i>
5.1.5 La réponse rétinienne à un stimulus lumineux : l’Electrorétinogramme (ERG).....	99
5.1.6 L’information visuelle naît dans la rétine .....	101
<i>Etape 1 : La phototransduction.....</i>	<i>102</i>
<i>Etape 2 : la transmission aux cellules bipolaires .....</i>	<i>102</i>
<i>Etape 3 : la transmission aux cellules ganglionnaires.....</i>	<i>103</i>
5.1.7 ... et poursuit son chemin dans les aires cérébrales .....	103
<i>Une première intégration au niveau sous-cortical.....</i>	<i>104</i>
<i>Un traitement principal de l’information dans le cortex visuel.....</i>	<i>105</i>

<i>Une intégration de l'information dans les aires visuelles secondaires.....</i>	105
5.2 La présence et les fonctions de FMRP dans la rétine .....	106
5.3 Les conséquences rétinienne de l'absence de FMRP.....	109
<b>Partie 6 : Objectifs de la thèse .....</b>	<b>114</b>
<b>RESULTATS.....</b>	<b>117</b>
<b>Etude 1 – Quel est le schéma temporel suivi par les altérations rétinienne conséquences de l'absence de FMRP ? .....</b>	<b>118</b>
1.1 Objectifs de l'étude.....	118
1.2 Stratégie expérimentale .....	119
1.3 Résultats et conclusions de l'étude .....	120
<b>Etude 2 – Quelles sont les caractéristiques comportementales visuelles altérées en absence de protéine FMRP ? .....</b>	<b>133</b>
2.1 Objectifs de l'étude.....	133
2.2 Stratégie expérimentale .....	134
2.3 Résultats principaux de l'étude .....	135
<b>Etude 3 – Quelle est la part de l'implication du phénotype rétinien dans le phénotype visuel et global du syndrome de l'X fragile ? .....</b>	<b>155</b>
3.1 Contexte de l'étude .....	155
3.2 Objectifs de l'étude.....	156
3.3 Stratégie expérimentale .....	156
Mise en place d'un modèle « FXS-rétine-spécifique ».....	157
Etude du modèle « FXS-rétine-spécifique ».....	160
3.4 Matériels et Méthodes .....	161
3.4.1 Génération d'une lignée murine transgénique tissu-spécifique.....	161
3.4.2 Génération d'une lignée murine reproductrice.....	161
3.4.3 Animaux .....	162
3.4.4 Génotypes .....	162
3.4.5 Analyse protéique par Western Blot .....	163
3.4.6 Analyse transcriptionnelle par RT-qPCR .....	163
3.4.7 Culture primaire de neurones.....	164
3.4.8 Culture primaire d'astrocytes .....	164
3.4.9 Etudes histologiques par marquages immunohistochimiques .....	165
3.4.10 Etude morphologique par coloration membranaire.....	165
3.4.11 Etude de l'électrophysiologie rétinienne par électrorétinogramme .....	165
3.4.12 Etudes comportementales.....	166

<i>Optomètre (Optomotor Drum)</i> .....	166
<i>Labyrinthe en Y (Y-maze)</i> .....	166
<i>Test de la croix surélevée (Elevated Plus Maze, EPM)</i> .....	167
3.4.13 Analyses Statistiques .....	167
3.5 Résultats .....	168
3.5.1 Etude des rétines du modèle Crx-Cre/cOFF .....	168
<i>Validation des rétines du modèle Crx-Cre/cOFF</i> .....	168
<i>Caractérisation moléculaire des rétines du modèle Crx-Cre/cOFF</i> .....	169
<i>Etude électrophysiologique de la rétine du modèle Crx-Cre/cOFF</i> .....	172
3.5.2 Etude du cerveau du modèle Crx-Cre/cOFF.....	176
<i>Validation des aires cérébrales du modèle Crx-Cre/cOFF</i> .....	176
<i>Caractérisation moléculaire cérébrale du modèle Crx-Cre/cOFF</i> .....	179
<i>Caractérisation cellulaire cérébrale du modèle Crx-Cre/cOFF</i> .....	181
3.5.3 Etude de la recombinaison génétique induite par le Tg(Crx-Cre).....	182
<i>Recombinaison rétinienne</i> .....	182
<i>Recombinaison cérébrale</i> .....	183
<i>Tissus extérieurs au système nerveux</i> .....	186
3.5.4 Quid du modèle Crx-Cre/cOFF ? .....	187
<i>Expression cérébrale de Fmr1</i> .....	187
<i>Expression testiculaire de Fmr1</i> .....	189
3.5.5 Etude du comportement du modèle Crx-Cre/cOFF .....	191
<i>L'animal Crx-Cre/cOFF présente-t-il des anomalies visuelles ?</i> .....	191
<i>L'animal Crx-Cre/cOFF présente-t-il des anomalies cognitives ?</i> .....	192
<i>L'animal Crx-Cre/cOFF présente-t-il une anomalie de l'anxiété ?</i> .....	193
3.6 Discussion .....	195

## DISCUSSION ..... 201

Les anomalies neurodéveloppementales de la rétine, origine des perturbations de l'ensemble de l'axe visuel ? .....	203
Phénotypes rétinien et cérébral : quelles conséquences, et qui fait quoi ?.....	204
Altération de la perception de la perspective .....	204
Défaut de perception du contraste et du mouvement.....	206
Diminution de la sensibilité aux contrastes .....	208
Dernier trait visuel : quid de la vision des couleurs ? .....	211
Connaissance du phénotype visuel du Syndrome de l'X Fragile : où en sommes-nous aujourd'hui ?..	211
Vers une terminologie plus juste : parlons de dys-sensibilité .....	213
Phénotype visuel : des conséquences bien au-delà de simples « problèmes de vue ».....	214

Redonner du sens aux sens .....	215
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>218</b>
<b>PERSPECTIVE.....</b>	<b>219</b>
Petit tour dans la littérature du système visuel.....	219
<i>Période critique et maturation du cortex visuel.....</i>	<i>219</i>
<i>De la détermination d'un partenaire moléculaire crucial, Otx2, ...</i>	<i>219</i>
<i>... vers la preuve de la participation centrale de la rétine .....</i>	<i>220</i>
<i>Environnement cellulaire .....</i>	<i>220</i>
Quel lien avec le syndrome de l'X fragile ou la souris Fmr1 KO ? .....	221
Proposition d'étude expérimentale .....	222
<b>ANNEXES.....</b>	<b>223</b>
<b>Productions scientifiques .....</b>	<b>224</b>
<b>Publications dans des journaux de rang A .....</b>	<b>224</b>
<b>Articles en préparation.....</b>	<b>224</b>
<b>Communications .....</b>	<b>224</b>
Communications affichées.....	224
Communications orales .....	225
<b>Prix et récompenses.....</b>	<b>226</b>
<b>Prix pour communications affichées.....</b>	<b>226</b>
<b>Récompenses pour communications orales .....</b>	<b>226</b>
<b>Projets scientifiques .....</b>	<b>226</b>
<b>Encadrement.....</b>	<b>227</b>
<b>Formations.....</b>	<b>227</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>228</b>

# Figures

Figure 1 : Jeunes patients atteints du syndrome de l'X fragile.

Figure 2 : Représentation schématique des symptômes physiques du FXS.

Figure 3 : Imageries cérébrales d'un individu sain et d'un patient atteint du syndrome de l'X fragile.

Figure 4 : Caryotypes cytogénétiques de patients FXS.

Figure 5 : Représentation schématique du gène *FMR1*.

Figure 6 : Représentation schématique de la protéine FMRP, de ses principaux domaines et de leurs fonctions.

Figure 7 : Le phénotype varie en fonction du nombre de répétitions de triplets CGG dans la séquence du gène *FMR1*.

Figure 8 : Représentation schématique de la construction génétique portée par la souris *Fmr1* KO.

Figure 9 : Résultats comportementaux issus de la littérature illustrant les troubles cognitifs de la souris *Fmr1* KO.

Figure 10 : Résultats comportementaux issus de la littérature illustrant les troubles du comportement social de la souris *Fmr1* KO.

Figure 11 : Résultats comportementaux issus de la littérature illustrant les troubles neuro-associés de la souris *Fmr1* KO.

Figure 12 : Association des principales altérations relevées chez le modèle *Fmr1* KO aux symptômes cliniques des patients atteints du syndrome de l'X fragile (FXS).

Figure 13 : Représentation schématique des changements morphologiques au cours de la maturation dendritique, en conditions physiologiques.

Figure 14 : Phénotype cellulaire neuronal caractéristique du syndrome de l'X fragile (FXS).

Figure 15 : Représentation schématique des mécanismes engendrés par l'activation des récepteurs Gpl mGluR et de leurs conséquences sur la plasticité synaptique (LTD).

Figure 16 : Résultats issus de la littérature concernant le phénotype sensoriel auditif des patients FXS.

Figure 17 : Résultats issus de la littérature concernant le phénotype sensoriel auditif des souris *Fmr1* KO.

Figure 18 : Résultats issus de la littérature concernant le phénotype électrophysiologique auditif des souris *Fmr1* KO.

Figure 19 : Résultats issus de la littérature concernant le phénotype sensoriel tactile comportemental de la souris *Fmr1* KO.

Figure 20 : Résultats issus de la littérature concernant le phénotype sensoriel tactile fonctionnel de la souris *Fmr1* KO.

Figure 21 : Résultats issus de la littérature concernant le phénotype sensoriel tactile cellulaire et moléculaire de la souris *Fmr1* KO.

Figure 22 : Résultats issus de la littérature concernant le phénotype sensoriel olfactif comportemental de la souris *Fmr1* KO.



Figure 23 : Résultats issus de la littérature concernant le phénotype sensoriel olfactif cellulaire de la souris *Fmr1* KO.

Figure 24 : Courbes en trois dimensions représentant le comportement de contact visuel social d'enfants autistes et d'enfants FXS.

Figure 25 : Résultats issus de la littérature concernant le phénotype sensoriel visuel comportemental des patients FXS.

Figure 26 : Etude structurale et cellulaire des aires subcorticales visuelles chez un individu sain (à gauche) et un patient FXS (à droite).

Figure 27 : Bilan des connaissances relatives au phénotype sensoriel du syndrome de l'X fragile.

Figure 28 : Mise en évidence de transcrits du gène *Fmr1* et de la protéine FMRP dans la rétine de la souris.

Figure 29 : Représentation schématique d'un œil humain (vue en coupe sagittale).

Figure 30 : Représentation schématique de la structure cellulaire de la rétine.

Figure 31 : Représentation schématique de cellules photoréceptrices de type bâtonnet et de type cône.

Figure 32 : Images par microscopie électronique de bâtonnets et de cônes de primate.

Figure 33 : Différentes fonctions assurées par les 2 types de photorécepteurs.

Figure 34 : Représentation graphique de la densité des deux types de photorécepteurs en fonction de la distance à l'axe optique.

Figure 35 : Photopigment des cellules de type bâtonnet.

Figure 36 : Longueurs d'onde d'absorption des différents types de cônes.

Figure 37 : Marquages immunohistologiques de cellules de Müller.

Figure 38 : Exemple d'électroretinogramme humain.

Figure 39 : Exemple de courbes de sensibilité rétinienne.

Figure 40 : Projection des informations lumineuses de la rétine vers les aires cérébrales.

Figure 41 : Noyau géniculé latéral et colliculus supérieur.

Figure 42 : Projections de l'information visuelle depuis le cortex visuel primaire.

Figure 43 : Marquage immunohistologique montrant la présence et la répartition de la protéine FMRP dans la structure rétinienne, en conditions physiologiques.

Figure 44 : Impact d'une stimulation lumineuse sur la quantité et la fonction de régulation de la traduction de la protéine FMRP dans les cellules photoréceptrices de la rétine.

Figure 45 : Marquages immunohistologiques montrant la présence et la répartition des protéines Rhodopsine, PSD95, Syt1a et mGluR5 dans la rétine des souris WT et *Fmr1* KO.

Figure 46 : Phénotype rétinien cellulaire de la souris *Fmr1* KO.

Figure 47 : Structure cellulaire de rétines d'animaux WT et *Fmr1* KO.

Figure 48 : Quantification de plusieurs caractéristiques de l'électrophysiologie rétinienne enregistrées par ERG chez les souris WT et *Fmr1* KO.

Figure 49 : Architecture du plan expérimental mis en place pour la première étude.

Figure 50 : Modèles FXS-tissu-spécifiques proposés.

Figure 51 : Représentation schématique de la construction *Fmr1* cOFF.

Figure 52 : Représentation de la construction transgénique Tg(*Crx-Cre*).

Figure 53 : Hybridations in situ révélant l'expression du gène *Crx* dans la rétine en développement et mature.

Figure 54 : Recombinaison rétinienne induite par le Tg(*Crx-Cre*).

Figure 55 : Transcription rétinienne de *Fmr1* à P5 et à P25.

Figure 56 : Expression rétinienne de FMRP à P5 et à P25.

Figure 57 : Transcription rétinienne de *Rhodopsine* à P5 et à P25, *Psd95* à P5 et à P25.

Figure 58 : Expression rétinienne à P5 de Rhodopsine et PSD95.

Figure 59 : Expression rétinienne à P25 de Rhodopsine et PSD95.

Figure 60 : Exemples de courbes d'ERG d'animaux à 3 mois WT et *Crx-Cre/cOFF*.

Figure 61 : Paramètres d'ERG enregistrés à 3 mois, à savoir  $A_{max}$ ,  $B_{max}$ ,  $K$  et  $n$ .

Figure 62 : Paramètres d'ERG enregistrés à 6 mois, à savoir  $A_{max}$ ,  $B_{max}$ ,  $K$  et  $n$ .

Figure 63 : Courbes de sensibilité rétinienne à 3 mois et 6 mois.

Figure 64 : Transcription cérébrale de *Fmr1* à P5 et à P25.

Figure 65 : Expression cérébrale de FMRP à P5 et à P25.

Figure 66 : Analyse génotypique de la recombinaison du gène *Fmr1* cOFF.

Figure 67 : Transcription cérébrale de *Psd95* à P5 et à P25.

Figure 68 : Expression cérébrale de PSD95 à P5 et à P25.

Figure 69 : Etude du phénotype neuronal de la lignée.

Figure 70 : Etude de la recombinaison rétinienne induite par le Tg(*Crx-Cre*).

Figure 71 : Etude de la recombinaison cérébrale induite par le Tg(*Crx-Cre*).

Figure 72 : Etude histologique de la recombinaison cérébrale induite par le Tg(*Crx-Cre*).

Figure 73 : Expression de Cre recombinase et de GFP dans les testicules et la rate des animaux adultes de la lignée *Crx-Cre/RCE*.

Figure 74 : Transcription cérébrale de *Fmr1* dans l'hippocampe, le cervelet, le cortex visuel, le cortex somatosensoriel et les bulbes olfactifs.

Figure 75 : Analyse génotypique d'astrocytes d'animaux de lignée *Crx-Cre/cOFF*.

Figure 76 : Transcription de *Fmr1* dans des populations neuronales d'animaux de lignée *Crx-Cre/cOFF*.

Figure 77 : Transcription de *Fmr1* dans les tissus testiculaires d'animaux de lignée *Crx-Cre/cOFF* à P5.

Figure 78 : Expression testiculaire de FMRP à P5 et à P25.

Figure 79 : Masse testiculaire d'animaux de lignée *Crx-Cre/cOFF* à 6 mois.

Figure 80 : Etude de la compréhension des contrastes et mouvements par le test de l'optomètre.

Figure 81 : Etude des capacités de mémorisation par le test du labyrinthe en Y.

Figure 82 : Etude des capacités de mémorisation par le test du labyrinthe en Y.

Figure 83 : Etude de l'état d'anxiété par le test de la croix surélevée.

Figure 84 : Bilan des connaissances relatives au phénotype sensoriel visuel du syndrome de l'X fragile après ce travail de thèse.

# Abréviations

ABC	<i>Aberrant Behavior Checklist</i>
ABR	réponse du tronc cérébral auditif (en anglais <i>Auditory Brainstem Response</i> )
ADAMS	<i>Anxiety Depression And Mood Scale</i>
ADHA	trouble du déficit de l'attention avec hyperactivité (en anglais <i>Attention Deficit Hyperactivity Disorder</i> )
ADI(-R)	<i>Autism Diagnostic Interview (- Revised)</i>
ADN	Acide DesoxyriboNucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADOS	<i>Autism Diagnostic Observation Schedule</i>
$A_{max}$	amplitude maximale de l'onde a en ERG
AMPA	acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique
APA	association américaine de psychiatrie (en anglais <i>American Psychiatric Association</i> )
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messenger
ASD	trouble du spectre autistique (en anglais <i>Autism Spectrum Disorder</i> )
ATG	séquence d'initiation de la transcription
BCA	<i>BiCinchoninic acid Assay</i>
BET	Bromure d'Ethidium
BK	maxi canal potassique (en anglais <i>Big Potassium</i> )
$B_{max}$	amplitude maximale de l'onde b en ERG
BSA	albumine de sérum bovin (en anglais <i>Bovine Serum Albumin</i> )
C57BL6	souche murine dite " <i>Black 6</i> "
CA	corne d'Ammon
cKO	knock-out conditionnel (en anglais <i>Conditional Knock-Out</i> )
CO <sub>2</sub>	dioxyde de carbone
cOFF	knock-out conditionnel (en anglais <i>conditional OFF</i> )
cOFF	animal porteur de la construction <i>Fmr1</i> cOFF
Cre	enzyme de recombinaison (en anglais <i>Causes Recombination</i> )
<i>Cre</i>	gène d'expression de l'enzyme Cre
CREEA	Comité Régional d'Ethique pour l'Expérimentation Animale
<i>Crx</i>	gène d'expression de la protéine CRX, murin
CRX	protéine Cone-rod homeobox, murine
<i>Crx-Cre</i>	animal porteur du transgène Tg( <i>Crx-Cre</i> )
<i>Crx-Cre/cOFF</i>	animal porteur à la fois du transgène Tg( <i>Crx-Cre</i> ) et de la construction <i>Fmr1</i> cOFF
CS	Colliculus Supérieur
Ct	cycle seuil (en anglais <i>Cycle Threshold</i> )
DAPI	fluorochrome 4',6-diamidino-2-phénylindole
<i>dfmr1</i>	gène <i>Fragile Mental Retardation 1</i> de la drosophile
DiI	composé fluorescent 3H-Indolium, 2-[3-(1,3-dihydro-3,3-diméthyl-1-octadecyl-2H-indol-2-ylidene)-1-propényl]-3,3-diméthyl-1-octadecyl-, perchlorate
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DSM	manuel de référencement des troubles mentaux (en anglais <i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i> )
E[chiffre]	âge embryonnaire, en jours
ECL	<i>Enhanced ChemioLuminescence</i>
EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique
EEG	ElectroEncéphaloGramme
EGFP	protéine de fluorescence verte augmentée (en anglais <i>Enhanced Green Fluorescence Protein</i> )
EPM	test de la croix surélevée (en anglais <i>Elevated Plus-Maze</i> )
EPR	Epithelium Pigmentaire Rétinien
ERG	ElectroRétinoGramme
ERP	potentiel évoqué par un événement (en anglais <i>Event-Related Potential</i> )
<i>FMR1</i>	gène <i>Fragile Mental Retardation 1</i> , humain
<i>Fmr1</i>	gène <i>Fragile Mental Retardation 1</i> , murin
FMRP	<i>Fragile Mental Retardation Protein</i> , humaine et murine
FRAXA	site fragile du chromosome X
FXPOI	<i>Fragile X-associated Premature Ovarian Insufficiency</i>

FXRP	<i>Farnesoid X Receptor Protein</i> , humaine et murine
FXS	Syndrome de l'X fragile (en anglais <i>Fragile X Syndrome</i> )
FXTAS	<i>Fragile X-associated Tremor/Ataxia Syndrome</i>
GABA	acide gamma-aminobutyrique (en anglais <i>Gamma AminoButyric Acid</i> )
GCL	couche des cellules ganglionnaires (en anglais <i>Ganglionnar Cells Layer</i> )
GFAP	protéine acide fibrillaire gliale (en anglais <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i> )
GFP	protéine de fluorescence verte (en anglais <i>Green Fluorescence Protein</i> )
GpI	récepteurs du groupe 1
GZ	zone grise (en anglais <i>Grey Zone</i> )
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HK	domaine d'homologie à la riboprotéine nucléaire K
ICD-10	<i>International Classification of Diseases 10th Revision</i>
IL2	InterLeukine 2
INL	couche nucléaire interne (en anglais <i>Inner Nuclear Layer</i> )
IPL	couche plexiforme interne (en anglais <i>Inner Plexiform Layer</i> )
IPL	latence inter-pic (en anglais <i>InterPaek Latency</i> )
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
K	paramètre de l'ERG correspondant à l'intensité lumineuse nécessaire pour atteindre $B_{max}/2$
Kcnma1	sous-unité alpha-1 du canal BK (en anglais <i>Potassium Calcium-activated Channel, subfamily M alpha member 1</i> )
KO	extinction génique (en anglais <i>Knock-Out</i> )
loxP	séquence génétique issu du bactériophage P1 correspondant au site de recombinaison locus of X-over P1
LTD	dépression à long terme (en anglais <i>Long-Term Depression</i> )
LTP	potentialisation à long terme (en anglais <i>Long-Term Potentiation</i> )
MAN	Modulateur Allostérique Négatif
mGluR	récepteur métabotrope au glutamate (en anglais <i>metabotropic Glutamate Receptor</i> )
MMP-9	métalloprotéinase matricielle 9 (en anglais <i>Matrix Metalloproteinase 9</i> )
n	paramètre de l'ERG correspondant à la pente de la courbe de sensibilité de l'onde b dans sa partie linéaire
NBL	couche neuroblastique (en anglais <i>Neuroblastic Layer</i> )
NeuN	protéine Hexaribonucleotide Binding Protein-3
NMDA	acide (2R)-2-(méthylamino)butanedioïque
OCT	tomographie par cohérence optique (en anglais <i>Optical Coherence Tomography</i> )
OMIM	catalogue des gènes humains et des troubles génétiques (en anglais <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i> )
ONL	couche nucléaire externe (en anglais <i>Outter Nuclear Segment</i> )
OPL	couche plexiforme externe (en anglais <i>Outter Plexiform Layer</i> )
OS	segment(s) externe(s) des photorécepteurs (en anglais <i>Outter Segment</i> )
OTX, Otx	protéine Orthodenticle homeobox, murine
P[chiffre]	âge après la naissance, en jours
PBS	tampon phosphate salin (en anglais <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PCR	réaction en chaîne par polymérase (en anglais <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PFA	Paraformaldéhyde
PNN	réseau péri-neuronal (en anglais <i>PeriNeuronal Net</i> )
PSD95	protéine de densité post-synaptique de 95 kDa (en anglais <i>Postsynaptic Density-95kDa</i> ), humaine et murine
<i>Psd95</i>	gène d'expression de la protéine PSD95, murin
PV	parvalbumine
QI	Quotient Intellectuel
RCE	lignée murine reportrice ROSA26 CAG-boosted EGFP
RGG	motif Arginine-Glycine-Glycine
Rh1	Rhodopsine majoritaire chez la drosophile
RT-qPCR	PCR quantitative en temps réel (en anglais <i>Real Time quantitative PCR</i> )
SDS-PAGE	électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du laurylsulfate de sodium (en anglais <i>Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i> )
SEM	écart standard à la moyenne (en anglais <i>Standard Error of the Mean</i> )
SEN	Signal d'Exportation Nucléaire
SLN	Signal de Localisation Nucléaire
SRS	<i>Social Responsiveness Scale</i>
SVF	Serum de Veau Foetal
SVZ	zone sous-ventriculaire (en anglais <i>SubVentricular Zone</i> )
Syt1a	protéine Synaptotagmine 1a
Tg	transgène
UTR	région non traduite de l'ADN (en anglais <i>Untranslated Transcribed Region</i> )
UV	ultraviolet
WB	Western Blot
WT	animal sauvage (en anglais <i>Wild Type</i> )

# **Chapitre 1**

## **Introduction générale**

## Partie 1 - Le Syndrome de l'X Fragile

**Le syndrome de l'X fragile (FXS) (OMIM n°300624, ICD-10 n°Q99.6) est la première cause de déficience mentale héréditaire monogénique liée au chromosome X. A l'échelle mondiale, la prévalence parmi la population est estimée actuellement entre 1:4000 et 1:7000 chez les hommes, et entre 1:8000 et 1:11000 chez les femmes (Hunter et al., 2014). L'Union Européenne définissant une maladie rare comme une maladie affectant moins de 1:2000 individus, le syndrome de l'X fragile est catégorisé comme maladie rare. Cependant, sa prévalence est loin d'être négligeable, et est même égale à celle de la mucoviscidose (fibrose kystique) (Angelis et al., 2015). Le FXS est une pathologie syndromique. Elle se traduit par un phénotype clinique complexe, nécessitant une prise en charge lourde par l'entourage médical et institutionnel tout au long de la vie des patients, dont l'espérance de vie est normale (Angelis et al., 2015). Par conséquent, les études estiment que le coût total au cours d'une vie s'élève à environ 980000€ par patient (Angelis et al., 2015). Chaque patient nécessiterait une prise en charge à hauteur de 31000€ par an, dont 20% représentent les médicaments utilisés, ce qui démontre l'impact socio-économique significatif de cette pathologie (Angelis et al., 2015). En tant que maladie due à une anomalie du chromosome X, le syndrome de l'X fragile s'exprime par un phénotype complexe chez les hommes. Les femmes porteuses de cette anomalie sont, elles, hétérozygotes. Par conséquent elles sont asymptomatiques ou présentent un phénotype plus léger que celui décrit chez l'homme (Wolff et al., 1988). Ceci explique la différence de prévalence constatée à l'échelle de la population mondiale, et le caractère masculin attribué à la pathologie. Ainsi, le phénotype du syndrome de l'X fragile tel que décrit d'un point de vue clinique est décrit chez l'homme. Les études se concentrent majoritairement sur les patients masculins, et sur les mâles lors des études sur des modèles animaux. **Sauf mention contraire, les descriptions et résultats détaillés par la suite concerneront le patient masculin atteint du syndrome de l'X fragile.****

### 1.1 Description clinique du Syndrome de l'X Fragile

#### *1.1.1 La déficience mentale, le symptôme central du FXS*

**La déficience intellectuelle est le symptôme central du syndrome de l'X fragile. A l'heure actuelle, cette pathologie représente 2,4% des cas de déficience intellectuelle, ce qui en fait la seconde cause de déficience intellectuelle (après le syndrome de Down), et la première cause de déficience intellectuelle héréditaire chez l'homme (Hunter et al., 2014). L'intégralité des patients présente une déficience intellectuelle globale, caractérisée par un retard développemental et des troubles neurocognitifs à l'âge adulte (Huddleston et al., 2014).**

Maladie neurodéveloppementale, sa symptomologie est en place dès la naissance, et se manifestera tout au long de la vie de l'individu, s'exprimant de différentes manières et à des degrés divers selon les

patients. Dès le plus jeune âge, un **retard global de développement** se fait sentir : retard du langage (premiers mots à 2 ans et demi), retard de la locomotion (premiers pas à plus de 2 ans), et troubles de la sphère psychomotrice (Wisniewski et al., 1985; Alanay et al., 2007; Kover et al., 2015). Généralement, c'est l'observation de ces retards qui pousse les parents à consulter un médecin, et qui conduit à l'établissement du diagnostic. Les enfants atteints du syndrome de l'X fragile présentent aussi un retard de la mise en place de la lecture, et des difficultés d'apprentissage compliquant considérablement leur parcours scolaire (Adlof et al., 2015). Une mesure de l'évolution des capacités cognitives d'enfants diagnostiqués FXS et d'enfants au développement typique montre que les enfants atteints du syndrome de l'X fragile sont capables d'apprendre et de s'améliorer, mais dans une moindre mesure que les enfants au développement normal (Hall et al., 2008). Concrètement, le taux de croissance cognitive d'un enfant X fragile est moitié moins important que celui d'un enfant au développement typique, ce qui conduit à l'agrandissement progressif du fossé qui sépare un enfant non affecté d'un enfant affecté au cours de leur développement. Ceci explique un apparent déclin du QI avec l'âge chez les patients atteints du syndrome de l'X fragile (Hall et al., 2008).

Ainsi, à l'âge adulte, les patients présentent une **déficiência intellectuelle allant de sévère à modérée**. Sachant que la valeur normale du QI est établie à 70, les patients masculins se situent, eux, entre 20 et 70 (Fisch et al., 2002), avec 70% d'entre eux ayant un QI inférieur à 50 (Alanay et al., 2007; Garber et al., 2008). Ces patients montrent une faible mémoire à court terme, des difficultés de langage et des difficultés significatives avec les concepts abstraits et les mathématiques (Lewis et al., 2006; Hall et al., 2014). Ils présentent aussi un ensemble de limitations dans leurs fonctions exécutives, telles que la mémoire de travail, l'inhibition, les procédures séquentielles, ou la capacité à s'adapter (Hooper et al., 2008). D'une manière concrète, il leur est très difficile de se désengager d'une tâche et de s'engager dans une nouvelle tâche alors qu'ils désirent poursuivre la première. De plus, ils montrent des troubles de la motricité et de la coordination et des dysfonctions lors de tâches nécessitant de la coordination psychomotrice fines (Crowe and Hay, 1990; Freund and Reiss, 1991; Cornish et al., 1999; Baranek et al., 2005).

La **vie quotidienne** des patients est par conséquent complexifiée sur de nombreux aspects, leur déficiencia mentale rendant impossible de s'approprier certains concepts de la vie courante, tels que le temps, l'argent, les nombres (Raspa et al., 2018). A titre d'exemple, 30% ne sont pas capable de dire la date du jour, et ne comprennent pas le concept de « demain ». Environ 60% comprennent que l'argent sert à acheter des choses, et moins de 10% sont capables de juger s'ils ont assez d'argent pour acheter une chose et donner la valeur approximative au caissier. Seuls 50% sont capables de compter jusqu'à 10 correctement, de comprendre ce que « premier » et « dernier » signifient, et de lire l'heure (Raspa et al., 2018). Ces diverses et nombreuses incapacités rendent leur autonomie difficile, et peuvent mettre en jeu leur sécurité : la moitié des patients ne savent pas suivre la signalisation pour traverser une rue sans danger, ou comprendre les enjeux de leur propre sécurité vis-vis d'un étranger, par exemple (Raspa et al., 2018).

### 1.1.2 Les troubles de type autistique : les patients sont-ils « autistes » ?

**Le deuxième symptôme le plus fort du syndrome de l'X fragile est la présence de troubles de type autistique chez environ 40% des patients. Les patients montrent des anomalies de la sphère sociale et de la réciprocité socio-émotionnelle, illustrés par une pauvreté du contact visuel, un refus du contact tactile et des troubles de la communication. Les patients présentent aussi des mouvements typiques tels que des battements de mains et des stéréotypies (Hagerman et al., 1991; Kaufmann et al., 2004; Schneider et al., 2009).**

#### *Autisme, ou troubles de type autistique ?*

Diagnostiquer « **l'autisme** » chez les patients FXS est une tâche délicate, rendue difficile par les chevauchements des symptômes de l'anxiété sociale, de l'autisme, des déficits de langages et de la déficience mentale d'une manière générale. A cela s'ajoute une corrélation entre l'importance de la déficience mentale et l'ampleur des troubles autistiques (McDuffie et al., 2010; Wheeler et al., 2015). Différents tests et échelles d'évaluation de l'autisme ont été appliqués sur des cohortes de patients, et rapportent qu'une partie considérable des patients rentre dans les critères des troubles du spectre autistique (Harris et al., 2008). Les proportions de patients considérés comme autistes varient selon le test utilisé : pour une même cohorte, en se basant sur les critères de l'ADOS, 32% des patients sont classés autistes, et ce taux monte à près de 50% avec les critères ADI-R (Harris et al., 2008). Les différences s'expliquent par le moyen de collecte des données, l'un utilisant les retours historiques des parents et soignants accompagnant le patient, l'autre évaluant le comportement actuel du patient par un clinicien (Harris et al., 2008) (*voir paragraphe « tests et échelles d'autisme appliqués au FXS »*).

Ainsi, en se basant sur les critères énoncés dans le *DSM-IV-TR* (American Psychiatric Association, 2000), environ 40% des patients atteints du syndrome de l'X fragile sont considérés comme souffrant de troubles autistiques (catégorie *Autism Disorders*). Cependant, cette catégorisation a été modifiée pour la parution du *DSM-5*, édition la plus récente du DSM publiée en 2013 par l'APA (American Psychiatric Association, 2013). Désormais, il convient de parler de Troubles du Spectre Autistiques (ASD, en anglais *Autism Spectrum Disorders*), et les critères de cette catégorie ont été considérablement remaniés (redistribution des symptômes dans les différents critères et augmentation du nombre de symptômes minimum à atteindre). Par conséquent, en appliquant scrupuleusement le *DSM-5*, la proportion de patients atteints du syndrome de l'X fragile présentant des troubles du spectre autistique est désormais d'environ 30% (Wheeler et al., 2015). **Quoi qu'il en soit, le syndrome de l'X fragile se caractérise par une présence indéniable de la symptomologie autistique, puisque plus de 90% des patients montrent au moins un comportement autistique (Brock and Hatton, 2010).**

#### *Troubles associés au spectre autistique*

Les patients atteints du syndrome de l'X fragile présentent d'autres symptômes faisant partie des troubles associés au spectre autistique, certaines échelles prenant en compte les comportements qui leur



sont associés pour catégoriser les patients. Ces symptômes composent un profil psychologique assez uniforme, mais s'exprimant avec des prévalences plus ou moins importantes et de manière plus ou moins forte parmi la population des patients.

L'**hyperactivité** associée à des troubles de l'attention (ADHA, en anglais *Attention Deficit and Hyperactivity Disorders*) est le symptôme le plus communément diagnostiqué chez les patients atteints du syndrome de l'X fragile. Des études reportent que 84% des patients souffrent de déficit de l'attention et 66% montrent un comportement hyperactif (Bailey et al., 2008). Tout comme dans la population générale touchée par ce trouble, les caractéristiques de ce dernier évoluent au cours de la vie des individus avec une rapidité d'évolution en un court laps de temps particulièrement prononcée chez les patients FXS (Tranfaglia, 2011). En effet, les très jeunes enfants porteurs de la pathologie sont souvent hypoactifs avec une attention légèrement altérée (Tranfaglia, 2011). Au cours de l'enfance, et en particulier lors des âges des premières années de la vie scolaire, les patients connaissent une forte augmentation de leur niveau d'activité, menant rapidement à un comportement turbulent et perturbateur (Tranfaglia, 2011). L'hyperactivité va ensuite généralement s'atténuer avec la croissance de l'enfant et l'augmentation de la masse corporelle, mais le déficit d'attention persistera tout au long de la vie de l'individu (Tranfaglia, 2011). De manière concrète, les patients montrent de grandes difficultés à discriminer une cible d'un événement de distraction, et à inhiber des impulsions qui les mènent à changer leur centre d'attention (Munir et al., 2000). Le déficit d'attention constaté chez les patients atteints du syndrome de l'X fragile s'exprime selon un schéma spécifique à cette pathologie, différent d'autres troubles neurodéveloppementaux (Munir et al., 2000).

Soixante-dix pourcents des patients atteints du syndrome de l'X fragile montrent également une large gamme de **symptômes anxieux**, tels que des phobies spécifiques, des peurs paniques, des troubles obsessionnels compulsifs, une anxiété généralisée, et surtout une phobie sociale (Bailey et al., 2008). Là encore, caractériser l'anxiété n'est pas chose aisée chez des patients déficients mentaux éprouvant des difficultés à reconnaître et à communiquer leurs émotions (Boyle and Kaufmann, 2010). Cependant, certains signes et comportements permettent de cerner ces anxiétés. Parmi les signes décrits le plus classiquement chez les patients, la pauvreté du contact visuel, l'aversion pour le regard direct et la timidité excessive sont des traits comportementaux illustrant une anxiété due à la phobie sociale. L'anxiété peut aussi expliquer d'autres comportements typiques comme les battements de main, les morsures des mains ou l'agressivité (Boyle and Kaufmann, 2010).

En effet, à ces symptômes s'ajoutent des **troubles de l'humeur**, tels que de l'irritabilité, une humeur labile, des accès d'agressivité et des comportements d'automutilation constatés chez 40% des patients (Bailey et al., 2008). Ces symptômes ont généralement un caractère fugace et épisodique, provoqués par un environnement perçu comme anxiogène par le patient (Tranfaglia, 2011).

#### *Tests et échelles « d'autisme » appliqués aux patients FXS*

Évaluer les troubles de type autistiques chez des patients atteints de déficience intellectuelle est une tâche très complexe, qui ne peut être qu'en partie résolue. Les symptômes de déficience intellectuelle et

de troubles autistiques sont intimement liés, et leurs manifestations peuvent être aussi bien la cause que la conséquence de certains de ces symptômes. Le phénotype comportemental de pathologie mêlant ces deux aspects est extrêmement complexe.

Lors des études de patients atteints du syndrome de l’X fragile, ces derniers étaient généralement évalués par leur quotient intellectuel que par leurs troubles autistiques. Pendant de nombreuses années, les patients étaient même catégorisés comme autistes, et leur comportement évalué suivant des échelles d’autisme. L’échelle la plus largement utilisée fut, et est encore, l’*Aberrant Behavior Checklist (ABC)*, (Aman et al., 1985). Cette échelle se compose d’une série de questions posées aux parents du patient, qui doivent évaluer la gravité d’un comportement chez leur enfant. Ainsi, la question n’est pas de savoir si un trouble est présent, mais si les accompagnants considèrent que ce trouble n’est pas problématique (score 0) ou pose un problème sévère (score 3). Le résultat obtenu à la fin des 58 questions donne un score au patient. Il paraît ainsi assez évident que ce score est subjectif, et ne permet pas de noter la présence ou non d’un trouble, mais plutôt la gêne que l’entourage perçoit. Sur la base de ce test, différents arrangements ont été proposés pour tenter d’adapter l’ABC à diverses maladies, regroupant les troubles par catégories. Cette échelle a surtout été utilisée dans le cadre d’essais thérapeutiques, afin d’évaluer l’évolution du patient avant et après une thérapie. Parmi les tests plus couramment utilisés, on retrouve aussi l’*Autism Diagnostic Interview (ADI)*, (Lord et al., 1994). Ce test se base aussi sur un ensemble de questions posées aux parents du patient, qui permet de rentrer en détails sur de nombreux troubles spécifiques de l’autisme. Ce test, très long, permet d’identifier quels sont les comportements les plus anormaux et leur degré. La description classe les comportements en 3 catégories (communication, jeu et développement social), rendant ce test réellement adapté à l’autisme (et pas aux comportements anormaux d’une manière générale, comme l’est l’ABC). Citons aussi le *Social Responsiveness Scale (SRS)*, (Constantino et al., 2004), ensemble de questions posées aux parents de manière à évaluer les troubles relationnels et les anomalies de la sphère sociale, ou encore l’*Anxiety Depression And Mood Scale (ADAMS)*, (Esbensen et al., 2003), là encore basée sur la réponse des parents quant à la fréquence et le caractère problématique des troubles de l’humeur (anxiété, dépression) de leur enfant. Ces dernières évaluations demeurent cependant assez générales, et peuvent paraître parfois assez peu adaptées. L’ensemble de ces évaluations se base sur les réponses obtenues des parents. Ceci présente l’inconvénient de se heurter à la barrière de la déficience mentale, difficile au quotidien à différencier les troubles autistiques, et à l’affectif des parents pour leur enfant. Cependant, ce dernier aspect présente également, aux dires de professionnels pratiquant certains de ces tests, l’avantage d’obtenir le ressenti de personnes connaissant intimement et au quotidien le patient. Le comportement au quotidien est très informatif et peut participer à mettre en évidence des symptômes jusqu’alors sous-estimés par, ou invisibles pour, les praticiens. Le ressenti humain de l’entourage constitue une vraie richesse pour l’exploration et la caractérisation des troubles comportementaux des patients. Ceci pourrait certainement participer à améliorer la catégorisation en « troubles de type autistique » dans le cas du syndrome de l’X fragile, et à le différencier clairement de l’autisme idiopathique. **Malheureusement, il n’existe à ce jour aucune échelle spécifiquement adaptée au phénotype propre du syndrome de l’X fragile. Le caractère**

**particulier et unique de la mosaïque comportementale de ces patients mériterait toutefois qu'une échelle adaptée leur soit dédiée.** L'absence de test adapté est tenue pour responsable de l'échec des essais cliniques menés jusqu'à présent, en rendant impossible une description claire et précise des symptômes et comportements des patients (Berry-Kravis et al., 2018).

### *1.1.3 Les troubles sensoriels*

Ainsi les patients atteints du Syndrome de l'X Fragile présentent des traits comportementaux caractéristiques des troubles autistiques en lien avec la sphère sensorielle. Le refus du contact tactile, par exemple, est très marqué chez les patients dès leur enfance, 80% d'entre eux ayant une très forte aversion pour tout contact tactile (Hagerman et al., 1991). En plus de refléter une anxiété sociale prononcée, ce phénotype peut également être une illustration d'une perturbation purement sensorielle de la perception et de l'intégration des stimuli tactiles et nociceptifs. Il en est de même avec la fuite du regard des patients, refusant tout contact visuel avec un interlocuteur et ne fixant pas un visage de manière prolongée (Cohen et al., 1989, 1991). Ce comportement est un signe de refus du contact social, mais peut aussi être la traduction d'une difficulté à percevoir et intégrer des indices visuels environnementaux et de communication non verbale (Garrett et al., 2004). **D'une manière générale, l'intégralité des patients atteints du Syndrome de l'X fragile montre une sensibilité particulière face aux stimuli sensoriels.** Une étude a reporté une réponse électrodermale augmentée chez ces patients en réponse à des stimuli olfactifs, auditifs, visuels et tactiles (Miller et al., 1999), indiquant une anomalie de la perception et de l'intégration de ces stimuli chez les patients. Cependant, jusqu'à présent, peu d'études ont investigué ces troubles chez les patients pour en faire une description claire.

### *1.1.4 Les troubles neuro associés*

**L'épilepsie représente une importante comorbidité chez les patients FXS.** Chez les enfants, 10 à 20% des garçons sont épileptiques, et cette caractéristique perdure chez 25% de ces patients à l'âge adulte (Berry-Kravis et al., 2010). Les crises les plus fréquentes chez ces patients sont des crises partielles complexes (90%), suivies par des crises tonico-cloniques généralisées (46%) et les crises partielles simples (25%) (Musumeci et al., 1999; Berry-Kravis et al., 2010). Ces crises s'accompagnent dans 7% des cas de convulsions fébriles (Musumeci et al., 1999). Fort heureusement, la plupart des patients répondent aux traitements anti épileptiques (Berry-Kravis et al., 2010).

Enfin, **les patients atteints du syndrome de l'X fragile sont sujets à des troubles du sommeil.** Environ 30% d'entre eux éprouvent des difficultés à s'endormir, et se réveillent plusieurs fois par nuit (Kronk et al., 2010). L'ensemble du cycle circadien des individus semblent donc perturbé, puisque les patients montrent à la fois des réveils répétés au cours de la nuit et un éveil très tôt le matin, ainsi que des endormissements pendant la journée (Kronk et al., 2010). Une étude a souligné un lien intéressant entre individus éprouvant ces problèmes de sommeil et d'autre symptômes (humeur, capacité à

s'adapter, capacité d'écoute, ...) aggravés chez ces individus (Kronk et al., 2010). Il n'est évidemment pas possible de faire un lien direct entre ces troubles du sommeil et ces difficultés fonctionnelles, mais des études réalisées chez les enfants ont souligné un lien entre les fonctions neurocomportementales et le sommeil (Sadeh et al., 2002; Touchette et al., 2007). Implicitement, il est possible que les enfants FXS souffrant d'une mauvaise qualité de sommeil voient leurs capacités cognitives et comportementales altérées par ce trouble fonctionnel (Kronk et al., 2010).

### 1.1.5 Les symptômes physiques

**L'anatomie corporelle des patients trahit également la pathologie. En particulier, une augmentation du volume testiculaire (macroorchidie) est constatée chez la totalité des sujets après leur puberté** (Turner et al., 1975; Bowen et al., 1978; Lachiewicz and Dawson, 1994). La pénétrance très importante et incontournable du phénotype de macroorchidie en fait le troisième symptôme le plus marquant du syndrome de l'X fragile, après la déficience mentale et les troubles de type autistique. Les patients adultes ont un volume testiculaire d'environ 50mL quand la moyenne chez un homme sain est inférieure à 25mL. Il est intéressant de noter que ce symptôme ne s'est pas montré source de trouble de la reproduction ou de la fertilité, puisque les patients sont aptes à se reproduire (Turner et al., 1975).

D'un point de vue physique, à la naissance, les poids, taille et périmètre crânien d'un nouveau-né atteint du syndrome de l'X fragile sont normaux (Lachiewicz et al., 2000). Toutefois, **les jeunes patients commencent à montrer assez tôt dans leur enfance des traits physiques précoces**, qui se caractérisent la plupart du temps par un visage long et étroit, et des oreilles décollées (Lachiewicz et al., 2000; Hagerman and Hagerman, 2002; Heulens et al., 2013) (Figures 1 et 2). D'autres caractéristiques physiques se développeront ensuite avec la croissance de l'enfant jusqu'à sa puberté. Au niveau du visage ces traits sont visibles, avec des yeux proches et cerclés de poches, associés à des fentes palpébrales allongées, un nez large et plat, un philtrum élargi, une mâchoire proéminente, et une hypotonie faciale générale, conférant au patient un facies caractéristique et reconnaissable (Lachiewicz et al., 2000; Hersh et al., 2011; Heulens et al., 2013) (Figures 1 et 2). Il est tristement intéressant de noter qu'au-delà de l'aspect esthétique, les traits physiques précédemment décrits peuvent avoir de douloureuses conséquences sur la santé du patient. Par exemple, la dysmorphie nasale gêne l'écoulement sinusal, expliquant l'augmentation des cas de sinusite chez les patients (Kidd et al., 2014). De la même manière, la dysmorphie faciale engendre un affaissement des tubes auditifs (trompes d'Eustache), empêchant un drainage normal des fluides et favorisant l'accumulation de bactéries dans l'oreille moyenne, ce qui explique l'augmentation des cas d'otites chez les jeunes patients (Hagerman et al., 1987; Kidd et al., 2014).



*adapté de Penagarikano et al. 2007*

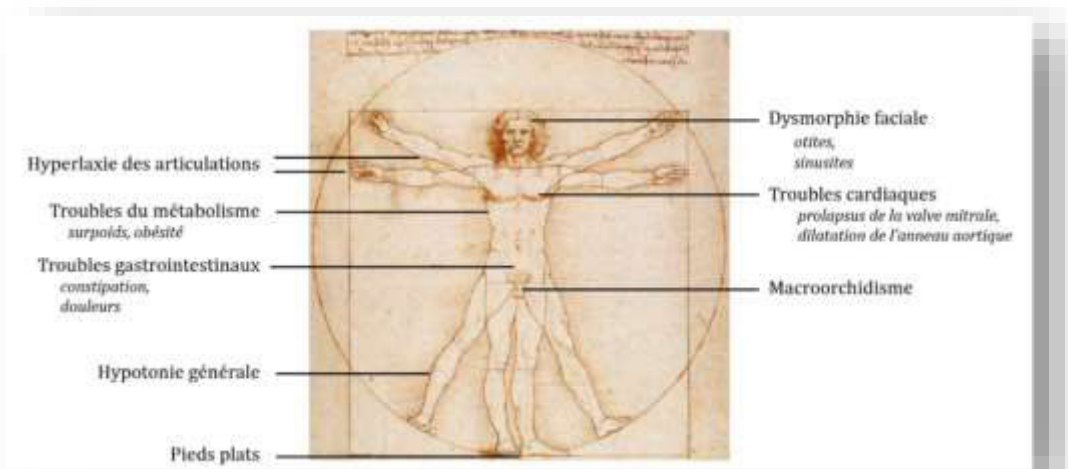


*adapté de Ciaccio et al. 2017*

**Figure 1 : Jeunes patients atteints du syndrome de l’X fragile.**

Notons le faciès caractéristique du FXS : le visage long, les oreilles décollées, le front large, le nez large et plat, des fentes palpébrales allongées, un philtrum élargi.

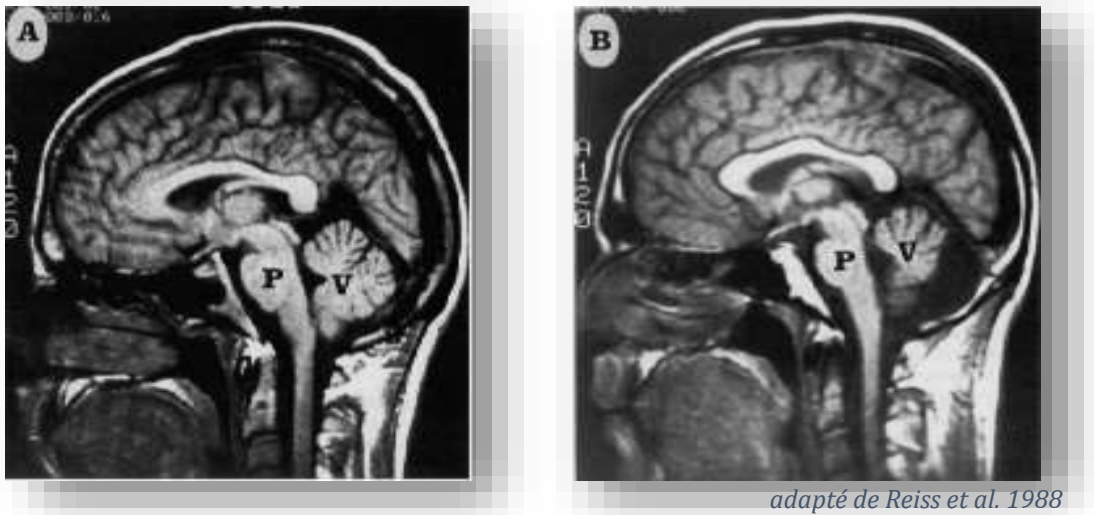
Diverses autres parties du corps des patients présentent des anomalies (Figure 2). En particulier une anomalie des tissus connectifs engendre une hyperlaxie des articulations chez la moitié des patients, affectant tout particulièrement leur articulations metacarpo-phalangiennes (Saul and Tarleton, 1993). Cette anomalie, associée à une hypotonie générale, est aussi à l’origine des troubles cardiaques, notamment un prolapsus de la valve mitrale et une dilatation de l’anneau aortique (Pyeritz et al., 1982; Sreeram et al., 1989), et gastrointestinaux (Goldson and Hagerman, 1993; Utari et al., 2010) décrits chez les patients. Enfin des troubles du métabolisme sont aussi couramment documentés, générant un surpoids ou de l’obésité chez environ 60% des patients (Lisik et al., 2016).



**Figure 2 : Représentation schématique des symptômes physiques du FXS.**

### 1.1.6 Les patients présentent-ils des anomalies de l'anatomie cérébrale ?

Dès les premières imageries cérébrales opérées sur les patients atteints du Syndrome de l'X fragile, les cliniciens ont notifié l'absence de différence de volume global entre un cerveau de patient et un cerveau d'individu sain (Reyniers et al., 1999; Gothelf et al., 2008). En revanche, quelques anomalies structurales spécifiques à cette pathologie ont été mises en évidence, et leur localisation a souvent été reliée aux symptômes cliniques des patients. La première d'entre elles, observée en 1988, est une hypoplasie du vermis cérébelleux (ou paleocerebellum) (Reiss et al., 1988) (Figure 3). Par la suite, un lien sera établi entre diminution du volume du vermis cérébelleux et des symptômes autistiques tels que les stéréotypies et les troubles de la communication (Mazzocco et al., 1998).



**Figure 3 : Imageries cérébrales (A) d'un individu sain et (B) d'un patient atteint du syndrome de l'X fragile.**

L'imagerie démontre la diminution du volume du vermis cérébelleux (V) chez le patient FXS par rapport à un individu sain. Imagerie par IRM, cerveaux vues en coupes sagittales. P : pédicule cérébral ; V : vermis cérébelleux.

Par la suite les imageries ont montré une augmentation du volume de l'hippocampe, structure particulièrement importante pour la mémoire et l'apprentissage (Reiss et al., 1995). De plus, connaissant les troubles des fonctions exécutives (attention, inhibition, comportement dirigé vers un objectif, organisation) vécus par les patients, il ne fut pas surprenant d'observer des anomalies dans les structures centrales régissant ces comportements. En particulier, le noyau caudé, structure associée au putamen pour effectuer le filtrage et l'organisation des informations ainsi qu'aux aires frontales pour contrôler l'attention et la planification motrice, présentait une forte augmentation de volume chez les patients diagnostiqués FXS observés par IRM (Reiss et al., 1995). Par conséquent, cette augmentation volumique fut associée à la diminution de QI des patients FXS (Reiss et al., 1995).

L'ensemble de ces constatations, réalisées par mesure de surface d'intérêt sur des images d'IRM, ont été reproduites ultérieurement avec des technologies plus avancées et donnant accès à plus de données, affinant ainsi les mesures effectuées. En particulier, la modélisation volumétrique basée sur le couplage de voxel et de surface a confirmé que les patients FXS et les individus contrôles ne présentent pas de différence du volume cérébral global (Gothelf et al., 2008). Elle a aussi confirmé les résultats précédemment décrits. Notamment, les mesures des noyaux caudés ont montré une importante augmentation volumique de cette structure de l'ordre de 23% (Gothelf et al., 2008). Cependant, cette fois-ci, l'augmentation de la taille du noyau caudé a été reliée au comportement aberrant du FXS, mais pas au score de QI. Selon certains auteurs l'élargissement du noyau caudé joue un rôle dans les comportements anormaux, tels que les stéréotypies et l'hypersensibilité sensorielle, tandis que les modifications du vermis cérébelleux sont plutôt à relier aux altérations cognitives (Schneider et al., 2009). L'imagerie a aussi révélé une diminution du volume de l'amygdale, ce qui peut expliquer les comportements d'anxiété et de retrait sociaux.

De plus, une analyse des volumes de substance blanche et de substance grise dans plusieurs régions cérébrales de jeunes patients (entre 1 et 3 mois) a montré les mêmes résultats que ceux observés jusqu'alors sur des patients plus âgés (Hoeft et al., 2008). Détecter des anomalies de structures cérébrales aussi précocement dans la vie d'un individu est la preuve que les facteurs génétiques régulent le développement cérébral très tôt dans l'enfance, voire de manière prénatale. **Quoi qu'il en soit, pour ce qui concerne le Syndrome de l'X fragile, ces observations attestent que la plupart des anomalies neuro-anatomiques constatées chez les patients sont spécifiquement d'origine constitutive plutôt que la conséquence du retard mental (Schneider et al., 2009).**

Enfin, il semble important de souligner que les anomalies neuro-anatomiques constituent une signature unique de la pathologie. En effet, si l'on compare les imageries IRM d'hommes diagnostiqués FXS avec celles d'hommes atteints d'autisme idiopathique, les patients atteints du Syndrome de l'X fragile, présentent une claire augmentation de leur noyau caudé, et les patients autistes ont, quant à eux, une plus grosse amygdale (Hazlett et al., 2009). De plus, les patients atteints du FXS ne présentent pas, entre eux, de différence dans ces régions cérébrales, qu'ils soient atteints d'autisme ou non. Cette étude souligne de manière anatomique le caractère unique du Syndrome de l'X fragile, en marquant clairement la différence avec l'autisme idiopathique. Ces données affirment de manière empirique qu'il existe différentes manières d'atteindre un comportement de type autistique.

**Ainsi le cerveau des patients atteints du Syndrome de l'X Fragile présente des anomalies volumiques très spécifiques et se restreignent à des régions cérébrales très localisées. La communauté scientifique s'accorde à dire que les cerveaux des patients ont une anatomie sans anomalie majeure de développement et de structure.**

## 1.2 A propos de l'existence d'un phénotype féminin

Dans un souci d'équité, et bien que les femmes porteuses de la pathologie ne soient pas le sujet de cette étude, il semble important d'aborder et décrire les caractéristiques de ces dernières, et les troubles dont elles peuvent souffrir elles aussi. **Les femmes sont moins affectées que les hommes par la présence d'un allèle muté sur l'un de leur chromosome X. Les femmes porteuses d'un allèle sont asymptomatiques ou présentent un phénotype clinique allégé en comparaison de celui, assez lourd, montré par les sujets masculins (Freund et al., 1993).** La cause de ce phénomène est que la présence de la mutation sur l'un des deux chromosomes influence une expression prédominante du chromosome porteur de l'allèle non muté, ce qui compense le défaut d'expression du chromosome muté (Wolff et al., 1988). Ainsi, les femmes hétérozygotes pour la mutation responsable du FXS présentent généralement un QI normal ou très légèrement diminué, générant pour certaines d'entre elles des difficultés d'apprentissage (Wolff et al., 1988; Freund et al., 1993). Elles sont, dès lors, peu touchée par la déficience intellectuelle (Wolff et al., 1988; de Vries et al., 1996). Cependant, bien que peu affectées sur le plan cognitif, elles montrent une plus grande fréquence de **troubles de l'humeur et de stéréotypies**, sans pour autant souffrir d'hyperactivité ou de déficit de l'attention. Leur entourage reporte un comportement réservé et déprimé, illustrant un trouble de la socialisation et une diminution de leurs compétences interpersonnelles (Freund et al., 1993).

## 1.3 L'étiologie du syndrome de l'X fragile

La transmission d'un retard mental suivant un schéma lié au chromosome X fut démontrée pour la première fois au sein d'une grande famille en 1943 par Martin et Bell (Martin and Bell, 1943). En 1969, Lubs détecta pour la première fois une **construction anormale à l'extrémité du bras long du chromosome X** dans le caryotype cytogénétique de plusieurs membres d'une même famille atteints de retard mental (Lubs, 1969) (Figure 4).

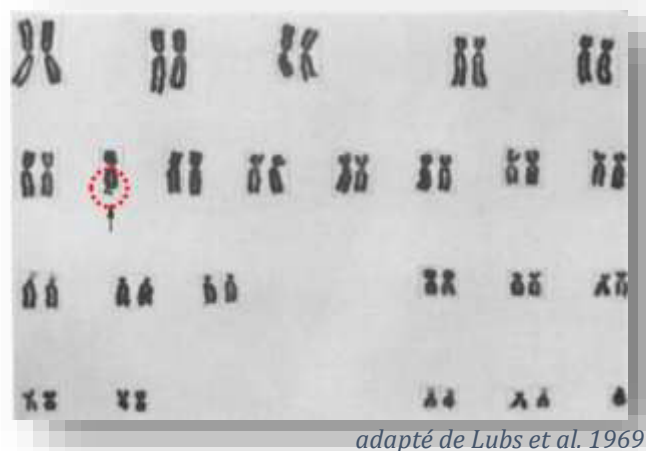


Figure 4 : Caryotypes cytogénétiques de patients FXS.

Notons la présence d'excroissances anormales, appelées « marqueurs X » (entourées en rouge), au bout des bras longs du chromosome X. Les chromosomes sont ici en métaphase.

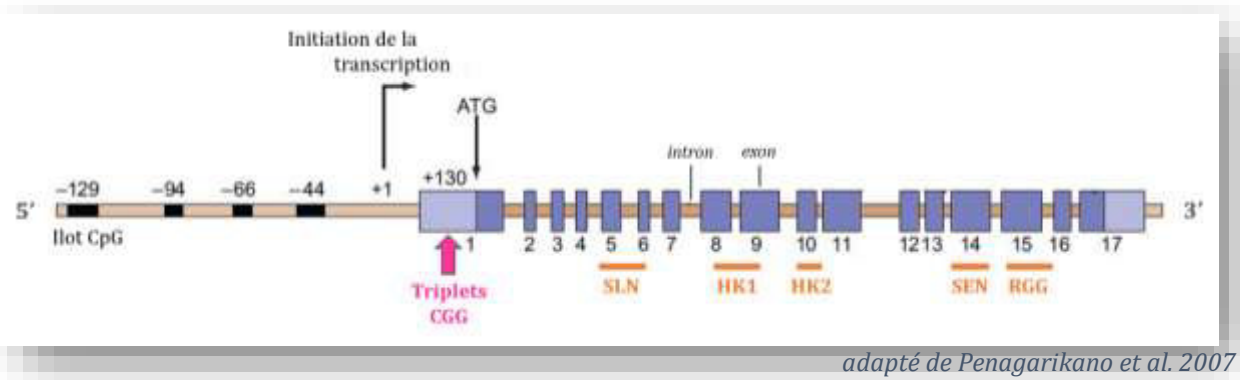


Cette « excroissance » anormale fut dès lors identifiée comme liée à une zone de cassure chromosomique, située dans un site fragile du chromosome X qui fut nommé FRAXA, pour Fragilité du chromosome X (le dernier A de l'initiale indiquant que ce site de fragilité était le premier décrit sur ce chromosome) (Berger et al., 1985).

Par conséquent, le syndrome de Martin et Bell fut désormais désigné Syndrome de l'X fragile (Richards and Sutherland, 1994). Le site de fragilité associé à ce syndrome fut situé dans le locus Xq27.3 (Harrison et al., 1983), et des études par hybridations encadrant ce site permirent d'identifier une séquence anormalement méthylée chez les patients (Heitz et al., 1991; Oberlé et al., 1991). C'est en 1991 qu'un gène élongué chez les patients et coïncidant avec le site fragile du chromosome X fut identifié (Verkerk et al., 1991). **Il est maintenant établi que ce gène est à lui seul responsable du syndrome de l'X fragile : le gène *FMR1*.**

### 1.3.1 Le gène *FMR1*

Le gène *FMR1* est localisé dans le bras long du chromosome X, situé dans le locus Xq27.3. Sa longueur totale est de 38 kb, et il se compose de 17 exons (Eichler et al., 1993) (Figure 5). Le premier exon du gène *FMR1* est caractérisé par la présence de la répétition d'un triplet de nucléotides CGG dans sa partie 5' UTR. Cette répétition est polymorphique, sa taille variant entre 6 et 44 unités chez des individus sains (Fu et al., 1991; Ciaccio et al., 2017). De plus, le gène possède un îlot CpG en amont de sa partie codante (Figure 5).



**Figure 5 : Représentation schématique du gène *FMR1*.**

Notons la présence d'une séquence constituée de la répétition de triplets CGG dans le premier exon. En orange : domaines protéiques codés à partir des séquences génétiques indiquées. ATG : séquence d'initiation de la transcription ; SLN : signal de localisation nucléaire ; SEN : signal de d'exportation nucléaire ; HK : domaine d'homologie à la riboprotéine nucléaire K ; RGG : motif Arginine-Glycine-Glycine ; CpG : Cytosine-poly-Guanine.

Chez l'humain, en condition physiologique, **le gène *FMR1* s'exprime dans certains tissus spécifiques au cours du développement de l'organisme** (Lim et al., 2005). Durant le développement embryonnaire, le tube neural montre de forts niveaux de transcrits du gène *FMR1* dès 21 jours (Lim et

al., 2005). Cette expression perdure et s'intensifie pour être présente dans toutes les régions cérébrales de l'embryon de 4 semaines (Abitbol et al., 1993; Agulhon et al., 1999). On la retrouve en particulier dans les cellules en prolifération et en migration, majoritairement des cellules neuronales, chez des fœtus de 9 et 25 semaines (Abitbol et al., 1993). En particulier, le fœtus de 25 semaines exprime de nombreux transcrits du gène *FMR1* dans ces neurones en prolifération de l'hippocampe, du noyau basal magnocellulaire, du néocortex, du striatum, du thalamus et du cervelet (Abitbol et al., 1993). D'autre part, des structures non cérébrales, telles que l'œil, le cartilage et les gonades expriment le gène *FMR1* (Abitbol et al., 1993). Tout comme pour les stades embryonnaire et fœtal, les stades post-nataux connaissent une expression du gène dans des tissus neuronaux et non neuronaux. En effet, chez l'adulte, des niveaux élevés de transcrits ont été constatés dans le cerveau, les testicules, les ovaires, le thymus, l'œsophage et la rate. **Dans le système nerveux central, on trouve une forte expression de *FMR1*** notamment dans les bulbes olfactifs, l'hippocampe et le cervelet (Bakker et al., 2000).

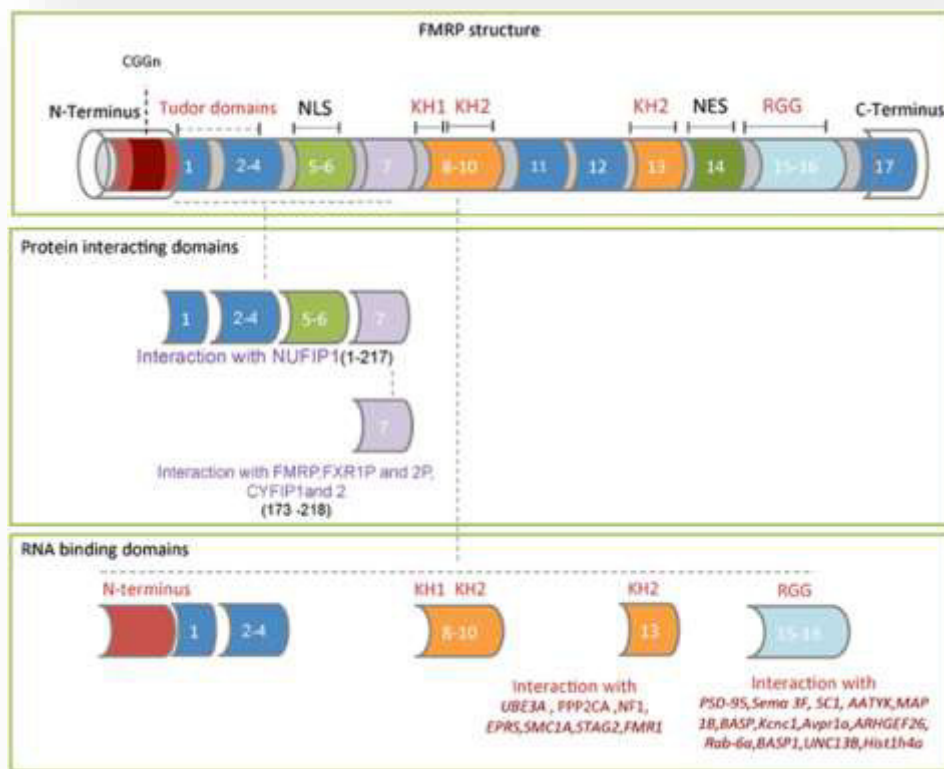
### 1.3.2 La protéine FMRP

Lors de sa transcription, le gène *FMR1* peut être épissé dans 5 régions pour encoder 12 isoformes protéiques entre 67 et 80kDa, connus collectivement sous le nom de FMRP (Devys et al., 1993; Siomi et al., 1993; Verkerk et al., 1993). Les différents isoformes n'ont pas montré de région de prédominance parmi les structures d'expression du gène *FMR1*, et participent tous à la mise en place de l'information génétique de *FMR1* (Verkerk et al., 1993). **La séquence de FMRP présente des motifs révélateurs de sa fonction cellulaire.** Tout d'abord, un signal de localisation nucléaire (SLN) ainsi qu'un signal d'exportation nucléaire (SEN) renseignent sur l'activité de navette que la protéine FMRP réalise dans la cellule (Eberhart et al., 1996; Feng et al., 1997) (Figures 5 et 6). FMRP est localisée de manière prédominante dans le cytoplasme mais elle est présente également dans le noyau des cellules qui l'expriment (Feng et al., 1997). De plus, FMRP possède un domaine de liaison à l'ARN dans sa région N terminale (Adinolfi et al., 2003), 2 domaines d'homologie à la riboprotéine nucléaire K (HK) assurant une forte interaction avec les structures « *kissing complex* » des ARN (Darnell et al., 2005), ainsi qu'un motif Arginine-Glycine-Glycine (RGG) lui permettant la fixation d'une structure G-quartet de l'ARN (Darnell et al., 2001; DeMarco et al., 2019) (Figures 5 et 6). Par conséquent, de par sa composition, sa structure et ses multiples localisations, **FMRP est une protéine fortement impliquée dans le cycle de vie de nombreux ARN, de leur épissage et maturation jusqu'à leur trafic et traduction, tout en assurant leur stabilité** (Penagarikano et al., 2007; Fernandez et al., 2013). Sa localisation nucléaire et cytoplasmique ainsi que ses domaines de liaisons à l'ARN lui permettent d'assurer le rôle de navette pour prendre en charge les transcrits et assurer leur transport jusqu'à leur site de traduction (Eberhart et al., 1996). FMRP cible de manière sélective un ensemble d'ARN. La liste des candidats est très longue, mais à l'heure actuelle seules quelques protéines ont été clairement identifiées comme étant régulées dans leur expression par la protéine FMRP (Davis and Broadie, 2017). Cependant, cette dernière a un enclin tout particulier pour la régulation des ARN messagers codant pour des protéines synaptiques, bien que

cette régulation ne soit pas localisée exclusivement au niveau de la synapse (Wang et al., 2016; Zhao et al., 2017). Des études estiment que **FMRP se lie ainsi avec environ 4% des ARN messagers cérébraux**, soit environ 840 ARNm, y compris ses propres ARNm (Ashley et al., 1993b; Bagni and Greenough, 2005; Darnell et al., 2011), ce qui fait d'elle une protéine clé du développement et de la maturation cérébrale.

**FMRP s'associe également aux polyribosomes** de manière RNA dépendante via des ensembles de ribonucléoprotéines. En particulier, ces complexes contiennent les protéines FXR1P et FXR2P, 2 homologues de FMRP montrant une très forte similarité dans leurs domaines fonctionnels (SLN, SEN, HK, RGG). FMRP interagit également avec d'autres protéines nucléaires et cytoplasmiques (notées NUFIP, CYFIP1 et CYFIP2), directement ou au sein de complexes protéiques (Fernandez et al., 2013) (Figure 6). De plus, FMRP subit des modifications post-traductionnelles, et en particulier la phosphorylation de son résidu sérine 499 qui déclenche la phosphorylation des résidus environnants. Cette phosphorylation joue un rôle dans l'activité de la protéine FMRP, puisque la déphosphorylation de la protéine FMRP augmente l'ubiquitination de cette dernière, et la fait donc tendre vers sa dégradation (Hou et al., 2006; Nalavadi et al., 2012). Cependant, cette modification n'a pas pour objectif de modifier les ARN avec lesquels elle interagit. Elle régule l'activité de FMRP : la forme phosphorylée se lie aux polyribosomes inactifs, tandis que la forme déphosphorylée est liée aux polyribosomes en pleine activité de traduction (Ceman et al., 2003). **Ainsi, FMRP est impliqué dans les mécanismes même de traduction, comme l'atteste sa présence dans les polyribosomes et son influence sur leur activité, dépendante de l'état de phosphorylation de FMRP.** Plus récemment, des recherches appuient d'avantage le rôle de suppression de la traduction que joue FMRP sur de nombreux ARN. La protéine inhibe la traduction de nombreux ARNm de par son rôle de régulateur de traduction (Brown et al., 2001; Muddashetty et al., 2007), seule ou en agissant de concert avec d'autres protéines liant l'ARN (Sofola et al., 2008; Yu et al., 2012). Typiquement, FMRP et son état de phosphorylation sont impliqués dans le mécanisme de régulation qu'exercent le complexe RISC et les miARN, mécanisme impliqué entre autres dans la régulation de la traduction de PSD95 (Muddashetty et al., 2011; DeMarco et al., 2019).

**La protéine FMRP est fortement exprimée dans les neurones**, ainsi que dans les cellules gliales, où elle module la synthèse de protéines. En particulier, FMRP participe à la plasticité structurale et fonctionnelle des synapses. En effet, FMRP joue un rôle déterminant dans la localisation de la traduction de protéines structurantes, telles que, la cofilline 1 (Feuge et al., 2019). De manière plus indirecte, FMRP gère la disponibilité des ARN messagers de gènes tels que *MAPP1B*, *Rac1*, *Arc*, *PAK*, intervenant dans la modulation du cytosquelette microtubulaire et actinique (Darnell et al., 2001; Zhang et al., 2001; Antar et al., 2006; Chen et al., 2010; Bongmba et al., 2011; Martinez and Tejada-Simon, 2018). De plus, FMRP régule les ARNm de nombreuses protéines impliquées dans la fonction et la plasticité synaptique, telles que PSD95, des sous-unités des récepteurs AMPA et des sous-unités de canaux ioniques dépendants du voltage (Bear et al., 2004; Muddashetty et al., 2007; Zalfa et al., 2007; Gross et al., 2011; Lee et al., 2011). **Ainsi, la protéine FMRP est impliquée dans l'établissement de nombreux aspects synaptiques via la régulation de la traduction d'une proportion importante d'ARNm nécessaires à ces mécanismes** (Darnell and Richter, 2012) (Figure 6).



adapté de Fernandez et al. 2013

**Figure 6 : Représentation schématique de la protéine FMRP, de ses principaux domaines et de leurs fonctions.**

L'action de la protéine FMRP passe principalement par ses interactions avec les protéines impliquées dans la traduction (au milieu) et les ARNm (en bas). Les ARNs cibles principaux sont notés en rouge foncé (en bas). NLS : signal de localisation nucléaire ; NES : signal d'exportation nucléaire ; KH : domaine d'homologie à la riboprotéine nucléaire K ; RGG : motif Arginine-Glycine-Glycine.

Récemment, il a été démontré que **le domaine N-terminal** de la protéine FMRP comporte 2 motifs Agenet (Tudor) qui peuvent servir de plateforme pour une interaction protéine-protéine (Fernandez et al., 2013; Myrick et al., 2015b, 2015a). Ces interactions N-terminales peuvent réguler de manière directe les propriétés des protéines de canaux ioniques. En particulier, FMRP module l'activité du canal potassique BK (en anglais *Big Potassium*) en interagissant avec sa sous-unité  $\beta 4$  (Deng et al., 2013). Les canaux BK étant dépendants du voltage et des ions  $Ca^{2+}$ , ils influencent l'excitabilité neuronale en contrôlant la durée du potentiel d'action et le potentiel post-hyperpolarisation lors d'impulsions prolongées. Ils jouent donc un rôle important dans l'émission de neurotransmetteurs et la capacité du neurone à générer des influx nerveux de haute fréquence (Contractor et al., 2015). Par conséquent, l'action directe de FMRP sur ces canaux ioniques régule l'excitabilité des neurones, notamment au niveau cortical et hippocampique (Deng et al., 2013; Myrick et al., 2015a). Ce type d'action est également remarqué dans d'autres zones cérébrales, telles que le tronc cérébral et les bulbes olfactifs, par interaction du domaine N-terminal de la protéine FMRP avec le canal potassique dépendant du sodium Slack (Brown et al., 2010). Ce canal joue un rôle majeur dans l'excitabilité neuronale en régulant l'adaptation aux impulsions durant une activité soutenue et en instaurant des potentiels d'action avec une haute fréquence temporelle. Il est intéressant de souligner que les mécanismes impliquant les canaux Slack sont fortement présents dans les processus sensoriels (Kim et al., 2013).

Le **domaine C-terminal** de FMRP, quant à lui, interagit directement avec les canaux calciques dépendant du voltage (Ferron et al., 2014). Cependant, contrairement aux interactions avec les canaux Slack et BK, le rôle de FMRP ici n'est pas d'agir sur l'activité du canal mais de réguler leur expression de surface au niveau présynaptique (Ferron et al., 2014).

Enfin, **l'expression de FMRP est elle-même modulée par l'activité synaptique**. D'une manière générale, En effet, l'activation des récepteurs synaptiques métabotropiques du glutamate mGluR1 et mGluR5 stimule la synthèse de FMRP dans les synapses (Weiler et al., 1997; Gabel et al., 2004; Wang et al., 2012). Cette expression synaptique de FMRP est régulée de manière très dynamique lors des phénomènes de dépression sur le long terme (LTD, en anglais *Long Term Depression*), avec une forte augmentation du niveau de FMRP en réponse à une stimulation des récepteurs mGluR suivi une diminution rapide pour retourner à un niveau basal de FMRP dans la synapse. La dégradation rapide de FMRP semble donc nécessaire pour permettre la traduction des ARN dont elle inhibe la traduction afin de consolider la LTD (Hou et al., 2006). De plus la stimulation des récepteurs mGluR augmente le transport des granules contenant FMRP vers les dendrites (Antar et al., 2004). Le pic d'expression de FMRP coïncide donc avec les périodes critiques d'affinement synaptique, et ainsi FMRP permet la distribution et la libération des ARNm pour leur traduction en fonction de l'activité synaptique (Lu et al., 2004; Singh et al., 2007; Tessier and Broadie, 2012). Par conséquent, FMRP apparait être un parfait capteur d'activité cellulaire, capable de réguler la traduction d'un groupe de protéines spécialisées déterminantes dans la stabilisation et la modification synaptique pendant le développement cérébral.

**En résumé, FMRP peut influencer l'excitabilité neuronale par une myriade de mécanismes : en régulant la traduction d'un large éventail de protéines qui modulent, indirectement, l'excitabilité neuronale, et en interagissant directement avec tout un ensemble de canaux ioniques afin d'adapter l'excitabilité cellulaire.**

### 1.3.3 De la mutation à la maladie

**Lorsqu'une mutation amplifie la répétition du triplet CCG, l'expression du gène est perturbée.** Les allèles avec 45 à 54 répétitions sont définis comme intermédiaires, ou encore en « **zone grise** » (GZ, en anglais *Grey Zone*) (Monaghan et al., 2013) (Figure 7A). Les individus porteurs de tels allèles ne présentent pas le phénotype clinique du syndrome de l'X fragile, mais peuvent présenter des neuropathies périphériques, de l'ataxie, des troubles de l'humeur (anxiété, dépression), et des troubles cliniques similaires à ceux des patients atteints de Parkinsonisme (bradykinésie, rigidités, troubles mnésiques) (Debrey et al., 2016). Si la répétition s'amplifie et demeure inférieure à 200 unités, l'individu est en situation dite de **prémuation** (Figure 7A). C'est le cas de femmes dites « porteuses », et d'hommes dits « transmetteurs normaux », chez qui le gène *FMR1* s'exprime toujours pour produire la protéine FMRP. Cependant, il est intéressant de remarquer que les individus prémutés présentent une augmentation de leur transcription du gène de *FMR1*, avec des niveaux d'ARN messagers 5 à 10 fois plus élevés comparés aux individus sains (Tassone et al., 2000), mais que contre toute attente leur niveau de

protéine FMRP est diminué (Figure 7A). De plus, ce phénomène est d'autant plus marqué que la répétition des triplets CGG est importante au sein de l'allèle prémuté (Tassone et al., 2000; Ludwig et al., 2014) (Figure 7B). Ceci met en évidence une anomalie de l'efficacité de traduction des ARN messagers produits par *FMR1* en cas de prémutation.

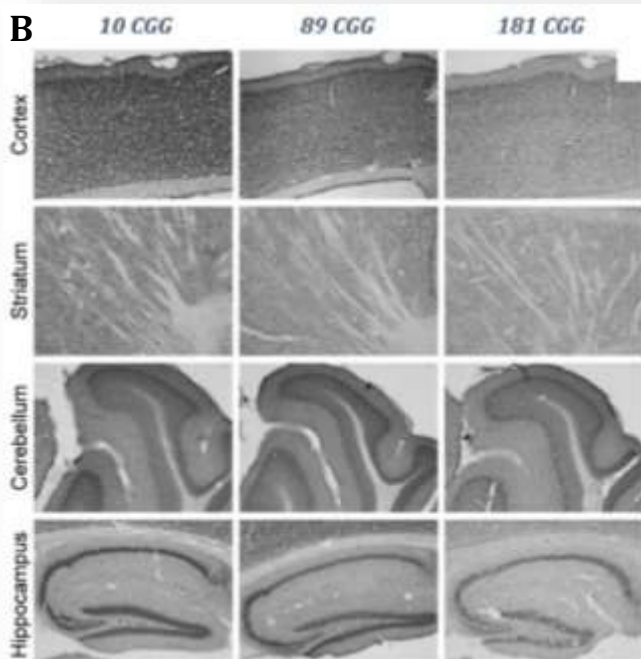
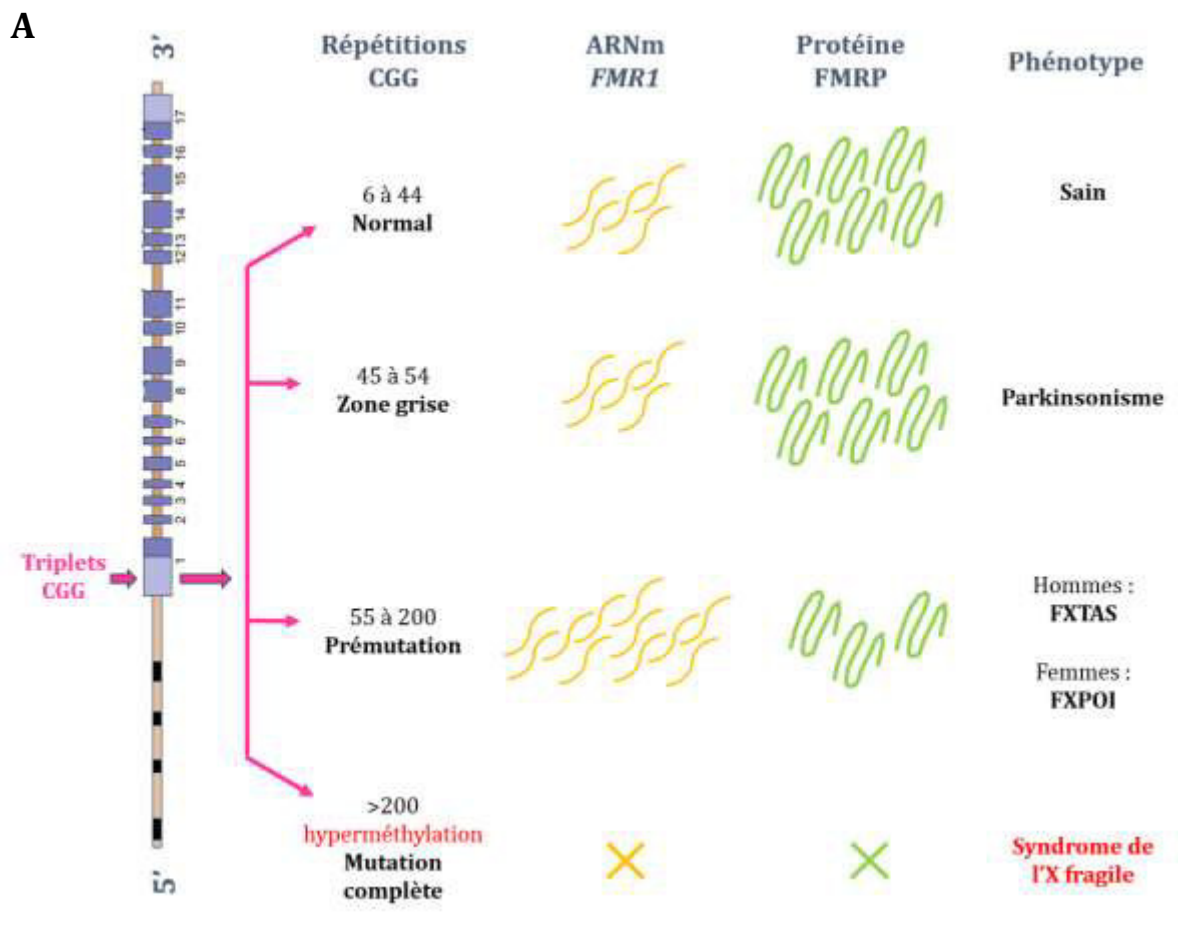
L'hypothèse la plus vraisemblable pour expliquer ce phénomène suggère que l'activité transcriptionnelle du gène *FMR1* est augmentée pour compenser une diminution de la quantité de protéine FMRP, suivant un mécanisme de rétro-action négative. Ce mécanisme serait alors une réponse cellulaire à la diminution de production de FMRP (Tassone and Hagerman, 2003). Ce dérèglement de l'activité transcriptionnelle de *FMR1* pourrait être à l'origine des troubles cliniques observés parmi les porteurs de prémutation. Ces derniers sont, en particulier, sujet au développement de problèmes neurologiques au cours de leur vieillissement. Connu sous le nom de FXTAS (en anglais *Fragile X-associated Tremor/Ataxia Syndrome*), ce phénotype neurodégénératif inclut des tremblements non intentionnels, une ataxie cérébelleuse, ainsi qu'une atrophie cérébrale globale, du parkinsonisme, et un déclin cognitif (Hagerman, 2013) (Figure 7A). A ce jour, deux explications sont avancées pour décrire l'origine moléculaire de ce trouble spécifique des porteurs d'une prémutation du gène *FMR1*. D'une part, les ARN messagers *FMR1* surproduits induisent une toxicité de par leur gain de fonction (Jacquemont et al., 2003). D'autre part, la transcription est initiée dans la séquence de répétition des triplets CGG et engendre la formation de peptides toxiques poly-glyciniques, notés FMRpolyG. Des accumulations de tels peptides ont été retrouvées dans des cellules cérébrales de patients prémutés (Sellier et al., 2017; Derbis et al., 2018). En outre, les femmes porteuses de la prémutation sont 20 fois plus touchées par l'insuffisance ovarienne précoce que la population globale (Penagarikano et al., 2007). Désormais dénommé FXPOI (en anglais *Fragile X-associated Premature Ovarian Insufficiency*), ce dysfonctionnement de la reproduction est la première cause d'infertilité ovarienne précoce héritée. 20% des femmes porteuses de la prémutation du gène *FMR1* expriment ce trouble (Allingham-Hawkins et al., 1999) (Figure 7A). Tout comme pour le FXTAS, ce trouble spécifique des porteurs d'une prémutation du gène *FMR1* est associé à une toxicité du gain de fonction des ARN messagers *FMR1* surproduits (Jacquemont et al., 2003; Milà et al., 2016) ainsi qu'à la production d'une protéine toxique FMRpG (Sellier et al., 2017; Derbis et al., 2018) (Figure 7A).

Si la répétition se voit amplifiée et dépasse les 200 triplets de nucléotides, le stade dit de **mutation complète** est atteint, et le porteur d'une telle mutation se trouve en situation pathologique : il est atteint du syndrome de l'X fragile (Pieretti et al., 1991) (Figure 7A). Cette élongation anormale du gène *FMR1* engendre une hyperméthylation des îlots CpG, du promoteur en amont de la partie codante du gène et des triplets CGG (Pieretti et al., 1991; Verheij et al., 1993) (Figure 7A). L'hyperméthylation inhibe la fixation des facteurs de transcription, et induit une condensation de la chromatine qui bloque la fixation de la machinerie transcriptionnelle (Penagarikano et al., 2007). De manière directe et indirecte, ces deux phénomènes rendent impossible la transcription du gène, et causent la mise en silence du gène *FMR1* (Figure 7A). **Le syndrome de l'X fragile est ainsi causé par l'absence d'expression du gène *FMR1*, ce qui engendre une absence de protéine FMRP (Figure 7A). Ainsi, le trop grand nombre de**

**répétitions du triplet CGG et l'hyperméthylation du gène *FMR1* sont les causes biologiques du syndrome de l'X fragile.** Cette configuration génétique est confirmée chez les patients diagnostiqués, et demeure la situation décrite classiquement pour expliquer l'origine des symptômes constatés.

Pour être tout à fait précis, il convient de tenir compte de récentes avancées dans l'étude génétique des patients atteints du syndrome de l'X fragile, modulant quelque peu cette affirmation rigide. En effet, il a été montré que 12 à 41% des hommes diagnostiqués X fragile sont en réalité des individus mosaïques dans leurs allèles du gène *FMR1* tout en présentant les mêmes caractéristiques et le même panel de symptômes que les autres patients (Nolin et al., 1994). Ce mosaïsme concerne le nombre de répétitions de triplets CGG, puisque les cellules contiennent des répétitions CGG de tailles différentes, et/ou l'état méthylé ou non de cette répétition. La situation la plus courante est une mosaïque composée de cellules avec un allèle prémuté et l'autre complètement muté mais non méthylé, avec des cellules porteuses des deux allèles complètement mutés et méthylés. Ainsi ces individus connaissent une expression minimale de transcrits du gène *FMR1*, composée d'ARNm élongués, mais pas de traduction en protéine FMRP. Baker et associés ont démontré que ces patients présentent des traits autistiques plus forts que les patients complètement mutés, sans connaître d'aggravation de leur déficience intellectuelle (Baker et al., 2019). Ceci met en évidence un rôle toxique des ARNm transcrits à partir d'un gène *FMR1* anormalement élongué. Ce phénomène de mosaïcisme chez les patients diagnostiqués X fragile explique l'hétérogénéité de pénétrance du phénotype observée sur le plan de la déficience intellectuelle et des troubles du spectre autistique (Baker et al., 2019). Enfin, 2 cas de patients présentant le phénotype clinique du syndrome de l'X fragile de manière très prononcée mais sans présenter ni élongation ni hyperméthylation du gène *FMR1*, ont été identifiés lors de ces 30 dernières années (De Boule et al., 1993; Myrick et al., 2014). Ces 2 patients présentent chacun une mutation ponctuelle dans la séquence du gène *FMR1*, conduisant à la substitution d'un acide aminé dans la chaîne peptidique de la protéine FMRP et altérant sa fonctionnalité (De Boule et al., 1993; Myrick et al., 2014). Ces 2 exemples démontrent qu'une altération de la protéine FMRP peut suffire à engendrer un phénotype clinique de type syndrome de l'X fragile.

**Quoi qu'il en soit, l'origine moléculaire du syndrome de l'X fragile demeure l'absence de protéine FMRP, due à une mutation importante du gène *FMR1*.**



adapté de Ludwig et al. 2014

**Figure 7 : Le phénotype varie en fonction du nombre de répétitions de triplets CGG dans la séquence du gène *FMR1*.**

(A) Différences de phénotype moléculaires et cliniques en fonction du nombre de répétition de triplets CGG dans la séquence du gène *FMR1*. FXTAS : *Fragile X-associated Tremor/Ataxia Syndrome*; FXPOI : *Fragile X-associated Premature Ovarian Insufficiency*.

(B) Niveau d'expression de FMRP en fonction du nombre de répétitions de triplet CGG dans la séquence du gène *Fmr1*. Ici, l'expression est étudiée chez la souris. Notons la diminution de l'intensité de l'expression de FMRP (en gris-noir) avec l'augmentation du nombre de répétitions du triplet CGG dans la séquence du gène *Fmr1*.



## 1.4 La transmission du syndrome de l’X fragile

**La mutation à l’origine de ce syndrome étant située sur le chromosome sexuel X, la pathologie concerne majoritairement les garçons.** En effet, un garçon (XY) aura une expression nulle du gène *FMR1* dès lors qu’il possède un chromosome porteur de la mutation complète, tandis qu’une fille (XX) sera en situation pathologique si ses deux chromosomes X sont porteurs de la mutation. La probabilité qu’une fille soit porteuse des 2 allèles mutés sur ses chromosomes X, et présente l’ensemble des symptômes de la pathologie, est extrêmement faible (possible uniquement si les deux parents sont porteurs de l’allèle muté). Ceci explique la différence de prévalence du FXS selon le sexe. En revanche, une femme peut être hétérozygote pour l’allèle muté et le transmettre à sa descendance. On parle alors de femme conductrice. Ainsi, **un individu porteur de l’allèle muté (garçon malade ou fille conductrice) peut en avoir hérité de l’un de ses parents.**

De plus, les allèles élongués sont instables. Les allèles en zone grise peuvent voir leur nombre de répétitions augmenté et atteindre une situation de prémutation, mais ne rentre jamais en conditions de mutation complète, lors de la transmission à la génération suivante (Nolin et al., 2011). En revanche, **les allèles prémutés peuvent subir une expansion de leur répétition jusqu’à atteindre une situation de mutation complète** lors de la transmission à la génération suivante. Le risque est particulièrement accru chez la femme, qui présente une forte chance de transformer sa prémutation en mutation complète lors de l’ovogénèse (Fu et al., 1991; Nolin et al., 2015). De plus, le risque d’expansion vers la mutation complète augmente avec la taille de la répétition, et atteint les 100% dès lors que la répétition est supérieure à 90 unités (Fu et al., 1991; Nolin et al., 2015). En revanche, un homme prémuté transmettra plus probablement sa prémutation à ses filles, saines (Fu et al., 1991; Nolin et al., 2015). Ainsi, un parent prémuté pourra donner naissance, lui aussi, à un enfant porteur de la mutation complète. Ce phénomène explique la survenue d’un individu porteur de la mutation complète dans la lignée d’une famille ne présentant pas la pathologie, et propose une hypothèse au paradoxe de Sherman (1985), qui avait observé que le risque de présence d’un phénotype chez un individu d’une famille avec un patient FXS est dépendant de la position de l’individu dans le pedigree de la famille (Sherman et al., 1985).

## 1.5 Comment le syndrome de l’X fragile est-il diagnostiqué ?

Le retard dans l’apparition du langage chez un enfant est généralement la première cause qui pousse des parents à consulter le corps médical. Les enfants atteints du syndrome de l’X fragile ne présentent pas tous de caractéristiques physiques trahissant la pathologie. C’est pourquoi un test de détection du syndrome de l’X fragile est pratiqué pour tous les enfants présentant un retard développemental, un retard mental ou des comportements de type autistiques, bien que cela ne s’avère être juste que dans 1 à 2% des cas (Rauch et al., 2006). Une liste des critères phénotypiques destinée à identifier les patients potentiellement atteints du syndrome de l’X fragile a été établie afin d’orienter les médecins dans leur recherche de diagnostic face à un patient avec un retard de développement non diagnostiqué (Maes et

al., 2000). Ce choix d'orientation est également étayé par la présence dans la famille du patient de membres présentant eux même des troubles de l'apprentissages, un retard mental, des désordres des mouvements, ou une insuffisance ovarienne précoce. Un questionnaire sur l'histoire familiale doit alors être réalisé afin de notifier ce genre de phénotypes qui accroît la suspicion de mutation du gène *FMR1* dans la famille (Garber et al., 2008).

À la suite de quoi, **si le syndrome de l'X fragile est une piste envisageable pour expliquer les troubles décelés chez le patient, une investigation moléculaire est réalisée pour confirmer ou infirmer le diagnostic médical.** Les premiers diagnostics du syndrome de l'X fragile étaient basés sur l'analyse cytogénétique afin de déterminer la présence de site de fragilité muté sur les chromosomes X (FRAXA) dans les lymphocytes sanguins. Cette technique présentait néanmoins nombre d'inconvénients, à commencer par son caractère chronophage et sa difficulté d'interprétation, nécessitant des compétences techniques très spécifiques (Garber et al., 2008). Ces limitations ont tenté d'être surpassées par la mise au point d'hybridations *in situ* avec sondes à ADN spécifiques afin de détecter les FRAXA. Mais les analyses cytogénétiques ont par la suite été remplacées par des investigations de l'ADN du sang périphérique par technique de Southern blot, après digestion par endonucléases de restriction. Cette technique permettait de détecter tous les allèles du gène *FMR1*, normaux, prémutés et complètement mutés, et de déterminer l'état de méthylation de la région promotrice. Mais elle restait néanmoins longue à réaliser et relativement couteuse (Garber et al., 2008). La méthode la plus utilisée dès lors, et considérée comme le gold standard dans le diagnostic moléculaire du syndrome de l'X fragile, alliait l'analyse par Southern blot et une PCR (initiales) standard, basée sur l'amplification directe de la répétition CGG en utilisant des sondes encadrant cette répétition. Il devenait alors rapide et de manière suffisamment sensible de détecter les répétitions de taille normales et prémutées dans le gène *FMR1*. Cependant, elle ne pouvait révéler que les allèles dont la répétition n'excédait pas 300 unités et échouait dans l'identification des expansions plus conséquentes (Garber et al., 2008). Ces limitations ont conduit à l'élaboration d'une PCR triplement primée permettant d'amplifier simultanément de l'allèle *FMR1* en entier et la séquence de triplets CGG dans la même réaction de PCR (Lyon et al., 2010). Le niveau de méthylation des triplets CGG peut être analysé grâce à l'utilisation de kits Methylation-Sensitive Long-Range PCR (Garber et al., 2008).

**Le diagnostic moléculaire du syndrome de l'X fragile est habituellement réalisé après la naissance, mais il est également possible de réaliser des tests pré-nataux.** Ceux-ci reposent sur l'analyse de l'ADN prélevé soit dans les villosités chorales soit dans l'amniocyte de l'embryon (Garber et al., 2008). Ce test est proposé lorsque la famille présente un historique de troubles associés au syndrome de l'X fragile, notamment en raison du risque d'expansion des allèles prémutés en mutation complète d'une génération sur l'autre. Le dépistage des nouveau-nés a été proposé mais sa mise en application suscite la controverse (Godler et al., 2014; Famula et al., 2015). **En effet le bénéfice réel de réaliser des tests n'est pas au rendez-vous, puisqu'à l'heure actuelle il n'existe pas de thérapie pour traiter les enfants atteints, et les traitements mis en place sont particulier à chaque patient en fonction des symptômes diagnostiqués.**

## Partie 2 : Un modèle pour étudier le Syndrome de l'X Fragile : la souris

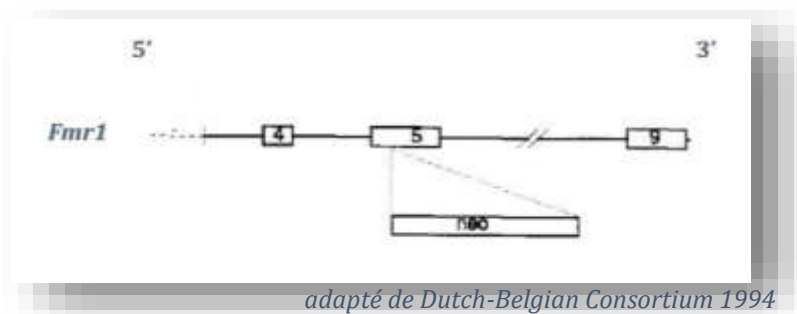
### Fmr1 KO

L'étude des phénotypes causés par la mise en silence du gène *FMR1* ne pouvant être intégralement réalisée sur l'humain, la compréhension de la physiopathologie du syndrome de l'X fragile nécessitait la création de modèles biologiques animaux qui mimeraient de manière robuste la pathologie. **Le gène *FMR1* étant hautement conservé entre les espèces (Verkerk et al., 1991), plusieurs animaux knock-out (KO) pour ce gène purent être génétiquement créés afin d'étudier les impacts de l'absence de la protéine FMRP.** Historiquement, l'animal de choix pour créer un modèle animal était la souris. Le modèle murin fut le premier créé et validé, l'homologue murin de *FMR1* montrant 97% d'homologie avec le gène humain (Ashley et al., 1993a). A la suite de la création du modèle murin, un modèle de drosophile fut mis au point. Chez cet animal, la protéine homologue de FMRP, notée FMR1, possède une séquence peptidique très conservée par rapport à celle de l'humain (Wan et al., 2000) ainsi qu'une action de liaison à l'ARN (Darnell et al., 2005). Ce modèle *dFmr1* KO a été validé par ses caractéristiques cellulaires, comportementales et cognitives comparables au phénotype du syndrome de l'X fragile (Rais et al., 2018). Plus récemment, un modèle a été mis au point chez le poisson zèbre (*zebrafish*), en tant que modèle vertébré complémentaire pour l'étude de la physiopathologie du syndrome de l'X fragile. La protéine FMRP de cette espèce montre 72% d'homologie avec la protéine humaine, et est fortement exprimée dans les régions cérébrales (van 't Padje et al., 2005). Enfin, un autre modèle a été créé chez le rongeur : le rat *Fmr1* KO permet de modéliser des processus cognitifs et du comportement social plus complexes que chez la souris *Fmr1* KO (Hamilton et al., 2014). Quoi qu'il en soit, **le modèle le plus couramment utilisé pour l'étude de la physiopathologie du syndrome de l'X fragile demeure la souris *Fmr1* KO. Cette souris est le modèle ayant été le plus caractérisé sur de nombreux aspects, et est à ce jour le modèle le plus validé phénotypiquement.**

### 2.1 De la mise au point à la validation par le *Dutch-Belgian Fragile X Consortium*

L'homologue murin de *FMR1* montre 97% d'homologie avec le gène humain (Verkerk et al., 1991; Ashley et al., 1993a). De plus, il a été montré que le schéma d'expression des ARN messagers de *FMR1* et de la protéine FMRP est similaire dans de nombreux tissus humain et murins (Abitbol et al., 1993; Devys et al., 1993). La souris semblait donc tout indiquée pour créer un modèle animal du syndrome de l'X fragile, qui mimerait de manière optimale la physiopathologie de cette maladie. La première souris mutante pour le gène *Fmr1* fut créée au début des années 90' par une recombinaison homologue réalisée via un vecteur plasmidique dans des cellules souches embryonnaires de la lignée germinale de souris (Consortium et al., 1994). La construction portée par ce vecteur contenait le 5<sup>ème</sup> exon du gène *Fmr1* additionné de la séquence du gène de résistance à la néomycine (*neo*) au sein de sa séquence codante

(Figure 8). Après injection dans des blastocystes, puis implantation dans des femelles de souche C57BL/6J pseudo-gestantes, les mâles issus des portées sont croisés avec des femelles C57BL/6J sauvages (WT, en anglais *Wild Type*) pour créer des femelles C57BL/6J porteuses de la mutation dans le chromosome X de leurs cellules germinales, et capables de la transmettre à leur descendance après croisement avec des mâles C57BL/6J WT : **des mâles hémizygotés pour la construction *Fmr1*-neo. Chez ces mâles, l'augmentation de la taille de leur unique allèle du gène *Fmr1* conduit à une impossibilité de la transcription de ce gène. Ainsi, ils n'expriment ni transcrite du gène *Fmr1* ni protéine FMRP, comme vérifié dans leurs testicules, cerveau, reins et foie (Consothium et al., 1994) : ce sont les premiers animaux *knock-out* pour le gène *Fmr1*, désignés par la suite *Fmr1* KO.**



**Figure 8 : Représentation schématique de la construction génétique portée par la souris *Fmr1* KO.** La cassette neomycine (neo) allonge la séquence génétique d'environ 1,8 kb.

Les croisements suivants entre des femelles C57BL/6J hétérozygotes pour la construction et des mâles C57BL/6J WT n'ont pas présenté de problème de reproduction (Consothium et al., 1994). Les animaux porteurs de la construction étaient parfaitement fertiles, et les portées obtenues présentaient des tailles similaires à celles obtenues lors de croisements de souris C57BL/6J WT. De plus, les animaux obtenus étaient parfaitement viables, les plus vieux ayant dépassé les 250 jours de vie (Consothium et al., 1994).

Il s'agissait alors de **caractériser les mâles *Fmr1* KO** afin de valider la présence du phénotype connu chez l'humain. A l'échelle macroscopique, les organes étudiés (reins, foie, cœur, rate) ne présentaient pas de différence pondérale entre les animaux *Fmr1* KO et les animaux WT à l'âge adulte (Consothium et al., 1994). La macroorchidie a pu être simplement évaluée par pesée des testicules de ces animaux. Ceux-ci présentent effectivement une élévation significative du poids testiculaire de l'ordre de 20 à 30%, quel que soit l'âge de la mesure choisie, en comparaison des animaux C57BL/6J WT (Consothium et al., 1994). A l'échelle tissulaire, les organes n'ont présenté aucune différence dans leur structure cellulaire globale entre les animaux *Fmr1* KO et les animaux WT. De plus, les testicules des mâles *Fmr1* KO ainsi que les ovaires des femelles hétérozygotes n'ont montré aucune différence structurale avec ceux des animaux WT lors de leur étude microscopique (Consothium et al., 1994). Le cerveau des mâles hémizygotés, quant à lui, ne présente aucune différence structurale macroscopique et microscopique. Les cortex

frontal, temporal et occipital, le striatum, le corps calleux, l'hippocampe, les ventricules, le plexus choroïdes, l'hypothalamus, le cervelet et le tronc cérébral de ces animaux se sont révélés identiques dans leur structure globale et agencement cellulaire à ceux des animaux WT (Consortium et al., 1994). Etant connus pour exprimer de manière importante le gène *Fmr1*, l'hippocampe et le cervelet ont fait l'objet d'une attention toute particulière, et leurs examens approfondis n'ont révélé aucune anomalie de leur architecture chez les animaux mutés. **Ces caractéristiques anatomiques sont cohérentes avec les premières observations post mortem réalisées sur des cerveaux et organes de patients.**

Les premières **observations comportementales** des mâles *Fmr1* KO ont montré une augmentation de l'activité locomotrice lors de différents tests d'exploration libre (Consortium et al., 1994). Ce phénotype murin est cohérent avec le comportement hyperactif constaté chez les patients atteints du syndrome de l'X fragile. De plus, l'augmentation de l'exploration d'un environnement peut illustrer un problème d'apprentissage et de la mémoire immédiate : l'animal a besoin de plus de répétitions pour mémoriser l'environnement exploré. Ce constat est confirmé par les performances obtenues lors d'un test de mémorisation spatiale, le labyrinthe aquatique de Morris (ou piscine de Morris). Brièvement, lors d'une première phase, les animaux immergés dans une piscine mémorisent l'emplacement d'une plateforme sur laquelle ils peuvent se hisser pour échapper aux eaux à l'aide d'indices spatiaux disposés dans la pièce. La répétition de cette phase permet la mémorisation de l'emplacement de la plateforme. Après plusieurs répétitions, les souris *Fmr1* KO ont mémorisé où se situe la plateforme, et la rejoignent aussi rapidement que les animaux contrôles (Consortium et al., 1994). Cependant, si à la suite de cet apprentissage l'emplacement de la plateforme est modifié, les souris *Fmr1* KO montrent des difficultés à s'adapter et à apprendre la nouvelle localisation de la plateforme (Consortium et al., 1994). L'observation des souris montre que ces résultats ne sont pas dus à un déficit de motivation, ou au niveau moteur. Les souris *Fmr1* KO peuvent donc apprendre, après de nombreuses répétitions, et réutiliser cette connaissance dans une situation identique. Elles éprouvent cependant des difficultés à apprendre une nouvelle situation (Consortium et al., 1994). Ce constat est parfaitement cohérent avec le phénotype clinique observé chez les patients atteints du syndrome de l'X fragile. Comme décrit précédemment, ces derniers éprouvent des difficultés à s'extraire d'une tâche familière pour aller vers une nouvelle situation et s'y adapter, avec une certaine obsession à persévérer dans la première tâche.

Fort de ces observations anatomiques et comportementales montrant une belle cohérence entre le phénotype murin *Fmr1* KO et le phénotype clinique décrit chez les patients atteints du syndrome de l'X fragile, ce modèle animal a été validé par le Consortium Belgo-Hollandais sur l'X Fragile (Consortium et al., 1994). **Le modèle *Fmr1* KO est valide pour apporter une connaissance approfondie des fonctions du gène *Fmr1* et de la physiopathologie du syndrome de l'X fragile** (Consortium et al., 1994).

**Sauf mention contraire, dans la suite de la présente étude, l'ensemble des résultats concernera le modèle murin *Fmr1* KO.**

## 2.2 Le phénotype comportemental de la souris *Fmr1* KO

Depuis la validation du modèle murin *Fmr1* KO par le consortium du fragile X, l'étude du phénotype comportemental de ce modèle s'est poursuivie afin d'enrichir la connaissance des altérations macroscopiques associées à l'absence de la protéine FMRP. Le syndrome de l'X fragile étant une pathologie de la sphère neuropsychiatrique engendrant des troubles cognitifs et de type autistique, les études comportementales du modèle *Fmr1* KO se sont en particulier attachées à décrire les caractéristiques de ces anomalies. Avant toute chose, il convient de souligner que la très grande majorité des investigations comportementales a été réalisée avec des souris adultes, c'est-à-dire âgées de 3 à 6 mois, de souche C57BL/6. Afin de cartographier de manière concise le phénotype comportemental de la souris *Fmr1* KO, les résultats détaillés ici se concentreront uniquement sur des souris mâles de souche C57BL/6.

### 2.2.1 Evaluation des capacités cognitives

Caractériser les capacités intellectuelles d'une souris n'est pas une tâche facile à accomplir. Le syndrome de l'X fragile étant une maladie de déficience mentale, il a pourtant fallu être en mesure d'explorer ces capacités afin de caractériser le modèle et pouvoir constater d'éventuels effets bénéfiques de traitements et de stratégies thérapeutiques. En accord avec le phénotype clinique humain, les compétences cognitives sont étudiées ici en évaluant les capacités d'apprentissage et de mémorisation des animaux testés. Les tests mis en place utilisent des instincts naturels de la souris. Par exemple la propension naturelle à l'exploration d'un espace inconnu (utilisée dans le labyrinthe en Y) ou d'un objet inconnu (exploitée dans le test de reconnaissance d'un nouvel objet), la mémorisation de la configuration spatiale d'un espace (employée dans le test de la piscine de Morris) ou d'une succession d'événements (utilisée dans les tests de conditionnement par la peur et d'évitement passif).

Dans la situation où les souris testées sont confrontées à un espace inconnu et un espace familier, dans le test du labyrinthe en Y, les souris sauvages (WT) vont naturellement explorer plus longtemps un espace inconnu au détriment d'un espace déjà familier (environ 60% du temps dédié à l'exploration) (Hébert et al., 2014). Or les souris *Fmr1* KO ne passent pas plus de temps à explorer l'espace inconnu que l'espace familier (environ 40% du temps d'exploration), indiquant qu'elles n'ont pas distingué un environnement pourtant déjà exploré d'un environnement nouveau (Bilousova et al., 2009; Hébert et al., 2014) (Figure 9A). La reconnaissance spatiale des souris *Fmr1* KO est donc altérée. Ainsi, les souris *Fmr1* KO présentent des difficultés de mémoire spatiale. De manière similaire, dans la situation où les souris se voient présenter deux objets dont un est familier et l'autre est inconnu, la souris sauvage explore davantage l'objet inconnu, indiquant qu'elle reconnaît l'objet familier (Bhattacharya et al., 2012; King and Jope, 2013; Costa et al., 2018) (Figure 9B). Dans une telle situation, les souris *Fmr1* KO explorent de manière identique les deux objets, illustrant le déficit de mémorisation de la lignée *Fmr1* KO

(Bhattacharya et al., 2012; King and Jope, 2013; Costa et al., 2018) (Figure 9B). Ainsi, les souris *Fmr1* KO présentent des difficultés de **mémoire visuelle**.

Les tests de conditionnement par la peur et d'évitement passif exposent à plusieurs reprises la souris à un léger stimulus désagréable en association avec un événement (signal sonore et franchissement d'une porte entre deux compartiments, respectivement), de manière à lui faire apprendre l'enchaînement « événement puis stimulus ». Lorsque l'événement se produit de nouveau, le comportement de la souris indique si elle a mémorisé qu'un stimulus désagréable va se produire (Ding et al., 2014). Après un conditionnement par la peur répété plusieurs fois, le test effectué à 24h montre que les souris WT ont parfaitement mémorisé l'enchaînement des événements en se figeant dès que le signal sonore retentit (Hayashi et al., 2007; Ding et al., 2014) (Figure 9C). En revanche, les souris *Fmr1* KO se figent 2 fois moins que les souris WT pour les mêmes conditions de test ce qui indique un défaut de mémorisation de ces dernières (Hayashi et al., 2007; Ding et al., 2014) (Figure 9C). Pour ce qui est de l'évitement passif, lors du premier test qui suit la phase d'apprentissage les souris *Fmr1* KO franchissent de nouveau la porte entre les deux compartiments avec une latence 2 fois plus faible que celle des souris WT (Veeraragavan et al., 2011; Ding et al., 2014) (Figure 9D). Ainsi le comportement des souris *Fmr1* KO indique qu'elles n'ont pas mémorisé l'association des événements, ou en tout cas qu'elles ne sont pas capables de faire appel à leurs souvenirs de manière efficace (Hayashi et al., 2007; Ding et al., 2014). Ce résultat conforte les conclusions obtenues antérieurement, lors de la validation du modèle *Fmr1* KO, avec le test de la piscine de Morris dans sa phase de mémorisation et d'apprentissage, et reproduits par la suite (Kooy et al., 1996; D'Hooge et al., 1997) (Figure 9E). Ces observations étayent un peu plus le déficit cognitif des souris *Fmr1* KO, s'illustrant par des difficultés d'**apprentissage**, de mémorisation et de **recrutement de leurs souvenirs**. De plus, modifier et adapté d'une information apprise est difficile chez la souris *Fmr1* KO. Ceci est mis en évidence lorsque les souris sont confrontées à la version « reversal » du test de la piscine de Morris, dans laquelle l'emplacement de la plateforme est changé, dans le but d'observer l'apprentissage de ce nouvel emplacement par la souris testée. Par rapport aux souris sauvages, les souris *Fmr1* KO montrent un temps d'apprentissage plus long, car elles persévèrent à aller dans la région de la piscine là où était située anciennement la plateforme (Consortium et al., 1994; Kooy et al., 1996; D'Hooge et al., 1997; Bhattacharya et al., 2012) (Figure 9F). Ce résultat illustre les **difficultés d'adaptation** des souris *Fmr1* KO, qui persiste à répéter un comportement maîtrisé. Ce comportement dénote lui aussi un trouble cognitif. Ce manque de flexibilité mentale reflète un **caractère obsessionnel** qui peut être étudié par le test de l'enfouissement de billes, au cours duquel la souris est mise en présence de billes de verre sur la litière. Les souris sauvages ont une tendance naturelle à enfouir des billes, mais les souris *Fmr1* KO s'attachent à en enterrer davantage dans un même laps de temps (Veeraragavan et al., 2011; Bhattacharya et al., 2012; Costa et al., 2018) (Figure 9G). Les souris *Fmr1* KO présentent ainsi un grand caractère de **persévérance**. Le comportement de **répétition et d'obsession** des souris, proche de la stéréotypie, s'illustre par l'augmentation du toilettage lorsqu'elles sont seules (Carreno-Munoz et al., 2018; Costa et al., 2018) (Figure 10D), ou encore lors du test de l'*open field*, la souris étant libre de se déplacer et d'exprimer les comportements qui lui viennent naturellement. Des mesures ont mis en

évidence que les souris *Fmr1* KO montrent 25% de comportements répétitifs de plus que les souris WT (Hayashi et al., 2007).

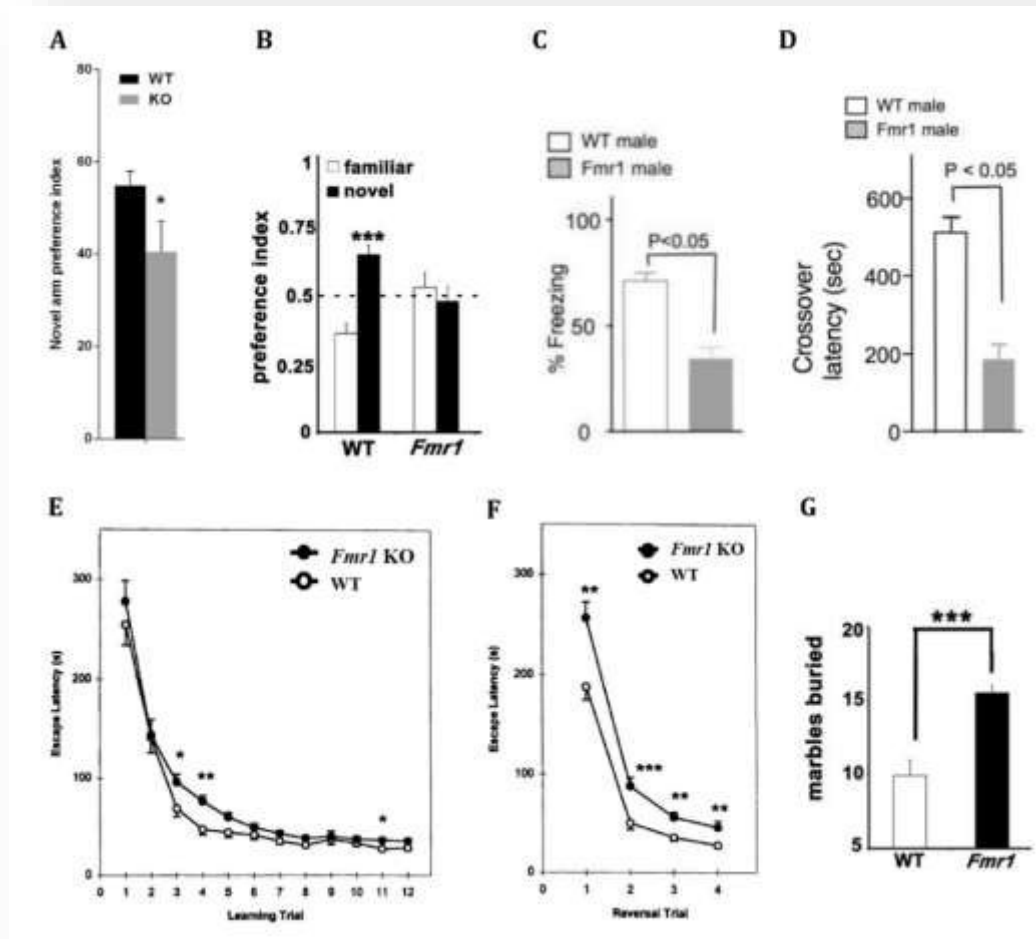


Figure 9 : Résultats comportementaux issus de la littérature illustrant les troubles cognitifs de la souris *Fmr1* KO.

**(A) Test du labyrinthe en Y.** Préférence pour l'espace inconnu, exprimé en pourcentage du temps total d'exploration. Adapté de Hébert et al. 2014.

**(B) Test de reconnaissance du nouvel objet.** Préférence pour chaque objet exprimé en pourcentage du temps total d'exploration. Adapté de Bhattacharya et al. 2012.

**(C) Test de conditionnement par la peur.** « Freezing » correspondant au comportement illustrant que la souris a mémorisé la succession « événement puis stimulus ». Adapté de Ding et al. 2014.

**(D) Test d'évitement passif.** La latence représentée ici est la durée écoulée avant que la souris ne franchisse le seuil de la zone déclenchant le stimulus. Adapté de Ding et al. 2014.

**(E) Test de la piscine de Morris.** La latence représentée ici correspond au temps dont la souris a besoin pour retrouver la plateforme, pendant la phase d'entraînement (apprentissage). Adapté de Kooy et al. 1996.

**(F) Test « reversal » de la piscine de Morris.** La latence représentée ici correspond au temps dont la souris a besoin pour retrouver la plateforme, après une phase d'entraînement (apprentissage), lorsque la plateforme est changée de localisation. Adapté de Kooy et al. 1996.

**(G) Nombre de billes enterrées dans le test d'enterrement des billes.** Adapté de Bhattacharya et al. 2012.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

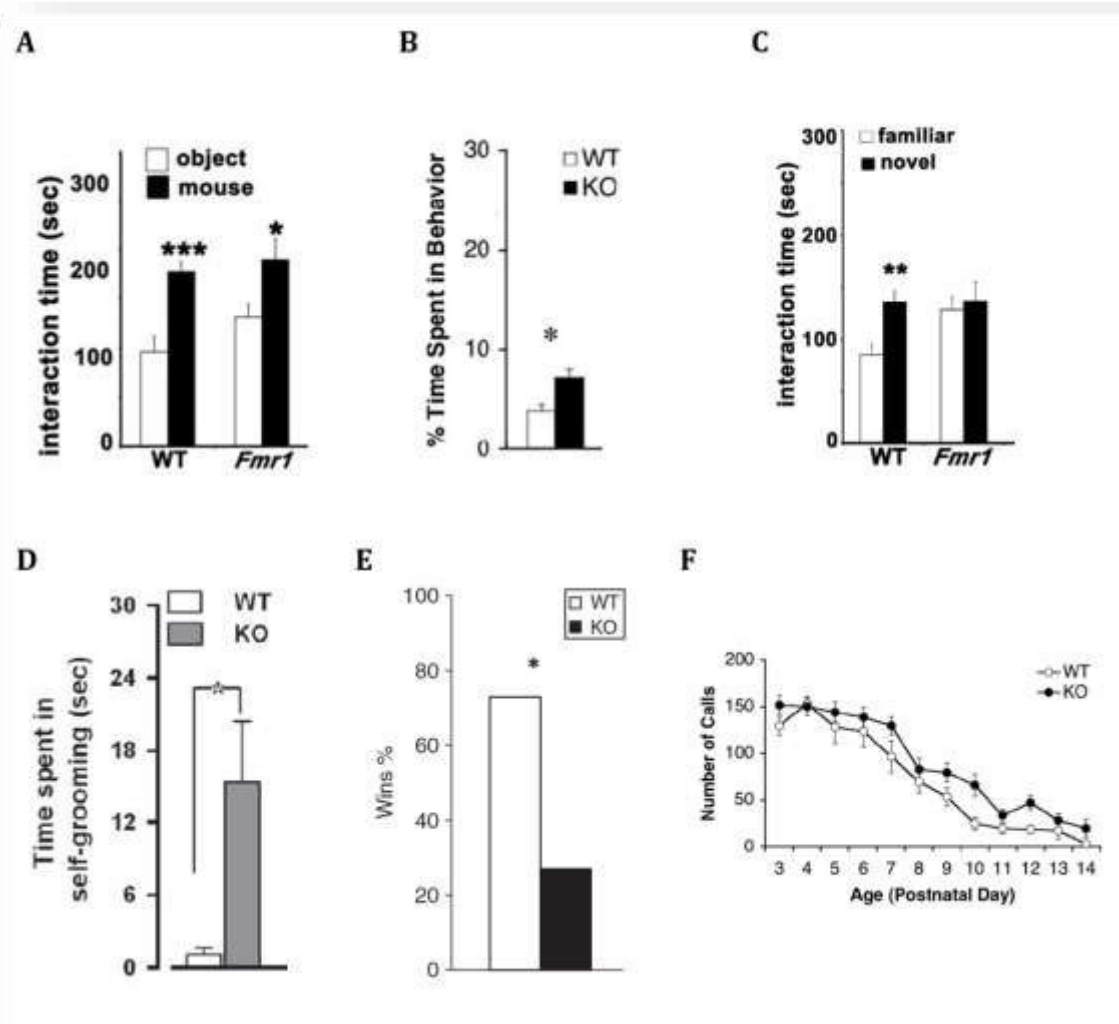


### 2.2.2 Evaluation des comportements sociaux

**Au vu des anomalies des comportements de la sphère sociale clairement établies chez le patient, il n'a pas été surprenant d'observer une altération des interactions sociales chez la souris *Fmr1* KO.** Il est intéressant de noter que les souris *Fmr1* KO ne présentent pas de déficit de **sociabilité**, dans le sens où elles préfèrent visiter un partenaire social plutôt qu'un objet, comme le font les souris WT (Bhattacharya et al., 2012; Hébert et al., 2014) (Figure 10A). En revanche, en situation d'**interaction sociale directe** avec une souris stimulus, les souris *Fmr1* KO s'investissent moins dans des comportements d'affiliations, tels que les reniflements du nez, de la zone ano-génitale, du corps et le toilettage du partenaire (Spencer et al., 2011; Hébert et al., 2014) (Figure 10B). De plus, en présence d'un animal déjà rencontré et d'un animal inconnu, une souris sauvage aura naturellement tendance à aller vers la nouveauté sociale et à favoriser le contact avec un partenaire inconnu (Bhattacharya et al., 2012). Dans une telle situation, les souris *Fmr1* KO ne passent pas plus de temps à rencontrer le nouveau congénère, ce qui illustre un déficit de **reconnaissance sociale** (Bhattacharya et al., 2012; Hébert et al., 2014) (Figure 10C).

En revanche, d'autres comportements indiquent une **anxiété sociale** latente chez les souris *Fmr1* KO. Ces dernières passent en effet beaucoup plus de temps que les WT à faire leur toilette lorsqu'elles se trouvent en présence d'un individu inconnu (McNaughton et al., 2008; Pietropaolo et al., 2011) (Figure 10D). Ceci traduit une augmentation de la nervosité lors d'une interaction sociale plus importante chez les souris *Fmr1* KO que chez les souris WT (McNaughton et al., 2008). Le test du tube permet également de mesurer l'anxiété sociale. Deux souris sont opposées dans un espace restreint afin d'évaluer la relation de dominance et de dominé des individus (Spencer et al., 2005). Face aux souris sauvages, les souris *Fmr1* KO ne remportent que 30% des confrontations (Spencer et al., 2005; Goebel-Goody et al., 2012). Ce modèle murin bat beaucoup plus en retraite que les souris contrôles, ce qui illustre une nouvelle fois l'anxiété sociale des souris *Fmr1* KO qui montrent un **retrait social** prononcé (Figure 10E).

Enfin, un autre aspect comportemental caractéristique des troubles de type autistique est une anomalie de la **communication**. Chez la souris, ce trait est étudié par l'analyse des vocalisations ultrasoniques. Par rapport à leurs frères sauvages, les souriceaux *Fmr1* KO réalisent plus de vocalisations ultrasoniques lors de leur séparation de leur mère ou de leur fratrie (Spencer et al., 2011) (Figure 10F). Ce comportement illustre une anomalie de la communication chez la souris *Fmr1* KO.



**Figure 10 : Résultats comportementaux issus de la littérature illustrant les troubles du comportement social de la souris *Fmr1* KO.**

**(A) Test d'interaction sociale, illustrant la sociabilité de la souris.** Temps d'interaction avec l'objet et avec le stimulus social lors de la phase de préférence sociale. *Adapté de Bhattacharya et al. 2012*

**(B) Comportements d'affiliation effectués lors du test d'interaction sociale directe.** Temps passé à réaliser des comportements d'affiliation (reniflements du nez, de la zone ano-génitale, du corps et le toilettage du partenaire) exprimé en pourcentage du temps total. *Adapté de Spencer et al. 2010.*

**(C) Test d'interaction sociale, illustrant la reconnaissance sociale de la souris.** Temps d'interaction avec le partenaire connu et avec le partenaire inconnu lors de la phase de reconnaissance sociale. *Adapté de Bhattacharya et al. 2012.*

**(D) Temps passé en toilettage personnel lors du test de l'interaction sociale directe.** *Adapté de Pietropaolo et al. 2011.*

**(E) Test du tube.** Le graphique représente le pourcentage de confrontations remportées par chaque génotype lors des rencontres WT vs *Fmr1* KO. *Adapté de Spencer et al. 2005.*

**(F) Ultravocalisations émises par les souriceaux lors de la séparation de la mère et de la fratrie.** *Adapté de Spencer et al. 2001.*

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

### 2.2.3 Evaluation des comportements / troubles neuro-associés

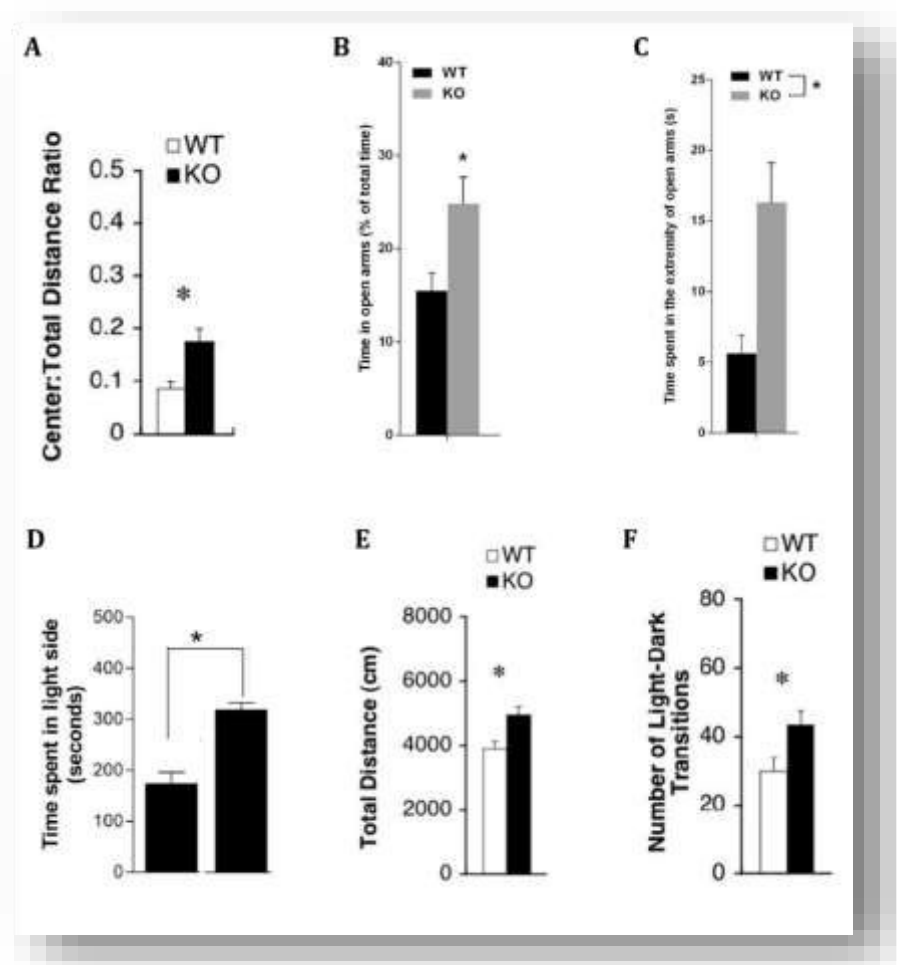
#### **D'autres caractéristiques comportementales faisant partie du corps de symptômes connus chez les patients atteints du syndrome de l'X Fragile ont été investiguées chez la souris *Fmr1* KO.**

En particulier, le comportement **anxieux** a été décrit dans différentes situations. Le comportement de l'animal dans un environnement naturellement anxiogène pour une souris (mis en place dans les tests tels que l'open field, la croix surélevée, ou la chambre claire-obscur) renseigne sur l'état émotionnel ressenti par cette dernière. Typiquement, le comportement enregistré dans un espace vide, dans lequel la souris est libre de se déplacer sans contrainte ni obstacle (*openfield*) indique l'état émotionnel basal de l'animal. Alors que les souris sauvages évitent instinctivement le centre de l'espace vide, zone à découvert présentant une exposition maximale à un danger, pour préférer rester à proximité des parois et dans les angles, les souris *Fmr1* KO passent jusqu'à 2 fois plus de temps que les souris WT au centre de l'espace vide (Hayashi et al., 2007; Spencer et al., 2011; Bhattacharya et al., 2012) (Figure 11A). De la même manière, lors du test de la croix surélevée (EPM, en anglais *Elevated Plus Maze*), dans lequel les souris sont libres de se déplacer dans des bras fermés et des bras ouverts placés en hauteur au-dessus du sol, l'anxiété naturellement évoquée chez les souris sauvages par les espaces découverts et le vide les fait instinctivement éviter les bras ouverts pour préférer les bras fermés (Goebel-Goody et al., 2012; Hébert et al., 2014). Les souris *Fmr1* KO passent, elles, presque 2 fois plus de temps dans les bras ouverts que les souris sauvages. (Goebel-Goody et al., 2012; Hébert et al., 2014) (Figure 11B). A cela s'ajoute que les souris *Fmr1* KO s'aventurent jusqu'à 3 fois plus longtemps aux extrémités des bras ouverts, dans une zone fortement à découvert et proche du vide représentant un risque maximal pour une souris (Hébert et al., 2014) (Figure 11C). Enfin, lors du test de la chambre claire-obscur, composé de 2 espaces vides dont l'un est dans l'obscurité et l'autre est exposé à la lumière, dans lequel la souris est libre de se déplacer et de passer d'un espace à l'autre par une petite ouverture, la souris sauvage passe plus de temps dans la partie obscure et peu de temps dans la partie lumineuse, exposée au danger et anxiogène (Goebel-Goody et al., 2012) (Figure 11D). La souris *Fmr1* KO effectue plus de transitions entre les zones et passe jusqu'à 2 fois plus de temps dans la partie lumineuse que la souris WT (Spencer et al., 2011; Goebel-Goody et al., 2012), preuve supplémentaire de la plus faible anxiété face à un danger dont fait preuve cette lignée murine. Le comportement montré par les souris *Fmr1* KO dans de telles situations naturellement anxiogènes pour une souris sauvage indique une diminution de l'anxiété, ce qui peut paraître aller à l'encontre du phénotype clinique décrit chez le patient humain. Cependant, il convient de préciser le sens que l'on attribue au terme « anxiété ». Ici, il conviendrait plutôt de dire que les souris *Fmr1* KO semblent moins sensibles aux dangers et aux menaces de leurs environnements. Elles semblent avoir moins conscience de l'environnement qui les entoure, et du potentiel qu'il engendre (précipice, exposition face aux prédateurs). Que cela soit une anomalie dans la perception même du danger ou dans l'interprétation qu'en fait la souris, il en résulte un comportement moins anxieux dans le sens où la souris montre moins de réaction face à une situation instinctivement perçue comme dangereuse. En revanche, d'autres comportements indiquent une **anxiété** latente chez les souris *Fmr1* KO, comme décrits

précédemment avec l'augmentation du toilettage chez ces souris, en situation sociale (McNaughton et al., 2008; Pietropaolo et al., 2011) mais également une augmentation du toilettage lorsqu'elles sont seules illustrant une nervosité due à un nouvel environnement (Carreno-Munoz et al., 2018; Costa et al., 2018) (Figure 10D).

Par-dessus tout, le trait phénotypique le plus en adéquation avec le comportement du patient humain atteint du Syndrome de l'X fragile, et le plus décrit chez la souris *Fmr1* KO, est le caractère **hyperactif** de cette lignée murine. Ce comportement peut être simplement visualisé par une mesure de la distance parcourus par les souris lors des tests précédemment décrits, et dans lesquels les souris sont libres de se déplacer, que cela soit le très classique open-field (Hayashi et al., 2007; Spencer et al., 2011; Ding et al., 2014; Carreno-Munoz et al., 2018), le test des trois chambres (Hébert et al., 2014), la croix surélevée (Hébert et al., 2014) ou encore le test de la chambre claire-obscur (Goebel-Goody et al., 2012). Typiquement, les souris *Fmr1* KO parcourent des distances jusqu'à 50% plus élevées que celles mesurées avec les souris WT pour ces divers tests (Figure 11E). L'hyperactivité s'observe aussi en comptant le nombre de transitions que les souris effectuent entre différentes zones d'un espace vide, par exemple dans le test de la chambre claire-obscur. Dans ce test, les souris *Fmr1* KO effectuent environ 50% de transitions de plus que les souris WT (Spencer et al., 2011; Ding et al., 2014) (Figure 11F).

Enfin, une étude a relevé une altération du **cycle circadien** chez les animaux *Fmr1* KO, caractérisée par des périodes circadiennes plus courtes et des alternances activité/repos plus fréquentes et diffuses (Zhang et al., 2008).



**Figure 11 : Résultats comportementaux issus de la littérature illustrant les troubles neuro-associés de la souris *Fmr1* KO.**

**(A) Distance parcourue au centre de l'openfield.** Distance parcourue par la souris exprimée en ratio de la distance totale parcourue. *Adapté de Spencer et al. 2010.*

**(B) Temps passé dans les bras ouverts du test de la croix surélevée.** Temps passé dans les bras ouverts exprimé en % du temps total. *Adapté de Hébert et al. 2014.*

**(C) Temps passé dans les extrémités des bras ouverts du test de la croix surélevée.** Temps passé dans les extrémités des bras ouverts exprimé en pourcentage du temps total. *Adapté de Hébert et al. 2014.*

**(D) Temps passé dans la zone claire dans le test de la chambre claire-obscur.** *Adapté de Goebel-Goody et al. 2012.*

**(E) Distance totale parcourue dans un openfield.** *Adapté de Spencer et al. 2010.*

**(F) Nombre de transition entre les zones claire et sombre dans le test de la chambre claire-obscur.** *Adapté de Spencer et al. 2010.*

\* $p < 0.05$ .

Ainsi, le modèle murin *Fmr1* KO présente des anomalies de la cognition, du comportement social et de la sphère neuropsychiatrique comparables à celles décrites dans le phénotype clinique des patients atteints du syndrome de l'X fragile. Ajoutées aux anomalies physiques et anatomiques étudiées lors de la validation de la création du modèle, l'ensemble dresse un tableau

cohérent avec l'ensemble des caractéristiques phénotypiques composant le phénotype complexe du syndrome de l'X fragile (Figure 12).

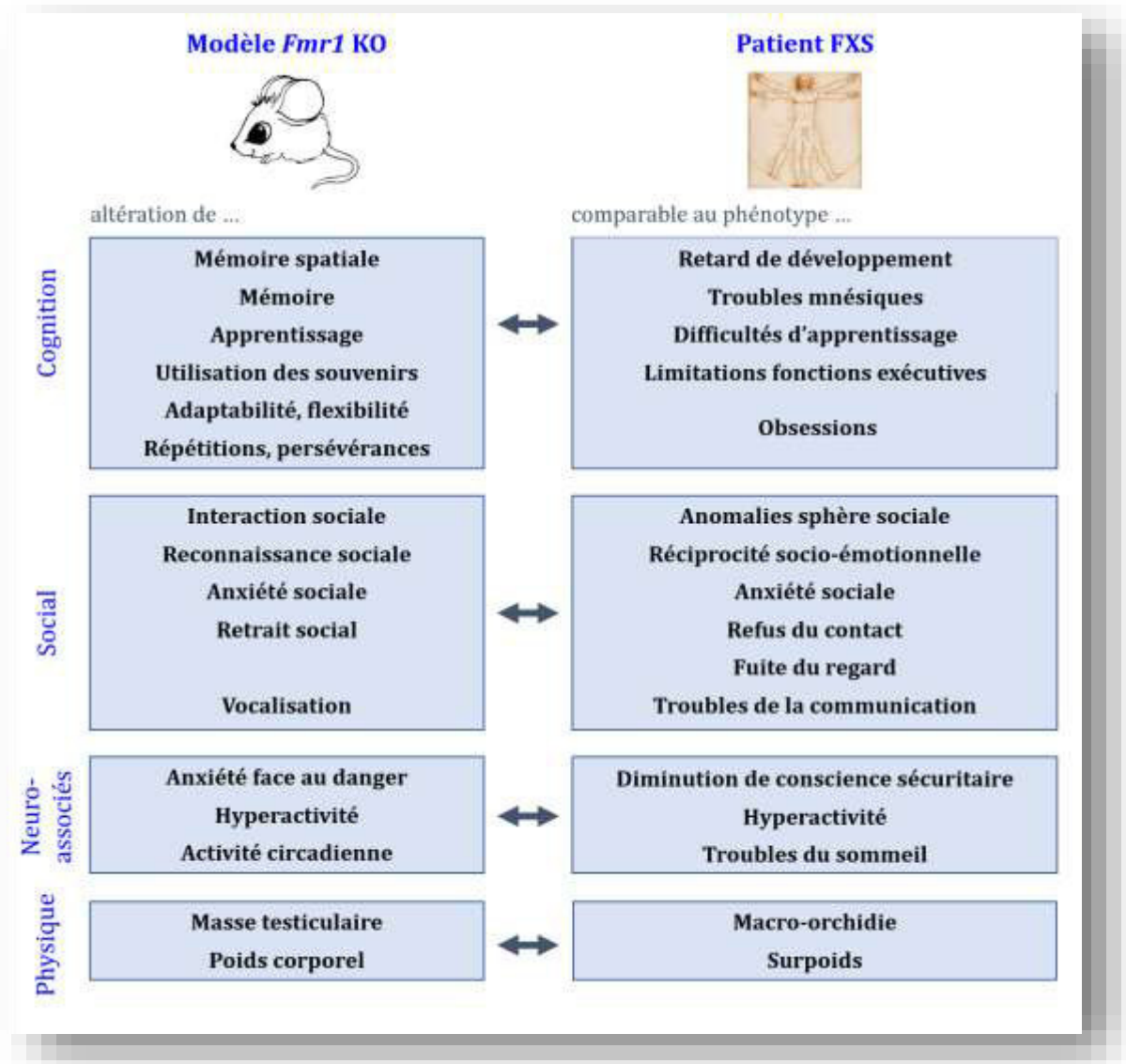


Figure 12 : Association des principales altérations relevées chez le modèle *Fmr1* KO aux symptômes cliniques des patients atteints du syndrome de l'X fragile (FXS).

La validité du modèle se confirme donc par sa construction génétique et de par sa cohérence avec le phénotype clinique du syndrome de l'X fragile. L'étude du modèle *Fmr1* KO permettra alors une exploration des mécanismes moléculaires, cellulaires et physiologiques régissant différents organes en absence de la protéine FMRP, et par conséquent à l'origine des symptômes cliniques du FXS.

## Partie 3 : Le phénotype cérébral du Syndrome de l'X Fragile

Ainsi, comme décrit précédemment, le cerveau des individus atteints du Syndrome de l'X Fragile est normal en apparence, du moins à l'échelle d'une inspection générale lors d'une autopsie, ou lors de neuroimagerie de routine. Certes, des variations de volume ont bien été constatées après analyse fine d'imageries cérébrales, et mesures volumétriques de précision dans certaines régions cérébrales bien précises. Mais les cerveaux ne présentent pas de désorganisation majeure, ou de déstructuration prononcée visible à l'œil nu (Hinton et al., 1991). L'analyse post-mortem de cerveaux de patients adultes s'est révélée normale dans la structure globale des cerveaux, dans leurs poids et dans leur organisation laminaire (Hinton et al., 1991). La densité neuronale n'est pas affectée chez ces patients, indiquant l'absence de phénomène induisant une perte neuronale ou un défaut de division cellulaire et de migration neuronale (Hinton et al., 1991). Cependant, l'absence de la protéine FMRP engendre des troubles cérébraux majeurs à de plus fines échelles.

### 3.1 Anomalies cérébrales fonctionnelles

Le fonctionnement cérébral des patients atteints du syndrome de l'X fragile a été analysé par IRM fonctionnel lors de la réalisation de certaines tâches, en particulier lors de tâches impliquant des fonctions exécutives. Le phénotype comportemental très complexe des patients, conséquence de leur déficience mentale et des troubles de type autistique, rend particulièrement difficile la réalisation technique de telles études fonctionnelles. **C'est pourquoi peu d'études de ce type ont été réalisées avec succès. Cependant, certaines ont permis la mise en évidence des anomalies affectant diverses zones cérébrales.** Par exemple, lors de la réalisation d'une tâche de mémorisation visuelle, un sujet sain montre une augmentation de l'activité des régions frontales avec l'augmentation de la difficulté, tandis qu'un individu atteint du FXS ne montre aucun changement d'activité entre les différentes intensités (Kwon et al., 2001). De la même manière, face à une tâche analysant la réponse inhibitoire, les patients connaissent une réduction significative de leur activation cérébrale, notamment dans leur cortex préfrontal, par rapport à des individus sains. Cette étude met un peu plus en évidence la relation entre la mutation du gène *FMR1* et les performances face à des tâches exécutives. En outre, l'expression cérébrale de *FMR1* étant conséquente dans l'hippocampe et le cerveau basal antérieur, il n'a pas été surprenant d'observer des dysfonctions fonctionnelles dans ces régions lors de la réalisation de tâches de mémorisation par des patients atteints du syndrome de l'X fragile (Greicius et al., 2004). De la même manière que lors de l'étude neuroanatomique des patients atteints du syndrome de l'X fragile, les activations cérébrales lors des tâches sont une signature unique de la pathologie, ce qui les différencie d'autres pathologies de la sphère neuropsychiatrique (Hoeft et al., 2007). En effet, les anomalies des zones activées lors d'une tâche exécutive ne sont pas identiques entre une cohorte de patients atteints du syndrome de l'X fragile et une cohorte de patients atteints de retard développemental (Hoeft et al., 2007).

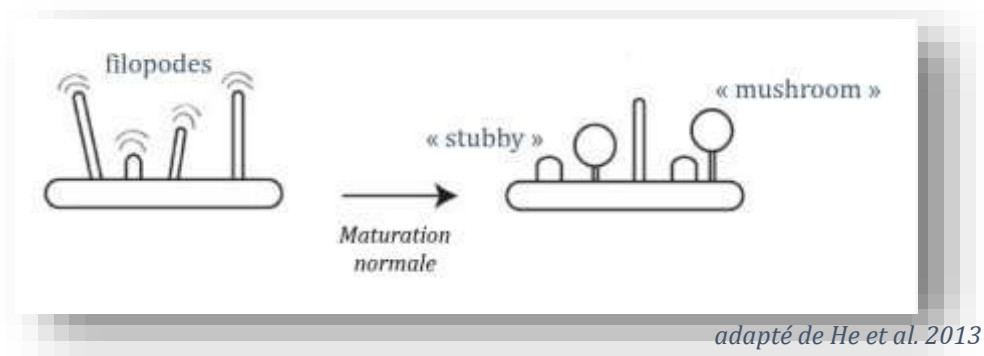
**Les quelques études de l'activité fonctionnelle cérébrale des patients atteints du syndrome de l'X fragile montrent donc des anomalies propres à la pathologie, qui soulignent des activités neuronales inadaptées face aux situations vécues par l'individu.**

### 3.2 Phénotype cellulaire neuronal

Les signes cliniques montrés par les patients atteints du syndrome de l'X fragile, caractérisés notamment par la déficience mentale et des comportements du spectre autistique, et l'implication de FMRP dans la structure et la fonctionnalité synaptique, portent à penser que les plus importantes conséquences de l'absence de la protéine FMRP se situent au niveau neuronal. A la suite de quoi une anomalie neurologique subtile a été clairement identifiée à l'échelle microscopique : une anomalie cérébrale des épines dendritiques dans le syndrome de l'X fragile.

Il faut savoir qu'au cours du développement normal du cerveau, de nombreuses connexions neuronales sont initiées. Visuellement, les dendrites des neurones montrent une forte densité de petites excroissances membranaires, appelées épines dendritiques, qui portent à leur extrémité la synapse à proprement parlé. Ces épines servent de sites de stockage synaptiques, supportent la transmission des signaux électriques et augmentent le nombre de contacts possibles entre neurones. Ainsi, au cours de la neurogénèse fœtale, les épines dendritiques sont formées en très grand nombre. Par la suite, lors de la phase de maturation, certaines synapses sont éliminées tandis que les autres sont stabilisées et renforcées (LeVay et al., 1980). Les mécanismes qui gèrent cette sélection et cette maturation sont des processus modulés par l'activité, qui mettent en compétition les synapses existantes (LeVay et al., 1980). Les synapses sélectionnées pour être renforcées connaissent alors une transition illustrée par un changement de morphologie : les synapses petites et immatures, associées à des épines dendritiques longues et fines, deviennent des synapses larges et matures, associées à des épines dendritiques courtes et trapues (Greenough, 1984; Horner, 1993). Ainsi, la morphologie des épines dendritiques associées à ces synapses révèle l'état de maturité des dendrites et de leurs connexions synaptiques. Les épines dendritiques immatures sont longues et fines, et sont couramment appelées filopodes. A l'inverse, les épines dendritiques matures sont plus courtes et plus larges, ou sont plus courtes avec une excroissance à leur extrémité, révélatrice d'une synapse étendue donc efficace. Ces morphologies sont appelées, respectivement, « *stubby* » et « en forme de champignon » (en anglais *mushroom-shaped*) (He and Portera-Cailliau, 2013) (Figure 13). Tant qu'elles demeurent au stade immature, les épines dendritiques montrent des défaillances dans la transmission des signaux. La taille et la forme des épines dendritiques sont des paramètres cruciaux de la fonction et de la connectivité neuronale. Concrètement, plus une épine est large plus le terminal présynaptique qui lui est associé est gros, et plus les courants post-synaptiques sont intenses (Kasai et al., 2010). De la même manière, des épines nouvellement formées seront naturellement plus petites, et établiront des synapses plus faibles (Holtmaat et al., 2006).



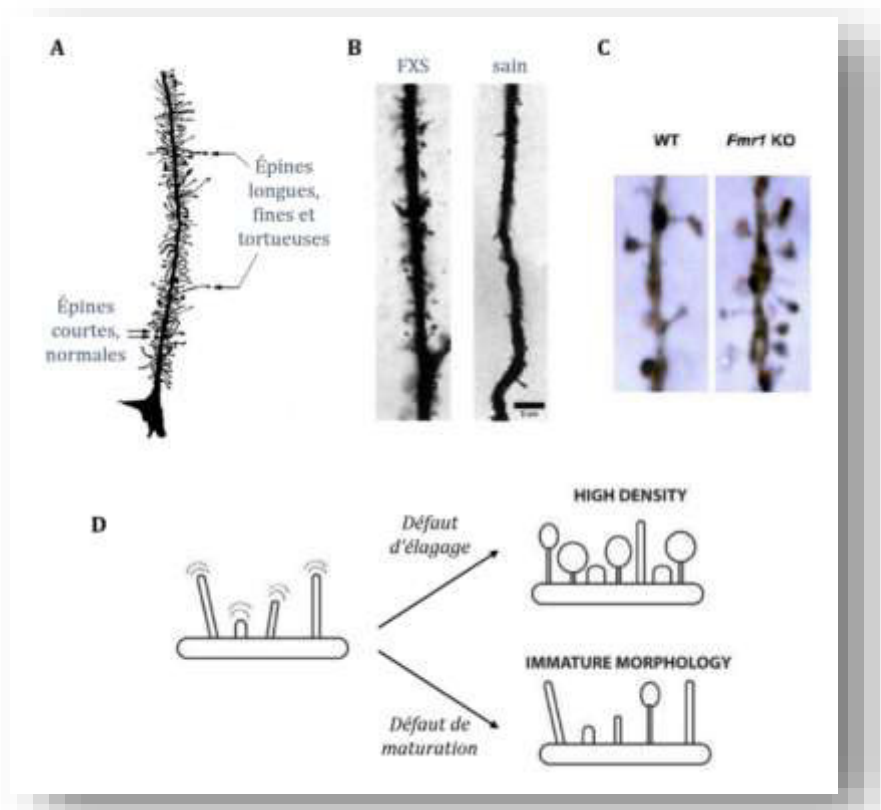


**Figure 13 : Représentation schématique des changements morphologiques au cours de la maturation dendritique, en conditions physiologiques.**

Ainsi, les premières autopsies réalisées sur des cerveaux de patients atteints du syndrome de l’X fragile ont été les premières à s’intéresser aux épines dendritiques dans cette pathologie. Elles ont permis de mettre en évidence une surabondance d’épines sur les dendrites des neurones pyramidaux des couches corticales 3 et 5 (Rudelli et al., 1985; Hinton et al., 1991; Wisniewski et al., 1991; Irwin et al., 2001). Ce phénomène indique une perturbation des mécanismes d’élagage des épines lors de la maturation dendritique, qui tend, en condition physiologique, à supprimer les épines superflues à la spécialisation du neurone. Par-dessus tout, cette observation va de concert avec une apparente immaturité des épines dendritiques dans la pathologie observée lors de ces premières autopsies. Initialement, c’est l’observation d’une forte fréquence d’épines à l’aspect anormalement long, fin et tortueux sur les dendrites des cellules pyramidales des couches corticales 3 et 5 (Rudelli et al., 1985; Hinton et al., 1991; Wisniewski et al., 1991) (Figure 14A), rappelant la morphologie décrite pendant le développement cortical, qui a conduit pour la première fois à l’hypothèse que le syndrome de l’X fragile pourrait être causé par un échec de la maturation des épines dendritiques (Figures 14 A, B et D). Cette hypothèse s’inscrivait parfaitement dans un contexte où ce type d’explication avait été proposé pour d’autres pathologies de retard mental (Purpura, 1974). Ces études avaient de plus révélé une nette diminution de la longueur des synapses offertes par les épines dendritiques, et par conséquent une diminution de l’ordre de 35% de l’aire de contact synaptique dans les zones cérébrales étudiées (Rudelli et al., 1985). La seule autre étude réalisée sur le cerveau de patients FXS afin d’étudier les épines dendritiques de manière quantitative releva, effectivement, une plus grande densité d’épines mais aussi une plus grande proportion d’épines longues et d’aspect immature dans le cortex temporal et visuel (Irwin et al., 2001) (Figure 14B). **L’un dans l’autre, l’ensemble des résultats de cette étude atteste que non seulement le mécanisme d’élagage mais aussi les phénomènes de maturation des épines dendritiques sont altérés dans le Syndrome de l’X Fragile** (Figure 14D). Les études menées sur le patient atteint du syndrome de l’X fragile reportent donc une indéniable anomalie dans la formation des épines dendritiques dans la pathologie.

Suite à ces observations, l’étude de ce phénotype a pu être approfondie grâce à l’utilisation du modèle murin *Fmr1* KO. **Les cortex de ces animaux à l’âge adulte présentent effectivement des neurones**

avec des épines en plus grande densité et anormalement longues, ainsi qu'une prépondérance des épines de type immature (Comery et al., 1997; Nimchinsky et al., 2001; Irwin et al., 2002; Galvez and Greenough, 2005; Restivo et al., 2005; Meredith et al., 2007; Liu et al., 2011; Michalon et al., 2012; Hébert et al., 2014) (Figure 14C). Cependant, bien que toutes les études ne rapportent pas une anomalie dans la taille des épines dendritiques, selon la zone cérébrale observée, la majorité atteste d'une relative immaturité des épines dendritiques en se basant sur des critères morphologiques. En particulier, un trop grand nombre d'excroissances immatures est décrit dans le cortex, mais aussi dans les neurones pyramidaux et les cellules granulaires du gyrus denté de l'hippocampe, dans les neurones Purkinje du cervelet et les cellules pyramidales de l'amygdale des souris *Fmr1* KO (Koekkoek et al., 2005; Antar et al., 2006; Grossman et al., 2006, 2010; Bilousova et al., 2009; Qin et al., 2011). Il est intéressant de noter que ce phénotype d'immaturité semble spécifique à certaines régions au sein des organes cérébraux. Par exemple dans l'hippocampe, on le retrouve dans le CA1 mais pas dans le CA3 (Levenga et al., 2011), ce qui est intéressant au regard des différents rôles que jouent ces zones dans les processus de mémorisation et d'apprentissage (Guzowski et al., 2004).



**Figure 14 : Phénotype cellulaire neuronal caractéristique du syndrome de l'X fragile.**

**(A) Dessin composite d'une dendrite corticale de patient FXS** marquée par Golgi-staining. *Adapté de Hinton et al. 1991.*

**(B) Photographie de dendrites d'un patient FXS (à gauche) et d'un individu sain (à droite).** Barre d'échelle : 5  $\mu$ m. Neurones marqués grâce au Golgi-staining. *Adapté de Irwin et al. 2000.*

**(C) Photographie de dendrites d'une souris contrôlée (à gauche) et d'une souris *Fmr1* KO (à droite).** *Adapté de Michalon et al. 2012.*

**(D) Représentation schématique des changements morphologiques au cours de la maturation dendritique, en conditions FXS.** L'augmentation de densité des épines dendritiques illustre un défaut d'élagage, associé à une augmentation de la proportion des épines de morphologie immature révélant un défaut du processus de maturation. *Adapté de He et al., 2013.*

Ainsi, le syndrome de l'X fragile n'est pas une pathologie de l'anatomie cérébrale, mais bien une pathologie de la synapse. Les aires cérébrales présentent un phénotype cellulaire d'immaturité neuronale, avec des dendrites présentant un aspect grêle caractérisé par augmentation de la densité en épines et une plus grande proportion d'épines avec une morphologie immature.

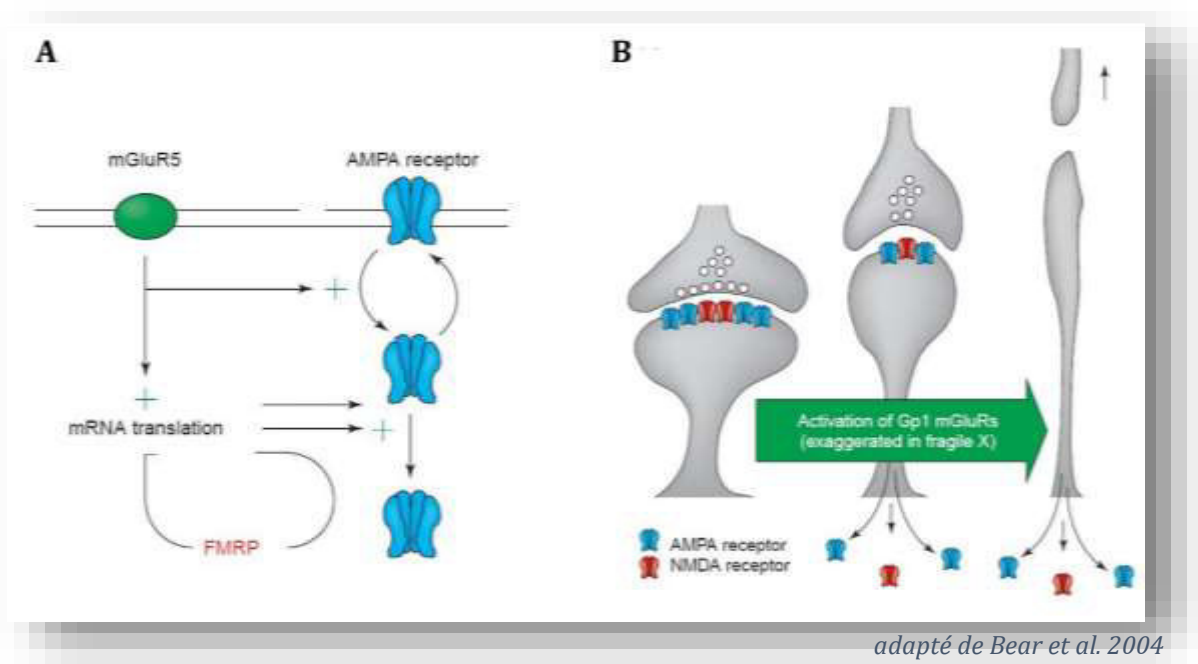
### 3.3 Phénotype moléculaire synaptique

La protéine FMRP est fortement exprimée dans les arbres et épines dendritiques, et se lie à de très nombreux ARNm localisés dans les dendrites, ou codant pour des protéines synaptiques. Cette donnée, ajouté au phénotype d'immaturité des épines dendritiques neuronales en absence de la protéine FMRP, conduit à postuler que **le syndrome de l'X fragile est une pathologie de la plasticité synaptique. L'absence d'FMRP engendre des anomalies dendritiques, causées par de nombreuses altérations de mécanismes moléculaires localisés au niveau synaptique.**

#### 3.3.1 La mise en évidence de la perturbation de la voie glutamatergique

La plasticité synaptique est associée à des changements fonctionnels d'éléments pré- et post-synaptiques des neurones, qui constituent des potentialisations (*i.e.* des renforcements) ou des dépressions (*i.e.* des affaiblissements) des synapses. C'est pourquoi les premières études des neurones du modèle *Fmr1* KO se sont focalisées sur ces phénomènes de potentialisation et de dépression, en premier lieu dans l'hippocampe. Contre toute attente, ces études ont reporté une potentialisation à long terme (LTP, en anglais *long-term potentiation*) des neurones hippocampiques comparable à celle observée chez les animaux contrôles, et ce pour des mécanismes dépendants ou non de synthèses protéiques (Godfraind et al., 1996; Paradee et al., 1999). De la même manière, la dépression à long terme (LTD) a été décrite comme identique entre des animaux *Fmr1* KO et des animaux contrôles (Godfraind et al., 1996; Paradee et al., 1999). Cependant, la LTD étudiée ici est celle classiquement initiée par les récepteurs ionotropiques au glutamate activés par le N-méthyl-D-aspartate, dits récepteurs NMDA. En revanche, une nouvelle forme de LTD induite, elle, par l'activation des récepteurs métabotropiques au glutamate du groupe 1 (GpI mGluR) et dépendante de la synthèse de protéines synaptiques est exacerbée chez les animaux *Fmr1* KO (Huber et al., 2000, 2002). En effet, la stimulation des GpI mGluR post-synaptiques dans les neurones hippocampiques engendre des modifications de la synapse, parmi lesquelles on retrouve l'internalisation des récepteurs ionotropiques au glutamate NMDA et AMPA (activés par le alpha-amino-3-hydroxy-5-méthylisozol-4-propionate) et la dépression synaptique (Huber et al., 2000; Snyder et al., 2001) (Figure 15). Ces phénomènes nécessitent tous la synthèse de protéines, consécutive à l'activation des mGluR. Par conséquent, l'activation des GpI mGluR a de nombreux impacts tant sur la structure que sur la fonction synaptique, résultats de la traduction de nouvelles protéines (Merlin et al., 1998; Huber et al., 2000; Raymond et al., 2000; Naie and Manahan-

Vaughan, 2005). De plus, la stimulation des GpI mGluR conduit à l'augmentation de la traduction de la protéine FMRP au niveau synaptique (Weiler et al., 1997). L'alliance de ces deux informations laisse à penser que **la LTD induite par les mGluR est due à un équilibre entre 2 mécanismes en opposition fonctionnelle**. D'un côté l'activation des GpI mGluR stimule la synthèse de FMRP et de protéines synaptiques impliquées dans la stabilisation de la LTD. De l'autre côté, la protéine FMRP joue son rôle de régulation de la traduction, et inhibe la traduction de ces protéines synaptiques afin de limiter et maîtriser la LTD. En résumé, en conditions physiologiques, **la morphologie des épines dendritiques est régulée de manière antagoniste par FMRP et par les récepteurs GpI mGluR** (Figure 15). Ainsi, en absence de la protéine FMRP, l'activation des récepteurs GpI mGluR post-synaptiques engendre une LTD anormalement exacerbée, caractérisée par une synthèse de protéines synaptiques dérégulées et une internalisation exagérée des récepteurs NMDA et AMPA (Figure 15). Ce phénomène peut expliquer le retard de maturation synaptique ainsi que la morphologie anormalement allongée des épines dendritiques (Bear et al., 2004). L'absence de la protéine FMRP déstabilise ainsi les mécanismes de plasticité neuronale contrôlés par les voies glutamatergiques.



**Figure 15 : Représentation schématique (A) des mécanismes engendrés par l'activation des récepteurs GpI mGluR et (B) de leurs conséquences sur la plasticité synaptique (LTD).**

En conditions physiologiques, les mécanismes résultant de l'activation des récepteurs GpI mGluR sont inhibés par la protéine FMRP. Ainsi, l'absence de cette protéine induit une LTD exacerbée en conditions FXS, qui participe aux anomalies dendritiques. mGluR5 est un récepteur du groupe GpI mGluR. C'est sur ce récepteur que se porte la majorité des études dans le cas du FXS.

**Ainsi, les voies excitatrices glutamatergiques sont altérées en absence de la protéine FMRP. Les anomalies de ces voies participent à l'établissement du phénotype cellulaire cérébral d'immaturation neuronale, en dérégulant des mécanismes impliqués dans la plasticité synaptique.**

**Les voies glutamatergiques excitatrices sont exacerbées en conditions de FXS, ce qui participe indéniablement aux phénotypes d'hyperexcitabilité et d'hypersensibilité de la pathologie.**

### 3.3.2 L'absence de FMRP induit également une perturbation de la voie GABAergique

**L'acide gamma-aminobutyrique (GABA)** est le neurotransmetteur inhibiteur le plus répandu dans le système nerveux central humain. Son action est possible grâce à deux types de récepteurs : les GABA<sub>A</sub>, ionotropiques, et les GABA<sub>B</sub>, métabotropiques. Les GABA<sub>A</sub> ont une action rapide associée à la dépolarisation du neurone post-synaptique, ce qui inhibe l'activité neuronale. Les récepteurs GABA<sub>B</sub> ont une action similaire, mais plus lente car couplée à une protéine G agissant sur des canaux ioniques au potassium (Télias, 2019). **Les symptômes d'hyperactivité et d'hypersensibilité constatés dans le syndrome de l'X fragile ont mené à s'interroger sur une éventuelle réduction de l'inhibition conduite par le GABA, soit pas une diminution de la quantité du neurotransmetteur même, soit par une diminution de ses récepteurs.**

Premièrement, l'absence de protéine FMRP engendre une dérégulation des quantités cérébrales de GABA. En effet, la souris *Fmr1* KO montre une diminution significative de ses niveaux de GABA, confirmée dans plusieurs régions cérébrales (Davidovic et al., 2011). Cette diminution est associée à une réduction des quantités d'ARNm codant pour la glutamate décarboxylase Gad65, l'enzyme responsable de la conversion du glutamate en GABA (D'Hulst et al., 2009). **L'absence d'FMRP engendre donc un défaut de production du neurotransmetteur inhibiteur GABA au niveau cérébral.**

En outre, il a été effectivement démontré qu'en absence de la protéine FMRP plusieurs ARNm codant pour des sous-unités des récepteurs GABA<sub>A</sub> sont diminués (D'Hulst and Kooy, 2007). Les mécanismes expliquant cette diminution restent incompris, car la protéine FMRP est connue pour jouer un rôle de régulation de la traduction, et non de l'expression d'un gène. A titre d'exemple, le cortex de la souris *Fmr1* KO montre des diminutions de l'ordre de 35% à 50% pour les ARNm de 8 sous-unités majeures des récepteurs GABA<sub>A</sub> (D'Hulst et al., 2006). L'expression des sous-unités de ce récepteur est alors diminuée dans plusieurs régions cérébrales de la souris *Fmr1* KO, en particulier dans l'hippocampe et l'amygdale (D'Hulst et al., 2006). Cette diminution est associée à une altération de la transmission synaptique GABAergique, visible par une réduction des courants d'inhibition au niveau post-synaptique (Sabanov et al., 2017; Zhang et al., 2017). La diminution des récepteurs GABA<sub>A</sub> a été confirmée chez les patients atteints du syndrome de l'X fragile qui présentent environ 10% de récepteurs visibles de moins que les individus sains lors d'une cartographie cérébrale par PET scan (en anglais *Positive Emission Tomography*) (D'Hulst et al., 2015).

De plus, une expression réduite des récepteurs GABA<sub>B</sub> a été démontrée dans le tronc cérébral des souris *Fmr1* KO (D'Hulst et al., 2009). Lorsqu'ils sont activés, ces récepteurs jouent un rôle d'inhibition de l'excitabilité neuronale en atténuant la sécrétion de glutamate. Ainsi, leur diminution lève cette inhibition et peut expliquer l'hyperexcitabilité constatée au niveau cérébral en condition FXS (D'Hulst et al., 2009). Plus récemment, des études ont montré des diminutions spécifiques de certaines sous-unités

des récepteurs GABA<sub>B</sub> au niveau des terminaux présynaptiques en l'absence de protéine FMRP, concourant à une augmentation de la libération synaptique de glutamate dans l'hippocampe des souris *Fmr1* KO (Kang et al., 2017). Cette hypothèse s'est vue confirmée chez le patient FXS, chez qui une tendance à la diminution de certaines protéines constituant des sous-unités des récepteurs GABA<sub>B</sub> a été observée sur des tissus post-mortem (Kang et al., 2017).

**Il existe donc une altération de la voie GABAergique dans le syndrome de l'X fragile. Cette voie inhibitrice majeure du système nerveux se voit affaiblie dans cette pathologie, ce qui participe aux phénotypes d'hyperactivité et d'hyperexcitabilité globale constatés chez les patients.**

**Par conséquent, le syndrome de l'X fragile se caractérise par une augmentation de la puissance de l'excitabilité associée à un affaiblissement de l'inhibition neuronale. Ces deux aspects se complètent pour concourir aux phénotypes d'hyperexcitabilité, hyperactivité et hypersensibilités constatées à différents niveaux dans la pathologie, et composent ce qu'il convient d'appeler le déséquilibre de la balance excitation/inhibition du syndrome de l'X fragile.**

### 3.3.3 Autres altérations en absence de la protéine FMRP

Une étude protéomique comparant les niveaux d'expression des protéines dans les synapses de souris *Fmr1* KO et WT a révélé qu'une multitude de protéines associées à la structure et à la morphogénèse synaptiques, au transport des ARNm dendritiques et à la transmission synaptique est dérégulée chez les souris *Fmr1* KO (Liao et al., 2008). Cette étude a généré une liste de 132 protéines dérégulées au niveau synaptique chez la souris *Fmr1* KO (Liao et al., 2008). Sans être exhaustif, des catégories de protéines, basées sur leur fonction moléculaire, se dégagent plus particulièrement.

L'absence de FMRP déstabilise les niveaux de nombreuses protéines **pré-synaptiques** (Liao et al., 2008). Notamment, les synapses hippocampiques des souris *Fmr1* KO montrent une diminution de l'ordre de 40% de bêta-caténine, et une augmentation de synapsine et synaptotagmine de l'ordre de 25% et 40% respectivement (Klemmer et al., 2011). Ces dernières sont impliquées dans la régulation des **vésicules synaptiques** et la formation de nouvelles connexions synaptiques. La perturbation de leur niveaux d'expression peut ainsi expliquer la désorganisation pré-synaptique observée chez dans ces mêmes synapses hippocampiques de la souris *Fmr1* KO, caractérisée par une plus faible quantité de vésicules organisées en cluster et une augmentation de la proportion de vésicules ancrées dans la membrane (Klemmer et al., 2011). Ces anomalies pré-synaptiques indiquent une activité synaptique réduite. De manière similaire, l'absence de FMRP au niveau pré-synaptique induit une augmentation du recyclage des vésicules et de l'augmentation du nombre de vésicules pré-synaptiques (Deng et al., 2011, 2013). Ces résultats montrent que la protéine FMRP régule la libération de neurotransmetteurs au niveau pré-synaptique. Les altérations vésiculaires observées en absence de la protéine FMRP sont associées à la réduction de la dépression sur le court terme (STD, en anglais *Short-Term Depression*) observée dans les neurones excitateurs de la souris *Fmr1* KO, phénomène qui implique des mécanismes pré-synaptiques

(Deng et al., 2011). De plus, l'analyse protéomique de cultures primaires de neurones de souris *Fmr1* KO a montré une diminution de l'ordre de 50% de l'expression de l'une des sous-unités du **canal BKCa**, la protéine KCNMA1 (Liao et al., 2008). Par la suite, il a été démontré que les neurones hippocampiques souffrent d'une diminution de leurs courants BK d'une manière dépendante de la traduction gérée par FMRP (Deng et al., 2013). A cela s'ajoute que FMRP interagit avec la sous-unité régulatrice du canal potassique BK, dans une interaction protéine-protéine directe sans implication de la traduction d'ARNm (Deng et al., 2013). L'absence de FMRP au niveau pré-synaptique engendre donc une dérégulation dans le fonctionnement des canaux BK, impliqués dans la concentration neuronale en  $Ca^{2+}$  et dans la libération de neurotransmetteurs tels que le glutamate (Latorre and Brauchi, 2006; Salkoff et al., 2006). L'absence de FMRP impacte la durée de leur potentiel d'action, la libération de neurotransmetteurs et la plasticité à court terme induite par les canaux BK. Ces canaux étant impliqués dans certains troubles cognitifs et comportementaux (Laumonier et al., 2006; Higgins et al., 2008), ces informations fournissent une nouvelle piste d'explication des phénotypes du FXS (Hébert et al., 2014).

En conditions physiologiques, la protéine FMRP interagit avec des ARNm et des protéines qui impactent le cytosquelette, élément crucial de la forme des épines dendritiques. Par exemple, FMRP interagit avec la protéine CYFIP et le complexe inhibe, entre autres, le remodelage actinique dépendant de la protéine Rac (Castets et al., 2005; Pfeiffer and Huber, 2009). Rac est une protéine participant aux modifications du cytosquelette actinique. Ainsi, en absence de FMRP, le remodelage actinique est augmenté dans les cellules, comme cela a été observé dans des fibroblastes de souris (Castets et al., 2005). En particulier, **au niveau post-synaptique**, FMRP interagit avec l'ARNm de la **protéine PSD95**, localisée au niveau de la synapse (Muddashetty et al., 2007; Zalfa et al., 2007). Cette protéine est la plus abondante de la densité postsynaptique, et est considérée comme la protéine synaptique la plus importante pour l'organisation de la synapse. La dérégulation de cette protéine est associée à une altération de la plasticité synaptique, et aux troubles autistiques (Tsai et al., 2012; Westmark, 2013). En absence de la protéine FMRP, PSD95 est dérégulé au niveau cérébral, mais de manière structure spécifique. En effet, par rapport à des animaux WT, chez la souris *Fmr1* KO, les quantités de PSD95 sont inchangées dans le cortex et le cervelet (Zalfa et al., 2007), mais diminuées dans l'hippocampe (Zhu et al., 2011) et augmentées à l'échelle du cerveau tout entier (Rossignol et al., 2014). Ceci met en évidence des mécanismes complexes de régulation de la traduction des ARNm de PSD95 par FMRP (Zhu et al., 2011). Ces mécanismes peuvent être une association directe des ARNm de PSD95 par FMRP (Zalfa et al., 2007), mais aussi via l'association à des molécules partenaires, telles que les miRNA-125 (Todd et al., 2003; Muddashetty et al., 2011). Enfin, l'absence de FMRP diminue la dégradation des protéine PSD95 par la voie du protéasome (Tsai et al., 2012). Quoi qu'il en soit, FMRP est fortement lié au niveau de PSD95 synaptique (Westmark, 2013). Ainsi, l'absence de FMRP au niveau synaptique perturbe les niveaux de PSD95, ce qui joue un rôle incontestable dans l'anomalie d'immaturité des épines dendritiques, en déstabilisant la structure synaptique.

L'absence de la protéine FMRP impacte également **l'environnement des synapses**. En particulier, la métalloprotéinase matricielle 9 (MMP-9), dont les ARNm font partie des transcrits ciblés par FMRP, voit son expression ainsi que son activité augmentées (Bilousova et al., 2009). Les MMP sont des

endopeptidases impliquées dans le remodelage tissulaire, tel que le clivage de composants de la matrice extracellulaire. Au niveau cérébral, la MMP-9 participe à la plasticité synaptique (Ganguly et al., 2013; Knapska et al., 2013). Or, il a été récemment démontré qu'une hyperactivation de la MMP-9 neuronale peut engendrer une dégradation de l'environnement extracellulaire du neurone, ce qui peut avoir de sérieuses conséquences sur le fonctionnement et la maturation des synapses (Reinhard et al., 2015).

Des études estiment que **FMRP se lie ainsi avec environ 4% des ARN messagers cérébraux**, soit environ 840 ARNm, y compris ses propres ARNm (Ashley et al., 1993b; Bagni and Greenough, 2005; Darnell et al., 2011). De plus, de par ses nombreuses interactions et son implication dans des mécanismes de régulation synaptiques, elle est une protéine clé de la plasticité et de la maturation dendritiques. C'est pourquoi **son absence impacte de nombreuses quantités protéiques associées à la plasticité synaptique, mais aussi le bon déroulement de mécanismes de dépression et potentialisation synaptique, menant à une déstabilisation du fonctionnement synaptique global.**

## 3.4 Stratégies thérapeutiques

### 3.4.1 Théorie mGluR5

Les caractéristiques phénotypiques du syndrome de l'X fragile pouvant être mis en parallèle de conséquences de la suractivation des GpI mGluR donna naissance à la « **théorie mGluR du syndrome de l'X fragile** », prédisant que de nombreuses modalités phénotypiques de la pathologie peuvent être corrigées par une action de down-régulation des GpI mGluR (Bear et al., 2004). Cette théorie s'est révélée exacte pour plusieurs caractéristiques phénotypiques exprimées par la souris *Fmr1* KO. En effet, un croisement de cette lignée avec une lignée connaissant une diminution de 50% de l'expression des récepteurs mGluR5 (souris hétérozygotes pour la mutation du gène *Grm5*) permet d'obtenir des animaux *Fmr1* KO dont l'expression des récepteurs mGluR5 est génétiquement réduite à 50%. Ces derniers retrouvent un phénotype proche de celui des animaux WT pour des modalités tant cognitives (densité des épines dendritiques, plasticité de dominance oculaire) que syndromiques (sensibilité aux convulsions audiogéniques, poids corporel, synthèse protéique) (Dolen et al., 2007). Cette étude étaye de manière solide la thèse de rôles régulateurs opposés entre FMRP et mGluR5.

Sur la base de cette théorie, des voies thérapeutiques composées d'antagonistes des récepteurs mGluR ont été imaginées. En particulier, les composés testés ciblent les récepteurs mGluR5. Parmi les plus connus, citons le Mavoglurant, un antagoniste des récepteurs mGluR5 ayant montré une restauration d'altérations dendritiques, synaptiques et comportementales chez la souris *Fmr1* KO (Gantois et al., 2013; Zerbi et al., 2019), mais n'a pas montré d'améliorations chez les patients FXS (Bailey et al., 2016; Berry-Kravis et al., 2016). Un modulateur allostérique négatif (MAN) des récepteurs mGluR5 utilisé classiquement comme antidépresseur, le Basimglurant, fut également mené jusqu'en phase 2 d'un essai clinique, mais s'est révélé incapable d'améliorer les comportements des patients évalués par le test



ADAMS (Quiroz et al., 2016; Youssef et al., 2018). Le MPEP (2-Methyl-6-(phenylethynyl) pyridine), un autre MAN des récepteurs mGluR5 a montré des résultats encourageants, restaurant plusieurs phénotypes cellulaires et comportementaux chez la souris *Fmr1* KO (Yan et al., 2005; Meredith et al., 2011; Gandhi et al., 2014). Le fenobam, MAN lui aussi des récepteurs mGluR5, s'est également montré prometteur de par ces changements au niveau synaptique chez la souris *Fmr1* KO (Wang et al., 2014) mais a montré des effets délétères chez les souris contrôles (Vinueza Veloz et al., 2012). **A ce jour, il n'existe aucune solution thérapeutique répondant à la théorie mGluR ayant passé avec succès les épreuves des essais cliniques.**

### 3.4.2 Théorie GABAergique

Bien que la perturbation des voies GABAergiques dans le syndrome de l'X fragile n'ait pas été étudiée de manière expansive, ni chez le modèle murin ni chez le patient, **des essais cliniques ont été menés avec divers composés pharmaceutiques destinés à augmenter l'activité induite par les récepteurs au GABA.** En effet, l'administration directe de GABA n'est pas envisageable, cette molécule ayant une faible capacité de pénétration des tissus cérébraux (Castagnola et al., 2017). Une stratégie envisagée fut d'augmenter l'activité des récepteurs GABA<sub>A</sub> (Braat and Kooy, 2015). Le Riluzole fut testé en essai clinique mais ne s'est pas montré très efficace dans l'amélioration des troubles cliniques de la majorité des patients (Erickson et al., 2011). Pour pallier la diminution présynaptique des récepteurs GABA<sub>B</sub>, des agonistes spécifiques de ces récepteurs ont été testés sur le modèle murin du FXS. Le baclofen et la R-baclofen ont montré, après un traitement chronique, des effets positifs sur les déficits sociaux et sur les comportements répétitifs chez ces souris (Silverman et al., 2015). Cependant, il s'est révélé inefficace dans l'amélioration de l'activité synaptique des neurones du modèle *Fmr1* KO, et l'essai clinique chez l'humain n'a pas montré de résultats convaincants (Telias, 2019). L'Acamprosate, un activateur des récepteurs GABA<sub>A</sub> et GABA<sub>B</sub>, a aussi permis d'améliorer certains phénotypes de la souris *Fmr1* KO (Schaefer et al., 2017). Enfin, citons le Galaxolone, un neurostéroïde modulateur positif des récepteurs GABA<sub>A</sub> avec des propriétés sédatives, anxiolytiques et anticonvulsives, qui a lui aussi ciblé plusieurs phénotypes de la souris *Fmr1* KO (Braat et al., 2015). Cependant, **les différentes approches thérapeutiques ciblant la voie GABAergique n'ont pas fourni les améliorations cliniques attendues lors des essais cliniques.**

### 3.4.3 Autres stratégies thérapeutiques envisagées

La diminution des courants BKCa cérébraux chez la souris *Fmr1* KO a fait de ces canaux une nouvelle cible thérapeutique pour le FXS. Un **molécule ouvreuse de canaux BK**, le BMS-204352 a montré des résultats encourageants tant en *in vitro*, en restaurant le phénotype d'immaturité des épines dendritiques de cultures de neurones primaires de souris *Fmr1* KO, qu'en *in vivo*, avec une diminution des anomalies comportementales de ces animaux (Hébert et al., 2014).

Le **niveau cérébral de MMP-9** a été normalisé avec succès grâce à un antibiotique large spectre, la Minocycline, chez la souris *Fmr1* KO (Bilousova et al., 2009). Suite à ce traitement, cette souris a également montré une amélioration de son phénotype anxieux et de ses vocalisations ultrasonique (Bilousova et al., 2009; Rotschafer et al., 2012). La Minocycline s'est vue efficace lors de 2 essais cliniques chez l'homme, mais la présence d'effets secondaires indésirables a remis en question l'utilisation de cette molécule (Paribello et al., 2010; Leigh et al., 2013).

L'obésité étant l'un des symptômes montrés par la plupart des patients atteints du FXS, un **traitement anti-diabétique**, la Metformine, a été administrée à des patients en obésité sévère, et a montré une amélioration de la cognition et du langage (Dy et al., 2018). La Metformine s'est révélée être un traitement efficace chez le patient, et l'administration de cette molécule a montré des améliorations de nombreux biomarqueurs *in vitro* et *in vivo* du FXS chez la souris *Fmr1* KO (Gantois et al., 2017). De plus, l'administration chronique de Metformine à des souris *Fmr1* KO a permis une diminution du niveau de MMP-9 dans le cerveau de ces souris (Gantois et al., 2017), ce qui souligne la pertinence de l'implication de la MMP-9 dans la physiopathologie du FXS (Castagnola et al., 2017).

L'absence de FMRP a aussi un impact sur le fonctionnement du **système endocannabinoïde**, un système modulateur de divers aspects neuronaux tels que l'anxiété, la nociception mais aussi la susceptibilité à l'épilepsie (Khan et al., 2016). Le Rimonabant, un antagoniste sélectif des récepteurs cannabinoïdes 1, a montré une restauration de la plasticité synaptique dans l'hippocampe de souris *Fmr1* KO et de leurs capacités d'apprentissage et de mémorisation (Gomis-González et al., 2016). Les **voies de la sérotonine et de l'ocytocine** ont également été ciblées à des fins thérapeutiques, suite aux démonstrations que plusieurs acteurs de ces voies sont altérés en conditions FXS (Castagnola et al., 2017). C'est pourquoi des inhibiteurs sélectifs de la récupération de la sérotonine (Citalopram, Escitalopram, Fluoxetine, Fluvoxamine, ...), ainsi qu'un bloqueur du co-transporteur au chlorure impliqué dans la voie de l'ocytocine (Bumetanide) ont été testés sur la souris *Fmr1* KO, et ont montré des premiers résultats encourageants (Castagnola et al., 2017).

Pour finir, **d'autres cibles thérapeutiques** ont été envisagées pour de futurs traitements du syndrome de l'X fragile. A titre d'exemples, citons la protéine précurseur de l'amyloïde (APP, en anglais *Amyloid Precursor Protein*), le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF, en anglais *Brain-derived neurotrophic factor*), et le récepteur NMDA proposés dans de récentes revues (Wei et al., 2012; Castrén and Castrén, 2014; Tian et al., 2015; Westmark et al., 2016; Castagnola et al., 2017).

**A l'heure actuelle, aucune solution thérapeutique n'a été complètement approuvée.** Les molécules qui ont réussi à passer les phases précliniques ont échoué lors des phases cliniques, la plupart du temps parce que leurs effets ne perduraient pas dans le temps ou « échappaient » avec des effets secondaires délétères. Il apparaît donc clairement que l'architecture des futurs essais thérapeutiques doit être repensée, et inclure plus de précautions quant aux potentiels effets bénéfiques recherchés. Dernièrement, de nombreuses voix s'élèvent, faisant le bilan des essais réalisés à ce jour et tirant des conclusions des nombreux échecs, afin de conseiller sur les efforts à fournir pour les futures

investigations thérapeutiques (Jacquemont et al., 2014; Castagnola et al., 2017; Berry-Kravis et al., 2018). Parmi les conseils les plus vivement recommandés, la connaissance plus approfondie des phénotypes est un point majeur. Outre la description d'un symptôme biologique, il convient de s'intéresser à son âge d'émergence et son évolution au cours du temps. De nouveaux biomarqueurs sont également recherchés, de manière à pouvoir suivre de manière biologique et solide l'effet d'une thérapeutique ciblant un élément en lien direct avec ce biomarqueur (Jacquemont et al., 2014; Berry-Kravis et al., 2018). D'une manière générale, l'accent doit être mis sur les investigations précliniques, apportant des preuves solides d'effets bénéfiques sur un modèle animal, mais aussi des données reproductibles sur différentes espèces (Berry-Kravis et al., 2018). Par conséquent, la connaissance de la pathologie ne doit plus se restreindre uniquement au phénotype d'immaturité neuronale et d'hyperexcitabilité cérébrale, mais doit être approfondie et élargie à d'autres aspects (Berry-Kravis et al., 2018). Ces nouveaux challenges demandent alors une nouvelle approche stratégique tant d'un point de vue scientifique qu'organisationnelle : des initiatives pour lier de manière plus coopérative les instituts académiques, les industries, les associations de patients et des investisseurs, commencent à émerger afin d'émettre des consignes de bonnes pratiques, acquérir une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires mais aussi des effets des thérapeutiques sur différents modèles précliniques de la pathologie (Berry-Kravis et al., 2018).

**Ainsi, les patients atteints du syndrome de l'X fragile ne présentent pas d'anomalie majeure de leur morphologie cérébrale. Les quelques anomalies, localisées à certaines régions très spécifiques, ne sont pas le fruit direct de la pathologie, mais sont les conséquences des anomalies cellulaires qui caractérisent le syndrome de l'X fragile. Cette pathologie n'est pas une pathologie de l'anatomie cérébrale, mais bien une pathologie de la synapse causée par de nombreuses anomalies moléculaires, conséquences de l'absence de la protéine FMRP.**

## Partie 4 : Le phénotype sensoriel du Syndrome de l'X Fragile

Une des originalités du phénotype clinique des patients atteints du syndrome de l'X fragile réside dans la présence d'anomalies sensorielles parmi les symptômes. Le refus du contact tactile, par exemple, très marqué chez 80% des patients dès leur enfance, ou encore le refus du contact visuel, illustre l'inconfort vécu par les patients face aux stimulations sensorielles (Hagerman et al., 1991). **D'une manière générale, l'intégralité des patients atteints du syndrome de l'X fragile montre une sensibilité particulière face aux stimuli sensoriels, qu'ils soient olfactifs, auditifs, visuels ou tactiles** (Miller et al., 1999). Ces anomalies représentent un des piliers de l'expression de la pathologie, puisqu'elles affectent l'intégralité des patients. Certes, chaque patient montre des degrés divers d'altérations pour chaque sens, mais la force phénotypique de ces perturbations, présentes chez tous les patients, souligne toute l'importance des altérations physiologiques, moléculaires et cellulaires à l'origine de ces anomalies. Ainsi, il est surprenant de constater que les traits sensoriels n'ont été que peu étudiés dans cette pathologie, que cela soit chez le patient ou chez le(s) modèle(s) animal(aux) du syndrome de l'X fragile.

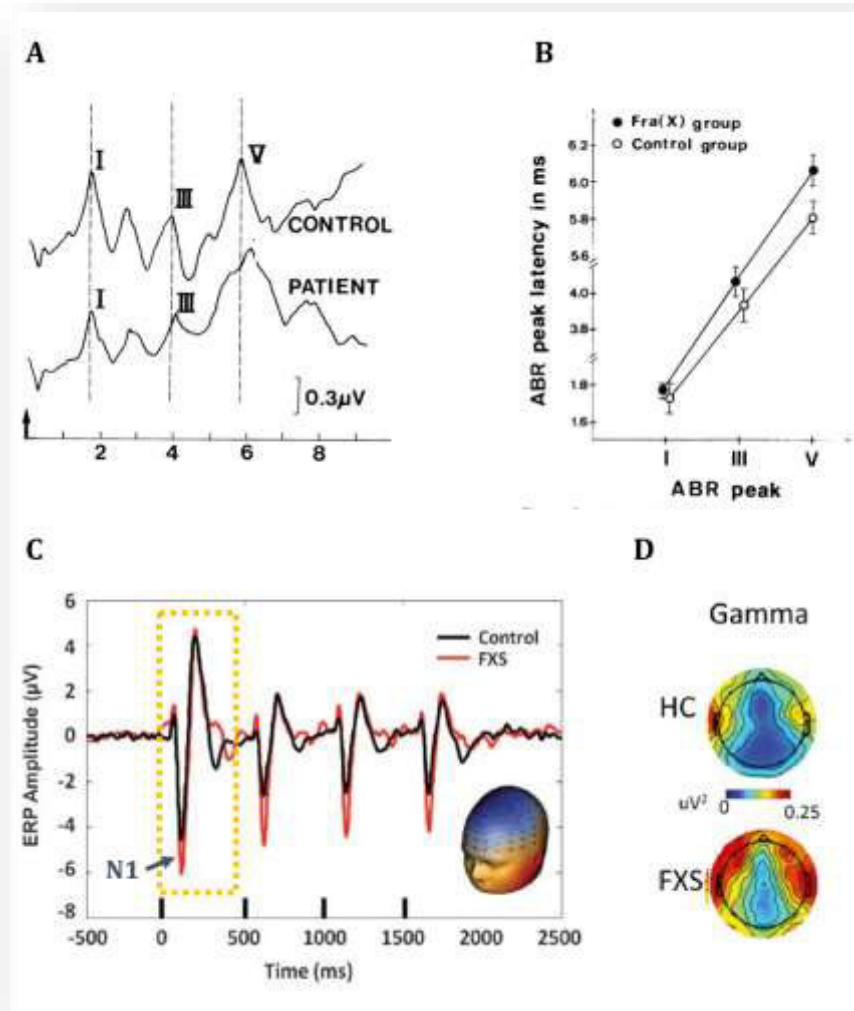
**La volonté réelle d'investiguer les perturbations sensorielles est assez récente.** Concrètement, ce sont les nombreux échecs des essais thérapeutiques qui ont poussé à remettre en question les connaissances sur la pathologie (Berry-Kravis et al., 2018). Les recherches s'étaient jusqu'alors essentiellement concentrées sur la déficience mentale et sur les troubles de type autistique. Les échecs ont montré que le phénotype de la maladie était mal maîtrisé, et donc que les cibles thérapeutiques n'étaient sans doute pas correctement adaptées. Il convenait donc de s'intéresser à un plus grand nombre de symptômes de la pathologie, qui apporteraient de nouveaux éléments de compréhension de la mécanistique du syndrome de l'X fragile. L'hypersensibilité sensorielle étant présente chez l'intégralité des patients, elle devenait alors une cible de choix pour de nouvelles pistes d'investigations du phénotype du syndrome de l'X fragile. De plus, les sens présentent l'avantage de donner accès aux connaissances sur le fonctionnement cérébral tout en utilisant des stimuli extérieurs. Enfin, chaque sens peut apporter des informations complémentaires sur différents types de structures tissulaires, de cellules, de réseaux et d'interactions moléculaires, et leur mode de fonctionnement avec et sans protéine FMRP.

### 4.1 L'audition

Dès les premières descriptions cliniques des patients atteints du syndrome de l'X fragile, les études **fonctionnelles** ont mis le doigt sur une anomalie des signaux auditifs chez ces patients. En premier lieu, la réponse auditive du tronc cérébral (ABR, pour *Auditory Brainstem Response*) enregistrée chez des patients atteints du FXS montre au premier abord un profil normal, avec les ondes I, II, III, IV, et V attendues (Gillberg et al., 1986; Arinami et al., 1988) (Figure 16A). Cependant, la particularité du profil FXS réside dans le progressif retard qui s'installe dans les ondes successives (Gillberg et al., 1986;

Arinami et al., 1988). En effet, la latence de l'onde I n'est pas différente entre les individus sains et les patients, mais une différence commence à apparaître pour l'onde III et devient significativement importante pour l'onde V (Arinami et al., 1988) (Figure 16B). Ce phénomène est dû à un allongement des latences interpics (IPL, en anglais *InterPics Latency*) chez les patients atteints du syndrome de l'X fragile (Arinami et al., 1988). La prolongation de l'IPL I-V est principalement due à un allongement de l'IPL III-V plutôt que de l'IPL I-III (Arinami et al., 1988). Une hypothèse avancée pour expliquer ce phénomène fut la récurrence des otites que les patients subissent de manière précoce (Hagerman et al., 1987; Kidd et al., 2014), qui peut altérer le développement de la partie tronc cérébrale du système auditif (Arinami et al., 1988). Cependant, l'allongement des IPLs est un phénomène observé dans d'autres maladies, telles que le syndrome de Guillain-Barré (Schiff et al., 1985) et la neuropathie héréditaire motrice et sensitive de type I (Satya-Murti et al., 1979). En outre les ondes de l'ABR représentent des activations successives des différentes structures périphériques et centrales de la voie auditive : l'onde I est associée à la cochlée et au nerf auditif, l'onde II au noyau cochléaire, l'onde III au noyau olivaire supérieur, l'onde IV au lemniscus latéral, et l'onde V au colliculus inférieur (Stockard et al., 1979). Ainsi, l'allongement anormal des IPLs indique une conduction retardée dans le système nerveux des patients FXS (Arinami et al., 1988). Ce phénomène est donc un premier indice sur l'anomalie du traitement des signaux auditifs chez les patients atteints du syndrome de l'X fragile. Par la suite, les recherches ont utilisé des techniques de mesure du potentiel évoqué par un événement (ERP, en anglais *Event-Related Potential*), qui permet d'évaluer les processus sensoriels (St Clair et al., 1987; Rojas et al., 2001; Castrén et al., 2003; Van der Molen et al., 2012a, 2012b; Schneider et al., 2013). Les ERP reflètent l'activité d'un ensemble de neurones en réponse à des processus sensorio-cognitifs, et peuvent être enregistrés par un simple EEG réalisé sur le patient lorsque celui-ci est confronté à un stimulus sensoriel. Dans le cas de l'audition, l'enregistrement de l'ERP est réalisé au niveau du cortex auditif. Quelques millisecondes après un simple son, le cortex auditif connaît une fluctuation de son activité électrique, dont les composantes les plus visibles sont une première onde négative, appelée N1, puis d'une onde positive notée P1 et une seconde onde négative notée N2. L'onde N1, apparaissant autour de 140 ms, reflète l'activité cérébrale spontanée des neurones corticaux en réponse à un stimulus sonore. La mise en œuvre d'une telle technique sur les patients atteints du syndrome de l'X fragile confrontés à plusieurs sonorités a révélé une amplitude de l'onde N1 anormalement élevée, ainsi qu'une habituation diminuée lors de la répétition des stimuli sonores (Rojas et al., 2001; Castrén et al., 2003; Van der Molen et al., 2012a, 2012b; Ethridge et al., 2016) (Figure 16C). En outre, des EEG réalisés au niveau du cortex auditif chez les patients FXS au repos révèlent que ceux-ci montrent une onde gamma plus puissante que des individus sains (Ethridge et al., 2017; Wang et al., 2017a) (Figure 16D). L'onde gamma est classiquement associée à l'état de repos qui permet une perception attentive des informations (Herrmann et al., 2016). Ce dernier résultat indique que le cortex sensoriel chez les individus atteints du syndrome de l'X fragile connaît un état au repos constamment « bruyant », phénomène probablement lié à l'excitabilité neuronale augmentée par la pathologie. De telles anomalies des processus régissant le fonctionnement du cortex auditif, qui seraient mis en place dès les premiers stades du développement, pourraient contribuer à des déficits

fonctionnels de degrés supérieurs, notamment les troubles de la communication et le retard de langage observé dans la pathologie (Barnes et al., 2009; Finestack et al., 2009).



**Figure 16 : Résultats issus de la littérature concernant le phénotype sensoriel auditif des patients FXS.**

**(A) ABR enregistrés chez un individu sain (en haut) et un patient FXS (en bas).** La flèche noire indique le moment de l'émission du stimulus auditif. *Adapté de Arimani et al. 1988.*

**(B) Latences des ondes des ABR enregistrés.** Notons l'écart qui se creuse au fur et à mesure des ondes entre les individus sains et les patients FXS. *Adapté de Arimani et al. 1988.*

**(C) ERP enregistrés au niveau du cortex auditif lors de stimuli auditifs répétés.** Les barres noires indiquent la survenue d'un stimulus auditif. L'encadré orange correspond à la réponse à un stimulus. La première réponse est appelée onde N1. Notons l'amplitude de N1 plus élevée chez les individus FXS que chez les individus sains, et la faible diminution de cette amplitude, signe d'habituation, avec la répétition des stimuli. *Adapté de Ethridge et al. 2016.*

**(D) Représentation de la puissance des ondes gamma enregistrées par EEG chez des individus au repos.** Notons la puissance accrue de ces ondes chez les patients FXS. HC : individu sain (en anglais Human Control). *Adapté de Wang et al. 2017.*

Les souris *Fmr1* KO montrent, elles aussi, des **comportements** reflétant des anomalies du traitement des signaux auditifs. En effet, les animaux ont un réflexe de sursaut plus important que les animaux WT lors de l'émission d'un bruit sec de basse intensité (80dB), mais plus faible lorsque ce bruit est de forte intensité (120dB) (Nielsen et al., 2002) (Figure 17A). De plus, les souris *Fmr1* KO sont acoustiquement hypersensibles, et plus enclines aux convulsions auditives, puisque chez ces animaux un stimulus auditif puissant et prolongé (>100 dB) engendre une course désorganisée puis des convulsions tonico-cloniques, qui peuvent mener à la mort de l'animal (Miller et al., 1999; Musumeci et al., 2000, 2007; Chen and Toth, 2001) (Figure 17B). Ceci suggère une excitabilité accrue du système auditif en absence de la protéine FMRP.

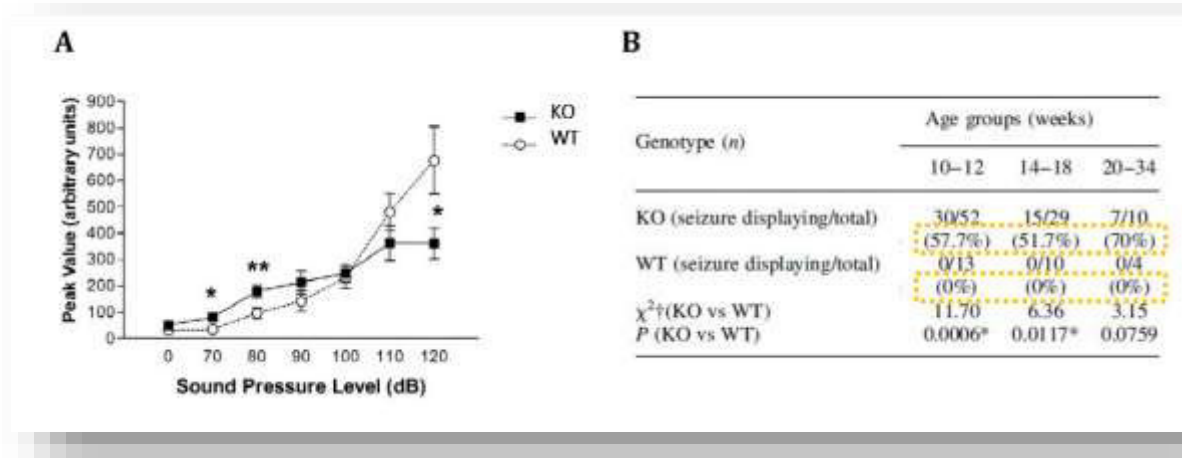


Figure 17 : Résultats issus de la littérature concernant le phénotype sensoriel auditif des souris *Fmr1* KO.

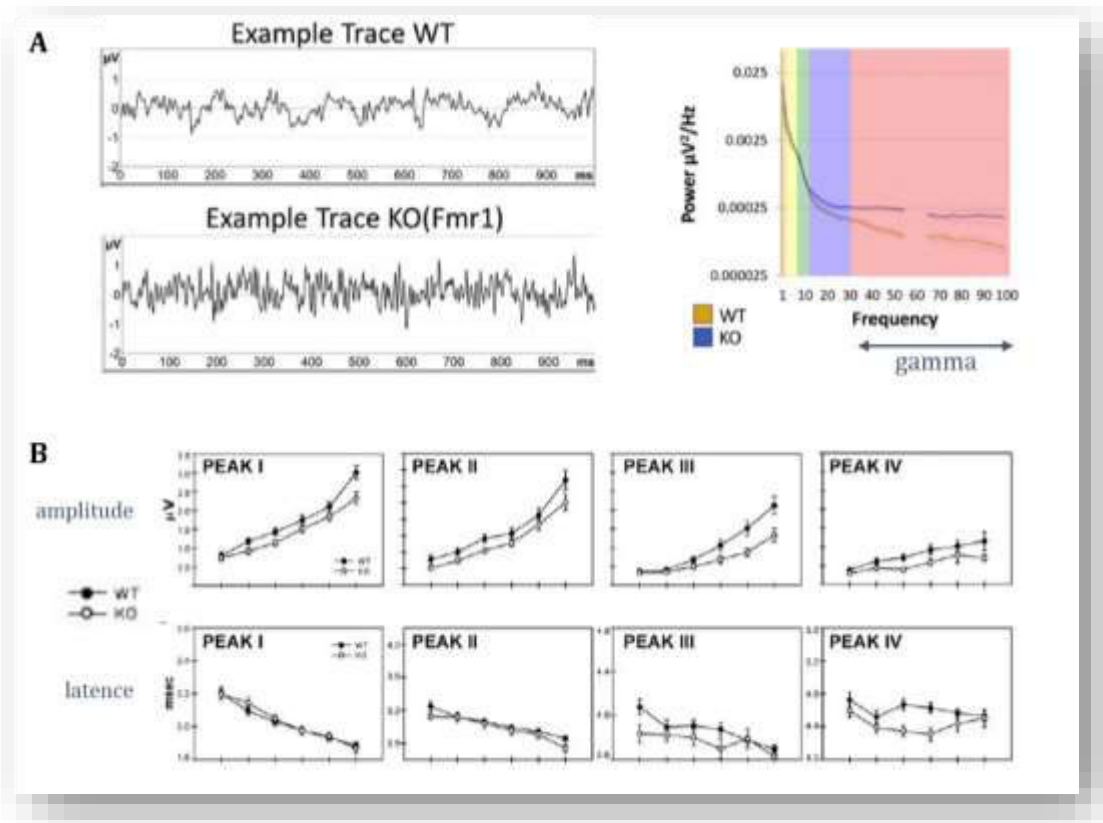
**(A) Réflexe de sursaut en réponse à un stimulus auditif chez les animaux WT (en blanc) et *Fmr1* KO (en noir).** Adapté de Nielsen et al. 2012. Notons l'inversion des supériorités avec l'augmentation du volume auditif du stimulus.

**(B) Comportement épileptique déclenché par de forts stimuli auditifs.** Adapté de Chen et al. 2001. Ici, le stimulus utilisé a une puissance de 115 dB. Test réalisé pendant 60 s. Les pourcentages de souris ayant déclaré une crise d'épilepsie sont encadrés en orange. n : nombre d'individus.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

Ce phénotype peut s'expliquer par les anomalies **électrophysiologiques** précédemment décrites chez le patient et confirmées chez la souris *Fmr1* KO. En effet, des enregistrements d'EEG chez ces souris ont révélé une augmentation de la puissance des ondes gamma en EEG basal (sans stimulation) (Figure 18A), à laquelle viennent s'ajouter des perturbations lors de stimulations auditives, notamment augmentation de l'amplitude de l'onde N1 de l'ERP (Sinclair et al., 2017a, 2017b; Lovelace et al., 2018). L'ensemble de ces anomalies fonctionnelles suggère qu'en absence de protéine FMRP, le cortex auditif est maintenu dans un environnement bruyant même à l'état de repos, et connaît une hypersensibilité lors de stimuli auditifs. Ces résultats sont cohérents avec les enregistrements réalisés chez les patients atteints du syndrome de l'X fragile (Arinami et al., 1988; Rojas et al., 2001; Castrén et al., 2003; Van der

Molen et al., 2012a, 2012b; Ethridge et al., 2016). En revanche, les ABR enregistrées chez la souris *Fmr1* KO ont montré d'autres altérations que celles observées chez le patient FXS. Tout d'abord, les pics I et III montrent une plus faible amplitude que ceux des animaux WT (Rotschafer et al., 2015) (Figure 18B). De plus, ces pics montrent un gain plus faible avec l'augmentation de l'intensité du stimulus auditif (Rotschafer et al., 2015). Ces anomalies des pics I et III suggèrent une anomalie de l'audition provenant des régions périphériques du système auditif mais aussi du tronc cérébral auditif (Rotschafer et al., 2015). Cependant, l'étude menée sur les souris *Fmr1* KO n'a pas montré, dans les conditions expérimentales mises en place ici, d'altérations concernant les latences des différents pics de l'ABR, contrairement à ce qui avait été enregistré chez les patients FXS (Rotschafer et al., 2015) (Figure 18B). Cette absence d'effet sur la latence est attribuée à la taille très réduite de la voie auditive chez la souris ainsi qu'aux différences de traitement des signaux auditifs qui peuvent exister entre l'humain et le rongeur (Rotschafer et al., 2015).



**Figure 18 : Résultats issus de la littérature concernant le phénotype électrophysiologique auditif des souris *Fmr1* KO.**

**(A) Ondes gamma enregistrés chez une souris contrôles (en haut) et une souris *Fmr1* KO (en bas), ainsi que la puissance mesurée (à droite).** Les tracés représentent l'onde gamma enregistrée pendant 1 s. Le graphique de droite représente la puissance des ondes enregistrées au repos chez les souris testées. Les ondes gamma sont celles de haute fréquence, au-delà de 30 Hz. *Adapté de Lovelace et al. 2018.*

**(B) ABR enregistrés chez une souris contrôles (en noir) et une souris *Fmr1* KO (en blanc).** Les données présentées ici représentent les amplitudes (en haut) et les latences (en bas) des ondes principales enregistrées lors d'un ABR. *Adapté de Rotschafer et Razak 2013.*



D'un point de vue **cellulaire**, des enregistrements *in-vivo* réalisés dans le cortex auditif de la souris *Fmr1* KO ont montré que l'hypersensibilité auditive démontrée par les ERP est très probablement due à un traitement anormal des signaux au niveau cortical (Rotschafer and Razak, 2013). Tout d'abord, chaque neurone du cortex auditif de la souris *Fmr1* KO répond individuellement aux sons avec un plus grand nombre de potentiels d'actions que chez la souris WT (Rotschafer and Razak, 2013; Wen et al., 2019). Les neurones émettent donc des potentiels d'action de manière prolongée, bien après la survenue du stimulus auditif. De plus, le champ de réception des fréquences est plus vaste, ce qui signifie que le nombre de neurones activés simultanément pour un seul son est plus grand, dans le cortex des souris *Fmr1* KO (Rotschafer and Razak, 2013). Enfin, le cortex de ces souris montre une habituation réduite à la répétition des sons, illustrée par l'amplitude des réponses répétées qui demeure élevée, alors qu'elle diminue avec les répétitions chez l'animal WT (Rotschafer and Razak, 2013). L'ensemble de ces observations dresse le tableau du fonctionnement du cortex auditif en absence de la protéine FMRP et l'hypersensibilité auditive par un triplet de mécanismes : une augmentation du nombre de neurones répondant à la stimulation auditive, chacun d'entre eux ayant une réponse anormalement élevée et une faible habituation à la répétition des stimuli auditifs (Rotschafer and Razak, 2013). Ces anomalies de traitements des signaux auditifs peuvent être constitutives à l'absence de protéine FMRP, mais être également le résultat d'altérations de la période critique de plasticité, une fenêtre temporelle très importante du développement des structures et fonctions cérébrales connues pour réduire les réponses des réseaux neuronaux face à une expérience sonore. En effet, le cortex auditif des souris *Fmr1* KO connaît une plasticité diminuée lorsqu'exposé à des expériences sonores pendant la période critique (Kim et al., 2013). Ainsi, les aires corticales ne connaissant pas une plasticité correcte face à des expériences sonores, elles impacteront les processus auditifs à l'âge adulte et peuvent expliquer les perturbations observées dans les réponses du cortex auditif du modèle *Fmr1* KO (Rotschafer and Razak, 2013).

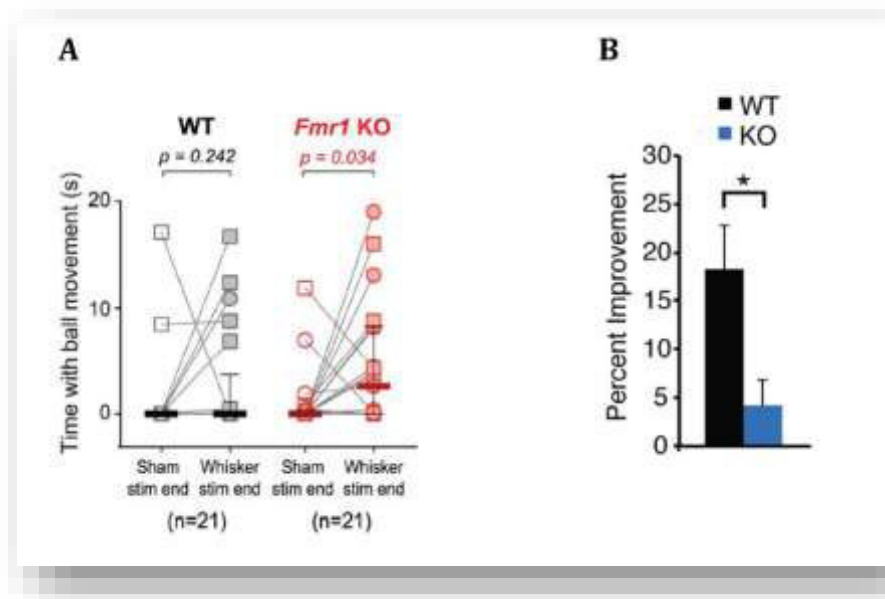
D'un point de vue **moléculaire**, l'origine des anomalies physiologiques semble à chercher du côté de l'activité des canaux ioniques. En effet, comme décrit précédemment, la protéine FMRP interagit avec les canaux Slack et BK, et régule leur activité (Brown et al., 2010; Deng et al., 2013; Ferron, 2016). Le canal Slack est très présent dans le tronc cérébral auditif, et l'absence de régulation de la protéine FMRP pourrait expliquer l'excitabilité accrue de cette région chez la souris *Fmr1* KO (Brown et al., 2010). De plus, il a été démontré que l'habituation au sursaut acoustique est liée à la fonction du canal BK (Zaman et al., 2017). L'augmentation de la réponse de sursaut de la souris *Fmr1* KO pourrait donc être due à l'absence de régulation des canaux BK en absence de la protéine FMRP (Rais et al., 2018). Quoi qu'il en soit, les mécanismes menant à l'augmentation de l'excitabilité des aires cérébrales, tronc comme cortex, en absence de protéine FMRP restent à explorer.

**Ainsi, l'absence de protéine FMRP dans les aires cérébrales du système auditif engendre des troubles fonctionnels, conséquence d'anomalies constitutives mais aussi de perturbations des mécanismes de maturation postnataux.**

Il est intéressant de souligner que les anomalies auditives du syndrome de l’X fragile ont toutes été étudiées au niveau cérébral, et que peu d’études ont analysé l’état structural et fonctionnel de structures plus « perceptives », comme la cochlée, en absence de la protéine FMRP. Cependant, l’étude de l’ABR de la souris *Fmr1* KO a montré que l’intensité du stimulus auditif nécessaire pour déclencher la survenue d’une réponse ABR est plus élevée chez la souris *Fmr1* KO que chez la souris WT (Rotschafer et al., 2015). Cette élévation du seuil de l’ABR traduit une hypo-sensibilité auditive, dans le sens où la souris *Fmr1* KO ne perçoit pas certains stimuli auditifs, pourtant perçus par les souris WT, si ceux-ci ne sont pas suffisamment intenses (Rotschafer et al., 2015). La genèse de l’ABR, *i.e.* le pic I, étant due aux tissus cochléaires, ce résultat suggère que le fonctionnement de la cochlée est altéré en absence de la protéine FMRP (Rotschafer et al., 2015). Une étude s’est alors intéressée aux cellules de la cochlée, et a révélé que les cellules du noyau ventral de la cochlée sont significativement plus petites chez la souris *Fmr1* KO que chez la souris WT (Rotschafer et al., 2015). **Par conséquent, la partie « périphérique » du système auditif est elle aussi affectée par l’absence de la protéine FMRP, ce qui contribue certainement au phénotype sensoriel auditif du syndrome de l’X fragile.**

## 4.2 Le toucher

L’hypersensibilité au toucher est un trouble communément décrit chez les patients atteints du syndrome de l’X fragile, environ 80% d’entre eux montrant des signes cliniques trahissant ce désagrément (Reiss and Freund, 1990; Hagerman et al., 1991; Miller et al., 1999; Baranek et al., 2008). La réponse électrodermale en réponse à des stimuli tactiles est augmentée chez ces patients, ce qui indique une anomalie de la perception et de l’intégration des signaux tactiles chez ces individus (Miller et al., 1999). Elle se traduit dans le **comportement** des patients par un refus, un évitement, du contact tactile et par une réponse aversive à des stimuli tactiles qui paraissent anodins pour tout à chacun, comme le contact d’un textile ou un léger toucher (Cascio, 2010). Ce comportement est également exprimé par la souris *Fmr1* KO, qui montre un fort évitement des stimulations tactiles de ses vibrisses, signe d’une attitude défensive envers le contact tactile (He et al., 2017) (Figure 19A). De plus, les souris *Fmr1* KO montrent un taux d’amélioration de leurs performances lors d’un test d’apprentissage tactile bien plus faible que les animaux WT (Arnett et al., 2014) (Figure 19B).



**Figure 19 : Résultats issus de la littérature concernant le phénotype sensoriel tactile comportemental de la souris *Fmr1* KO.**

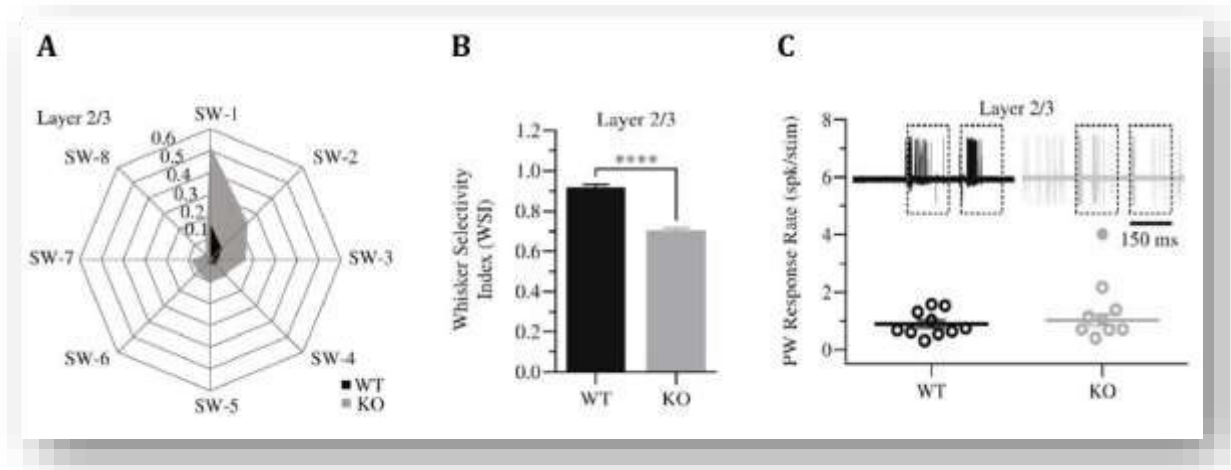
**(A) Mouvement d'évitement en réponse à une stimulation des vibrisses.** Temps passé en mouvements d'évitement au cours du test. « *Sham* » représente un test sans que les vibrisses ne soient touchées (habituation des animaux). « *Whisker stim end* » représente le test avec la stimulation réelle d'une vibrisse. *n* : nombre d'individus. *Adapté de He et al. 2017.*

**(B) Amélioration des performances d'apprentissage tactile.** Résultats exprimés en pourcentage d'amélioration entre les 2 phases du test. *Adapté de Arnett et al. 2014.*

\* $p < 0.05$

Ce phénotype comportemental est l'illustration de perturbations des **processus** traitant l'information tactile. Bien que moins étudiés que l'anomalie auditive, quelques études se sont attachées à décrire les mécanismes somatosensoriels en absence de la protéine FMRP. Des enregistrements *in-vivo* dans le cortex somato-sensoriel de la souris *Fmr1* KO ont montré des anomalies de traitement des signaux tactiles générés par une stimulation des vibrisses de l'animal. Tout d'abord, la zone corticale activée pour un unique stimulus au niveau des vibrisses est plus large que chez les animaux WT (Juczewski et al., 2016). Concrètement, la carte somatosensorielle des couches corticales 2/3 est plus étendue, ce qui induit une augmentation de la propagation de l'excitabilité neuronale au sein de cette structure (Juczewski et al., 2016) (Figure 20A). De plus, le cortex des souris *Fmr1* KO montre une diminution de la sélectivité des vibrisses, ce qui signifie que la sélectivité avec laquelle une seule vibrisse devrait activer une zone bien précise est amoindrie (Juczewski et al., 2016) (Figure 20B). Par conséquent, les animaux sont probablement incapables de discriminer avec précision les stimuli provenant de différentes vibrisses (Juczewski et al., 2016). Enfin, les signaux eux-même sont perturbés au sein de ces couches corticales 2/3, tant dans leur fréquence que dans leur latence d'apparition, ainsi que dans le niveau d'excitation qui perdure entre plusieurs stimuli (Juczewski et al., 2016) (Figure 20C). L'ensemble de ces résultats décrit l'état très altéré des processus de traitement des signaux tactiles au sein du cortex

somatosensoriel en absence de la protéine FMRP. Il convient de souligner que ces résultats ne concernent pas la couche corticale 4, au sein de laquelle les signaux n'ont pas montré de différence entre les souris *Fmr1* KO et les souris WT (Juczewski et al., 2016).



**Figure 20 : Résultats issus de la littérature concernant le phénotype sensoriel tactile fonctionnel de la souris *Fmr1* KO.**

**(A) Réponse enregistrée lors de la stimulation d'une vibrisse.** La réponse est enregistrée au niveau cortical dans la zone correspondant à la vibrisse ciblée et aux vibrisses environnantes. PW : vibrisse principale ; SW : vibrisses environnantes. *Adapté de Juczewski et al. 2016.*

**(B) Indice de sélectivité d'une vibrisse.** Cet indice est calculé ainsi :  $1 - (SW/PW)$ . Il représente la manière dont la stimulation d'une seule vibrisse donne une réponse dans une seule colonne corticale. *Adapté de Juczewski et al. 2016.*

**(C) Exemple de réponse enregistrée dans la couche corticale 2/3 suite aux stimulations d'une vibrisse.** Chaque stimulation commence au niveau du bord gauche des encadrés en pointillés. La réponse représentée ici est celle de la zone principale de la vibrisse stimulée. *Adapté de Juczewski et al. 2016.*

\*\*\*\* $p < 0.0001$

L'étude de **l'électrophysiologie des circuits neuronaux**, réalisée *ex vivo* sur des tissus de cortex somatosensoriels de souris *Fmr1* KO, montre que les principales caractéristiques de ces circuits ne sont pas modifiées en absence de la protéine FMRP (Bureau et al., 2008). En effet, les circuits *Fmr1* KO fonctionnent en suivant des colonnes de neurones entre les différentes couches corticales, et les neurones de la couche L4 reçoivent de fortes excitations de la couche L3 et de faibles entrées provenant de la couche L5, comme observé chez des animaux sauvages (Bureau et al., 2008). L'architecture fonctionnelle d'une colonne de neurones du cortex somatosensoriel n'est donc pas altérée en absence de la protéine FMRP. De même, la force d'une connexion entre une cellule étoilée de la couche L4 et une cellule pyramidale de la couche L3 n'est pas altérée (Bureau et al., 2008). Cependant, la force de la projection entre la couche L4 et la couche L3 est diminuée de 40% dans le cortex des animaux *Fmr1* KO (Bureau et al., 2008). Ceci suggère que parmi les connexions établies entre ces deux couches il y a une plus grande proportion de connexions non fonctionnelles (Bureau et al., 2008).

Les perturbations électrophysiologiques observées en absence de la protéine FMRP peuvent être la conséquence d'anomalies **cellulaires** mises en place au cours du développement embryonnaire. En effet, les anomalies d'immaturation des épines dendritiques, phénotype cellulaire du syndrome de l'X fragile, ont été observées dans le cortex somatosensoriel des souris *Fmr1* KO (Nimchinsky et al., 2001), et les dendrites de neurones de la couche corticale 4 ont été décrites comme n'ayant pas eu un élagage de maturation normal (Galvez et al., 2003). De plus, les axones de la couche L4 du cortex somatosensoriel de la jeune souris *Fmr1* KO sont anormalement diffus dans la couche L2/L3 (Bureau et al., 2008) (Figure 21A). Cette observation confirme le rôle joué par FMRP dans l'élagage et l'orientation axonale dans le néocortex (Bureau et al., 2008). Les anomalies fonctionnelles décrites peuvent également provenir de mécanismes altérés lors de la maturation postnatale des réseaux neuronaux au cours de la période de plasticité, en réponse à des expériences sensorielles. En particulier, l'élargissement du champ réceptif peut être le résultat d'une intégration sensorielle altérée lors de cette fenêtre temporelle. En effet, le développement des connexions intracorticales est une étape clé de la formation des cartes neuronales qui définissent le champ réceptif des signaux tactiles au stade adulte, et elle dépend des expériences sensorielles vécues par le jeune animal (Allen et al., 2003; Bender et al., 2006). Celles-ci permettent une réorganisation des champs réceptifs et des cartes sensorielles, qui auront un impact sur la perception sensorielle tout au long de la vie de l'animal. Or les neurones corticaux des souris *Fmr1* KO montrent des émissions anormalement élevées pendant le développement postnatal, ce qui laisse penser que les réseaux neuronaux sont hyperexcitables pendant la phase critique de plasticité dépendante de l'expérience (Gonçalves et al., 2013). Ceci peut expliquer le caractère diffus et immature des axones des neurones somatosensoriels.

D'un point de vue **moléculaire**, les mécanismes de développement post-nataux du cortex somatosensoriel liés au glutamate sont altérés chez la souris *Fmr1* KO. Premièrement, le développement postnatal précoce des connexions excitatrices entre le thalamus et les neurones de la couche 4 du cortex somatosensoriel est fortement perturbé (Harlow et al., 2010). De plus, le développement des voies de signalisations excitatrices via les récepteurs ionotropiques au glutamate, qui se met en place au cours de la première semaine, est retardée elle aussi (Harlow et al., 2010; Till et al., 2012). A cela s'ajoute un déséquilibre dans le ratio récepteurs NMDA / récepteurs AMPA à la sortie de la période critique (Harlow et al., 2010) (Figure 21B), alors que cette période voit normalement une augmentation des récepteurs AMPA et une réduction des récepteurs NMDA (Crair and Malenka, 1995). Or les récepteurs NMDA jouent un rôle clé dans les mécanismes de plasticité synaptique et de raffinement des circuits sensoriels en lien avec les expériences sensorielles vécues lors de la période de plasticité (Crair and Malenka, 1995). Par conséquent, l'altération des signalisations passant par les récepteurs NMDA affecte très probablement le développement des circuits corticaux pendant la période critique de plasticité. L'ensemble de ces perturbations touchant aux mécanismes de maturation liée à l'expérience du cortex somatosensoriel peut expliquer le défaut d'apprentissage tactile de la souris *Fmr1* KO (Arnett et al., 2014; Juczewski et al., 2016).

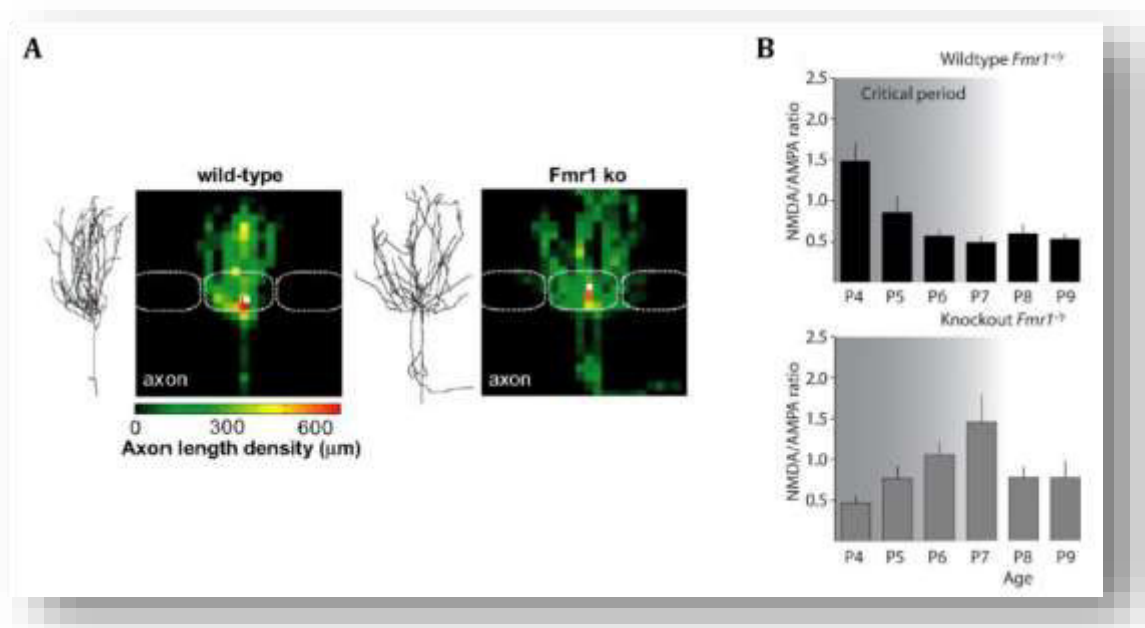


Figure 21 : Résultats issus de la littérature concernant le phénotype sensoriel tactile cellulaire et moléculaire de la souris *Fmr1* KO.

(A) Exemple de morphologie de neurones corticaux de la couche 2/3. Ces images montrent l'arborescence plus diffuse chez la souris *Fmr1* KO. Adapté de Bureau et al. 2008.

(B) Ratio récepteurs NMDA/récepteurs AMPA dans le cortex somatosensoriel lors de la période critique. Adapté de Harlow et al. 2010.

Par extrapolation, la gestion des stimuli douloureux est également perturbée en absence de la protéine FMRP. La souris *Fmr1* KO répond plus faiblement qu'une souris sauvage à un contact après une inflammation locale aigue, indiquant des anomalies dans les processus de perception et d'intégration des informations nerveuses de la douleur (Price et al., 2007; Busquets-Garcia et al., 2013).

Ainsi, de la même manière que pour les anomalies du cortex auditif, les perturbations fonctionnelles du système somatosensoriel observées en absence de la protéine FMRP peuvent être la conséquence d'anomalies constitutives mises en place au cours du développement embryonnaire, mais aussi de mécanismes altérés lors de la maturation postnatale des réseaux neuronaux au cours de la période de plasticité, en réponse à des expériences sensorielles.

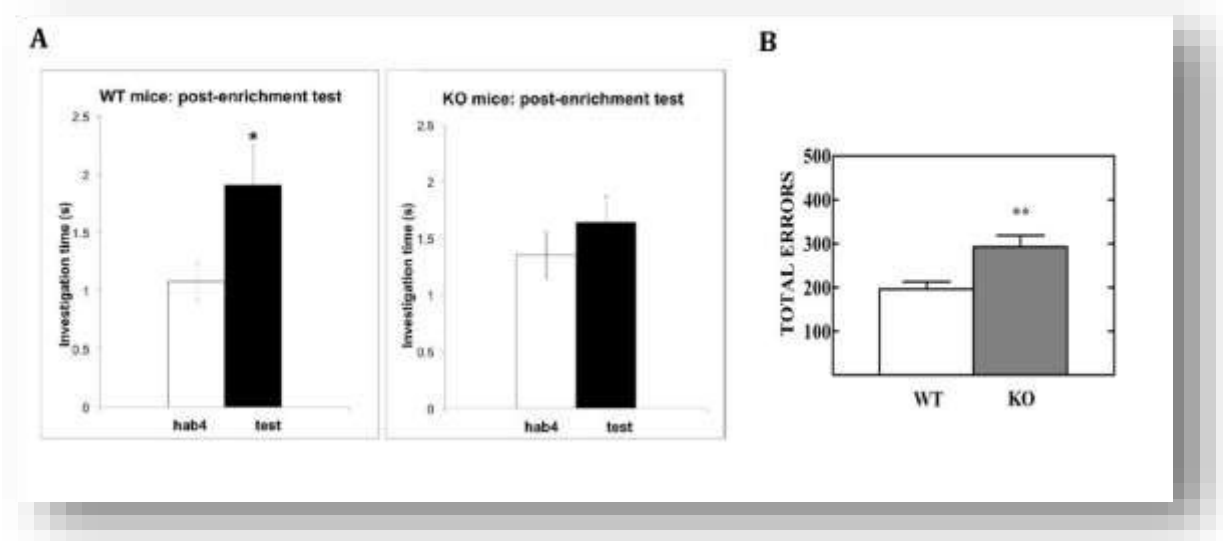
De la même manière que pour l'audition, il semble important de souligner que les anomalies tactiles du syndrome de l'X fragile ont toutes été étudiées au niveau cérébral, mais qu'aucune étude n'a étudié l'état structural et fonctionnel des organes de la perception, comme les jonctions neurodermiques du derme, en absence de la protéine FMRP.

### 4.3 L'olfaction

L'étude de Miller a reporté une réponse électrodermale augmentée chez les patients atteints du syndrome de l'X fragile en réponse à des stimuli olfactifs (Miller et al., 1999). Ainsi, bien que l'olfaction ne soit pas un sens très développé chez l'humain, l'impact de l'absence de FMRP sur le système olfactif a été étudié. En premier lieu car la protéine FMRP est exprimée dans les cellules neuroblastiques olfactives humaines, et son absence a bien été confirmée chez les patients atteints du syndrome de l'X fragile (Abrams et al., 1999). Mais aussi parce que le système olfactif présente des caractéristiques très intéressantes pour l'étude des impacts neurophysiologiques de l'absence de FMRP. En effet, le système olfactif possède une anatomie en couches, avec des circuits neuronaux très organisés, ce qui rend facilement identifiables les circulations d'informations (Murthy, 2011). De plus, le système olfactif du rongeur est la seule région cérébrale, autre que l'hippocampe, montrant de la neurogénèse à l'âge adulte (Gheusi et al., 2013), ce qui permet d'étudier la dynamique de prolifération, de migration, de maturation et de plasticité induite par l'expérience dans le cerveau postnatal. Le système olfactif du modèle murin *Fmr1* KO a donc permis d'étudier plusieurs impacts de l'absence de la protéine FMRP sur un système neurosensoriel.

Chez le rongeur, la protéine FMRP est fortement exprimée dans les régions cérébrales traitant les informations olfactives, des neurones sensoriels de l'épithélium olfactif jusqu'à l'intégralité des neurones des bulbes olfactifs et du cortex olfactif (Hinds et al., 1993; Christie et al., 2009; Akins et al., 2012; Brackett et al., 2013). Cette présence dans l'intégralité des tissus du système olfactif suggère que la protéine joue un rôle aussi bien dans les processus de perception que dans le traitement computationnel au niveau cérébral, tels que la discrimination, l'apprentissage et la mémoire olfactifs. Cette thèse s'est révélée confirmée par les déficits **comportementaux** des souris *Fmr1* KO lors de la réalisation de tâches impliquant leurs capacités olfactives. En effet, ces souris ont montré une diminution de leur sensibilité olfactive, c'est-à-dire une altération de leur capacité à détecter de manière suffisamment précise une odeur de manière à pouvoir la discriminer d'une autre odeur (Schilit Nitenson et al., 2015). A titre d'exemple, les souris sauvages sont capables de discriminer, après habituation, les odeurs du limonène Lim<sup>-</sup> et du limonène Lim<sup>+</sup>, tandis que les souris *Fmr1* KO en sont incapables (Daroles et al., 2016) (Figure 22A). Ainsi la perception même d'un stimulus sensoriel est altérée chez cet animal. De plus, ces souris ont exprimé des difficultés de reconnaissance d'odeurs, révélant une altération tant dans la mémorisation que dans le recrutement des souvenirs ou de la réutilisation du vécu (Larson et al., 2008; Schilit Nitenson et al., 2015) (Figure 22B). Les auteurs de cette étude ont par ailleurs précisé que la plupart des souris *Fmr1* KO parvenait à apprendre la tâche aussi bien que des animaux contrôles, mais elles effectuaient tout de même plus d'erreurs et certaines ne réussirent pas une seule fois la tâche (Larson et al., 2008; Schilit Nitenson et al., 2015). Il est intéressant de noter le parallèle flagrant avec les constatations comportementales déjà évoquées, concernant le phénotype de la souris *Fmr1* KO, capable d'apprendre après un grand nombre de répétitions, mais semblant ne pas être en mesure de recruter des souvenirs et de réutiliser les connaissances pour mener à bien une nouvelle tâche (voir paragraphe sur

le phénotype comportemental du modèle *Fmr1* KO). Ainsi, les processus computationnels de l'information olfactive sont impactés par l'absence de la protéine FMRP.



**Figure 22 : Résultats issus de la littérature concernant le phénotype sensoriel olfactif comportemental de la souris *Fmr1* KO.**

**(A) Temps passé à explorer chaque odeur lors du test de discrimination olfactive du limonène Lim+ et limonène Lim-.** Temps passé à explorer chaque odeur lors de la phase de test, qui suit la phase d'habituation à une des deux odeurs (Lim + ou Lim-). hab4 : odeur utilisée lors de l'habituation ; test : odeur nouvelle utilisée lors du test. *Adapté de Daroles et al. 2016.*

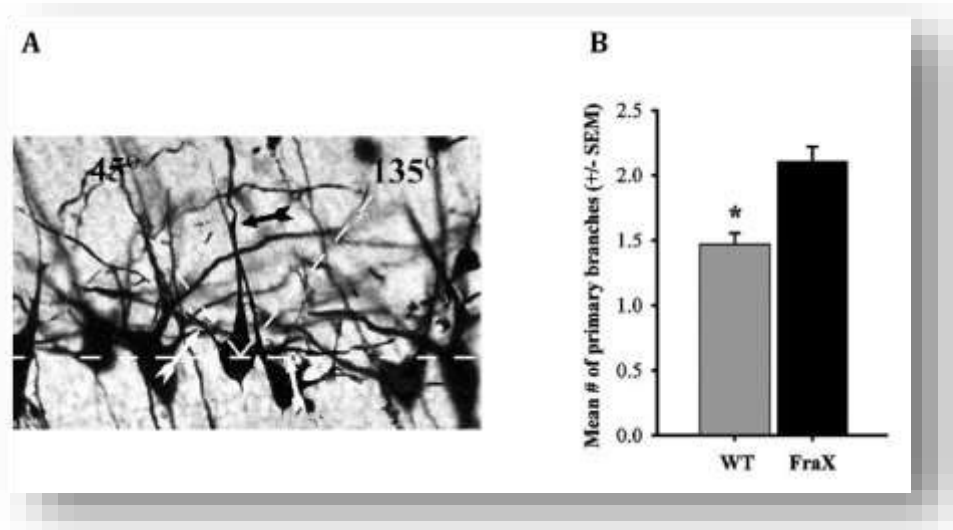
**(B) Diminution de la capacité d'apprentissage olfactive.** Nombre total d'erreurs lors de la phase d'apprentissage du test de discrimination olfactive. Les souris *Fmr1* KO réalisent un plus grand nombre d'erreurs que les souris WT. *Adapté de Larson et al. 2008.*

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

Le rôle exact de la protéine FMRP dans les processus olfactifs reste encore à élucider, mais des éléments indiquant son rôle au niveau **cellulaire** dans la plasticité et l'excitabilité des circuits neuronaux du système olfactif commencent à émerger. En effet, FMRP est exprimée non seulement au niveau post-synaptique mais également dans les terminaux pré-synaptiques sur les axones de neurones sensoriels olfactifs, ce qui suggère qu'elle joue un rôle dans la régulation de traductions post-synaptiques et dans les processus olfactifs liés à une plasticité pré-synaptique (Christie et al., 2009; Akins et al., 2012; Korsak et al., 2017). Par exemple, une anomalie morphologique a été constatée dans les cellules mitrales des souris *Fmr1* KO. En condition physiologique, ces cellules projettent avec une seule dendrite vers un unique glomérule, ce qui permet une transmission, vers les bulbes olfactifs puis vers le cortex olfactif, en colonnes parallèles (Malun and Brunjes, 1996; Murthy, 2011) (Figure 23A). Cependant, les cellules mitrales de souris *Fmr1* KO ont en moyenne 2 dendrites (Galvez et al., 2005) (Figure 23B). Pour l'heure, il n'est pas connu si ces deux dendrites projettent vers le même glomérule, ou vers 2 entités distinctes,



mais cette morphologie aberrante est, dans un cas comme dans l'autre, très probablement à l'origine d'une transmission perturbée des signaux olfactifs (Bodaleo et al., 2019).



**Figure 23 : Résultats issus de la littérature concernant le phénotype sensoriel olfactif cellulaire de la souris *Fmr1* KO.**

**(A) Exemple de morphologie des cellules mitrales des bulbes olfactifs.** La dendrite principale est située dans l'angle entre 45° et 135° (indiquée avec la flèche noire), et les dendrites secondaires sont hors de ce champ d'angle (indiquées avec les flèches blanches). Ici, la cellule est considérée comme ayant une dendrite principale, projetant vers les couches supérieures. *Adapté de Galvez et al. 2005.*

**(B) Nombre de dendrites principales chez les cellules mitrales des animaux WT et *Fmr1* KO (FraX).** *Adapté de Galvez et al. 2005.*

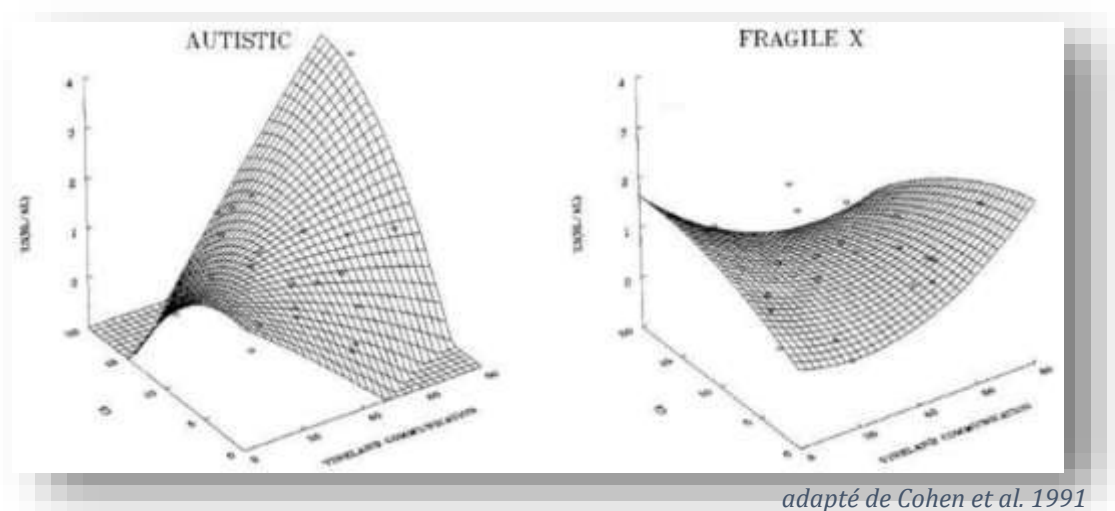
\* $p < 0.05$

Il est intéressant de noter que le système olfactif possède des neurones cérébraux capables de proliférer à l'âge adulte, tels que les cellules granuleuses des bulbes olfactifs issus de la zone sous-ventriculaire (SVZ, en anglais *SubVentricular Zone*) (Gheusi et al., 2013). Ces neurones connaissent eux aussi des phénomènes de plasticité structurelle en réponse à des expériences olfactives, faisant varier leur arborisation dendritique et la morphologie de leurs épines dendritiques (Knafo et al., 2001; Lamprecht and LeDoux, 2004). Ce phénomène n'est pas observé chez les souris *Fmr1* KO, ce qui conduit à un défaut d'apprentissage basé sur l'expérience, et donc une diminution des capacités à discriminer des odeurs. Ces résultats donnent un aperçu des altérations de la plasticité dans la pathologie du Syndrome de l'X Fragile, en particulier dans les régions cérébrales responsables de l'intégration des informations olfactives et de la genèse d'une mémoire olfactive.

**Ainsi, l'absence de protéine FMRP dans les aires périphériques et centrales du système olfactif génère des troubles fonctionnels, conséquences d'anomalies cellulaires constitutives mais également de mécanismes de maturation postnataux altérés.**

## 4.4 La vision

Très tôt dans la description clinique des troubles **comportementaux** caractérisant le syndrome de l’X fragile les praticiens ont noté la pauvreté du contact visuel des patients. L’évitement du regard est noté chez environ 90% des patients (Cohen et al., 1989), et, bien que la pauvreté du contact visuel soit un trait majeur du comportement autistique, ce phénotype n’est pas exclusivement réservé aux patients atteints du syndrome de l’X fragile diagnostiqués autistes (Cohen et al., 1988). L’évitement du regard est présent chez la plupart des patients, bien qu’ils ne soient pas tous autistes. D’ailleurs, des études ont montré par la suite que les mécanismes responsables de la pauvreté du contact visuel sont probablement différents entre les individus autistes et les patients FXS (Cohen et al., 1991) (Figure 24). De la même manière, les patients atteints du syndrome de l’X fragile montrent des capacités diminuées face à des tâches neuropsychologiques évaluant leurs fonctions visuo-motrices. En effet, des dysfonctions visuo-motrices ont été décrites lors de tests de dessin, d’utilisation de blocs de construction pour reproduire des formes abstraites et nécessitant de la coordination psychomotrice (Crowe and Hay, 1990; Freund and Reiss, 1991; Cornish et al., 1999). Certes, ces tâches font appel à de nombreuses compétences, mais la composante visuo-motrice est un facteur commun à toutes (Rais et al., 2018). L’ensemble de ces observations a incité les études à se pencher sur des déficits dans les compétences visuelles des patients atteints du syndrome de l’X fragile.

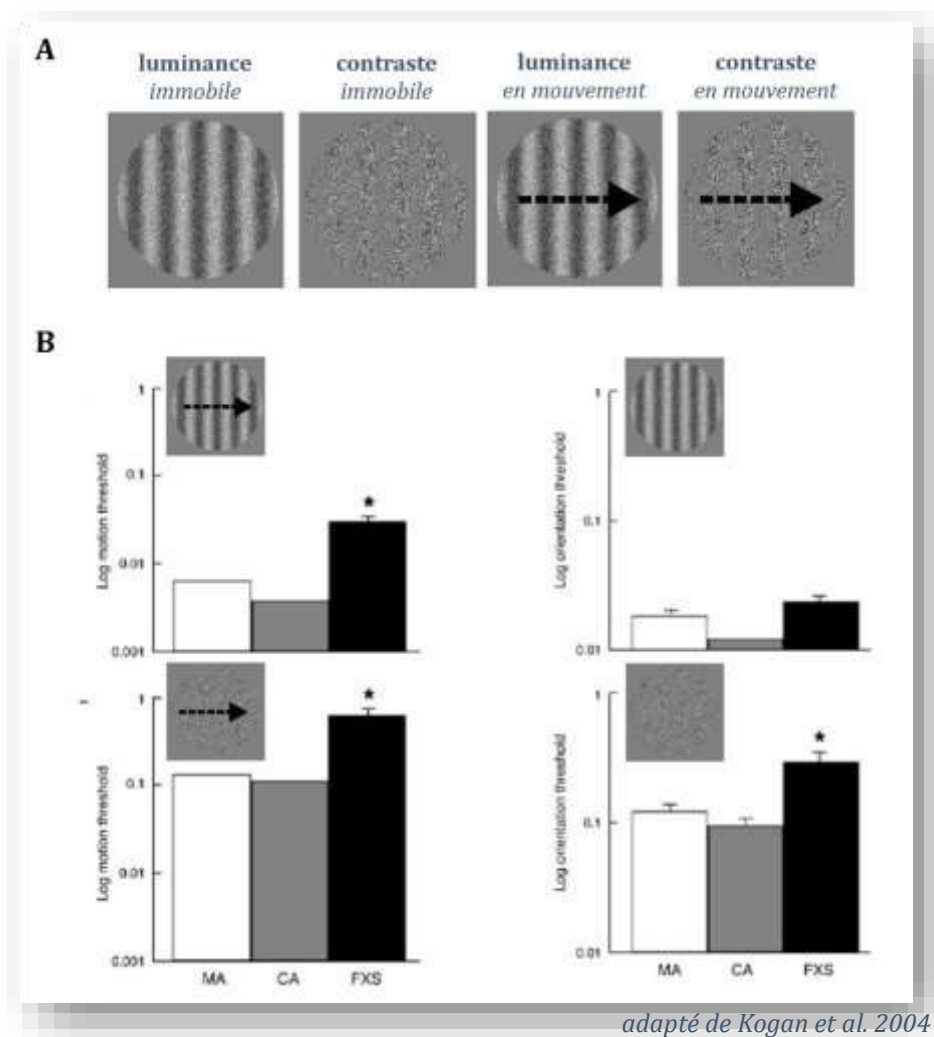


**Figure 24 : Courbes en trois dimensions représentant le comportement de contact visuel social d’enfants autistes (à gauche) et d’enfants FXS (à droite).**

La courbe représente le contact visuel effectué par l’enfant en réponse à un regard « social » prolongé initié par les parents. L’unité est propre aux auteurs, et prend en compte l’apparition du regard de l’enfant dans la succession chronologique des regards échangés et stoppés. Un score « Z » élevé signifie une réponse au contact visuel plus importante. Le contact visuel social est représenté en fonction de l’âge de l’enfant (noté CA) et de son score d’autisme évalué avec l’échelle Vineland.

Notons la différence de profil entre les enfants autistes et FXS, l’évolution avec l’âge et le score de comportement autistique qui ne suit pas la même dynamique. Notons que pour les enfants FXS, le comportement de contact visuel reste stable quel que soit le score « d’autisme » et l’âge. La pauvreté du contact visuel chez ces enfants n’est pas liée au caractère autistique de la pathologie.

Ainsi, quelques études ont accumulé des preuves indiquant que les patients atteints du syndrome de l'X fragile connaissent des difficultés dans le **traitement des informations visuelles**. En particulier, la gestion des processus spatio-temporels visuels, c'est-à-dire la gestion des informations qui changent d'emplacement au cours du temps, s'est révélée fortement altérée. En effet, des patients adultes n'ont pas montré d'anomalie dans leur sensibilité de perception face à des stimuli statiques présentant des différences de luminance, mais ces mêmes patients ont montré une diminution de leur sensibilité à la perception de stimuli caractérisés par des différences de texture, que ces stimuli soient en mouvement ou immobiles (Kogan et al., 2004a) (Figures 25 A et B). Les auteurs soulignent que la moitié des individus FXS testés n'a pas réussi à percevoir la direction du mouvement (Kogan et al., 2004a). De plus, ces patients adultes montrent une diminution de la sensibilité au contraste pour des stimuli visuels mouvants présentés à basse fréquence temporelle, ce qui a été confirmé par une autre étude (Kogan et al., 2004a, 2004b) (Figures 25 A et B). Ces résultats laissent donc suggérer que les patients atteints du syndrome de l'X fragile connaissent un déficit dans leur compréhension des informations dynamiques (Kogan et al., 2004b). A la suite de ces observations, des investigations similaires ont été réalisées chez des enfants et très jeunes enfants atteints du syndrome de l'X fragile, et ont révélé des résultats similaires (Farzin et al., 2008). Ces enfants ont montré une nette réduction de leur sensibilité à la détection de stimuli visuels dynamiques définis par leur texture, et sont capables de détecter des stimuli fixes définis par leur luminance (Farzin et al., 2008). De plus, ces enfants ont montré un déficit spécifique dans le traitement des informations dynamiques de par leur incapacité à maintenir une image mentale d'un objet dissimulé pendant une modification spatio-temporelle, et de le suivre pendant ce déplacement, alors qu'ils en sont capables quand l'objet est simplement dissimulé sans être déplacé (Farzin et al., 2011). **Pour résumer, les patients atteints du Syndrome de l'X Fragile montrent, dès leur plus jeune âge et jusqu'à l'âge adulte, des difficultés dans la compréhension des textures, des contrastes et des mouvements. Ces difficultés sont associées à une diminution de leur compétence, voire une incapacité, à gérer les modifications spatio-temporelles de stimuli dynamiques.**



adapté de Kogan et al. 2004

Figure 25 : Résultats issus de la littérature concernant le phénotype sensoriel visuel comportemental des patients FXS.

(A) Représentation des stimuli utilisés pour tester l'impact de la luminance et des contrastes des stimuli immobiles et en mouvement.

(B) Résultats des participants face aux différents stimuli visuels des patients FXS (en noir) et des individus sains d'âge équivalent (en gris) et de développement équivalent (en blanc). Les résultats sont exprimés en termes de seuil de détection du stimulus. CA : individus contrôles d'âge équivalent ; MA : individus contrôles de développement équivalent.

\* $p < 0.05$ .

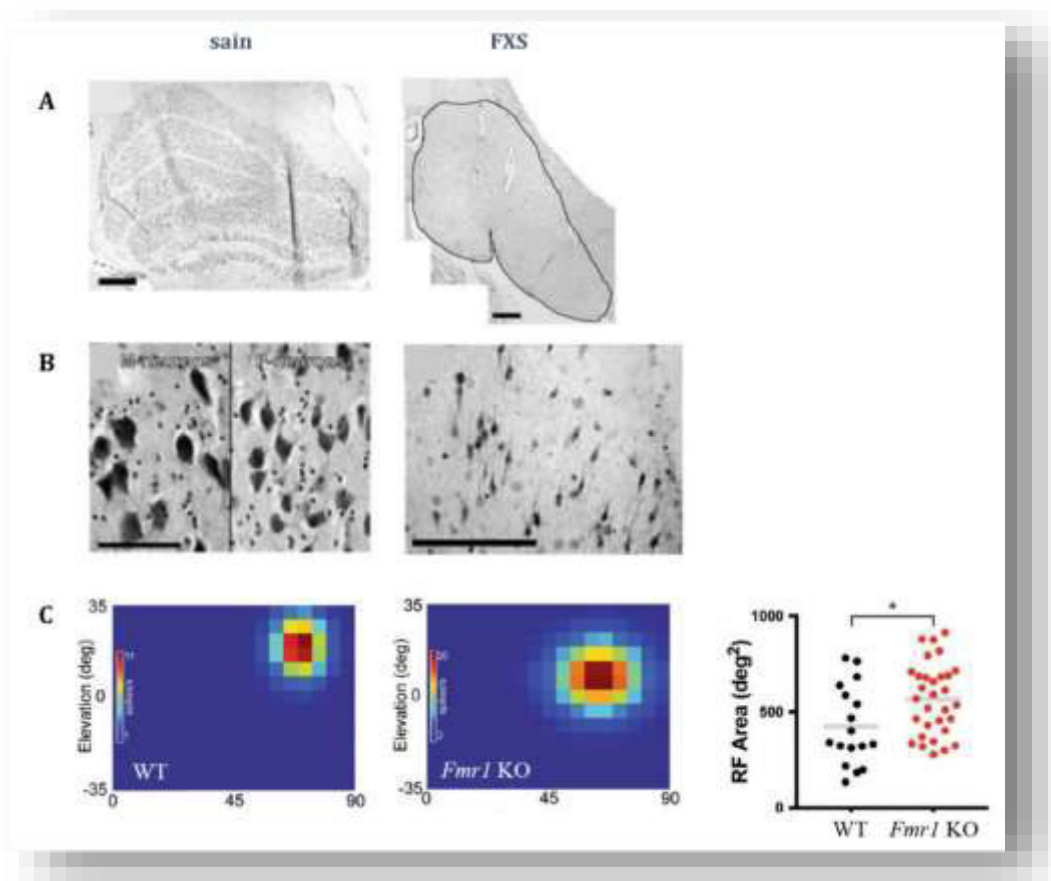
Cependant, ces anomalies de sensibilité visuelle ont été attribuées, la plupart du temps, à des déficits d'attention des patients investigués (Farzin et al., 2011). En effet, ceux-ci présentent des anomalies d'attention visuelle cohérentes avec les troubles de l'inhibition et du contrôle montrés par les patients, enfants comme adultes (Scerif et al., 2004, 2007). Les études plus poussées ont montré que la résolution visuelle spatiale des jeunes patients est normale, indiquant ainsi que l'attention ne se limite pas à une zone plus restreinte du champ de vision (Farzin et al., 2011). En revanche, ces mêmes patients se sont

révélés avoir une résolution temporelle plus basse que des enfants au développement typique (Farzin et al., 2011). La résolution temporelle est définie comme l'intervalle de temps minimum nécessaire pour que le système visuel soit capable de ségréger des informations. Ainsi les enfants atteints du syndrome de l'X fragile ont un taux de discrimination plus faible que des enfants au développement normal : les phases visuelles doivent être plus longues pour que leurs informations soient discriminées (Farzin et al., 2011). L'étude estime que la fréquence temporelle limite nécessaire à l'individualisation des informations des enfants atteints du syndrome de l'X fragile est moitié moins élevée que celles d'enfants du même âge au développement typique (Farzin et al., 2011).

Contrairement aux autres systèmes sensoriels décrits précédemment, aucune investigation **fonctionnelle** n'a été menée sur les aires cérébrales du système visuel en absence de protéine FMRP. La seule étude fonctionnelle concernant les capacités visuelles des patients FXS est une analyse par IRM fonctionnelle de la fonction cérébrale des patients face à des regards fixes ou fuyants, de face ou de profil (Garrett et al., 2004). Celle-ci indique des anomalies d'activation des zones typiquement activées lors de contacts visuels (Garrett et al., 2004). Ces résultats suggèrent que l'évitement du regard des individus atteints du syndrome de l'X fragile est associé à une diminution de leur capacité de perception du regard et de l'orientation du visage qui leur fait face (Garrett et al., 2004). Le modèle *Fmr1* KO n'a, lui, pas été investigué sur ses aspects fonctionnels liés à la vision.

Au niveau **cellulaire**, le cortex visuel des patients FXS comme des souris *Fmr1* KO est sujet au phénotype d'immaturation neuronale, décrit précédemment, caractérisé par des épines dendritiques plus nombreuses et plus fréquemment d'aspect immature (Irwin et al., 2000; Greenough et al., 2001). Cependant, il est connu que les stimuli visuels à haute fréquence temporelle engagent la voie magnocellulaire du système visuel (Kogan et al., 2004b). Cette voie commence avec les cellules ganglionnaires de la rétine qui projettent vers la couche magnocellulaire du noyau latéral géniculé, et se termine dans le cortex visuel primaire (Merigan and Maunsell, 1993). Par conséquent, les troubles de la perception des stimuli à haute fréquence temporelle observés chez les patients ont orienté une équipe de recherche vers l'étude de cette voie en conditions FXS. Il a ainsi été confirmé que le noyau latéral géniculé des patients FXS a une structure altérée, alaminaire, et que les neurones de la couche magnocellulaire du noyau géniculé sont anormalement petits (Kogan et al., 2004b) (Figure 26A et B). Ceci suggère que cette région cérébrale subcorticale est particulièrement sensible à l'absence de la protéine FMRP. Plus récemment, une étude a mis en évidence pour la première fois des troubles dans une autre région subcorticale du système visuel : le colliculus supérieur. Cette structure possède des neurones responsables des mouvements des yeux selon les cibles visuelles. Chez la souris *Fmr1* KO, ces neurones montrent un champ de réception anormalement grand, associé à une diminution dans la sélectivité directionnelle (Kay et al., 2018). De plus, le colliculus reçoit des influx de la première couche corticale afin de régir les mouvements oculaires. Chez la souris *Fmr1* KO, la zone de terminaison nerveuse impactée par ces influx, qui réceptionne donc les informations provenant du cortex visuel, est plus large que celle des animaux sauvages (Kay et al., 2018) (Figure 26C). Ainsi, les influx reçus par le colliculus de la part du cortex visuel sont dérégulés en absence de la protéine FMRP (Kay et al., 2018). Ces premiers

résultats indiquent donc que la protéine FMRP joue un rôle dans l'établissement de circuits visuels, son absence induisant des anomalies dans l'intégration d'influx nerveux générés par une expérience visuelle. **Connaissant le rôle du colliculus et de la couche magnocellulaire du noyau latéral géniculé dans les processus visuels dynamiques, il est probable qu'une partie des troubles visuels décrits chez les patients atteints du syndrome de l'X fragile soit causée par ces anomalies subcorticales, qui s'ajoutent aux anomalies neuronales du cortex visuel.**



**Figure 26 : Etude structurale et cellulaire des aires subcorticales visuelles chez un individu sain (à gauche) et un patient FXS (à droite).**

**(A) Structure histologique chez un individu sain et un patient FXS.** Barres d'échelle : 1000µm. *Adapté de Kogan et al. 2004.*

**(B) Neurones du noyau latéral géniculé chez un individu sain et un patient FXS.** Barres d'échelle : 100µm. *Adapté de Kogan et al. 2004.*

**(C) Zone du colliculus supérieur réceptionnant les influx du cortex visuel.** Enregistrement du signal reçu dans le colliculus après un stimulus lumineux chez une souris contrôle (WT, à gauche) et une souris *Fmr1* KO (au milieu). Quantification de l'aire de réception (à droite). *Adapté de Kay et al. 2018.*

\* $p < 0.05$

De même que pour les autres sens, l'absence de protéine FMRP impacte non seulement le développement des régions corticales, mais aussi les mécanismes de plasticité cérébrale. Les mécanismes post-nataux de plasticité du cortex visuel sont altérés en absence de la protéine FMRP. L'étude des

phénomènes de plasticité du cortex visuel se réalise classiquement avec une expérience de privation monoculaire. Concrètement, un des deux yeux de l'animal est occulté pendant une période définie, et les modifications des circuits neuronaux, conséquences de cette privation d'informations sensorielles par un œil, sont observées. Au cours de la période de plasticité cérébrale, les zones corticales associées à l'œil fermé connaissent une dépression tandis que les régions associées à l'œil ouvert gagnent en maturité (Frenkel and Bear, 2004). Chez la souris *Fmr1* KO, la privation monoculaire induit une forte dépression des zones corticales associées à l'œil maintenu fermé et une forte potentialisation des zones corticales associées à l'œil encore ouvert (Dolen et al., 2007). Les modifications observées sont les mêmes que celles obtenues chez un animal contrôle, mais elles sont clairement exacerbées chez la souris *Fmr1* KO. Les auteurs de l'étude estiment que la plasticité obtenue chez l'animal KO en 3 jours est comparable à celle obtenue chez un animal contrôle avec une privation monoculaire plus longue, de l'ordre de 7 jours (Dolen et al., 2007). **Cette hyperplasticité confirme le rôle de la protéine FMRP dans la régulation de la plasticité neuronale.**

Il est très surprenant de constater un si grand décalage entre la quantité d'informations sur les déficits visuels des patients et le nombre très réduit d'études portant sur les anomalies du système visuel en cas d'absence de la protéine FMRP, chez le patient et à plus forte raison chez la souris. Les troubles visuels ont été, comme décrit précédemment, longtemps attribués à un déficit d'attention de la part des patients. Certes, ce déficit est réel, et est un symptôme de la pathologie. Mais il est curieux que **la majorité des études portant sur l'origine des anomalies visuelles se soit limitée à une explication psychologique et comportementale, sans réellement poser le problème en termes de pur trouble neurosensoriel de la sphère visuelle. Très peu d'études se sont penchées sur les aspects moléculaires, les perturbations cellulaires et fonctionnelles du système visuel en absence de protéine FMRP. De plus, la quasi-totalité des études portant sur la pathophysiologie du syndrome de l'X fragile sur le système visuel ont porté sur les aires cérébrales (en particulier le cortex visuel).**

Le système gustatif n'a pas été étudié, pour l'heure, que cela soit chez le patient FXS ou chez le modèle murine *Fmr1* KO.

**D'une manière générale, les sens se sont révélés perturbés chez les patients atteints du syndrome de l'X fragile, mais les causes de ces perturbations n'ont été explorées que de manière parcellaire. Aucun sens n'a bénéficié d'une totale investigation moléculaire, cellulaire et fonctionnelle (Figure 27).**

**Pourtant, les perturbations sensorielles semblent jouer un rôle important dans les comportements décrits chez les patients. Le refus du contact tactile et la fuite du regard, notamment, sont des preuves que les altérations sensorielles participent de manière non négligeable aux phénotypes de la pathologie. De plus, les recherches sur les anomalies des systèmes sensoriels causées par l'absence de FMRP se sont la plupart du temps concentrées sur les aires centrales de ces systèmes sensoriels. Les études des tissus sensoriels « périphériques »,**

dans le sens où ils sont localisés en dehors du cerveau, ne sont que trop rares. Or, si ces tissus sont « périphériques », ils sont loin d'être accessoires car ils constituent le premier récepteur et le premier analyste des informations sensorielles. En particulier, l'étude des anomalies visuelles en conditions FXS a totalement négligé le tissu pourtant absolument nécessaire à la perception des informations lumineuses : la rétine.

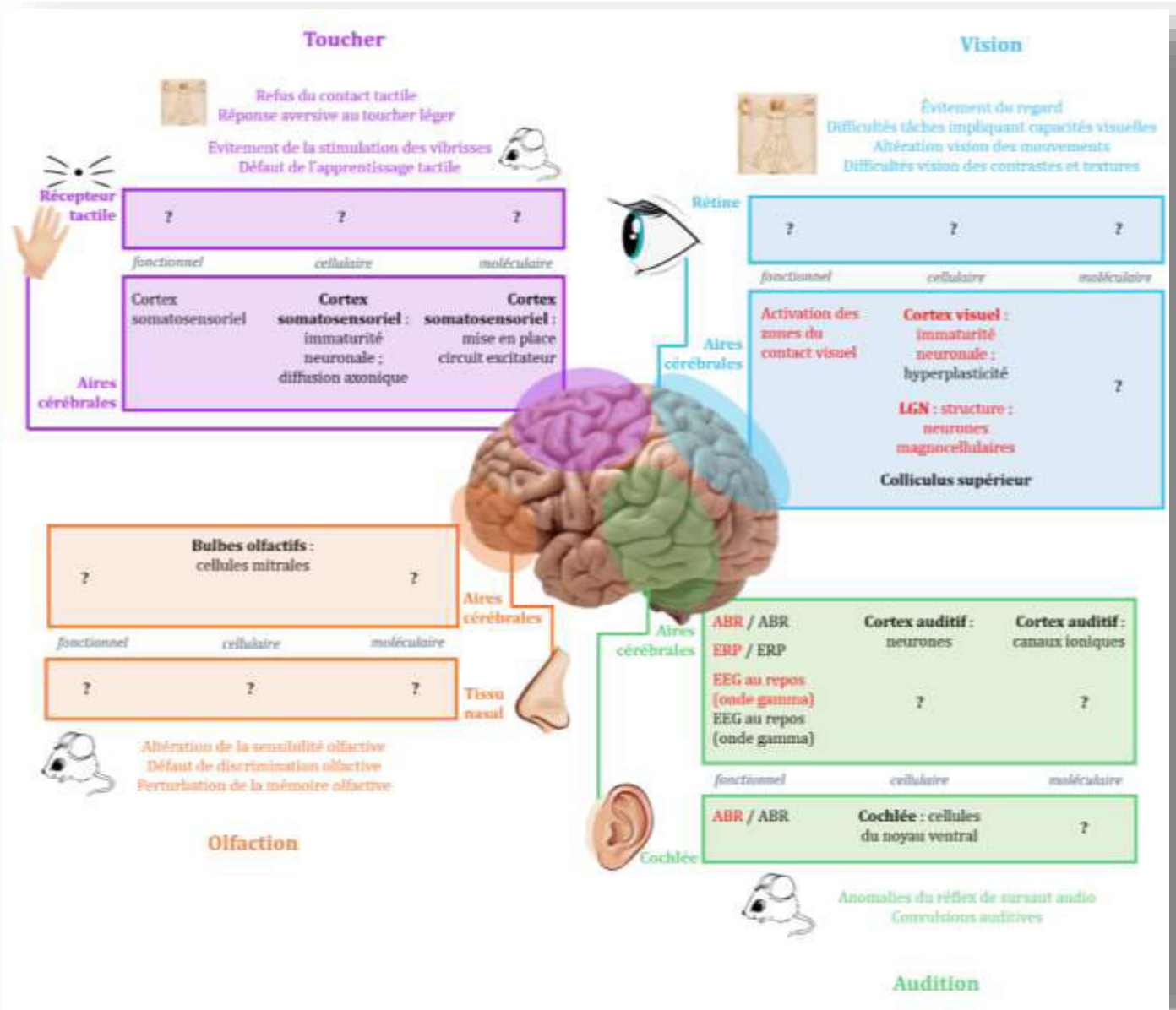


Figure 27 : Bilan des connaissances relatives au phénotype sensoriel du syndrome de l'X fragile.

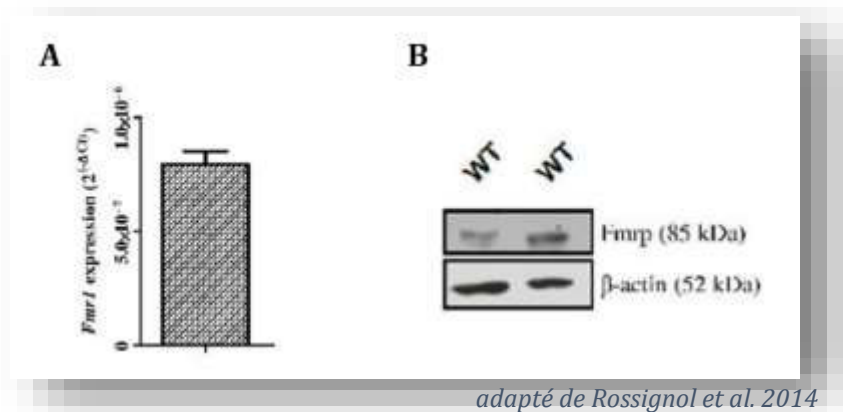
Les anomalies phénotypiques comportementales sont mentionnées pour chaque sens, en précisant si leur observation a été notée chez le patient FXS ou chez le modèle murin (annotations par illustrations). Pour chaque sens, les connaissances sont organisées selon leur relation avec les aires cérébrales ou avec les tissus « périphériques » (au sens anatomique du terme) du système sensoriel concerné. De plus, elles sont répertoriées selon l'échelle d'étude : fonctionnelle, cellulaire ou moléculaire. Les anomalies connues par l'étude de patients FXS sont notées en rouge, et les anomalies connues par l'étude du modèle *Fmr1* KO sont notées en noir. Notons l'absence totale de connaissance sur le système gustatif. Cette représentation ne mentionne pas les résultats obtenus dans notre laboratoire (à partir de 2014).



## Partie 5 : Le système visuel et la protéine FMRP

Comme dit précédemment, les altérations visuelles montrées par les patients atteints du syndrome de l'X fragile ont été attribuées aux anomalies cellulaires cérébrales connues dans cette pathologie. En particulier, l'immaturation des épines dendritiques constatées dans le cortex visuel des patients humains puis chez le modèle *Fmr1* KO, mais également les altérations neuronales dans le corps genouillé latéral des patients qui ont été considérées comme étant l'origine de ces troubles visuels (Irwin et al., 2000; Greenough et al., 2001; Kogan et al., 2004b). L'absence de FMRP concoure, certes, à des altérations des structures visuelles cérébrales. Mais jamais, alors, il n'a été envisagé que la structure « en amont » du cerveau, responsable de la perception des informations lumineuses, le premier maillon du processus de vision, puisse connaître elle aussi des altérations dans ces conditions. En effet, la rétine est le premier tissu neuro-sensoriel de la chaîne visuelle, sans quoi l'information visuelle qui arrive aux aires visuelles cérébrales n'existe pas. Cette structure partage la même origine embryonnaire que les aires cérébrales, et il a été montré que, en conditions physiologiques, le gène *Fmr1* s'exprime dans les tissus embryonnaires qui deviendront la rétine de l'individu (Abitbol et al., 1993). Ainsi, il semble cohérent de penser que la rétine exprime elle aussi la protéine FMRP, au cours du développement puis au cours de la vie de l'individu.

**Ce n'est que très récemment que la présence éventuelle de la protéine FMRP dans la rétine a été investiguée. C'est en 2014 que l'expression de la protéine FMRP a été démontrée pour la première fois dans la rétine de la souris** (Rossignol et al., 2014) (Figure 28).



**Figure 28 : Mise en évidence de (A) transcrits du gène *Fmr1* et (B) de la protéine FMRP dans la rétine de la souris.**

Expression significative des ARNm *Fmr1* dans la rétine des souris, quantifiée par technique de PCR quantitative en temps réel. Résultat exprimé en  $2^{-\Delta C_t}$ , normalisé par rapport à l'expression de l'ARN 18S (contrôle interne). Expression de la protéine FMRP dans la rétine entière de souris, attestée par technique de western blot. B-actine est la protéine de référence.

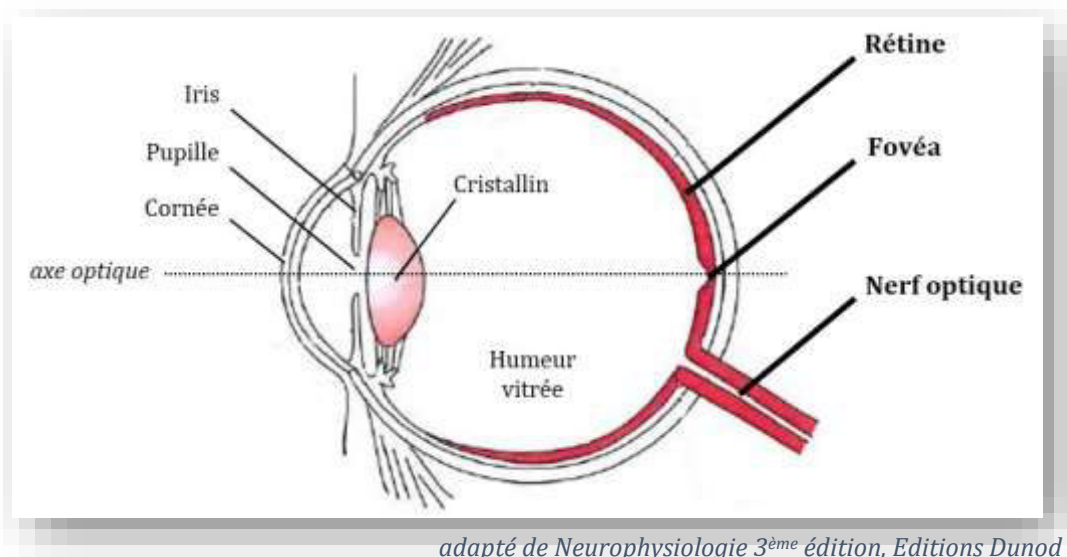
Par la suite, cette expression rétinienne a été confirmée chez la souris, ainsi que chez le poulet (Guimarães-Souza et al., 2016) ainsi que dans les rétines des ommatidies de la drosophile (Wang et al., 2017b). **Par conséquent, les individus privés de l'expression de FMRP connaissent très certainement des altérations visuelles « périphériques », dans le sens où ces anomalies sont localisées hors du cerveau, en amont dans la chaîne du processus visuel. La rétine privée de FMRP devient alors un nouveau sujet d'étude, tant cette structure « périphérique » joue un rôle « central » dans le système visuel.**

## 5.1 La rétine, un tissu « périphérique » jouant un rôle central

**La rétine est le tissu neurosensoriel du système visuel.** Tissu neuronal très fin, elle tapisse la surface du globe postérieur de l'œil, et a pour rôle capital de capter les informations lumineuses et de les transmettre aux composantes cérébrales du système visuel sous forme d'influx électriques.

### 5.1.1 La rétine au sein de l'œil

La rétine tapisse la face interne du globe oculaire. Sa structure, hétérogène, est composée de plusieurs couches de cellules nerveuses. Son organisation est telle que les rayons lumineux doivent d'abord traverser les neurones d'intégration avant d'atteindre les cellules réceptrices. On parle alors de **rétine inversée**. La rétine tapisse de manière relativement homogène l'intégralité de la face postérieure du globe oculaire, mais il faut noter une particularité macroscopique très localisée dans la rétine de l'homme. Au niveau de l'axe optique de l'œil, l'épaisseur de la rétine connaît une légère dépression : c'est la fovéa, ou macula (Figure 29). A l'échelle microscopique, cette zone correspond à un écartement des neurones d'intégration vers la périphérie de l'axe optique, ce qui permet aux rayons lumineux d'atteindre directement les cellules réceptrices sans devoir traverser plusieurs couches neuronales. Cette particularité permet de minimiser la diffraction et d'améliorer la qualité de l'image formée en ce point de la rétine. Au niveau de la fovéa, seuls des photorécepteurs de type cônes sont présents. Notons que la rétine de la souris ne possède pas de fovéa. Enfin, chaque œil possède un point aveugle dans son champ de vision. Dans cette région, excentrée d'environ 10° de l'axe optique et large d'environ 10°, la rétine ne peut fournir d'information visuelle à cause de l'absence de cellules réceptrices.



**Figure 29 : Représentation schématique d'un œil humain (vue en coupe sagittale).**

En rouge, la rétine qui tapisse le fond du globe oculaire et qui se prolonge via dans le nerf optique via les fibres nerveuses de ses neurones les plus internes. La fovéa, dépression dans l'épaisseur rétinienne, est traversée par l'axe optique.

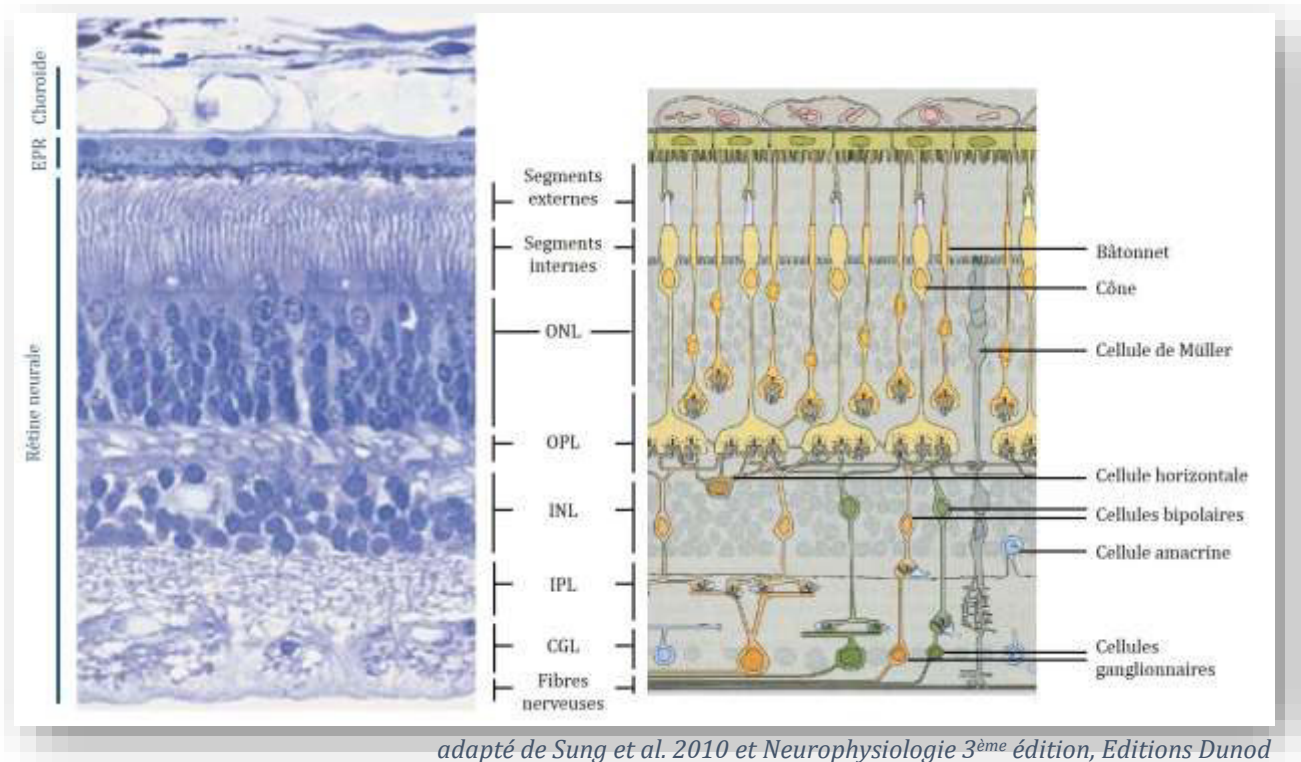
### 5.1.2 L'architecture du tissu rétinien

**La rétine est composée de 2 feuillets : l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) constitue un feuillet interne, et la rétine neurale constitue un feuillet externe.** L'EPR est une monocouche cellulaire. En revanche, la rétine neurale se décompose en couches cellulaires bien distinctes. Cette organisation permet la séparation des corps cellulaires, et des processus qui leurs sont associés. Schématiquement, la structure rétinienne se compose de couches nucléaires entre lesquelles s'interposent des couches plexiformes composées des contacts synaptiques opérés entre les corps cellulaires de deux couches nucléaires voisines. Ainsi, de l'extérieur vers l'intérieur du globe oculaire, la rétine neurale se compose successivement (Figure 30):

- des segments externes des cellules photoréceptrices
- des segments internes des photorécepteurs
- de la couche nucléaire externe (notée ONL, pour *Outer Nuclear Layer*), composée des corps cellulaires des photorécepteurs
- de la couche plexiforme externe (notée OPL, pour *Outer Plexiform Layer*), couche synaptique entre les neurones photorécepteurs et les cellules bipolaires de la couche inférieure
- de la couche nucléaire interne (notée INL, pour *Inner Nuclear Layer*), composée des noyaux des neurones situés dans cette région intermédiaire de la rétine neurale, à savoir les cellules bipolaires, amacrines et horizontales
- de la couche plexiforme interne (notée IPL, pour *Inner Plexiform Layer*), couche synaptique entre des neurones bipolaires et les cellules ganglionnaires de la couche inférieure

- de la couche des cellules ganglionnaires (notée GCL, pour *Ganglionnar Cells Layer*), composée des noyaux des cellules ganglionnaires
- et enfin de la couche des fibres nerveuses, composée des axones des cellules ganglionnaires qui se rejoindront pour constituer le nerf optique.

La densité de neurones au sein de chaque couche varie selon la région de la rétine considérée, localisée plus ou moins proche de l'axe optique.



adapté de Sung et al. 2010 et Neurophysiologie 3<sup>ème</sup> édition, Editions Dunod

**Figure 30 : Représentation schématique de la structure cellulaire de la rétine.**

ONL : couche nucléaire externe ; OPL : couche plexiforme externe ; INL : couche nucléaire interne ; IPL : couche plexiforme interne ; CGL : couche des cellules ganglionnaires.

### 5.1.3 Le feuillet externe de la rétine : l'Epithélium Pigmentaire Rétinien (EPR)

Inséré entre la rétine neurale et la choroïde de l'œil, **l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) est une monocouche de cellules adhérentes à la tunique uvéale du globe oculaire** et englobant en partie les segments externes de photorécepteurs (couche de cellules la plus externe de la rétine neurale) (Figure 30). L'EPR constitue une barrière hémato-rétinienne externe. Ces cellules jouent un rôle primordial dans l'homéostasie de la rétine neurale, en participant à l'apport de nutriments et à l'évacuation des déchets créé par les photorécepteurs, mais aussi et surtout en phagocytant leurs disques membranaires, assurant ainsi le renouvellement des segments externes des photorécepteurs (SanGiovanni and Chew, 2005;

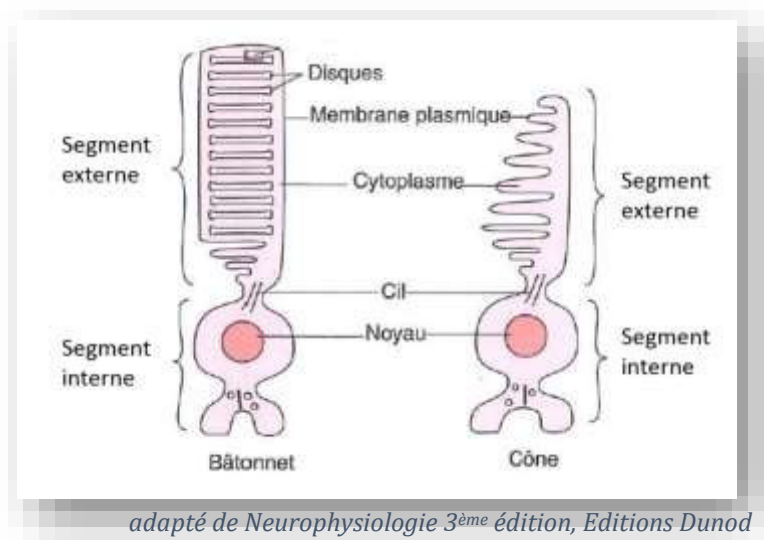
Strauss, 2005). L'EPR est un feuillet dans lequel abondent les pigments mélaniques, ce qui permet, en outre, d'absorber les rayons lumineux parasites.

#### 5.1.4 Le feuillet interne de la rétine : la rétine neurale

**La rétine neurale est l'emplacement clé des phénomènes de réception et de transmission de l'information lumineuse.** Ces fonctions peuvent être assurées grâce à une organisation rigoureuse des différentes cellules qui composent ce tissu en couches distinctes. Chacune d'entre elles jouent un rôle bien précis dans le fonctionnement rétinien.

##### *Les cellules photoréceptrices*

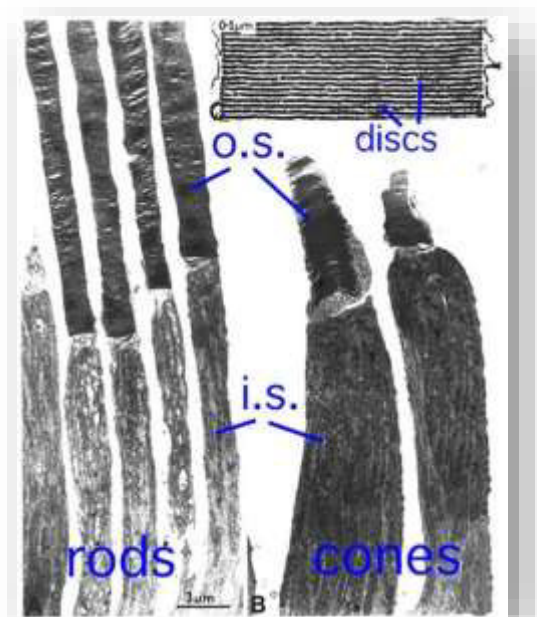
**Les photorécepteurs des vertébrés sont des neurones très spécialisés, responsables de la perception des rayons lumineux et de leur conversion en signal électrique compréhensible par le système visuel.** Morphologiquement, ces cellules sont composées d'un segment externe capable de traduire l'information lumineuse en un signal électrique, et un segment interne qui n'est autre que le corps cellulaire contenant le noyau et l'ensemble des organites nécessaires au métabolisme cellulaire (Figure 31). Le segment interne se termine par un prolongement synaptique lui permettant d'établir le contact avec les cellules neuronales de la couche immédiatement inférieure, en particulier les cellules bipolaires. C'est le segment externe des photorécepteurs qui est la partie sensible à la lumière. Il est composé selon une structure lamellaire, orientée perpendiculairement à l'axe du photorécepteur, qui contient les photopigments.



**Figure 31 : Représentation schématique de cellules photoréceptrices de type bâtonnet et de type cône.**

**Il existe 2 catégories de photorécepteurs : les cônes et les bâtonnets.** Bien que très similaires du point de vue de leur constitution, ces 2 types cellulaires diffèrent non seulement par leur morphologie mais aussi par leur fonction.

D'un point de vue **morphologique**, les bâtonnets ont un segment externe cylindrique, composé d'un empilement de saccules ou disques. Ceux-ci sont contenu à l'intérieur de la membrane plasmique, et en sont donc complètement séparés. Le segment interne des bâtonnets est fin et allongé. A l'inverse, les cônes ont un segment externe avec une structure lamellaire composée de repli de la membrane plasmique sur elle-même. De plus, le segment interne des cônes est plus large et plus court que celui des photorécepteurs de type bâtonnet (Figure 32).



*adapté de Webvision, the organization of the retina and visual system*

**Figure 32 : Images par microscopie électronique de bâtonnets (à gauche, rods) et de cônes (à droite, cones) de primate.**

Les photorécepteurs de type bâtonnet sont plus fins et allongés, tandis que les photorécepteurs de type cône sont plus courts et larges. Notons aussi la différence de taille des segments externes entre ces deux types cellulaires. o.s. : segment externe ; i.s. : segment interne. Barre d'échelle : 3 µm.

Un agrandissement (en haut à droite, barre d'échelle : 0,1 µm) permet d'apprécier la structure lamellaire, composée de disques, des segments externes des cellules photoréceptrices.

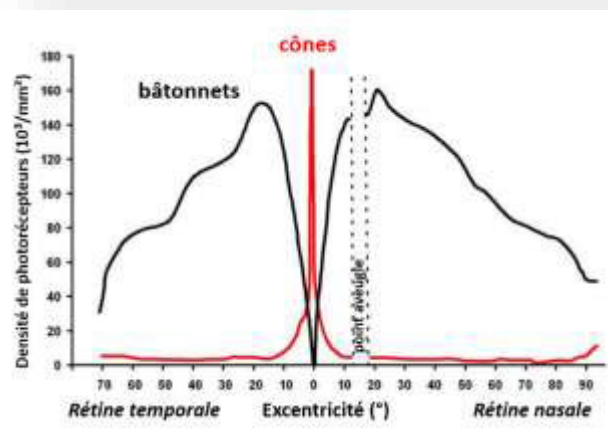
Pour ce qui est de la **fonction**, les bâtonnets se caractérisent par un seuil de stimulation très bas (1 seul photon suffit à les stimuler), alors que les cônes ont un seuil de stimulation beaucoup plus élevé (une centaine de photons). Ainsi, en condition lumineuse normale, c'est-à-dire en lumière du jour, les bâtonnets sont saturés et seuls les cônes sont en mesure d'encoder l'intensité lumineuse reçue par la rétine. Les cônes possèdent alors une très bonne résolution spatiale. Cependant, les bâtonnets sont de bons détecteurs des faibles luminosités, situations dans lesquelles les cônes ne sont pas actifs de par leur

seuil de stimulation trop élevé. De plus, les cônes assurent la vision des couleurs, tandis que les bâtonnets fournissent une vision achromatique. Enfin, les bâtonnets contiennent plus de pigments photosensibles que les cônes, et le renouvellement des disques de leur segment externe est plus rapide (Figure 33).

Bâtonnets	Cônes
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Seuil de stimulation bas (1 photon suffit)</li> <li>→ Saturation en situation d'éclairage normal (lumière du jour)</li> <li>→ Détection de faibles luminosités</li> <li>• Vision achromatique</li> <li>• Grande quantité de photopigments</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Seuil de stimulation haut (100 photons)</li> <li>→ Action en situation en éclairage normal (lumière du jour)</li> <li>→ Encodage de l'intensité lumineuse</li> <li>• Vision des couleurs</li> <li>• Plus faible quantité de photopigments</li> </ul>

Figure 33 : Différentes fonctions assurées par les 2 types de photorécepteurs.

Chez l'homme, les cônes sont **localisés** en forte densité dans et près de la fovéa (150000 à 180000 cônes/mm<sup>2</sup>), et plus on s'éloigne de l'axe optique, plus la densité des photorécepteurs de type cône diminue (6000 cônes/mm<sup>2</sup> à 1,5cm de la fovea) et celle des cellules de type bâtonnet augmente (environ 8000 bâtonnets/mm<sup>2</sup> à 4cm de la fovea) (Osterberg, 1937) (Figure 34). Ceci explique les différences fonctionnelles entre la rétine centrale et la rétine périphérique. Chez la souris, qui est un animal nocturne, la densité des bâtonnets est plus importante pour assurer la vision de nuit. La rétine murine ne présente pas de pic de densité de cônes. Les densités de cônes et de bâtonnets sont peu variables entre la zone centrale de la rétine et son immédiate périphérie (Masland, 2012).

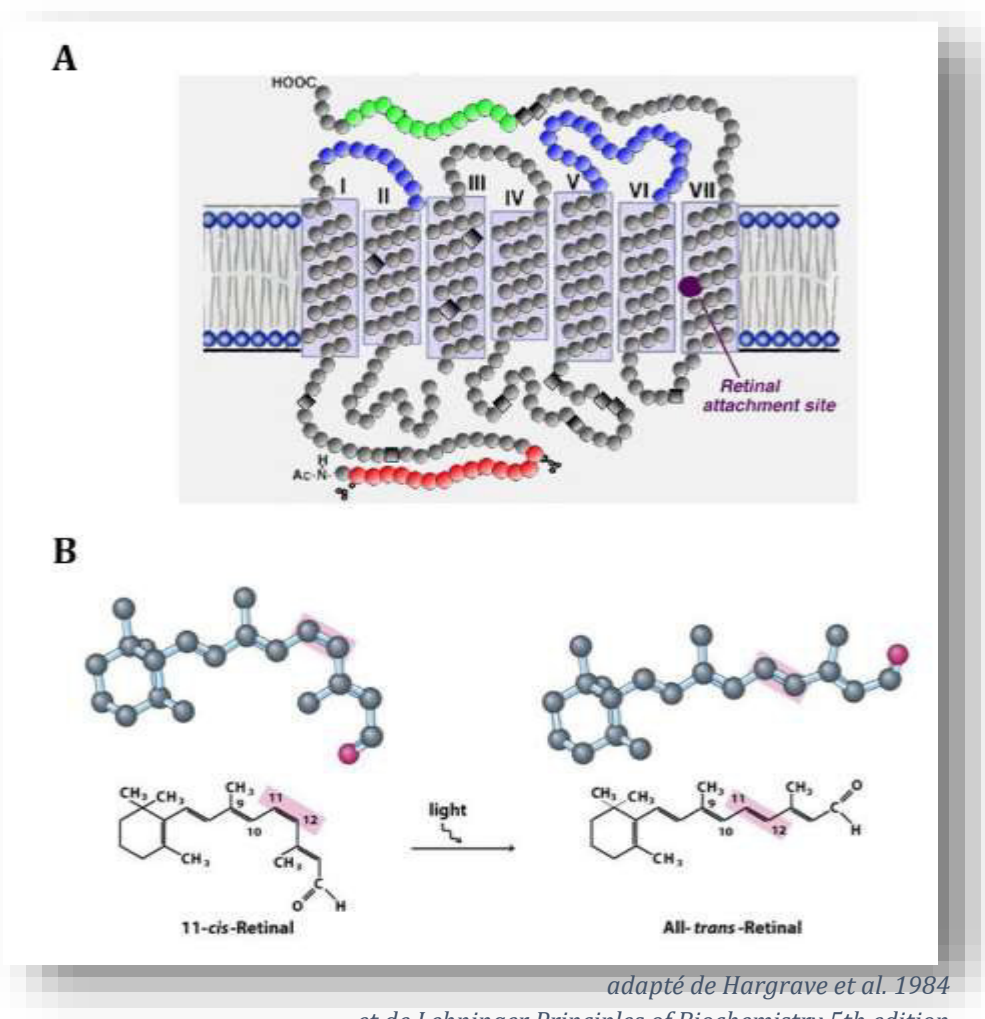


adapté de Osterberg et al. 1937

Figure 34 : Représentation graphique de la densité des deux types de photorécepteurs en fonction de la distance à l'axe optique.

Les photorécepteurs de type cône sont fortement concentrés au centre de la rétine, tandis que les photorécepteurs de type bâtonnet sont présents de manière plus périphérique.

Le **photopigment des bâtonnets est la rhodopsine**. Représentant à elle seule 90% des protéines du segment externe des bâtonnets, la rhodopsine est la protéine majeure des membranes des disques. Elle résulte de l'association d'une macromolécule protéique, nommée opsine, avec un chromophore, le 11-*cis* rétinol. L'opsine s'enroule sur elle-même pour former 7 hélices transmembranaires (Hargrave et al., 1984) (Figure 35A). L'extrémité N-terminale est intradiscale, tandis que la C-terminale est dans le cytoplasme du segment externe (Figure 35A). Le *cis* rétinol est confiné à l'intérieur de la chaîne de l'opsine, de manière parallèle à la membrane du disque. La structure chimique de l'opsine se compose d'un cycle carboné associé à une chaîne hydrocarbonée, terminée par un aldéhyde, présentant une alternance de liaisons simples et de liaisons doubles (Figure 35B).



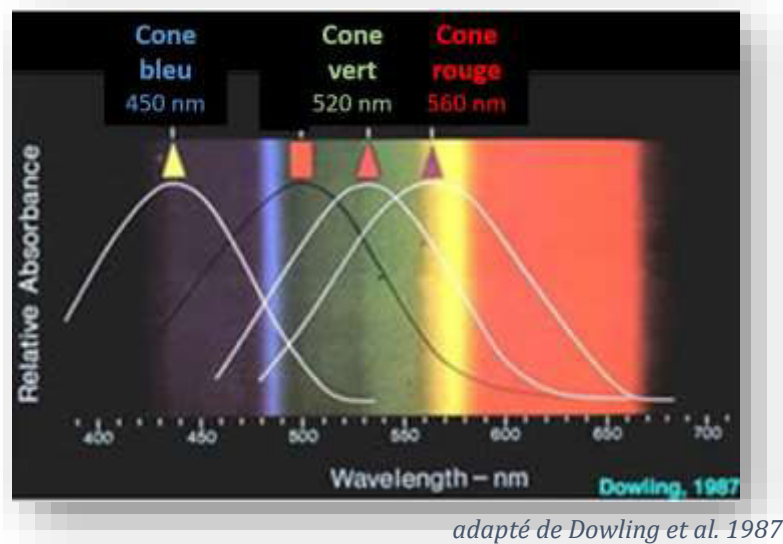
**Figure 35 : Photopigment des cellules de type bâtonnet.**

**(A) Structure moléculaire de la rhodopsine et son insertion dans la membrane des disques des segments externes des photorécepteurs.** Les domaines transmembranaires de la protéine sont indiqués en chiffres romains.

**(B) Molécule de rétinol.** Le 11-*cis* rétinol s'isomérisé en tout-*trans* rétinol sous l'effet d'une photostimulation.



La liaison du 11-*cis* rétinale à l'opsine entraîne un déplacement de ses électrons  $\pi$ , ce qui rend la molécule particulièrement sensible à l'excitation photonique (Figure 35B). Ces électrons sont particulièrement excités par les longueurs d'onde élevées, d'où un maximum d'absorption de la rhodopsine à 498 nm. Le **photopigment des cônes, l'iodopsine**, est similaire à la rhodopsine. Elle se compose elle aussi d'une molécule de 11-*cis* rétinale reliée à une opsine. Cependant, dans les cônes, il existe différentes opsines, chacune ayant une spécificité qui confère au photopigment une longueur d'onde d'absorption qui lui est propre. Ainsi les cônes se distinguent en 3 catégories selon qu'ils possèdent une opsine absorbant à 450nm, 520nm ou 560nm. Respectivement, ce sont alors des cônes sensibles à la lumière bleue (cônes S, « short »), verte (cônes M, « medium ») ou rouge (cônes L, « long ») (Brown and Wald, 1963; Dowling, 1987) (Figure 36).



**Figure 36 : Longueurs d'onde d'absorption des différents types de cônes.**

La courbe en noir représente l'absorption des bâtonnets.

Les segments externes des cellules photoréceptrices, cônes comme bâtonnets, sont constamment en **renouvellement**. La partie apical d'un photorécepteur est entourée par les microvillosités des cellules de l'EPR. Ces dernières vont assurer la phagocytose d'un morceau de segment externe (les disques les plus externes) afin de le cliver et le séparer du photorécepteur. Le phagosome ainsi extrait sera transporté dans le cytoplasme de la cellule de l'EPR afin d'être totalement lysé. Cette destruction progressive du segment externe du photorécepteur est compensée par l'assemblage, à sa base, de nouveaux disques. **Cet équilibre entre destruction et création assure le maintien d'une longueur constante du segment externe du photorécepteur.**

### *Les cellules bipolaires*

Les cellules bipolaires sont localisées au sein de la couche nucléaire interne. Leurs prolongements dendritiques projettent pour part dans la couche plexiforme interne afin de réaliser un contact synaptique avec les cellules photoréceptrices. Elles reçoivent ainsi les influx nerveux nés dans les photorécepteurs. D'autre part, leurs prolongements axonaux projettent dans la couche plexiforme interne. Dans cette couche, les cellules bipolaires peuvent transmettre l'information reçue aux neurones situés en aval dans la chaîne neuronale rétinienne : les cellules ganglionnaires. Les cellules bipolaires ne créent pas de potentiel d'action. L'information est conduite de manière purement électrique le long de la membrane cellulaire. Deux types de cellules bipolaires sont distingués d'après leur mode de fonctionnement : les cellules bipolaires ON et les bipolaires OFF. Les premières entrent en activité en condition lumineuse alors que les secondes sont actives en condition d'obscurité.

### *Les cellules ganglionnaires*

Situées dans la couche la plus interne de la rétine neurale, les cellules ganglionnaires sont les derniers relais de la chaîne des neurones rétiniens. Tout comme pour les cellules bipolaires, les cellules ganglionnaires se distinguent en deux catégories, les cellules ON et les cellules OFF, actives ou inactives selon les conditions lumineuses. Elles reçoivent de manière sélective les informations provenant des cellules bipolaires, elles-mêmes sélectives selon les conditions lumineuses, mais aussi des cellules amacrines. Les axones des cellules ganglionnaires constituent la fibre sortant de la rétine pour rejoindre l'encéphale. Ils se rejoignent en un seul point de la rétine, qui représente le départ du nerf optique. Dans cette région, aucune cellules photoréceptrices ne peut percevoir les rayons lumineux, donc aucune information sensorielle ne peut être générée. Cette perte d'informations explique la présence d'un point aveugle dans le champ de vision.

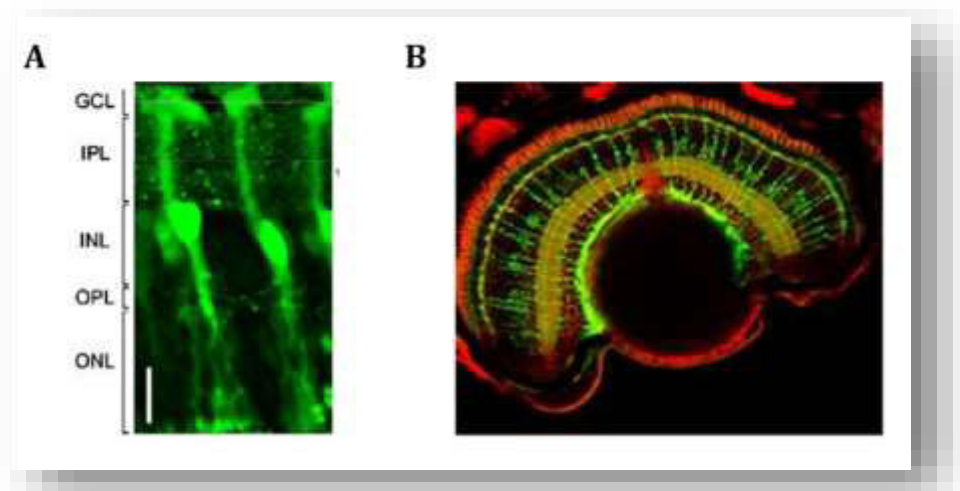
### *Les cellules horizontales et amacrines*

Les cellules horizontales et amacrines sont des cellules dites d'association. Elles sont localisées toutes les deux dans la couches nucléaire interne. Les premières se situent dans la partie externe de cette couche, proche de la couche plexiforme externe, tandis que les deuxièmes se situent près de la couche plexiforme interne. Les cellules horizontales réalisent des contacts synaptiques avec les cellules photoréceptrices mais aussi avec des cellules bipolaires. De plus, elles communiquent entre elles grâce à des jonctions gap. Cette architecture permet une transmission horizontale d'informations : un photorécepteur transmet ainsi à plus de cellules bipolaires, et une cellule bipolaire reçoit des informations provenant de plusieurs photorécepteurs. Les cellules amacrines réalisent une fonction similaire entre les cellules bipolaires et les cellules ganglionnaires. **Ces cellules permettent donc une distribution centrifuge de l'information visuelle au sein de la rétine.**

### *Les cellules gliales de la rétine*

**La rétine possède 3 types de cellules gliales : les cellules de Müller, les astrocytes et les cellules microgliales.**

**Les cellules de Müller sont les cellules gliales majoritaires de la rétine.** Ces cellules macrogliales traversent toute l'épaisseur de la rétine, et sont capitales dans le maintien de la structure et du métabolisme de la rétine (Figures 37 A et B). En effet, ces cellules sont polarisées, avec un corps cellulaire localisé dans la couche nucléaire interne et deux extensions qui s'étendent de manière opposée. D'un côté une extension forme des microvillosités pour entourer les photorécepteurs, et de l'autre une extension constitue un pied au niveau de la limite interne de la rétine. Ces cellules sont donc dites radiaires, et sont parallèles l'une par rapport aux autres. Chaque cellule de Müller s'associe avec des neurones de chaque couche rétinienne traversée et réalise des interactions métaboliques et fonctionnelles avec eux. Ainsi chaque cellule de Müller constitue le squelette d'une colonne cellulaire. A titre d'exemple, chez l'homme, une cellule de Müller est entourée d'environ 15 neurones, dont 10 photorécepteurs environ (Reichenbach and Bringmann, 2010). La cellule de Müller joue ainsi un rôle très important dans la capture des neurotransmetteurs libérés par les terminaisons synaptiques des différents neurones, et permet d'éviter les effets d'excitotoxicité. La cellule de Müller peut ensuite délivrer ses neurotransmetteurs, métabolisés ou non, aux neurones voisins. Elle régule donc de manière indirecte l'activité neuronale de la rétine. En particulier, la cellule de Müller métabolise le glutamate en glutamine, essentielle au fonctionnement neuronal (Bringmann et al., 2006). Les cellules de Müller participent également au métabolisme lipidique de la rétine, à la régulation du pH par la capture du dioxyde de carbone et au stockage du glycogène et sa glyco-glycogénolyse (Reichenbach and Bringmann, 2010). Enfin, elle est impliquée dans le maintien de la fonction des photorécepteurs en sécrétant des facteurs de croissance et des facteurs trophiques nécessaires à leur survie (Shen et al., 2012). **La cellule de Müller assure donc tout un panel de fonctions impliquées dans la régulation du métabolisme de l'ensemble des neurones rétiens.**



**Figure 37 : Marquages immunohistologiques de cellules de Müller.**

**(A) Cellules marquées (en vert) dans une coupe de rétine de cochon d'inde.** Cellules marquées par Mitotracker Orange. GCL : couche des cellules ganglionnaires ; IPL : couche plexiforme interne ; INL : couche nucléaire interne ; OPL : couche plexiforme externe ; ONL : couche nucléaire externe. Barre d'échelle : 20  $\mu\text{m}$ . *Adapté de Bringmann et al. 2006.*

**(B) Cellules marquées (en vert) dans une coupe de rétine poisson zèbre.** Marquage de la glutamine synthétase (en vert). *Adapté de Phillips et al. 2011.*

Les cellules de Muller traversent l'intégralité de la rétine afin d'assurer ses multiples fonctions et jouer un rôle structurant.

**Les astrocytes** sont des cellules macrogliales. Elles sont localisées au niveau de la couche des fibres nerveuses, à la surface de la rétine interne. **La fonction principale des astrocytes est d'orienter et de faire migrer les cellules endothéliales afin de former le réseau vasculaire superficiel de la rétine.** C'est pourquoi les astrocytes, qui ont une morphologie étoilée, forment un réseau en forme de nid d'abeille qui servirait de support pour le développement du système vasculaire rétinien (Dorrell et al., 2002). Cette trame permettrait de maintenir l'intégrité du système vasculaire tout en le limitant pour éviter la fuite et la migration de vaisseaux vers le vitré de l'œil (Zhang and Stone, 1997). Les astrocytes et les cellules de Müller peuvent communiquer par le biais de jonction gap (Newman, 2003).

Localisées dans les couches plexiformes interne et externe, **les cellules microgliales sont les principales cellules immunitaires de la rétine en condition physiologique.** En condition pathologique, elles s'activent et s'accumulent dans l'espace sous rétinien, avant de migrer vers les zones endommagées.

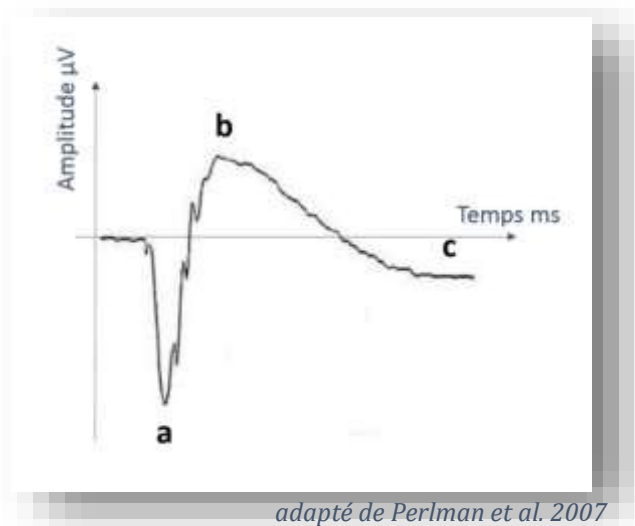
**La rétine est par conséquent un tissu neurosensoriel particulièrement stratifié et spécialisé, permettant une perception et une transmission de l'information lumineuse très organisée.**

### 5.1.5 La réponse rétinienne à un stimulus lumineux : l'Electrorétinogramme (ERG)

L'organisation stratifiée de cellules spécialisées au sein de la rétine se reflète dans la fonctionnalité de cette dernière. En effet, la réponse électrophysiologique rétinienne à un stimulus lumineux illustre également une transmission électrique progressive et organisée au sein des couches cellulaires de la rétine.

**La survenue d'un stimulus lumineux engendre une modification du potentiel électrique de l'œil chez le vertébré qui le perçoit. Cette activité électrique est causée par la réponse spécifique de la rétine à la stimulation lumineuse, dénommée électrorétinogramme.** La réponse électrophysiologique de la rétine à un stimulus lumineux peut donc être spécifiquement enregistrée et étudiée grâce à la technique du même nom, **notée ERG**.

Concrètement, l'ERG est enregistré via la mesure en temps réel du potentiel d'action entre deux électrodes, l'une placée directement sur la cornée (électrode de mesure) et l'autre en contact avec une région quelconque de la tête de l'animal (électrode de référence). Ce montage peut également s'accompagner d'une électrode de terre. L'enregistrement d'un ERG (Figure 38) s'effectue classiquement sur une rétine adaptée à l'obscurité (dite « dark-adapted ») soumise à un flash lumineux. Cet enregistrement permet de mesurer majoritairement la réponse des photorécepteurs de type cônes. On parle d'ERG scotopique. Si la rétine est adaptée à la lumière, on parle alors d'ERG photopique et la réponse enregistrée devra être analysée en tant que réponse due aux photorécepteurs de type bâtonnet.



**Figure 38 : Allure d'un électrorétinogramme humain.**

**Un ERG peut être divisé en 3 grandes ondes, notées a,b et c** (Figure 38). L'origine moléculaire et cellulaire de ces différentes grandes composantes reste à éclaircir, mais les différentes ondes peuvent être étudiées pour apporter des informations capitales sur l'état de fonctionnalité de la rétine et de ses diverses composantes.

**En premier lieu, le signal électrique de l'ERG connaît une inflexion négative, nommée onde a** (Figure 38). Cette première réponse temporelle est le courant créé par la lumière, c'est-à-dire qu'elle reflète la diminution du courant d'obscurité lors de l'absorption de l'énergie lumineuse par les segments externes des cellules photoréceptrices (Penn and Hagins, 1969; Sillman et al., 1969). Ceci explique que l'onde a soit négative, car elle reflète l'hyperpolarisation des segments externes des photorécepteurs. C'est pourquoi **l'onde a de l'ERG est considérée comme l'onde reflétant la capture de la lumière par les cellules photoréceptrices**. L'amplitude de l'onde a varie avec l'intensité du signal lumineux perçu, et sa durée dépend de la rapidité avec laquelle la rétine connaîtra une dépolarisation globale.

Immédiatement après l'onde a, le signal de l'ERG montre une forte augmentation positive (Figure 38), traduisant une importante dépolarisation des cellules rétinienne. Cette partie de l'ERG, nommée onde b, est l'onde la plus étudiée car représentant la majeure partie de l'enregistrement de l'ERG et apportant de précieuses informations sur le fonctionnement rétinien. **L'onde b trouve son origine dans les cellules en position post-synaptique des photorécepteurs** (Furukawa and Hanawa, 1955; Sillman et al., 1969; Pepperberg and Masland, 1978). L'origine cellulaire exacte de l'onde b n'est pas connue, mais des enregistrements ont identifiés que le courant est localisé entre la rétine proximale et la rétine distale. C'est pourquoi l'onde b a été généralement attribué à la réponse des cellules de Müller, ces cellules gliales montrant une distribution spatiale similaire à l'onde b (Miller and Dowling, 1970). Cette réponse reflèterait un changement de potentiel de membrane de ces cellules dans leur partie distale, en réponse à une variation du taux extracellulaire de potassium dans la couche plexiforme externe (Miller and Dowling, 1970). Cette augmentation est générée par les cellules bipolaires en réponse à une stimulation lumineuse (Dick and Miller, 1985), qui se dépolarise donc suite à une activité des photorécepteurs. Par conséquent, le signal électrique émit par les cellules de Müller, et visible via l'onde b de l'ERG, reflète la transmission du signal électrique entre les cellules photoréceptrices et les neurones plus internes de la rétine neurale. L'ensemble de ces informations confirme que **l'onde b reflète la transmission d'informations électriques au sein de la rétine interne**, suite à l'émission de signaux électriques des cellules photoréceptrices photostimulées.

Enfin, l'onde c de l'ERG (Figure 38) résulte d'une activité des cellules de l'EPR (positive) mais également de l'activité de la rétine neurale (négative) en cas de stimulation lumineuse (Noell, 1954). Ces deux éléments s'additionnent et composent l'onde c de l'ERG. Par conséquent, **l'onde c atteste de l'intégrité des photorécepteurs, des cellules de l'EPR et de l'interaction entre ces deux couches cellulaires** (Perlman, 1995).

L'ERG peut également renseigner sur l'évolution de la réponse électrophysiologique d'une rétine soumise à des stimulations d'intensité croissante. La réalisation d'ERG successifs avec des flashes lumineux de plus en plus intenses permet de visualiser cette évolution. La mesure des amplitudes des ondes a et b pour chaque intensité lumineuse imposée permet d'étudier la sensibilité rétinienne. En reportant ces amplitudes de réponse sur une représentation graphique en fonction de la luminance du stimulus imposé, appelée courbe de sensibilité, divers paramètres du fonctionnement rétinien peuvent être étudiés (Figure 39). Tout d'abord, l'amplitude maximale de l'onde a, notée  $A_{max}$ , renseigne sur la

réponse maximale que les cellules photoréceptrices peuvent fournir. De même, l'amplitude maximale de l'onde b, notée  $B_{max}$ , renseigne sur les capacités de transmission des informations électriques au sein de la rétine interne. La pente de la courbe de sensibilité de b, notée  $n$ , indique l'élévation d'énergie fournie par la rétine pour une augmentation donnée d'intensité lumineuse. Autrement dit, ce paramètre indique également l'augmentation lumineuse nécessaire pour induire une certaine élévation dans l'énergie transmise au sein de la rétine interne. Ce paramètre peut donc être assimilé à la sensibilité de la rétine. Enfin, l'intensité lumineuse à laquelle l'onde b atteint la moitié de son amplitude maximale, notée  $K$ , renseigne sur la saturation de la rétine étudiée.

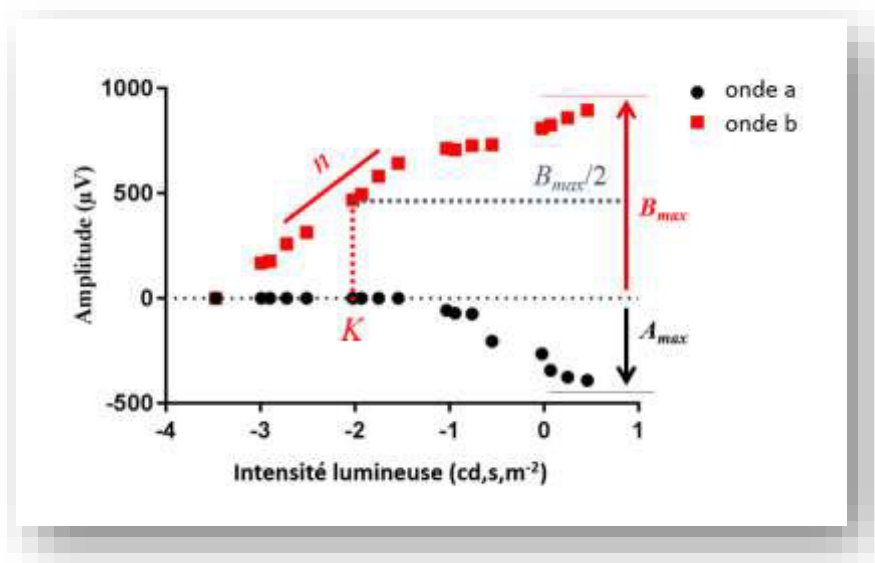


Figure 39 : Exemple de courbes de sensibilité rétinienne.

Les courbes de sensibilité sont obtenues à partir d'ERG réalisés avec des stimuli lumineux croissants.

$A_{max}$  : amplitude maximale de l'onde a ;  $B_{max}$  : amplitude maximale de l'onde b ;  $n$  : pente de la courbe de sensibilité de l'onde b ;  $K$  : intensité lumineuse nécessaire pour atteindre  $B_{max}/2$ .

**L'électrorétinogramme est ainsi une technique complète permettant l'étude du fonctionnement rétinien, de la perception des stimuli lumineux par les photorécepteurs jusqu'à la transmission de l'information électrique au sein de la rétine interne.**

### 5.1.6 L'information visuelle naît dans la rétine ...

**L'origine de la réponse électrophysiologique rétinienne face à un stimulus lumineux se trouve dans la réponse, stratifiée elle aussi, des cellules de la rétine, dont la structure en couches permet une transmission organisée de l'information visuelle.** L'initiation de la réponse du système visuel à un stimulus lumineux se déroule dans les couches les plus internes de la rétine avec un mécanisme moléculaire appelé phototransduction.

### *Etape 1 : La phototransduction*

**Lors d'une exposition à la lumière, la configuration du 11-*cis* rétinol se modifie** pour obtenir du tout-*trans* rétinol. Cette isomérisation du rétinol engendre un changement de conformation de l'opsine sur laquelle il est fixé, et par conséquent une modification de la rhodopsine en méta-rhodopsine II, dans les bâtonnets. La conversion du rétinol a aussi pour conséquence de rendre spontanée l'hydrolyse de la liaison entre ce chromophore et l'opsine. Le tout-*trans* rétinol diffuse alors librement, et est repris par les cellules de l'EPR afin d'être reconverti en *cis*-rétinol. La conversion de la rhodopsine en méta-rhodopsine II active une protéine de la membrane des segments externes : la transducine. Cette molécule est une protéine G dont l'activation active à son tour une phosphodiesterase qui dégrade le GMPc en GMP. La diminution du taux de GMPc entraîne la fermeture des canaux Na<sup>+</sup>, ce qui engendre l'hyperpolarisation de la membrane. Dans les faits, cette cascade est amplifiée : l'isomérisation d'une seule molécule de rhodopsine induit une chute importante du taux de GMPc intracellulaire et une fermeture massive de canaux sodiques. Ce phénomène explique que le seuil de sensibilité des bâtonnets soit aussi bas, quelques photons étant nécessaire pour former un potentiel des récepteurs de type bâtonnet. Les mêmes mécanismes ont lieu dans les cônes.

### *Etape 2 : la transmission aux cellules bipolaires*

**L'information née dans les cellules photoréceptrices est transmise aux cellules bipolaires sous-jacentes.** La transmission se fait par le glutamate. Dans l'obscurité, les photorécepteurs sont légèrement dépolarisés. Les canaux Na<sup>+</sup> de ces cellules, en position pré-synaptique, sont donc ouverts, ce qui induit une libération de glutamate par les photorécepteurs. Ce phénomène est appelé courant d'obscurité : en absence de stimulation lumineuse, les photorécepteurs libèrent en continu du glutamate dans la couche plexiforme externe. Lors d'une stimulation lumineuse, le photorécepteur s'hyperpolarise, ce qui engendre un arrêt de la libération de glutamate. L'impact du glutamate sur les cellules constituant le terminal post-synaptique est différent selon le type de cellule bipolaire considéré. En effet, les cellules bipolaires OFF ouvrent leurs canaux cationiques dépolarisants lors de la réception de glutamate. Ces cellules sont donc excitées en condition d'obscurité. A l'inverse, d'autres cellules bipolaires, dites ON, ferment leurs canaux Na<sup>+</sup> GMPc-dépendant en réponse à la réception de glutamate. La cascade mécanistique est la même que celle opérant dans le photorécepteur lors d'une stimulation lumineuse. Les cellules bipolaires ON sont donc excitées en cas de stimulation lumineuse. Ainsi, quelles que soient les conditions lumineuses, il existe en permanence un courant dans les cellules rétinienne, assurant une information constante sur l'environnement lumineux de l'individu. De plus, comme expliqué précédemment, les cellules horizontales participent à la transmission de l'information entre des récepteurs situés latéralement. En outre, plusieurs cellules horizontales communiquent entre elles, ce qui augmente l'étendue de des connexions latérales. Ainsi, les informations issues d'une cellule photoréceptrice sont transmises à plusieurs cellules bipolaires, et une cellule bipolaire reçoit les informations provenant de plusieurs photorécepteurs.



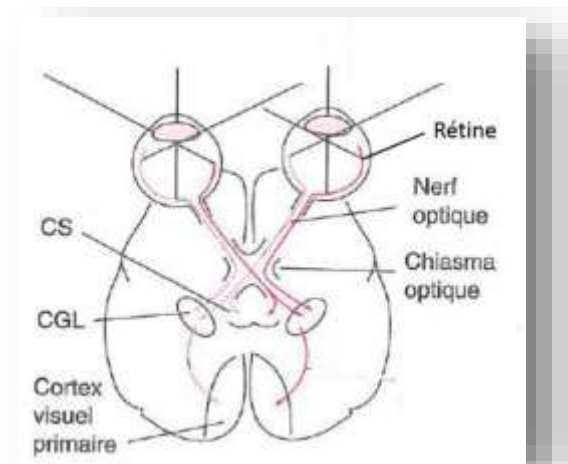
### Etape 3 : la transmission aux cellules ganglionnaires

Par la suite, **les cellules bipolaires transmettent l'information aux cellules ganglionnaires**, situées en aval dans la chaîne des neurones rétiniens. Les cellules amacrines participent elles aussi à la transmission de l'information vers les cellules ganglionnaires. A l'interface entre les cellules bipolaires et les cellules ganglionnaires, elles sont l'équivalent fonctionnel des cellules horizontales. A l'image des cellules bipolaires, les cellules ganglionnaires sont de deux types. Les ganglionnaires ON sont excitées par les cellules bipolaires ON, et sont donc activées par une stimulation lumineuse. A l'inverse, les ganglionnaires OFF sont excitées par les cellules bipolaires OFF, et donc s'activent à l'extinction de la lumière. D'un point de vue fonctionnel, les cellules ganglionnaires se différencient en 2 catégories. Les cellules dites M, de grandes dimensions avec des dendrites peu nombreuses mais étendues, ont un champ de perception large qui les rend sensibles au mouvement mais peu précises dans la vision des formes. Elles se localisent plutôt dans la périphérie de la rétine. Les cellules dites P, à l'inverse, sont de petite taille, ce qui leur offre un champ de perception très local et leur permet d'être précis dans la localisation de la source de l'information. Elles participent aussi à la vision des couleurs. Les cellules P se localisent au centre de la rétine, dans la partie fovéale.

**Les informations lumineuses nées dans la rétine empruntent le nerf optique, constitué des axones des cellules ganglionnaires, pour poursuivre leur chemin vers les aires cérébrales du système visuel.**

#### 5.1.7 ... et poursuit son chemin dans les aires cérébrales

**L'ensemble des informations provenant des cellules ganglionnaires de la rétine est intégré au niveau cérébral. Les axones de ces cellules, constituant le nerf optique, passent à travers le chiasma optique, puis projettent vers les centres supérieurs** (Figure 40).



*adapté de Neurophysiologie 3<sup>ème</sup> édition, Editions Dunod*

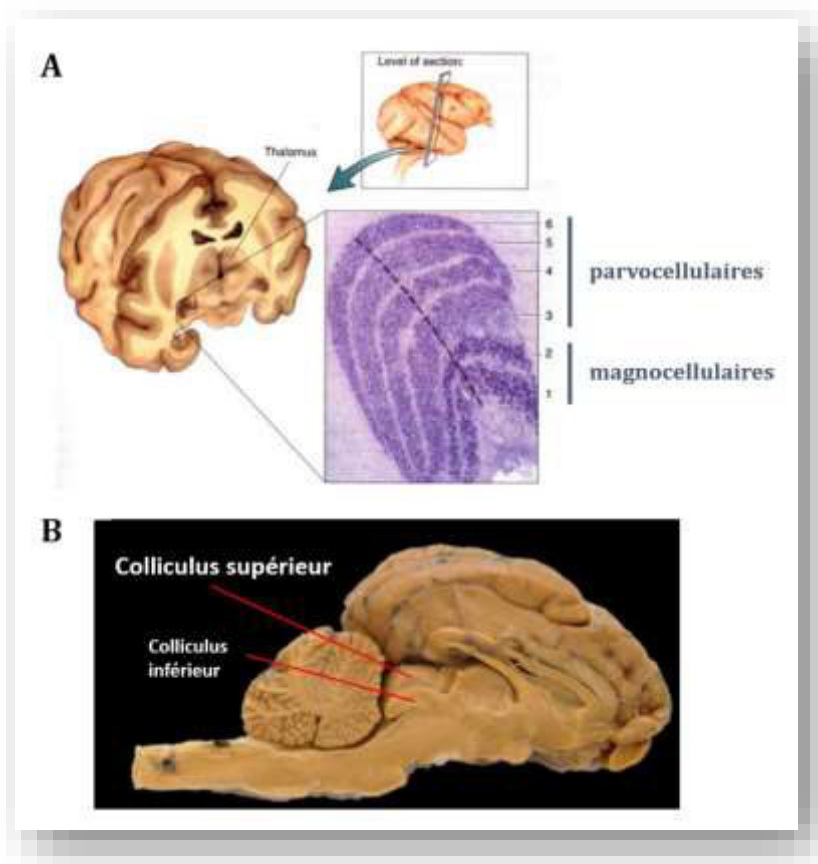
**Figure 40 : Projection des informations lumineuses de la rétine vers les aires cérébrales.**

Les nerfs optiques se croisent au niveau du chiasma optique, puis projettent vers les corps genouillés latéraux (CGL) et les colliculi supérieurs (CS). Les corps genouillés latéraux projettent à leur tour vers le cortex visuel primaire.

*Une première intégration au niveau sous-cortical*

**La projection aux aires cérébrales se dissocie en deux faisceaux principaux. Le faisceau principal aboutit dans le corps genouillé latéral (CGL),** un noyau localisé dans le thalamus (Figures 40 et 41). Dans le CGL, les fibres provenant des cellules P se terminent dans les 4 couches dites parvocellulaires, tandis que les cellules M projettent dans les 2 couches dites magnocellulaires. Les couches parvocellulaires sont les couches les plus externes du CGL, et sont composées de petites cellules, tandis que les couches magnocellulaires sont les couches les plus internes et sont composées de neurones plus gros (Figure 41). Les neurones du CGL projettent directement dans le cortex visuel primaire. Les neurones du CGL ont un traitement de l'information similaire à celui des cellules ganglionnaires de la rétine. Le traitement qui s'y produit n'est donc pas très important, il a pour rôle principal de renforcer le contraste entre le centre et la périphérie du champ de vision et améliorer la sensibilité au mouvement.

**Un second faisceau aboutit dans le colliculus supérieur (CS)** (Figures 40 et 41). Les projections d'informations visuelles issues de la rétine vers le colliculus jouent un rôle primordial dans le contrôle des mouvements oculaires.



**Figure 41 : Noyau géniculé latéral et colliculus supérieur.**

**(A) Localisation cérébrale et structure lamellaire du noyau géniculé latéral (LGN).** *D'après fourier.eng.hmc.edu.* Ici, dans un cerveau humain, vu en coupe coronale. Schématiquement, le LGN est composé de 6 couches cellulaires, 2 couches magnocellulaires et 4 couches parvocellulaires.

**(B) Localisation cérébrale du colliculus supérieur et colliculus inférieur.** *D'après scientistcindy.com.* Ici, dans un cerveau ovin, vu en coupe sagittale.

### *Un traitement principal de l'information dans le cortex visuel*

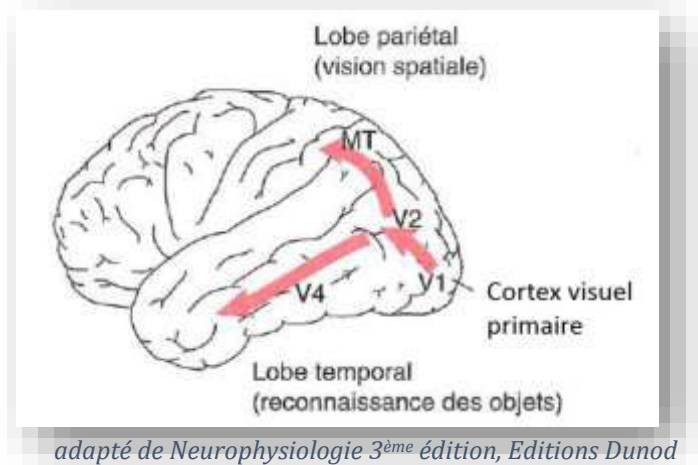
**Le traitement principal de l'information visuelle a lieu dans le cortex visuel primaire.** Cette aire se compose de 6 couches. Les noyaux du CGL projettent dans des neurones de la couche 4, qui ne sont que de simple relais de l'information visuelle provenant du thalamus. La plupart des cellules de la couche 4 projettent vers une seule cellule dite « simple », dont le champ récepteur résulte d'une simple sommation des informations reçues par plusieurs cellules, ce qui représente le premier niveau d'intégration de l'information visuelle dans le cortex visuel primaire. D'autres neurones, dits complexes et hypercomplexes, répondent eux à certains types de stimulation de certains points du champ visuel, à l'orientation du stimulus, ou encore à son mouvement. Ceci permet une intégration plus complexe de l'information visuelle. **Ainsi, les neurones du cortex visuel intègrent progressivement l'information visuelle, en la traitant de manière séquentielle, en fonction de propriétés de plus en plus spécifiques.**

L'information visuelle sera traitée en circulant dans les différentes couches du cortex visuel primaire. En effet, ces couches sont interconnectées grâce à un ensemble d'interneurones créant un véritable réseau intracortical. Ces interneurones sont composés de cellules étoilées. Certaines ont un arbre dendritique avec peu d'épines, et font partie d'un réseau inhibiteur, libérateur de GABA. Les autres, avec un arbre dendritique très épineux, sont des cellules excitatrices et utilisent le glutamate comme neurotransmetteur. L'ensemble de ces cellules étoilées permet une projection des informations de la couche corticale 4 vers les couches 2 et 3, principalement. Enfin, le cortex visuel comporte des cellules pyramidales, localisées principalement dans les couches profondes 5 et 6, mais aussi dans les couches 3 et 4. Ces neurones projettent vers des structures extérieures au cortex visuel, soit vers d'autres aires corticales, soit vers des zones sous-corticales.

### *Une intégration de l'information dans les aires visuelles secondaires*

**Le cortex visuel primaire est entouré d'aires visuelles secondaires qui participent au traitement et à l'intégration des informations visuelles.** Sans plus détailler l'ensemble de ces aires cérébrales, il est intéressant de poursuivre le cheminement des informations de la voie M et de la voie P précédemment décrites. **Les informations provenant du CGL parvocellulaire**, après avoir été relayées dans la couche 4 du cortex visuel puis transité dans l'ensemble des couches du cortex primaire se projettent dans le cortex péristrié puis vers des aires temporales (Figure 42). Le traitement et l'intégration dans ces zones sont associés à la détection des formes et à l'analyse de la couleur d'un objet. **Le système P est donc spécialisé dans la reconnaissance d'un objet. Les informations provenant du CGL magnocellulaire** font relais dans la couche 4 du cortex visuel primaire et se projettent ensuite dans le cortex secondaire puis sur l'aire médiotemporale et le cortex pariétal, qui sont des aires dorsales (Figure 42). Celles-ci sont associées aux processus de détection de l'emplacement d'un objet dans l'espace plutôt qu'à sa reconnaissance. **Le système M est donc spécialisé dans la relation entre l'espace et le mouvement ainsi qu'à la sensibilité à la profondeur. Ainsi, le traitement de**

**l'information visuelle se déroule en parallèle, dans différentes structures cérébrales, ce qui permet l'analyse de différents paramètres (couleur, forme, mouvement) en même temps.**



**Figure 42 : Projections de l'information visuelle depuis le cortex visuel primaire.**

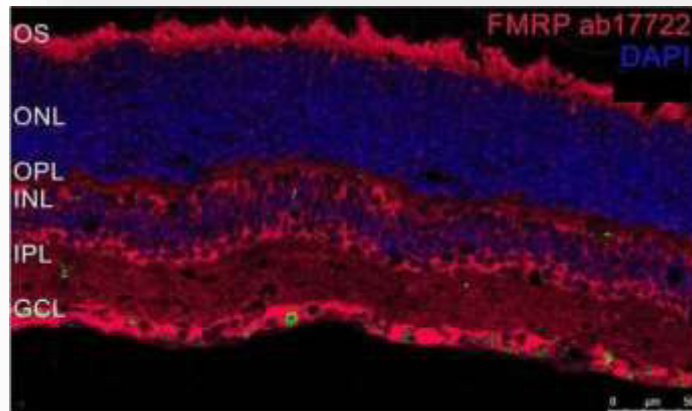
La voie vers MT représente la voie dorsale du signal visuel, tandis que la voie vers V4 correspond à la voie ventrale du système visuel. V2 : 2<sup>nd</sup>e aire rétinotopique ; V4 : 4<sup>ème</sup> aire rétinotopique, ventrale ; MT : 5<sup>ème</sup> aire rétinotopique, dorsale.

Enfin, des informations visuelles provenant du cortex visuel primaire mais aussi des aires visuelles secondaires projettent sur le colliculus. Cette structure subcorticale s'est révélée être impliquée dans la réalisation des saccades oculaires, mouvements involontaires et rapides des globes oculaires. En particulier, ces mouvements de saccades rapides, entrecoupés de période de fixation, interviennent dans certaines situations nécessitant une poursuite visuelle d'un objet ou d'une scène. Ce phénomène s'appelle le nystagmus. Il permet de suivre du regard une partie d'une scène visuelle, de revenir vers un point de fixation, puis de suivre de nouveau le stimulus initial. Le mouvement des yeux dans ce genre de réflexe est contrôlé par des centres nerveux spécifiques, ici le colliculus avec le soutien des informations provenant de la voie magnocellulaire. **Le colliculus reçoit donc des afférences en provenance aussi bien de la rétine que des aires corticales afin de préparer la commande motrice des mouvements oculaires, permettant une adaptation du champ visuel par un ensemble de mouvements de suivi adapté.**

## 5.2 La présence et les fonctions de FMRP dans la rétine

Comme dit précédemment, **ce n'est que très récemment que la présence éventuelle de la protéine FMRP dans la rétine a été investiguée.** C'est en 2014 que l'expression de la protéine FMRP a été démontrée pour la première fois dans la rétine de la souris (Rossignol et al., 2014). Par la suite, cette expression rétinienne a été confirmée chez la souris, ainsi que chez le poulet (Guimarães-Souza et al., 2016) ainsi que dans les rétines des ommatidies de la drosophile (Wang et al., 2017b). Chez la souris, FMRP est exprimée dans la globalité des couches cellulaires rétinienne : dans le segment externe des

photorécepteurs, dans la couche synaptique plexiforme externe, dans les cellules bipolaires et amacrines de la couche nucléaire interne, dans la couche synaptique plexiforme interne et enfin dans la couche des



adapté de Guimaraes-Souza et al. 2016

**Figure 43 : Marquage immunohistologique montrant la présence et la répartition de la protéine FMRP (en rouge) dans la structure rétinienne, en conditions physiologiques.**

En bleu, marquage des noyaux cellulaires (par DAPI). OS : segments externes ; ONL : couche nucléaire externe ; OPL : couche plexiforme externe ; INL : couche nucléaire interne ; IPL : couche plexiforme interne ; GCL : couche des cellules ganglionnaires. Barre d'échelle : 50 µm.

cellules ganglionnaires (Guimaraes-Souza et al., 2016) (Figure 43).

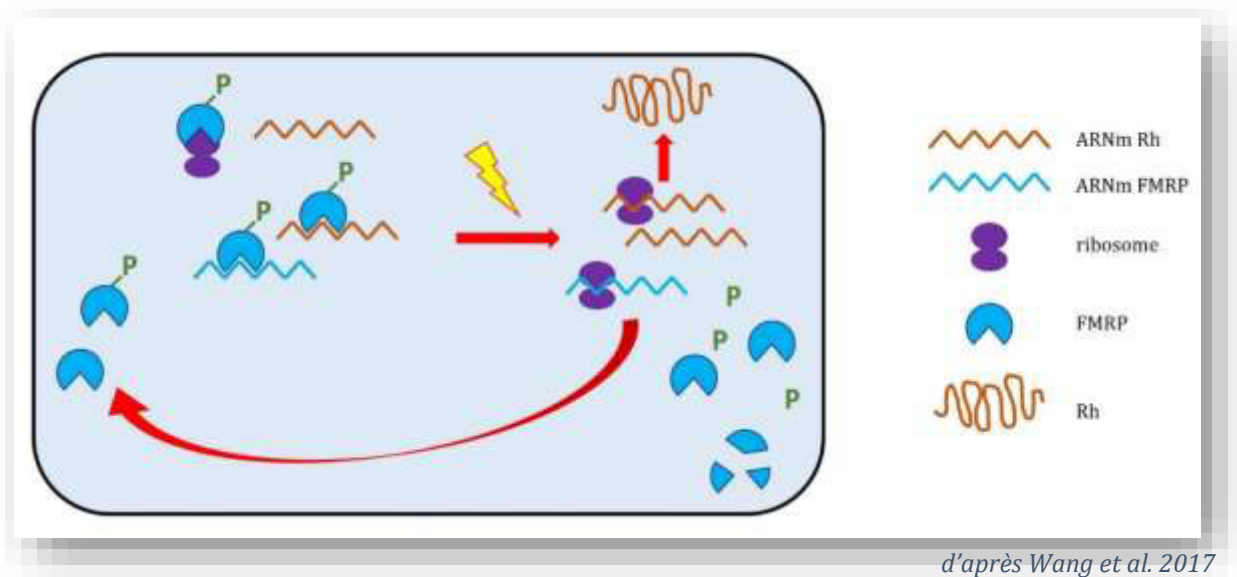
Chez la drosophile, le gène *dfmr1* code pour la protéine notée FMRP. Tout comme chez le rongeur, la protéine FMRP de la drosophile est fortement exprimée dans les cellules photoréceptrices, et se localise majoritairement dans le cytoplasme de ces cellules (Wang et al., 2017b). Elle subit également une modification post-traductionnelle de phosphorylation, sur son résidu Ser406 (Wang et al., 2017b). Tout comme dans d'autres structures, cette protéine joue au niveau rétinien un rôle de liaison à l'ARN et d'inhibition de la traduction (Wang et al., 2017b). En particulier, la quantité de FMRP impacte la traduction de la protéine Rh1, la rhodopsine majoritaire chez la drosophile (Wang et al., 2017b). De plus, l'activité de régulation de la traduction est liée à l'état de phosphorylation de la protéine FMRP rétinienne, puisque FMRP phosphorylée est liée aux polyribosomes inactifs, et la déphosphorylation de cette protéine permet à sa dissociation du complexe ribosome-FMRP (Wang et al., 2017b). C'est la déphosphorylation de FMRP qui permet la levée de la suppression de la traduction de la rhodopsine Rh1 (Wang et al., 2017b). L'ensemble de ces résultats démontre **le rôle crucial de la protéine FMRP au niveau rétinien, cette dernière impactant la production de la protéine clé de la perception lumineuse.**

Cependant, la particularité de la présence de FMRP dans la rétine se trouve dans les mécanismes qui entourent cette protéine : la quantité de protéine FMRP ainsi que son état de phosphorylation varient en fonction de l'exposition à la lumière. En effet, les quantités de FMRP et de FMRP phosphorylée sont plus importantes dans une rétine de souris exposée à la lumière que dans une rétine de souris maintenue dans

le noir (Guimarães-Souza et al., 2016). Chez la drosophile, 50% des protéines FMRP sont phosphorylées dans le noir, et une exposition à la lumière de 30 minutes fait diminuer ce taux de moitié (Wang et al., 2017b). De plus, une exposition de 60 minutes non seulement accentue cette diminution, mais engendre aussi une diminution globale de la protéine (Wang et al., 2017b), qui ne retrouvera un taux physiologique qu'après plusieurs heures d'exposition à la lumière (Wang et al., 2017b). **Il existe donc un lien entre la protéine FMRP et la lumière reçue par la rétine : la quantité de protéine FMRP et sa phosphorylation sont régulées par les conditions lumineuses.**

De plus, l'existence d'un état transitoire lors du passage de l'obscurité à la lumière, caractérisé par une diminution de la quantité de FMRP ainsi que de son taux de phosphorylation avant de revenir à un état physiologique, apporte des renseignements sur les mécanismes. Dans la rétine, la stimulation lumineuse engendre une réduction temporaire de la phosphorylation de la protéine FMRP, ce qui induirait 2 effets majeurs. Premièrement la déphosphorylation de FMRP engendrerait une dissociation des complexes que cette protéine forme avec les polyribosomes, ce qui fait entrer ces derniers en activité de traduction. Ceci génère, en particulier, une augmentation de la quantité de rhodopsine Rh1, causé par la levée de l'inhibition de la traduction des ARNm *Rh1* (Wang et al., 2017b). De plus, la déphosphorylation de la protéine FMRP augmente l'ubiquitination de cette dernière, et la fait donc tendre vers sa dégradation (Hou et al., 2006; Nalavadi et al., 2012), ce qui expliquerait la diminution de la quantité globale de protéine FMRP (Wang et al., 2017b). Ceci lèverait donc l'inhibition de la traduction des ARNm ciblés par FMRP, et en particulier ses propres ARNm. Ce mécanisme expliquerait la diminution transitoire de protéine FMRP lors du passage de l'obscurité à la lumière et le retour à un niveau de FMRP physiologique après plusieurs heures d'exposition à la lumière : les ARNm de la protéine FMRP sont eux-mêmes les cibles de la protéine FMRP, et la levée de l'inhibition de la traduction de ces ARNm de FMRP expliquerait alors la restauration de la quantité globale de FMRP sur le long terme (Wang et al., 2017b). Le niveau de protéine FMRP dans la rétine est régulé via une boucle de rétro-contrôle négative en cas de stimulation lumineuse (Figure 44).

**Ainsi, la protéine FMRP est présente dans la rétine et joue un rôle dans la régulation de la traduction de protéines clés du fonctionnement rétinien, telle que la rhodopsine. De plus, sa quantité et sa phosphorylation sont régulées par les conditions lumineuses vécues par la rétine. Par conséquent, les conditions lumineuses impactent le rôle fonctionnel joué par la protéine FMRP dans la rétine.**



**Figure 44 : Impact d'une stimulation lumineuse sur la quantité et la fonction de régulation de la traduction de la protéine FMRP dans les cellules photoréceptrices de la rétine.**

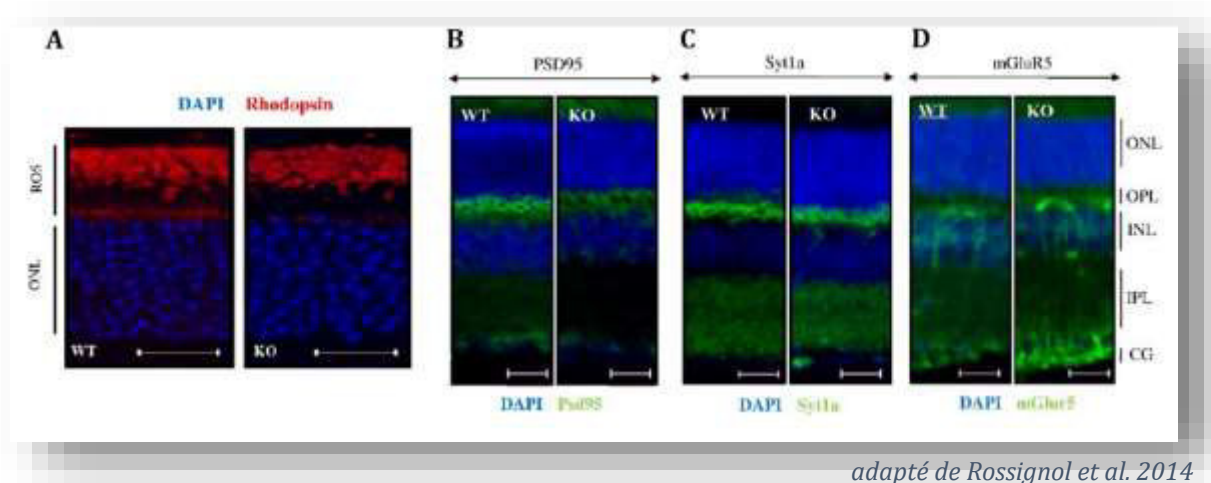
P : phosphorylation ; Rh : protéine rhodopsine.

### 5.3 Les conséquences rétinienne de l'absence de FMRP

A la lumière de la connaissance de la présence de la protéine FMRP dans la rétine et de son rôle en conditions physiologiques, **il devenait intéressant de s'intéresser aux conséquences éventuelles de l'absence de la protéine FMRP au niveau rétinien.** Cette interrogation était d'autant plus nécessaire que l'absence de FMRP dans les systèmes sensoriels avait jusque-là été étudié majoritairement dans les composantes cérébrales de ces systèmes. L'étude des rétines du modèle murin *Fmr1* KO permettait alors de se pencher sur les impacts à différents niveaux de l'absence de FMRP dans la rétine.

En premier lieu, l'absence de FMRP trouve ses conséquences au **niveau moléculaire.** Après avoir constaté l'absence effective et totale de la protéine FMRP, il ne fut pas étonnant, connaissant le rôle clé de cette protéine dans la régulation de la traduction de nombreux tandems gène/protéine, de remarquer des dérégulations dans les niveaux de protéines capitales dans l'accomplissement des fonctions rétinienne. En effet, dans ces conditions, la rhodopsine voit son niveau diminuer d'environ 40% par rapport aux quantités évaluées dans la rétine d'animaux contrôles (Rossignol et al., 2014) (Figure 45A). Cette diminution est cohérente avec le lien mis en évidence précédemment entre la protéine FMRP et l'expression de rhodopsine. Cependant, les résultats de Wang et associés suggéraient qu'une diminution de FMRP augmenterait la quantité de rhodopsine. Ce résultat suggère que les mécanismes de régulation de la traduction de la rhodopsine par la protéine FMRP ne sont pas encore parfaitement clairs. Quoi qu'il en soit, il confirme l'implication de la protéine FMRP dans l'expression rétinienne de rhodopsine. Les protéines pré- et post-synaptiques rétinienne se voient également dérégulées. En particulier, la synaptotagmine 1a (*Syt1a*) pré-synaptique et les récepteurs métabotropiques du glutamate mGluR5,

post-synaptiques, connaissent une diminution de leurs quantités dans la rétine des animaux *Fmr1* KO par rapport aux animaux contrôles, de l'ordre de 30% et 20% respectivement (Rossignol et al., 2014) (Figures 45C et D). De la même manière, la protéine post-synaptique PSD95 connaît, elle, une augmentation de sa quantité de l'ordre de 30% (Rossignol et al., 2014) (Figure 45B). Les quantités de ses diverses protéines se montrent dérégulées sans que ne soit constaté de variation dans les quantités de leurs ARN messagers respectifs dans la rétine des animaux *Fmr1* KO (Rossignol et al., 2014). Ce résultat est en parfait accord avec le rôle de régulation de la traduction des ARN joué par la protéine FMRP. De plus, les dérégulations des quantités protéiques ne se limitent pas à certaines couches rétinienne, mais concernent bien toute la structure de ce tissu nerveux (Rossignol et al., 2014). Ainsi, **l'ensemble des cellules rétinienne connaît des dérégulations moléculaires** caractérisées par des anomalies des quantités de protéines clés dans la réalisation des fonctions rétinienne, de la phototransduction à la transmission synaptique des signaux sensoriels électriques.



adapté de Rossignol et al. 2014

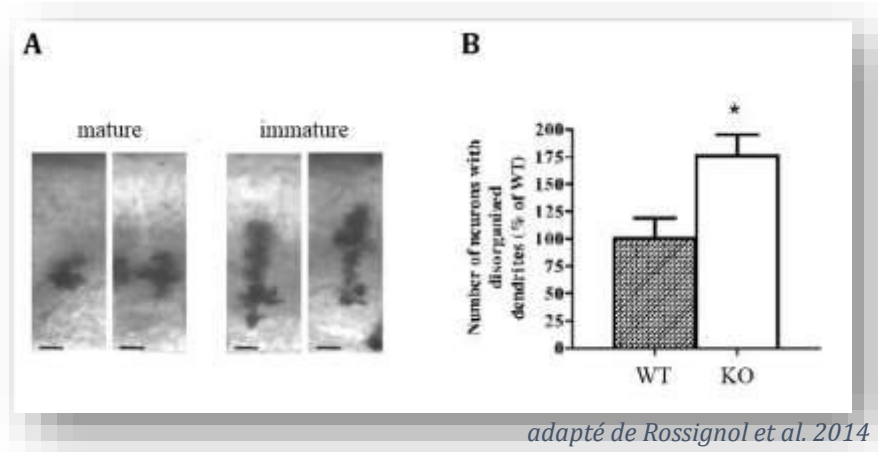
**Figure 45 : Marquages immunohistologiques montrant la présence et la répartition des protéines (A) Rhodopsine (en rouge), (B) PSD95 (en vert), (C) Syt1a (en vert) et (D) mGluR5 (en vert) dans la rétine des souris WT et *Fmr1* KO.**

Le DAPI (en bleu) marque les noyaux cellulaires. Syt1a : synaptotagmine 1a ; mGluR5 : récepteur métabotrope au glutamate 5 ; ROS : segments externes des photorécepteurs ; ONL : couche nucléaire externe ; OPL : couche plexiforme externe ; INL : couche nucléaire interne ; IPL : couche plexiforme interne ; CG : cellules ganglionnaires. Barres d'échelle : (A) 40  $\mu$ m, (B)(C)(D) 20  $\mu$ m.

De fait, l'absence de protéine FMRP engendre des conséquences au **niveau cellulaire**. En effet, de manière cohérente avec les défauts de protéines synaptiques et les anomalies connues au niveau cérébral, les neurones rétinien présentent un plus fort caractère immature (Rossignol et al., 2014) (Figures 46A et B). Parmi les cellules amacrines de la couche nucléaire interne, la proportion de neurones d'aspect immature est plus importante dans les rétines des animaux *Fmr1* KO que dans celles des animaux contrôles (Rossignol et al., 2014). Ces neurones présentent une morphologie similaire à celle décrite au niveau cérébral en absence de protéine FMRP, avec une plus grande densité d'épines



dendritiques et des épines avec une morphologie immature (Irwin et al., 2000; Greenough et al., 2001; Nimchinsky et al., 2001; Galvez and Greenough, 2005). Ainsi, **en absence de protéine FMRP, les neurones rétiniens connaissent un phénotype d'immaturité dendritique similaire à celui observé au niveau cérébral.**

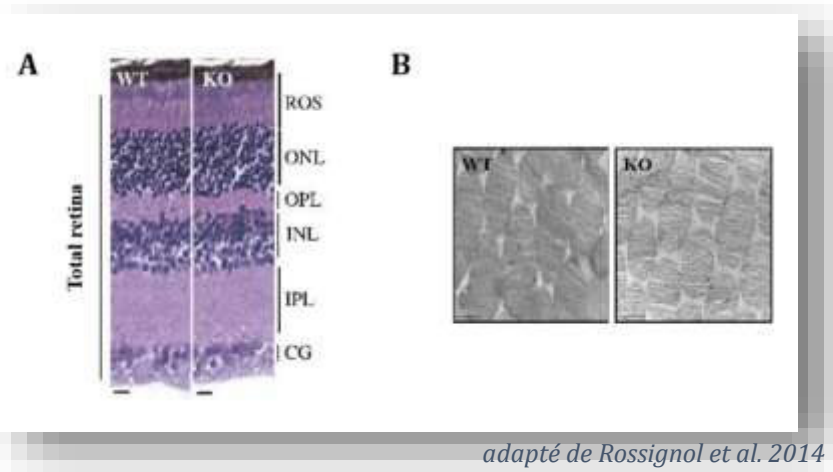


**Figure 46 : Phénotype rétinien cellulaire de la souris *Fmr1* KO.**

**(A) Marquage chimique de neurones rétiniens montrant la différence de morphologie entre neurones matures et immatures.** Les neurones immatures se caractérisent par une plus grande densité d'épines dendritiques, ainsi que par la présence plus importante d'épines avec une morphologie immature.

**(B) Quantification des neurones rétiniens immatures constatés dans la couche nucléaire interne chez des animaux WT et *Fmr1* KO.** L'absence de protéine FMRP dans la rétine engendre une plus grande fréquence de neurones immatures.

Cependant, l'absence de protéine FMRP n'engendre pas d'anomalie de la **structuration** des couches rétinienne (Rossignol et al., 2014). En effet, l'analyse par histologie conventionnelle n'a révélé **aucune différence dans l'épaisseur des couches** entre les rétines de souris *Fmr1* KO et d'animaux contrôle, et donc aucune altération de l'organisation cellulaire globale de la rétine en absence de la protéine FMRP (Rossignol et al., 2014) (Figure 47A). Ceci concerne également les segments externes des photorécepteurs qui ne présente pas d'anomalie de taille. Cependant, l'ultrastructure des disques des segments externes des photorécepteurs est altérée en absence de protéine FMRP, ceux-ci montrant une anomalie de densité et d'organisation (Rossignol et al., 2014) (Figure 47B).

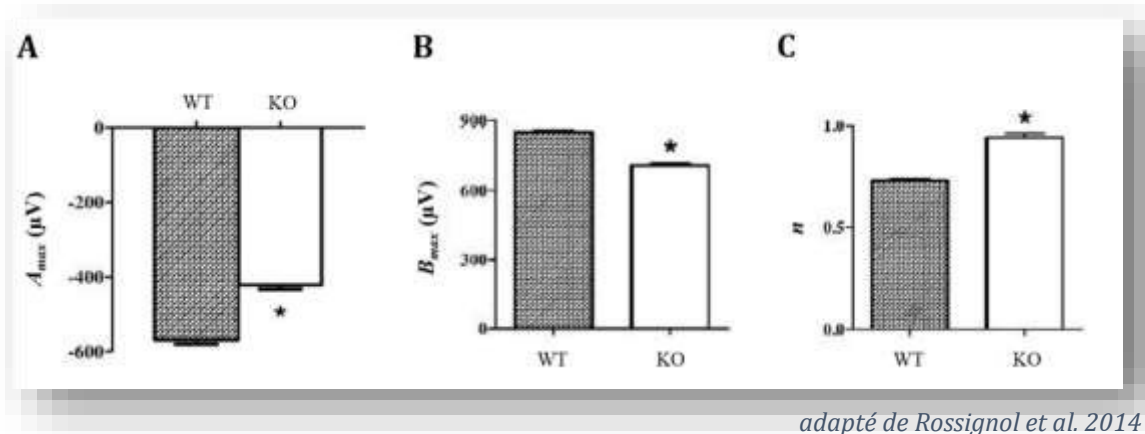


**Figure 47 : Structure cellulaire de rétines d'animaux WT et *Fmr1* KO.**

**(A) Histologie conventionnelle de rétines d'animaux WT et *Fmr1* KO.** La mesure des différentes couches rétinienne n'a montré aucune anomalie d'organisation rétinienne chez les animaux *Fmr1* KO. ROS : segments externes des photorécepteurs ; ONL : couche nucléaire externe ; OPL : couche plexiforme externe ; INL : couche nucléaire interne ; IPL : couche plexiforme interne ; CGL : couche des cellules ganglionnaires. Barre d'échelle : 15  $\mu$ m.

**(B) Spectroscopie électronique des segments externes des photorécepteurs de rétines d'animaux WT et *Fmr1* KO.** Les segments externes des photorécepteurs privés de FMRP montrent une altération d'organisation et de densité de leurs disques. Barre d'échelle : 50 nm.

En revanche, des **altérations significatives de l'électrophysiologie rétinienne** sont observées en absence de protéine FMRP (Rossignol et al., 2014). Les ERG enregistrés chez les souris *Fmr1* KO se caractérisent par une diminution de l'ordre de 26% de l'amplitude de l'onde a (paramètre  $A_{max}$ ) (Figure 48A) et une diminution de l'ordre de 20% de l'amplitude de l'onde b (paramètre  $B_{max}$ ) (Rossignol et al., 2014) (Figures 48B). Aucune altération de la latence d'apparition des ondes a et b n'est observée (Rossignol et al., 2014). Cependant, le paramètre  $n$ , reflétant la pente de la courbe de sensibilité de l'onde b, est augmenté de l'ordre de 30% chez ces animaux (Rossignol et al., 2014) (Figures 48C).



**Figure 48 : Quantification de plusieurs caractéristiques de l'électrophysiologie rétinienne enregistrées par ERG chez les souris WT et *Fmr1* KO.**

**(A) Amplitude maximale de l'onde a ( $A_{max}$ ).**

**(B) Amplitude maximale de l'onde b ( $B_{max}$ ).**

**(C) Paramètre  $n$ , pente de la courbe de sensibilité de l'onde b.**

Par rapport aux souris WT, les souris *Fmr1* KO montrent une diminution significative de l'amplitude maximale des ondes a et b, ainsi qu'une augmentation de leur paramètre  $n$  interprétée comme une diminution de leur sensibilité rétinienne aux contrastes.

\* $p < 0.05$ .

**L'ensemble de ces observations peut être expliqué de manière cohérente avec les anomalies moléculaires et cellulaires rétiniennes.** En effet, la diminution de l'amplitude de l'onde a traduit une anomalie de la perception du signal lumineux par les cellules photoréceptrices. Les segments externes de ces derniers ne montrant pas d'anomalie morphologique, mais uniquement une altération de leur contenu en rhodopsine, la diminution de l'amplitude de l'onde a est associée à la diminution de la quantité de rhodopsine dans la rétine de la souris *Fmr1* KO. Un résultat similaire avait également été obtenu lors de l'étude électrophysiologique de rétines de souris knock-out pour la Rhodopsine, montrant une diminution de l'ordre de 40% de leur contenu en Rhodopsine et une diminution de l'amplitude de l'onde a de l'ordre de 20% (Liang et al., 2004; Price et al., 2012). Les anomalies de l'onde b, quant à elles, reflètent une altération de la transmission de l'information électrique à travers la rétine interne. Elles sont cohérentes avec les anomalies neuronales constatées dans les rétines *Fmr1* KO. En premier lieu, les anomalies dans les quantités de protéines pré- et post-synaptiques (mGluR5, PSD95, Syt1a), décrites comme étant à l'origine de déstabilisations des structures synaptiques, d'immaturité des épines dendritiques et de la plasticité neuronale (Bilousova et al., 2009). En particulier, la diminution de PSD95 est connue pour créer des troubles de la communication entre neurones et de la plasticité (Tsai et al., 2012). Par conséquent, les altérations protéiques causées par l'absence de la protéine FMRP engendrent un développement neuronal perturbé, conduisant à un phénotype d'immaturité neuronale. Ces anomalies moléculaires et cellulaires sont très certainement à l'origine des perturbations de la transmission du signal des photorécepteurs vers la rétine interne (Rossignol et al., 2014) illustré par les anomalies de l'onde b de l'ERG des rétines du modèle murin *Fmr1* KO. L'augmentation du paramètre *n* indique une plus forte augmentation de la réponse de la rétine pour une augmentation de l'intensité du signal lumineux donnée. Cette augmentation peut donc s'interpréter comme une altération de la sensibilité au contraste des rétines en absence de protéine FMRP.

**Peu d'organes sensoriels « périphériques », dans le sens anatomique du terme, ont été étudiés jusqu'à présent en conditions d'absence de protéine FMRP. Les altérations montrées ici dans la rétine de la souris *Fmr1* KO apportent un tout nouveau point de vue quant à l'attribution uniquement cérébrale des altérations visuelles constatées chez le patient. L'organe même de la perception lumineuse est altéré en absence de protéine FMRP, présentant des anomalies moléculaires et cellulaires comparables à celles connues au niveau cérébral, ce qui concourt à la genèse de signaux électriques altérés. Par conséquent, en conditions FXS, l'information sensorielle est déjà altérée en elle-même, avant d'atteindre les structures cérébrales du système visuel qui effectueront à leur tour une intégration défectueuse de cette information.**

## Partie 6 : Objectifs de la thèse

De nombreux indices comportementaux mettent en évidence l'existence des troubles sensoriels, de divers ordres et de diverses intensités, chez les patients atteints du syndrome de l'X fragile. Ce phénotype sensoriel affecte cependant l'intégralité des patients, ce qui en fait un symptôme clinique majeur de la pathologie. Toutefois, l'étude de ces altérations est encore récente, et demeure parcellaire. En particulier, quelques études ont démontré l'existence de troubles visuels chez les patients atteints du FXS, caractérisés par des anomalies de compréhension des contrastes, textures et mouvements. Les praticiens ont souvent associé ces troubles à un défaut d'attention des patients, mais aussi aux anomalies cellulaires décrites précédemment dans le cortex visuel et le LGN des patients (Irwin et al., 2001; Kogan et al., 2004b).

Toutefois, la composante cérébrale du système visuel ne saurait fonctionner sans l'apport de la composante « périphérique », jouant un rôle central dans la perception lumineuse : la rétine. Il a été démontré récemment que la rétine exprime elle aussi la protéine FMRP en conditions physiologiques, et, par conséquent, connaît des altérations en cas d'absence de la protéine FMRP (Rossignol et al., 2014). En effet, l'étude des rétines de la souris *Fmr1* KO, modèle murin validé du syndrome de l'X fragile, a démontré des altérations moléculaires et cellulaires, induisant des anomalies significatives de la fonctionnalité rétinienne chez les animaux à l'âge adulte. Ces travaux, pionniers, ont été réalisés au laboratoire, et ont ouvert de nouvelles perspectives quant à la compréhension du phénotype visuel du syndrome de l'X fragile, et remettent en perspective la participation non négligeable des composantes « périphériques » des systèmes sensoriels.

Cette thèse s'inscrit dans la **poursuite de la description du phénotype visuel et l'extension des connaissances du phénotype rétinien en absence de protéine FMRP, ainsi que l'étude de la part d'implication de ce phénotype rétinien dans les phénotype visuel et global du syndrome de l'X fragile.**

Schématiquement, le travail de cette thèse a suivi deux axes majeurs. **Le premier axe tend à approfondir les connaissances du phénotype visuel en absence de protéine FMRP, en poursuivant l'étude du modèle murin *Fmr1* KO.** L'existence d'un phénotype rétinien a été démontrée pour la première fois chez ce modèle animal à l'âge adulte (Rossignol et al., 2014). Les perturbations rétiniennes concourent à l'émission de signaux visuels altérés en direction des aires cérébrales intégratives. Ainsi, le phénotype visuel est problématique « en soi », de par l'impact qu'il a sur les signaux visuels encodés. Mais la rétine a aussi un rôle à jouer dans la maturation et la mise en place du système visuel d'une manière plus large. En effet, il a été démontré que l'ouverture des yeux est un phénomène clé dans la maturation des aires visuelles cérébrales (Yoshii et al., 2003; Gandhi et al., 2005). Ainsi, le phénotype rétinien devient d'autant plus problématique qu'il met en jeu l'établissement d'un bon fonctionnement des structures en

aval dans la chaîne de l'intégration visuelle. La question du schéma temporel suivi par les anomalies rétiniennes causées par l'absence de FMRP revêt alors toute son importance : leur âge d'apparition et leur évolution au cours du temps peuvent impacter l'ensemble du système visuel. C'est pourquoi **une première partie de ce premier axe de recherche s'est consacrée à l'étude de l'âge d'apparition du phénotype rétinien de la souris *Fmr1* KO ainsi qu'à son évolution jusqu'à l'âge adulte.** Pour ce faire, la rétine de souris *Fmr1* KO a été étudiée à différentes échelles (moléculaire, cellulaire et fonctionnelle) de la naissance jusqu'à l'âge adulte (6 mois) de ces animaux. Nous avons mis en évidence la mise en place précoce du phénotype rétinien, établi dès la naissance de l'individu, et sa stabilité dans le temps.

La rétine présente donc un phénotype solide, précoce et stable en absence de la protéine FMRP. A ces anomalies « périphériques » viennent s'ajouter les altérations des structures visuelles cérébrales « centrales » (Irwin et al., 2000; Kogan et al., 2004b; Kay et al., 2018). Par conséquent, l'ensemble compose un système visuel perturbé de ses premières cellules perceptrices jusqu'à ses dernières cellules intégratives. Cela concourt très probablement à des altérations des capacités visuelles de l'individu. Or peu d'études se sont jusqu'à présent attelées à la description des anomalies visuelles connues par les patients atteints du syndrome de l'X fragile (Kogan et al., 2004a; Farzin et al., 2008), donnant quelques caractéristiques des traits visuels altérés chez ces patients. Cependant, à ce jour, la souris *Fmr1* KO n'a jamais été investiguée sur les aspects de compétences visuelles. Pourtant, la vision est un sens clé de l'exploration spatiale, de l'apprentissage et du comportement social, et il est tout à fait envisageable que des altérations des capacités visuelles participent au phénotype global du FXS. C'est pourquoi **la deuxième partie de ce premier axe de recherche a été dédiée à la description des capacités visuelles de la souris *Fmr1* KO.** Cette étude utilise naturellement une approche comportementale, et vise à étudier différents traits qui caractérisent les compétences visuelles : la perception de la profondeur, des contrastes et des mouvements. Pour ce faire, des tests comportementaux permettant d'évaluer ces capacités visuelles ont été mis au point et employés au laboratoire. Afin de ne pas biaiser la réalisation de ces tests par la souris *Fmr1* KO, qui présente des troubles cognitifs, nous avons mis en œuvre des tâches impliquant exclusivement des réflexes et instincts de la souris qui illustreront des capacités de perception visuelle sans nécessiter d'analyse, de mémorisation ou de réflexion. L'utilisation de telles tâches nous a permis de démontrer que la souris *Fmr1* KO présente de claires altérations de ses capacités visuelles, de son plus jeune âge jusqu'à l'âge adulte. En parallèle, nous avons clairement établi que la vision des formes et des contrastes participe à la réalisation d'un test comportemental couramment employé pour mettre en évidence des altérations cognitives chez le rongeur. Certes, les tests comportementaux visuels employés ici ne permettent pas de déterminer de manière précise les structures du système visuel à l'origine des altérations visuelles. Mais il est indéniable que tant le phénotype rétinien que le phénotype cérébral de la souris *Fmr1* KO participent à l'existence du phénotype comportemental visuel que nous décrivons.

Ce dernier aspect fait l'objet du **second axe de recherche de ma thèse**. En absence de la protéine FMRP, tant la composante rétinienne que la composante cérébrale du système visuel présentent des anomalies moléculaires, cellulaires et fonctionnelles, et l'alliance de ces phénotypes rétinien et cérébral concourent à des perturbations comportementales visuelles. Cependant, il est à ce jour impossible de déterminer avec précision quelle part du phénotype comportemental visuel est causée par le phénotype rétinien, et quelle part l'est par le phénotype cérébral. **L'objectif de ce second axe de recherche est ainsi de déterminer quelle est la part de l'implication du phénotype rétinien dans le phénotype visuel, et global, du syndrome de l'X fragile.** Cependant, cette étude ne peut être réalisée avec le modèle *Fmr1* KO : chez cet animal, l'absence d'expression du gène *Fmr1* est constitutive dans l'intégralité des cellules de l'organisme, et donc *a fortiori* dans les composantes rétiniennes et cérébrales du système visuel. Il faudrait alors dichotomiser le système visuel en 2 composantes distinctes, et induire de manière spécifique la mise en silence du gène *Fmr1*. Il s'agit donc de créer un nouveau modèle animal, dit « tissu-spécifique », dont seule la composante rétinienne est affectée par la mise en silence du gène *Fmr1*. Ce nouveau modèle permettrait alors d'étudier l'ensemble des conséquences de l'absence rétinienne de la protéine FMRP. Aucun animal modèle de ce genre n'existe actuellement. Une stratégie a donc été mise au point et réalisée au laboratoire afin de créer un modèle « FXS-rétine-spécifique ». Pour ce faire, un croisement entre deux lignées murines génétiquement modifiées a été réalisé, afin d'induire une recombinaison spécifiquement rétinienne du gène *Fmr1*. Le travail a ensuite consisté à valider le modèle, caractériser ses composantes visuelles d'un point de vue moléculaire, cellulaire et fonctionnel, et enfin de l'étudier, c'est-à-dire mettre en évidence des altérations comportementales visuelles et globales. Ce second axe de recherche s'est révélé plus ardu qu'imaginé, la stratégie choisie ayant fourni un modèle animal ambigu et non conforme aux attentes, mais soulevant de nouvelles interrogations.

Ainsi, **schématiquement, l'ensemble du travail est réparti en 3 projets. La suite du manuscrit s'attachera à présenter plus en détails chacun de ces projets, leur mise en œuvre, et leurs résultats.** Les deux premiers projets, correspondant au premier axe de recherche, ont fait l'objet de deux articles scientifiques, publiés dans des journaux internationaux de rang A. Ainsi, l'étude 1 et l'étude 2 seront sous forme de publications scientifiques, associées chacune à un résumé des objectifs, stratégie expérimentale et résultats obtenus. L'étude 3, non publiée, sera présentée sous forme d'un rapport.

# Chapitre 2

## Résultats

## Etude 1 – Quel est le schéma temporel suivi par les altérations rétinienne conséquences de l'absence de FMRP ?

*Travaux publiés dans Frontiers in Cellular Neuroscience le 6 avril 2018*

### 1.1 Objectifs de l'étude

L'absence totale d'étude sur les conséquences éventuelles de l'absence de la protéine FMRP au niveau rétinien a tout d'abord conduit l'équipe du laboratoire à réaliser un état des lieux des altérations connues par la rétine quand celle-ci est dépourvue de FMRP. Les travaux de Rossignol et collaborateurs ont ainsi révélé, comme décrit précédemment, que la rétine des souris *Fmr1* KO adultes présente des anomalies dans son contenu protéique et dans l'état de maturation de ses neurones, induisant par conséquent des anomalies de la fonctionnalité rétinienne illustrées par une électrophysiologie altérée (Rossignol et al., 2014). Ces altérations sont cohérentes avec le rôle connu de la protéine FMRP, impliquée notamment dans la traduction protéique et les mécanismes de maturation des cellules neuronales. De manière similaire à ce qui avait été observé au niveau cérébral, chez les animaux *Fmr1* KO ainsi que chez les patients, l'absence de protéine FMRP se traduit par des défauts de maturation des épines dendritiques et donc par des dysfonctions des circuits neuronaux causées par des altérations des connexions synaptiques. La rétine étant un tissu sensoriel partageant la même origine embryonnaire que les aires cérébrales et faisant donc partie intégrante du système nerveux central (Kaneko, 1979), les anomalies observées au niveau rétinien en absence de protéine FMRP sont parfaitement logiques dans leur similarité avec celles constatées précédemment au niveau cérébral.

La rétine des animaux *Fmr1* KO montre des altérations à l'âge adulte, ici à 6 mois. **Les questions qui découlent de ce travail pionnier concernent le schéma temporel suivi par ces anomalies rétiniennes.** Tout d'abord en ce qui concerne **le point de départ, la mise en place** de ces anomalies : A quel âge ces anomalies apparaissent-elles ? Le sont-elles de manière simultanée ? Existe-t-il des étapes, des stades de la vie de l'animal qui voient la mise en place des altérations rétiniennes en absence de FMRP ? Mais également en ce qui concerne **l'évolution** du phénotype rétinien en absence de FMRP : Les différentes anomalies évoluent-elles au cours de la vie de l'animal ? Dans quelle(s) direction(s) ?

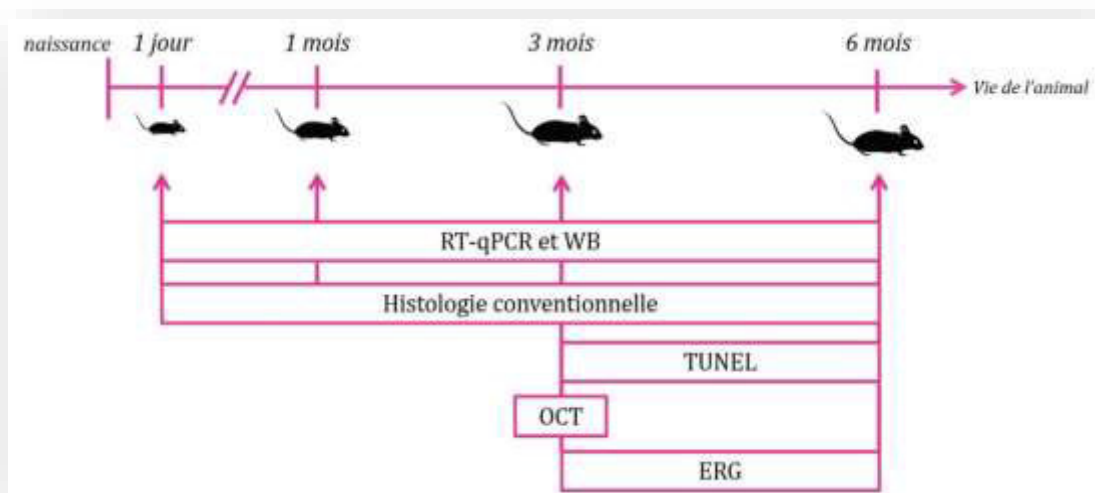
Ces interrogations sont cruciales dans la compréhension des mécanismes sous-jacents de la mise en place des altérations rétiniennes. Les réponses permettront de savoir si ces anomalies sont constitutives et dues à l'absence locale de FMRP, ou bien si elles sont influencées par des facteurs extérieurs, comme la lumière, ou des interactions avec d'autres systèmes défaillants en absence de la protéine FMRP. **Ainsi, en plus de l'approfondissement des connaissances sur le phénotype rétinien, l'exploration du**



**schéma temporel des anomalies rétiniennes de la souris *Fmr1* KO apportera des informations sur les potentiels liens de cause-conséquence existant entre les anomalies dues à l'absence de la protéine FMRP.**

## 1.2 Stratégie expérimentale

Le travail réalisé ici consiste à investiguer les anomalies rétiniennes mises en évidence lors de la toute première étude menée sur les souris *Fmr1* KO (Rossignol et al., 2014), de la naissance des animaux jusqu'à leur âge adulte. Pour cela, nous avons étudié différents plans. Au niveau **moléculaire**, nous avons analysé le contenu rétinien en protéines en nous focalisant sur 2 protéines d'intérêt, à savoir la rhodopsine et PSD95, ainsi que le contenu en ARNm codant pour ces protéines. Nous avons choisi ces deux protéines comme illustrations des grandes fonctions rétiniennes : la rhodopsine est la protéine clé de la capture des signaux lumineux par les photorécepteurs, et PSD95 est une protéine de structure et de fonction synaptique, connue pour être dérégulée au niveau cérébral en absence de FMRP (Zalfa et al., 2007; Zhu et al., 2011; Westmark, 2013; Rossignol et al., 2014). Ensuite, au niveau **tissulaire**, nous avons analysé la viabilité cellulaire en appliquant une technique TUNEL afin de mettre en évidence les cellules apoptotiques sur des coupes *ex vivo* de rétines. Nous avons également étudié l'épaisseur des couches cellulaires, ainsi que le nombre de noyaux contenus dans les couches nucléaires, par histologie conventionnelle sur des coupes de rétines *ex vivo*. Les résultats obtenus ont pu être confirmés par imagerie *in vivo* grâce à une technique de tomographie par cohérence optique (OCT). Enfin, la **fonctionnalité** rétinienne a été analysée par enregistrement d'ERG. **L'ensemble de ces expériences a été réalisé sur des animaux de 1 jour, 1 mois, 3 mois et 6 mois, dès que techniquement possible.** Seule l'OCT n'a été effectuée qu'à 3 mois.



**Figure 49 : Architecture du plan expérimental mis en place pour la première étude.**

OCT : tomographie par cohérence optique ; ERG : électrorétinogramme ; RT-qPCR : PCR quantitative en temps réel ; WB : western blot ; TUNEL : détection des phénomènes d'apoptose.

### 1.3 Résultats et conclusions de l'étude

Notre étude a démontré que **le phénotype rétinien de la souris *Fmr1* KO est précoce et stable dans le temps**. Il est présent dès la naissance de l'animal, et perdure sans évolution majeure jusqu'à l'âge adulte. De plus, il se caractérise par une diminution globale de la performance fournie par la rétine vers la partie cérébrale du système visuel. Le fait que le phénotype soit mis en place à la naissance pour ne plus évoluer par la suite renseigne sur le caractère constitutif de ce phénotype. Il n'est pas modifié par l'expérience visuelle vécue par l'animal après l'ouverture des yeux, ni par l'influence éventuelle d'une autre structure altérée en absence de la protéine FMRP. La présence des anomalies moléculaires dès la naissance appuie fortement l'hypothèse que l'ensemble des altérations cellulaires et fonctionnelles rétiniennes décrites à l'âge adulte est lui aussi en place à la naissance. Cela n'a malheureusement pas pu être clairement observé pour des raisons de limitations techniques, mais de nombreux indices l'indiquent. Enfin, l'ouverture des yeux étant un phénomène clé dans la maturation des aires visuelles cérébrales (Yoshii et al., 2003; Lu and Constantine-Paton, 2004; Gandhi et al., 2005; Zhao et al., 2013), **nous pouvons supposer que la présence du phénotype rétinien avant même l'ouverture des yeux impacte les mécanismes de synaptogénèse cruciaux pour la maturation cérébrale.**



# Early Retinal Defects in *Fmr1*<sup>-/-</sup> Mice: Toward a Critical Role of Visual Dys-Sensitivity in the Fragile X Syndrome Phenotype?

Olivier Perche<sup>1,2,3\*†</sup>, Chloé Felgerolle<sup>2,3†</sup>, Maryvonne Ardourel<sup>2,3</sup>, Audrey Bazinet<sup>2,3</sup>, Arnaud Pâris<sup>2,3</sup>, Rafaëlle Rossignol<sup>2,3</sup>, Géraldine Meyer-Dilhet<sup>2,3</sup>, Anne-Laure Mausset-Bonnefont<sup>4</sup>, Betty Hébert<sup>2,3</sup>, David Laurenceau<sup>1</sup>, Céline Montécot-Dubourg<sup>2,3</sup>, Arnaud Menuet<sup>2,3</sup>, Jean-Charles Bizot<sup>5</sup>, Jacques Pichon<sup>2,3</sup>, Isabelle Ranchon-Cole<sup>6</sup> and Sylvain Briault<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Genetic Department, Centre Hospitalier Régional d'Orléans, Orléans, France, <sup>2</sup>UMR7355, Immunologie et Neurogénétique Expérimentales et Moléculaires (INEM), Centre National de la Recherche Scientifique, Orléans, France, <sup>3</sup>Experimental and Molecular Immunology and Neurogenetics, University of Orléans, Orléans, France, <sup>4</sup>IRMB, University of Montpellier, INSERM, Montpellier, France, <sup>5</sup>KeyObs, CRO Pharmacology, Orléans, France, <sup>6</sup>Laboratory of Sensorial Biophysical, INSERM UMR1107 Equipe Biophysique Neurosensorielle, University of Clermont 1, Clermont-Ferrand, France

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Tommaso Pizzorusso,  
Consiglio Nazionale delle Ricerche  
(CNR), Italy

### Reviewed by:

Enrica Strettoi,  
Istituto di Neuroscienze (CNR), Italy  
Benjamin D. Philpot,  
University of North Carolina at Chapel  
Hill, United States

### \*Correspondence:

Olivier Perche  
operche@cnr-orleans.fr

<sup>†</sup>Co-first authors.

**Received:** 24 November 2017

**Accepted:** 22 March 2018

**Published:** 06 April 2018

### Citation:

Perche O, Felgerolle C, Ardourel M, Bazinet A, Pâris A, Rossignol R, Meyer-Dilhet G, Mausset-Bonnefont A-L, Hébert B, Laurenceau D, Montécot-Dubourg C, Menuet A, Bizot J-C, Pichon J, Ranchon-Cole I and Briault S (2018) Early Retinal Defects in *Fmr1*<sup>-/-</sup> Mice: Toward a Critical Role of Visual Dys-Sensitivity in the Fragile X Syndrome Phenotype? *Front. Cell. Neurosci.* 12:96. doi: 10.3389/fncel.2018.00096

Fragile X Syndrome (FXS) is caused by a deficiency in Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP) leading to global sensorial abnormalities, among which visual defects represent a critical part. These visual defects are associated with cerebral neuron immaturity especially in the primary visual cortex. However, we recently demonstrated that retinas of adult *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice, the FXS murine model, present molecular, cellular and functional alterations. However, no data are currently available on the evolution pattern of such defects. As retinal stimulation through Eye Opening (EO) is a crucial signal for the cerebral visual system maturation, we questioned the precocity of molecular and functional retinal phenotype. To answer this question, we studied the retinal molecular phenotype of *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice before EO until adult age and the consequences of the retinal loss of Fmrp on retinal function in young and adult mice. We showed that retinal molecular defects are present before EO and remain stable at adult age, leading to electrophysiological impairments without any underlying structural changes. We underlined that loss of Fmrp leads to a wide range of defects in the retina, settled even before EO. Our work demonstrates a critical role of the sensorial dysfunction in the *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice overall phenotype, and provides evidence that altered peripheral perception is a component of the sensory processing defect in FXS conditions.

**Keywords:** Fragile X syndrome, Fmrp, vision, sensorial dys-sensitivity, peripheral nervous system

## INTRODUCTION

Loss of Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP) induces alterations of neuronal synapses either in their structure or in their functions (Irwin et al., 2000; Nimchinsky et al., 2001) and thus leads to the human condition known as the Fragile X Syndrome (FXS). This neuropsychiatric pathology is the most common form of inherited intellectual and behavioral disabilities associated with hypersensitivity to sensory stimuli (Penagarikano et al., 2007; Hagerman and Hagerman, 2015). Indeed, the direct clinical observation

of children with FXS led clinicians to suggest the existence of sensorial disturbance. Early in life these children have a strong aversion for tactile contact, an increased sensitivity to noises and an over-sensitivity to light or face recognition defect (Wolff et al., 1989; Lachiewicz et al., 1994; Merenstein et al., 1996).

Concerning vision, it has been shown that visual signal integration is particularly affected in FXS patients, with alteration of spatiotemporal visual processing, reduction of contrast sensitivity for visual stimuli presented at high temporal frequencies, and visual sensitivity for both static (texture difference) and moving images (Kogan et al., 2008; Farzin et al., 2011). These visual defects are associated with cerebral neuron immaturity (Irwin et al., 2000; Bilousova et al., 2009) especially in the primary visual cortex (Berman et al., 2012). However, we recently demonstrated that, in mice, *Fmrp* is also expressed in the retina, the visual nervous peripheral system (Rossignol et al., 2014), which is the first structure responsible for light transduction. Moreover, in collaboration with Guimarães-Souza et al. (2016) we showed that the *Fmrp* retinal content is regulated by light exposure. In the same way, investigations on drosophila's retinas demonstrated a key role of *Fmrp* in Rhodopsin regulation (Wang et al., 2017). As Rhodopsin is the light sensor of photoreceptor cells, these studies highlighted the leading role of *Fmrp* in retinal function. All these reports are in line with our previous investigation demonstrating the retinal impact of *Fmrp* absence in the *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice (Rossignol et al., 2014), the murine model of FXS (Bakker et al., 1994). In 6 month-old mice, we demonstrated significant abnormalities in the signal transmission between photoreceptors and the inner retina, measured by electroretinogram (ERG) technique, associated to protein defects, such as Rhodopsin and PSD95, and cellular alterations in the retina (Rossignol et al., 2014). Therefore absence of *Fmrp* seems to lead to an overall visual defect starting from the perception of light by the neural retina to cerebral visual areas as showed in FXS patients (Kogan et al., 2008; Farzin et al., 2011). However, no data are currently available on the chronological evolution pattern of such defects. This is even more interesting since, under physiological conditions, the starting point of cerebral visual system maturation is the retinal light sensing by Rhodopsin occurring during Eye Opening (EO; Gandhi et al., 2008), which ends up in a massive synaptogenesis in the primary visual cortex (Blue and Parnavelas, 1983; Gandhi et al., 2005). We could therefore hypothesize that any retinal alterations occurring before EO should lead to visual cortical immaturity. Since adult *Fmr1*<sup>-/-</sup> retinas present alterations, we investigated the chronological order of this defect especially before EO by exploring molecular, structural and functional features before EO and in young and adult *Fmr1*<sup>-/-</sup> retinas.

We highlighted for the first time that in *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice retinal molecular phenotype due to loss of *Fmrp* is present before EO with consequences on retinal function in young and adult mice. Our work suggests a critical role of the sensorial peripheral dysfunction in the *Fmr1*<sup>-/-</sup> overall phenotype, and provides evidence that altered peripheral perception is a component of the sensory processing defect in FXS conditions. Thus, peripheral sensorial dys-sensitivity might lead to a misconception of the

environment, and therefore might contribute to the exacerbation of the behavioral phenotype of FXS.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

*Fmr1*<sup>-/-</sup> males and their wild-type (WT) littermates were generated by breeding heterozygous *Fmr1*<sup>+/-</sup> females with C57BL/6J background WT males. Mice were weaned at 21 days of age and group-housed with their same-sex littermates. On the same day, tail samples were collected for DNA extraction and for subsequent PCR assessment of genotypes as previously described (Bakker et al., 1994). Food and water were provided *ad libitum*. Animals were maintained under temperature (22°C) and humidity (55%) controlled conditions with a 12:12 h dim light–dark cycle (25 lux, lights on at 7 a.m.). All animal experimental protocols were reviewed by the “Ethics Committee for Animal Experimentation of CNRS Campus Orleans” (CCO N°3) and approved by the French National Committee of Ethical Reflexion for Animal Experimentation, under N° CLE CCO 1100.

### Experimental Design

*Fmr1*<sup>-/-</sup> mice male mice were investigated before and after the EO. The 1 day post-natal (1 DPN) time (day 1 postpartum), immediately after birth, was chosen since it covers the final stages of glial and neuronal proliferation and migration, axonal migration and synaptogenesis in the retina (Dorrell et al., 2004) without light experience. After EO, young (1 month-old) and adult (3 and 6 month-old) mice were selected since they fully express the *Fmr1*<sup>-/-</sup> phenotypes (McNaughton et al., 2008; Hébert et al., 2014; Gauducheau et al., 2017). Therefore, different groups of animals were investigated: a first group of animals was used for functional (see “*Electroretinography—ERG*” section), histological (see “*Retinal*” section) and apoptotic cell (see “*TUNEL Assays*” section) analysis. Among these mice, one part was sacrificed at 1 month of age (WT *n* = 10; *Fmr1*<sup>-/-</sup> *n* = 10). Remaining mice were sacrificed at 3 months of age (WT *n* = 10; *Fmr1*<sup>-/-</sup> *n* = 10) and at 6 months of age (WT *n* = 10; *Fmr1*<sup>-/-</sup> *n* = 10) after electroretinography. A second group of animals was used for *in vivo* investigation of retinal structures by OCT (see “*Optical Coherence Tomography—OCT*” section) at 3 months of age (WT *n* = 10; *Fmr1*<sup>-/-</sup> *n* = 10). A third group of animals was used to evaluate the time pattern of retinal defects through molecular analysis by Western blot and qRT-PCR. They underwent molecular analysis (see “*Western-Blotting and Quantitative RT-PCR*” sections) before EO at 1DPN (WT *n* = 13; *Fmr1*<sup>-/-</sup> *n* = 13), and at 1, 3 and 6 months of age (WT *n* = 13; *Fmr1*<sup>-/-</sup> *n* = 13 for each age). Part of the 1 DPN sacrificed animals were also used for histological analysis (WT *n* = 2; *Fmr1*<sup>-/-</sup> *n* = 2; see “*Retinal*” section).

### In Vivo Electroretinography (ERG)

After overnight dark adaptation, animals were anesthetized with ketamine (50 mg/kg) and xylazine (2 mg/kg). Eye drops were used to dilate the pupil (Atropine sulfate 1%, ALCON). Mice were placed on a temperature-regulated heating pad throughout

the recording session. ERGs were recorded using two Ag/AgCl electrodes, one in contact with the corneal surface and one placed on the tongue. A copper reference screen under the animal was used as reference. Strobe flashes (10  $\mu$ s) were presented through an integrating sphere (Labsphere, France) that mimics a Ganzfeld and allows to illuminate uniformly the whole retina. ERGs were recorded using increasing luminance from  $-3.47$  to  $+0.46$  log cd s/m<sup>2</sup>. Conversely, the duration of the interstimulus interval was 30 s since this interval had been shown to be sufficient for a flash not to alter the next flash response. Responses were differentially amplified (0.3–10,000 Hz), averaged, and stored. Intensity–response functions were obtained in a single session. At the end of the session, Oscillatory Potentials (OPs) are recorded by switching the amplifier to 100–300 Hz.

### ERG Analysis

Typically, an ERG (Figures 1Ai,Bi) is characterized by a negative deflection termed the a-wave, which is initiated by the activity of light-sensitive photoreceptor cells. The following positive deflection, termed the b-wave, reflects signal transmission to the inner retina, mainly due to light-induced activity of bipolar cells but also due to Müller cells involvement (Dong and Hare, 2000; Frischman, 2006). The small ripples on the ascending part of the b-wave, called OPs, involve multiple components, presumably including outer and inner retinal circuitry (Frischman, 2006).

The leading edge of the a-waves obtained in response to the highest-intensity stimuli (2.88 cd.s.m<sup>-2</sup>) was analyzed with a modified form of the Lamb–Pugh model of rod phototransduction (Granit, 1933; Lamb and Pugh, 1992) equation:  $P3 = \{1 - \exp[-S_A(t - t_d)^2]\} A_{max}$  where P3 represents the massed response of the rod photoreceptors and is analogous to the PIII component of Granit (Granit, 1933). The amplitude of P3 is expressed as a function of flash energy ( $i$ ) and time ( $t$ ) after flash onset.  $S_A$  is the gain of phototransduction,  $A_{max}$  is the maximum response, and  $t_d$  is a brief delay.

For each stimulus luminance, the b-wave amplitude was calculated from the minimum of the a-wave to the maximum of the b-wave. Intensity–response function of the b-wave amplitude (Figure 1Aii) was fitted with the Naka–Rushton equation:  $B/B_{max} = I^n / (I^n + K^n)$  where  $I$  is the stimulus luminance of the flash,  $B$  is the b-wave amplitude of ERG at  $I$  luminance,  $B_{max}$  is the maximal b-wave amplitude,  $K$  is the half-saturation constant corresponding to retinal sensitivity and  $n$  is a dimensionless constant controlling the slope of the function.

$B_{max}/A_{max}$  ratio was calculated with  $B_{max}$  and  $A_{max}$  values obtained at the highest-intensity stimuli (2.88 cd.s.m<sup>-2</sup>).

OP (OP1 to OP4) amplitudes (Figure 1Bii) are calculated from the baseline to the maximum of the potential.

Latency is the time interval between the stimulation and the peak of the waves.

### Retinal Histology

Retinal histology was done as described previously (Chang et al., 2011; Rossignol et al., 2014). The retinal tissue sections were scanned for evidence of gross defects at 1DPN and at 1, 3 and 6 months old. For the other adult ages, retinal thickness of the total retina (Ret), Outer Nuclear Layer (ONL),

Outer Plexiform Layer (OPL), Inner Nuclear Layer (INL) and Inner Plexiform Layer (IPL) were measured. In each retinal section, the measurement of thickness was made at 0.78 mm and 1.56 mm from the optic nerve to the inferior and to the superior *ora serrata*. All these results of measurements were then averaged per experimental groups. All measurements were performed with a Leica microscope ( $\times 40$ , Leica, Paris, France) and the ImageJ image processing program (National Institute of Health).

### Optical Coherence Tomography—OCT

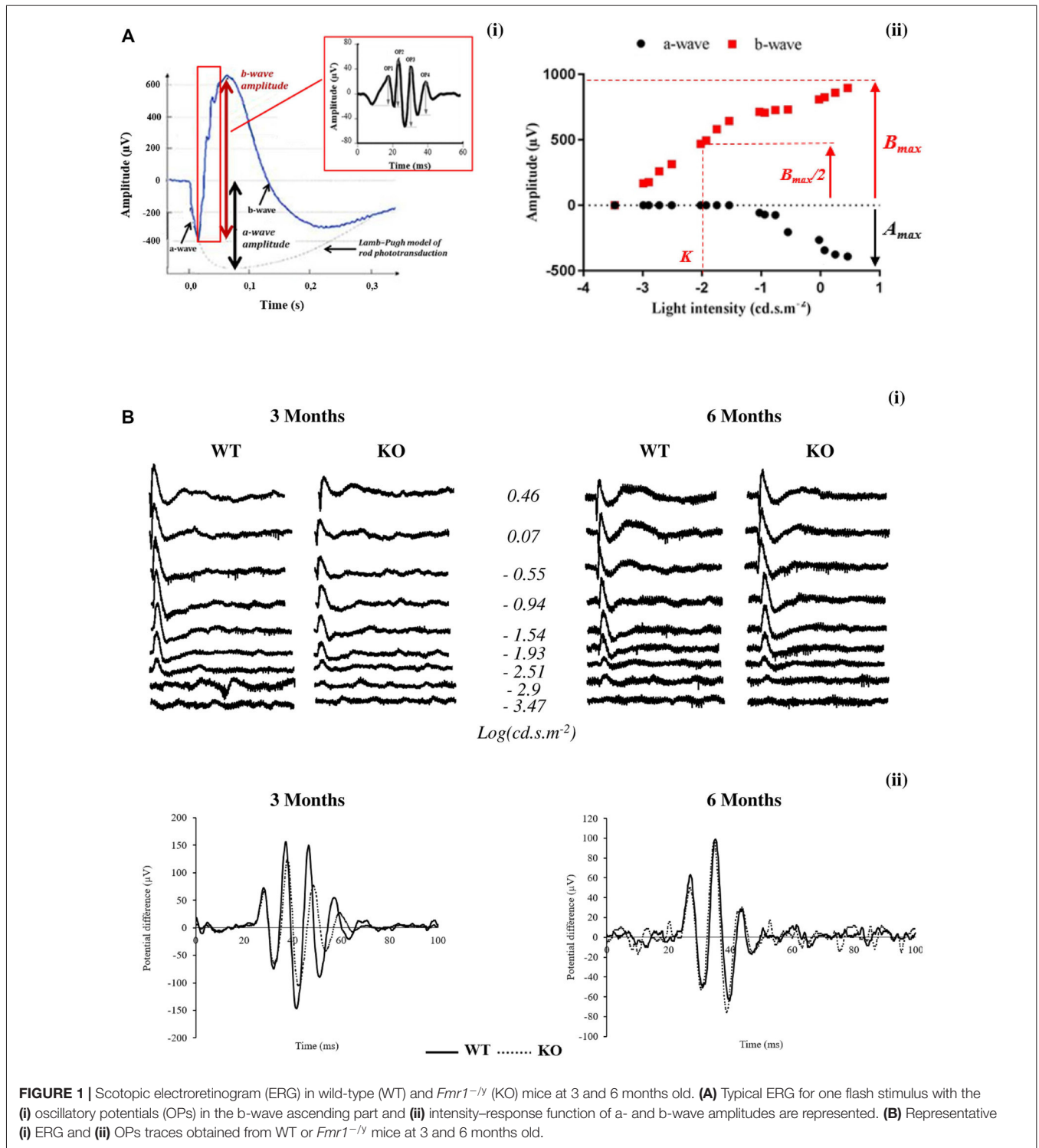
Mice were anesthetized (Ketamine at 20 mg/ml and Xylazine at 1.17 162 mg/ml) and their pupils dilated with 10% phenylephrine and 0.5% tropicamide provided as eye drops (Systane Ultra, Alcon). OCT was performed for mouse retinas with the spectral domain (SD) ophthalmic imaging system as described previously (Jagodzinska et al., 2017). Thickness of retinal layers was measured manually with ImageJ image processing program (National Institute of Health) at 0.3 mm distance from the optic nerve.

### TUNEL Assays

TUNEL assays were conducted with an ApopTag<sup>®</sup> Red *in situ* Apoptosis Detection Kit (S7165, EMD Millipore) following the indicated protocol. Briefly, sections were treated as indicated above, fixed in 1% PFA in PBS pH 7.4, washed in TBS pH 7.4 three times, incubated in equilibration pH buffer (potassium cacodylate; provided in the kit) for 10 min and incubated with terminal deoxynucleotidyl transferase for 60 min at 37°C. After 10 min in stop buffer (provided in the kit), sections were incubated with anti-digoxigenin conjugate overnight at 4°C. After washing in TBS pH 7.4, sections were counterstained with DAPI (10  $\mu$ g/ml, Sigma), mounted in Fluoromount-G (SouthernBiotech) and examined with a fluorescence microscope (Leica, Paris, France). The number of apoptotic cells and number of total nuclei of ONL and INL layers were counted from the optic nerve to the superior left *ora serrata* and from the optic nerve to the superior right *ora serrata*. Light-exposed (24 h, 3500 lux) albinos retinas (3 months old) were used as control (Ctrl, Figure 3C; Perche et al., 2009).

### Western Blotting

Proteins were extracted from mouse whole retinas as described previously (Rossignol et al., 2014). Briefly, the two retinas from the same mouse were homogenized in RIPA buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.6; 1 mM EDTA; 0.15 mM NaCl; 1% Igepal; 0.2% SDS) supplemented with protease cocktail inhibitors (Pierce, Paris, France). Protein concentration was determined in the supernatant by BCA protein assay kit (Pierce, Paris, France). Protein samples (15  $\mu$ g) were run on SDS/PAGE gels (8%–12%, w/v), transferred to a nitrocellulose membrane, and probed with primary antibodies (anti-Fmrp, 1:1000, anti-Rhodopsin, 1:200, anti-PSD95, 1:500) and secondary HRP-antibody (1:4000) purchased from AbCam (Paris, France), Sigma-Aldrich (Illkirch, France) and Phosphosolutions (Cliniscience, France). On the same blots, protein contents were normalized to the amounts of  $\beta$ -actin (mouse anti-beta



Actin antibody; 1:4000; AbCam, Paris, France). Quantification of immunoreactive bands was done using Western Blotting Imager PXi4 (Ozyme, Paris, France). Mean values in each group were expressed as percentage of WT mice. Western-blot were performed three times. Representative results are shown in figures.

### Quantitative RT-PCR

Quantitative RT-PCR was performed using Taqman technologies (Applied technologies) as described previously (Rossignol et al., 2014). Briefly, total RNA was isolated from WT and *Fmr1*<sup>-/-</sup> retinas using Trizol reagent (Ambion, Life Technologies), quantified and reverse transcribed (Superscript

iii reverse transcriptase, Invitrogen, Life Technologies). Real-time PCR reactions were performed in the Mx3005P Agilent (Applied, Life Technologies) with fivefold dilution of cDNA, 200 nM of each Taqman primer using the Expression Master Mix (Applied, Life Technologies). Data were analyzed by  $\Delta\Delta\text{Ct}$  method and normalized to the reference standard RNA 18S. Each measurement was performed three times.

## Statistical Analysis

All results are expressed as mean  $\pm$  SEM. Data analysis was performed using GraphPad Prism 7.00. Statistical analysis was conducted using two-Way ANOVA with age ( $F_a$ ) and genotype ( $F_g$ ) as main factors followed by *post hoc* Tukey's HSD-test when a statistically significant main effect or interaction was detected ( $p < 0.05$ ). For OCT measurements, statistical analysis was conducted using one-Way ANOVA followed by *post hoc* Tukey's HSD. Statistical significance was defined as  $p < 0.05$ . In figures, significant differences between genotypes are noted by \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ , and difference between ages are noted  $^{\$}p < 0.05$ ;  $^{\$\$}p < 0.01$ ;  $^{\$\$\$}p < 0.001$ ;  $^{\$\$\$\$}p < 0.0001$ .

## RESULTS

### Major Retinal Function Alteration in *Fmr1*<sup>-/-</sup> Without Retinal Structural Modification

In order to better understand the retinal function of the *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice, we recorded the electrophysiological response of the retina to light stimulation, called ERG (Figures 1Ai,Bi). For ERG parameters see "In Vivo Electroretinography" section in "Materials and Methods" paragraph. ERGs were recorded at 3 and 6 months of age.

#### A-Wave Investigation

For each ERG recorded at the highest light stimulus, the decreasing part of the a-wave was fitted to calculate the maximal a-wave amplitude ( $A_{\text{max}}$ ), the parameter  $S_A$  reflecting photoreceptor sensitivity and the a-wave latency corresponding to the time between light stimulation and  $A_{\text{max}}$  maximal response.

Regarding the  $A_{\text{max}}$  parameter, the photoreceptor response, no significant interaction between genotype and age were noticed ( $F_{a,g(1,76)} = 2.029$ ,  $p = 0.1584$ ). Moreover, interaction remained stable between 3 and 6 months old in WT ( $-674 \pm 59 \mu\text{V}$  and  $-568 \pm 74 \mu\text{V}$ , respectively) and *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice ( $-368 \pm 60 \mu\text{V}$  and  $-359 \pm 55 \mu\text{V}$ , respectively;  $F_{a(1,76)} = 2.792$ ,  $p = 0.988$ ; Figure 2A). However, *Fmr1*<sup>-/-</sup> retinas had a significantly lower ( $F_{g(1,76)} = 43.59$ ,  $p < 0.0001$ ) photoreceptor response than WT (*post hoc*:  $p < 0.0001$  and  $p = 0.0026$ , respectively). There was no significant variation in a-wave latency irrespectively of age or genotype (data not shown).

No significant interaction between genotype and age was noticed ( $F_{a,g(1,71)} = 0.01687$ ,  $p = 0.8970$ ) for the parameter  $S_A$  reflecting photoreceptor sensitivity. Moreover, interaction was similar between 3 months and 6 months old mice in WT ( $0.0012 \pm 0.0001 \mu\text{V}$  and  $0.0012 \pm 0.0001 \mu\text{V}$ , respectively) or

*Fmr1*<sup>-/-</sup> mice ( $0.0016 \pm 0.0002 \mu\text{V}$  and  $0.0016 \pm 0.0002 \mu\text{V}$ , respectively;  $F_{a(1,71)} = 0.0015$ ,  $p = 9689$ ). In addition, there was no significant variation between *Fmr1*<sup>-/-</sup> and WT mice ( $F_{g(1,71)} = 2.45$ ,  $p = 0.1218$ ). Therefore, *Fmr1*<sup>-/-</sup> retinas did not present alteration of photoreceptor sensitivity to light.

#### B-Wave Investigation

B-wave amplitude was plotted as a function of stimulus luminance to obtain a b-wave sensitivity curve (Figure 1Aii). For each animal, the b-wave sensitivity curve was fitted to calculate the maximal b-wave amplitude ( $B_{\text{max}}$ ) reflecting the maximal retinal response, the half saturation luminance ( $K$ ) reflecting the light intensity generating half  $B_{\text{max}}$ , and the slope of the curve in its linear part ( $n$ ) reflecting the contrast sensitivity of retina.

Regarding the  $B_{\text{max}}$  no significant interaction between genotype and age was noticed ( $F_{a,g(1,76)} = 0.2797$ ,  $p = 0.5984$ ) since it remained stable between 3 months and 6 months old WT ( $952 \pm 40 \mu\text{V}$  and  $853 \pm 33 \mu\text{V}$ , respectively) and *Fmr1*<sup>-/-</sup> ( $720 \pm 62 \mu\text{V}$  and  $659 \pm 35 \mu\text{V}$ , respectively) mice ( $F_{a(1,76)} = 2.783$ ,  $p = 0.0994$ ; Figure 2A). However, *Fmr1*<sup>-/-</sup> retinas had a significantly lower maximal b-wave amplitude at 3 and 6 months of age ( $F_{g(1,76)} = 43.46$ ,  $p < 0.0001$ ; *post hoc*:  $p < 0.0001$  and  $p = 0.0003$ , respectively) compared to WT ones. In addition, irrespectively of age or phenotype b-wave latency was similar (data not shown).

The half saturation luminance ( $K$ ) was not significantly different between 3 months and 6 months old WT ( $-1.93 \pm 0.11$  and  $-2.10 \pm 0.05$ , respectively) or *Fmr1*<sup>-/-</sup> ( $-2.03 \pm 0.17$  and  $-2.01 \pm 0.07$ ) mice ( $F_{ag(1,76)} = 2.537$ ,  $p = 0.1154$ ;  $F_{a(1,76)} = 2.286$ ,  $p = 0.5941$ ). Differences between WT and *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice were not significant ( $F_{g(1,76)} = 0.006$ ,  $p = 0.9372$ ).

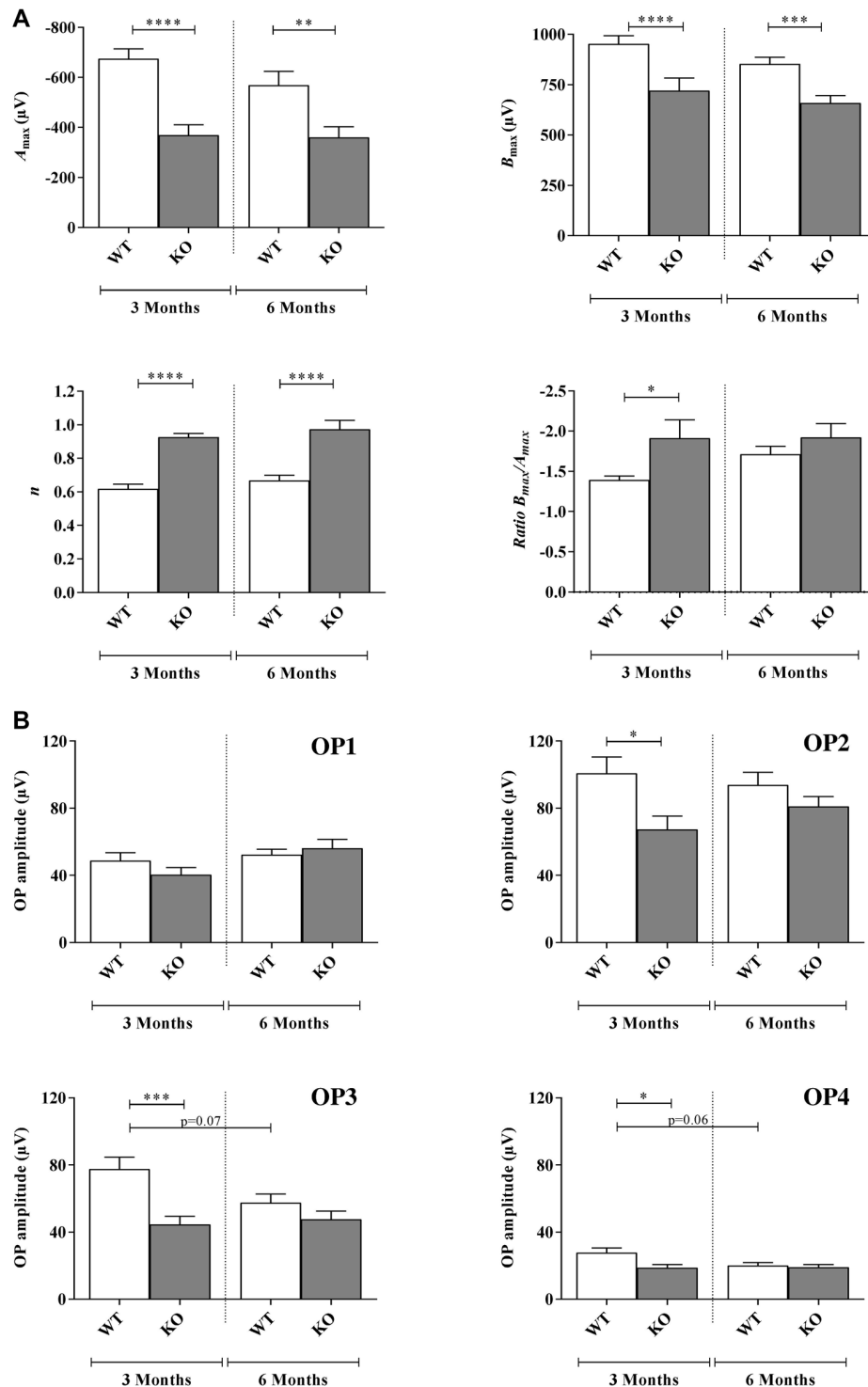
The  $n$  parameter did not significantly change between 3 months and 6 months old WT or *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice ( $F_{ag(1,68)} = 0.002$ ,  $p = 0.9614$ ;  $F_{a(1,76)} = 1.845$ ,  $p = 0.1789$ ; Figure 2A). However, *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice values were significantly higher ( $F_{g(1,76)} = 51.08$ ,  $p < 0.0001$ ) than WT ones at both 3 ( $0.62 \pm 0.02$  WT vs.  $0.92 \pm 0.02$  *Fmr1*<sup>-/-</sup>, *post hoc*:  $p < 0.0001$ ) and 6 months old ( $0.66 \pm 0.02$  WT vs.  $0.97 \pm 0.05$  *Fmr1*<sup>-/-</sup>, *post hoc*:  $p < 0.0001$ ). Therefore, *Fmr1*<sup>-/-</sup> retinas showed a lower contrast sensitivity compared to WT ones.

#### $B_{\text{max}}/A_{\text{max}}$ Ratio Investigation

The  $B_{\text{max}}/A_{\text{max}}$  ratio slightly increased between 3 months and 6 months old in WT retinas ( $-1.39 \pm 0.05$  and  $-1.71 \pm 0.09$ , respectively) but remained stable in *Fmr1*<sup>-/-</sup> retinas ( $-1.91 \pm 0.22$  and  $-1.92 \pm 0.17$ , respectively;  $F_{ag(1,73)} = 2.31$ ,  $p = 0.1329$ ;  $F_{a(1,73)} = 0.4207$ ,  $p = 5186$ ; Figure 2A). However, *Fmr1*<sup>-/-</sup> retinas had a significantly lower ratio at 3 months old compared to WT ( $F_{g(1,73)} = 5.909$ ,  $p = 0.0175$ ; *post hoc*:  $p = 0.0382$ ), but not anymore at 6 months (*post hoc*:  $p = 0.923$ ) due to the WT increase.

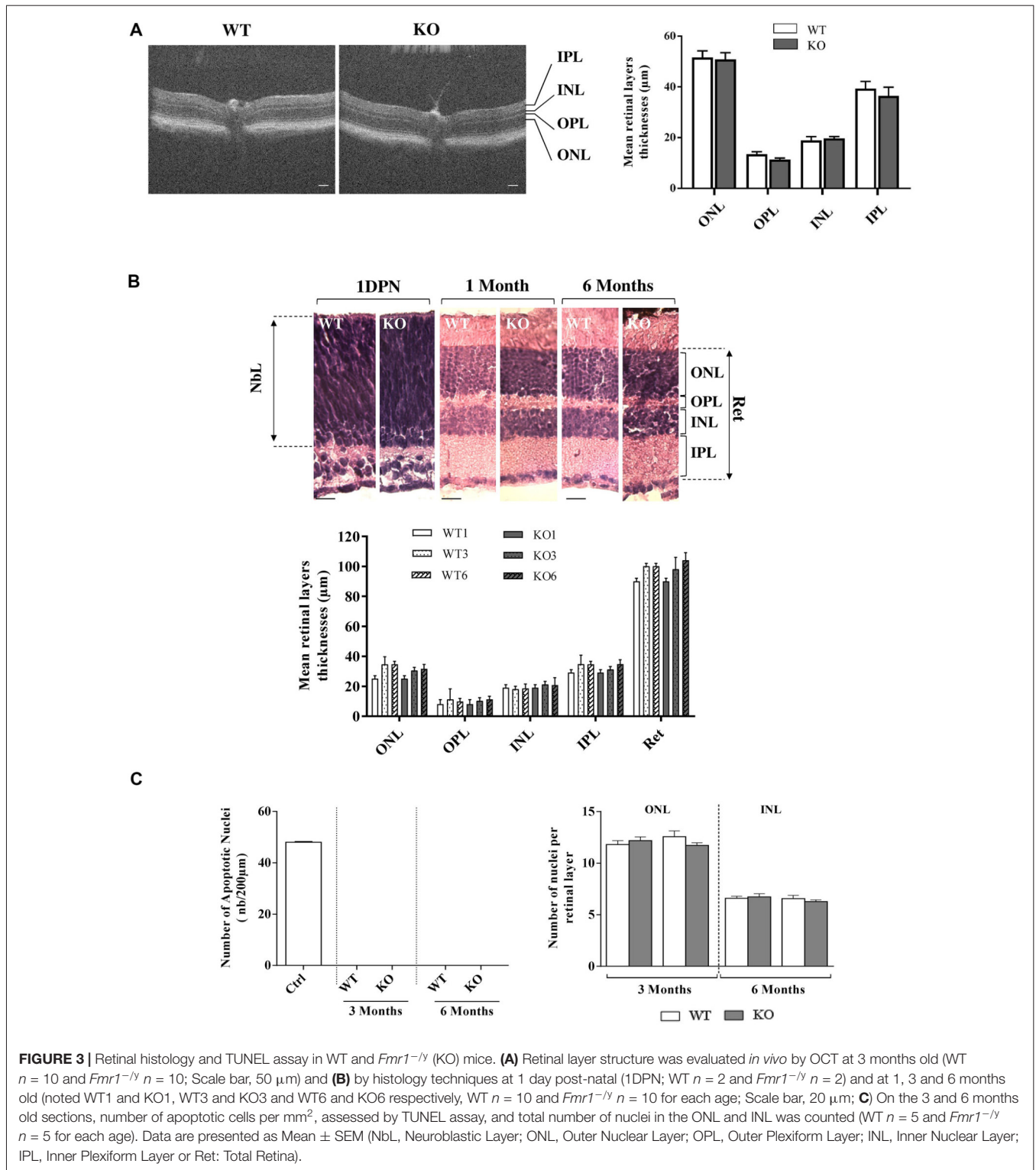
#### Oscillatory Potentials Investigation

Amplitude of the small ripples on ascending part of the b-wave, called OPs (Figure 1Ai), are represented for each age and genotype in Figure 2B. For each OP, no significant interaction between genotype and age was noticed (OP1:  $F_{a,g(1,74)} = 0.3539$ ,



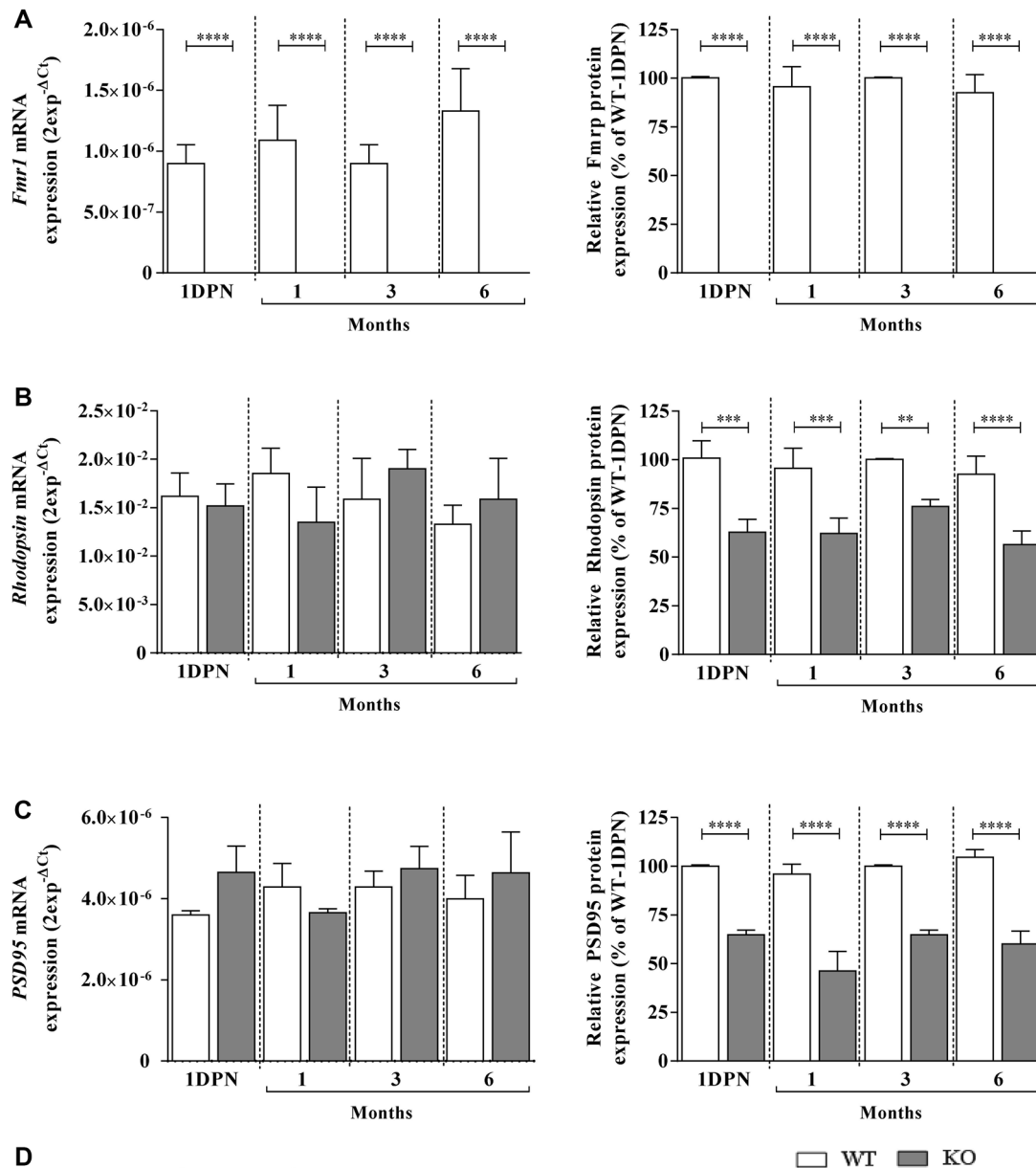
**FIGURE 2 |** Scotopic ERG parameters measured in WT and *Fmr1*<sup>-/-</sup> (KO) mice at 3 and 6 months old. **(A)** Retinal function was assessed by recording ERG (WT *n* = 10 and *Fmr1*<sup>-/-</sup> *n* = 10 for each age). For each typical ERG obtained at light intensity  $-2.88 \log(\text{cd.s.m}^{-2})$ , the decreasing part of the a-wave was fitted to calculate the extrapolated maximal a-wave amplitude ( $A_{max}$ ). From the fitted b-wave sensitivity curve obtained by serial responses to increasing flash stimuli ( $-3.47 \log(\text{cd.s.m}^{-2})$  to  $0.6 \log(\text{cd.s.m}^{-2})$ ) we calculated the saturated b-wave amplitude ( $B_{max}$ ) and the *n* parameter (representing the b-wave sensitivity curves slope). Ratio  $B_{max}/A_{max}$  was also calculated. **(B)** OPs result in the ascending part of the b-wave. OPs were recorded by using a band-pass between 30 Hz and 300 Hz. For each OPs, the amplitude from the baseline to the peak and the latency were calculated. Data are presented as Mean ± SEM. Significant differences between WT and *Fmr1*<sup>-/-</sup> for one age time are noted by \**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01; \*\*\**p* < 0.001; \*\*\*\**p* < 0.0001.





*p* = 0.5537; OP2:  $F_{a,g(1,74)} = 0.1382$ , *p* = 0.2431; OP3:  $F_{a,g(1,82)} = 3.514$ , *p* = 0.0644; OP4:  $F_{a,g(1,80)} = 2.814$ , *p* = 0.0974). Moreover, no effect of age was observed (OP1:  $F_{a(1,82)} = 3.638$ , *p* = 0.0603; OP2:  $F_{a(1,82)} = 0.1451$ , *p* = 0.7043; OP3:  $F_{a(1,823)} = 1.865$ , *p* = 0.1758; OP4:  $F_{a(1,80)} = 0.2470$  *p* = 0.1200)

while a main genotype effect was noticed for OP2, OP3 and OP4 (OP2:  $F_{g(1,74)} = 6.890$ , *p* = 0.0103; OP3:  $F_{g(1,82)} = 11.99$ , *p* = 0.0009; OP4:  $F_{g(1,80)} = 4.536$ , *p* = 0.0363) but not for OP1 (OP1:  $F_{g(1,74)} = 3.638$ , *p* = 0.0603). In WT, OP1 and OP2 amplitudes remained stable between 3 months and 6 months of age



**FIGURE 4 |** Fragile X mental retardation protein (Fmrp), Rhodopsin and PSD95 mRNA and protein expressions in WT and *Fmr1*<sup>-/-</sup> (KO) mice at 1 DPN and 1, 3 and 6 months old. mRNA and protein expressions of (A) Fmrp, (B) Rhodopsin and (C) PSD95 were assessed by qPCR (*n* = 8 per group) and Western-blot (*n* = 5 per group) analysis in WT (white bars) and *Fmr1*<sup>-/-</sup> (gray bars) mice. For qPCR, data are expressed as 2<sup>-ΔCt</sup> values and normalized to 18S RNA internal control. For Western-blot, data are presented as Mean ± SEM in percentage of WT aged of 1 DPN. (D) A representative Western-blot experiment obtained for WT and *Fmr1*<sup>-/-</sup> (KO) mice is presented for each protein at 1 DPN, 1 and 6 months old. Significant differences between groups are noted by \*\**p* < 0.01; \*\*\**p* < 0.001; \*\*\*\**p* < 0.0001.

(OP1: from  $48 \pm 4 \mu\text{V}$  to  $52 \pm 3 \mu\text{V}$ ; OP2: from  $100 \pm 9 \mu\text{V}$  to  $93 \pm 7 \mu\text{V}$ ; **Figure 2B**). However, OP3 and OP4 amplitudes tended to decrease between 3 months and 6 months but the difference was not significant (OP3: from  $77 \pm 7 \mu\text{V}$  to  $57 \pm 5 \mu\text{V}$ , *post hoc*:  $p = 0.0785$ ; OP4: from  $27 \pm 3 \mu\text{V}$  to  $20 \pm 2 \mu\text{V}$ , *post hoc*:  $p = 0.067$ ; **Figure 2B**). In *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice, OP1, OP2, OP3 and OP4 did not significantly vary between 3 months and 6 months (OP1: from  $40 \pm 4 \mu\text{V}$  to  $56 \pm 5 \mu\text{V}$ ,  $p = 0.039$ ; OP2: from  $67 \pm 7 \mu\text{V}$  to  $80 \pm 5 \mu\text{V}$ ; OP3: from  $44 \pm 4 \mu\text{V}$  to  $47 \pm 4 \mu\text{V}$  and OP4: from  $19 \pm 2 \mu\text{V}$  to  $19 \pm 2 \mu\text{V}$ ; **Figure 2B**). However, OP2, OP3 and OP4 were significantly decreased in *Fmr1*<sup>-/-</sup> retinas compared to WT ones at 3 months of age (*post hoc*: OP2:  $p = 0.022$ ; OP3:  $p = 0.0005$ ; OP4:  $p = 0.018$ ) but not anymore at 6 months. The loss of difference is explained by the decrease observed in WT values while *Fmr1*<sup>-/-</sup> ones remained stable between 3 months and 6 months of age. OP latencies were not different between WT and *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice whatever the age (data not shown).

### Retinal Histology

We first investigated *in vivo* retinal structure by OCT technique, measuring layer thickness at 3 months (**Figure 3A**). Whatever was the considered layer (ONL, OPL, INL, IPL), no significant difference in thickness was observed between WT and *Fmr1*<sup>-/-</sup> retinas (ONL:  $p = 0.840$ ; OPL:  $p = 0.111$ , INL:  $p = 0.630$ ; IPL:  $p = 0.531$ ). Then we investigated gross retinal histology throughout ages in WT and *Fmr1*<sup>-/-</sup> retinas by measuring retinal layer thicknesses (**Figure 3B**). These thicknesses were not different between WT and *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice whatever was the age or the considered layer (ONL:  $F_{a,g(2,54)} = 0.279$ ,  $p = 0.757$ ;  $F_{a(2,54)} = 1.205$ ,  $p = 0.307$ ;  $F_{g(2,54)} = 1.066$ ,  $p = 0.306$ –OPL:  $F_{a,g(2,54)} = 0.050$ ,  $p = 0.951$ ;  $F_{a(2,54)} = 0.3621$ ,  $p = 0.697$ ;  $F_{g(2,54)} = 0.002$ ,  $p = 0.962$ –INL:  $F_{a,g(2,54)} = 0.153$ ,  $p = 0.857$ ;  $F_{a(2,54)} = 0.033$ ,  $p = 0.967$ ;  $F_{g(2,54)} = 0.561$ ,  $p = 0.457$ –IPL:  $F_{a,g(2,54)} = 0.224$ ,  $p = 0.799$ ;  $F_{a(2,54)} = 1.671$ ,  $p = 0.197$ ;  $F_{g(2,54)} = 0.210$ ,  $p = 0.648$ –Total Retina (Ret):  $F_{a,g(2,54)} = 0.409$ ,  $p = 0.666$ ;  $F_{a(2,54)} = 0.866$ ,  $p = 0.426$ ;  $F_{g(2,54)} = 0.009$ ,  $p = 0.922$ ). This is consistent with *in vivo* observation. Interestingly, we found that even at the neonatal stage (1DPN) meaning before appearance of ONL and INL from the neuroblastic layer (NBL; Yu et al., 2011), there were no obvious differences in the overall retina structures between WT and *Fmr1*<sup>-/-</sup> (**Figure 3B**). These histological data were reinforced by TUNEL staining showing no apoptotic retinal cells and no significant difference of total nuclei number in ONL ( $F_{a,g(1,55)} = 2.564$ ,  $p = 0.115$ ;  $F_{a(1,55)} = 0.155$ ,  $p = 0.695$ ;  $F_{g(1,55)} = 0.321$ ,  $p = 0.573$ ) and INL ( $F_{a,g(1,55)} = 0.764$ ,  $p = 0.385$ ;  $F_{a(1,55)} = 0.976$ ,  $p = 0.327$ ;  $F_{g(1,55)} = 0.117$ ,  $p = 0.733$ ) layers (**Figure 3C**).

Therefore, ERG parameters showed altered retinal function in *Fmr1*<sup>-/-</sup> compared to WT mice, without any gross retinal structure modifications.

### Early Molecular Impairments in *Fmr1*<sup>-/-</sup> Retinas

In the retina, *Fmrp* was expressed in WT mice from 1 DPN, before EO, to 6 months old without any variation of protein nor

mRNA (**Figure 4A**) expression ( $F_{a,g(3,119)} = 2.076$ ,  $p = 0.1071$ ,  $F_{a,g(3,128)} = 0.3717$ ,  $p = 0.7736$ ;  $F_{a(3,119)} = 2.076$ ,  $p = 0.1071$ ,  $F_{a(3,128)} = 0.4894$ ,  $p = 0.6902$ , respectively). In *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice, *Fmrp* was always absent ( $F_{g(1,119)} = 263.9$ ,  $p < 0.0001$ ,  $F_{g(1,128)} = 1423$ ,  $p < 0.0001$ , respectively; **Figures 4A,D**).

Regarding Rhodopsin and PSD95 mRNA investigations, no age ( $F_{a,g(3,119)} = 0.2923$ ,  $p = 0.8309$ ,  $F_{a,g(3,128)} = 1.416$ ,  $p = 0.2415$ ;  $F_{a(3,119)} = 0.1392$ ,  $p = 0.9363$ ;  $F_{a(3,119)} = 0.4784$ ,  $p = 0.6979$ , respectively) or genotype ( $F_{g(1,119)} = 0.05769$ ,  $p = 0.8106$ ;  $F_{g(1,119)} = 1.577$ ,  $p = 0.2116$ , respectively) effects were noticed. However, the protein study showed no age effect ( $F_{a,g(3,115)} = 0.4508$ ,  $p = 0.7172$ ,  $F_{a,g(3,117)} = 2.262$ ,  $p = 0.0849$ ;  $F_{a(3,115)} = 2.609$ ,  $p = 0.549$ ;  $F_{a(3,117)} = 1.995$ ,  $p = 0.1185$ , respectively) but a main genotype effect ( $F_{g(1,115)} = 85.63$ ,  $p < 0.0001$ ;  $F_{a(1,117)} = 701.9$ ,  $p < 0.0001$ , respectively). Thus, in WT retinas, Rhodopsin mRNA and protein were detected and their contents were similar before EO and at young or adult ages (**Figures 4B,D**). In *Fmr1*<sup>-/-</sup> retinas, Rhodopsin mRNA expression was similar from 1 DPN to 6 months old, and similar to the one observed in WT retinas (**Figure 4B**). However, there was a significant decrease in Rhodopsin protein content by about 30%–40% in *Fmr1*<sup>-/-</sup> compared to WT at 1 DPN ( $100 \pm 8\%$  in WT vs.  $62 \pm 6\%$  in *Fmr1*<sup>-/-</sup>, *post hoc*:  $p = 0.0001$ ), at 1 month ( $99 \pm 10\%$  in WT vs.  $62 \pm 8\%$  in *Fmr1*<sup>-/-</sup>, *post hoc*:  $p = 0.0005$ ), at 3 months ( $100 \pm 1\%$  in WT vs.  $70 \pm 3\%$  in *Fmr1*<sup>-/-</sup>, *post hoc*:  $p = 0.0033$ ) and at 6 months ( $93 \pm 9\%$  in WT vs.  $56 \pm 7\%$  in *Fmr1*<sup>-/-</sup>, *post hoc*:  $p < 0.0001$ ; **Figures 4B,D**). In WT retinas, PSD95 mRNA and protein contents (**Figure 4C**) were similar before EO and at young or adult ages. In *Fmr1*<sup>-/-</sup> retinas, PSD95 mRNA expression was similar from 1 DPN to 6 months old, and similar to the one observed in WT retinas (**Figure 4C**). However, there was a significant decrease in PSD95 protein content by about 30%–40% in *Fmr1*<sup>-/-</sup> compared to WT at 1 DPN ( $100 \pm 1\%$  WT vs.  $64 \pm 2\%$  *Fmr1*<sup>-/-</sup>, *post hoc*:  $p < 0.0001$ ), at 1 ( $96 \pm 5\%$  WT vs.  $46 \pm 10\%$  *Fmr1*<sup>-/-</sup>, *post hoc*:  $p < 0.0001$ ), 3 ( $100 \pm 1\%$  WT vs.  $64 \pm 2\%$  *Fmr1*<sup>-/-</sup>, *post hoc*:  $p < 0.0001$ ) and 6 ( $104 \pm 4\%$  WT vs.  $60 \pm 6\%$  *Fmr1*<sup>-/-</sup>, *post hoc*:  $p < 0.0001$ ) months old compared to WT one (**Figures 4C,D**).

Therefore, even before EO until adult age, *Fmr1*<sup>-/-</sup> retinas presented Rhodopsin and PSD95 protein defects without alteration of their mRNA expression.

## DISCUSSION

In the absence of FMRP, a RNA-binding protein involved in protein translation, several proteic dysregulations (Darnell et al., 2005, 2011) had been shown to lead to cerebral neuronal immaturity and synaptic defects (Irwin et al., 2000; Nimchinsky et al., 2001). These cellular impairments responsible for functional and behavioral phenotypes of FXS (Penagarikano et al., 2007; Hagerman and Hagerman, 2015), are also noticed in *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice, the murine model of FXS (Hébert et al., 2014). Interestingly, our previous studies demonstrated that retina of this murine model presents molecular and cellular defects, similar to cerebral ones, in adult mice (Rossignol et al., 2014). However, no data are

currently available on the specific time course of these abnormalities.

## Early Molecular Retinal Defects Are Leading to Lifetime Retinal Function Impairment With No Structural Impact

At a cerebral level, in FXS conditions (Irwin et al., 2000) as in the animal model (Irwin et al., 2000; Nimchinsky et al., 2001; Bilousova et al., 2009), FMRP deficiency leads to the neuronal immaturity phenotype caused by proteomic defects. Indeed, critical imbalance in translational mechanisms had been pointed out between WT and *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice during the cerebral synaptogenesis stage and adulthood (Zhu et al., 2011; Tang et al., 2015). Among the wide panel of misregulated proteins, a major part is composed of scaffold proteins for the synaptic structure present at pre- and post-synaptic levels, such as Shank1, Shank2 and PSD95. As in the brain, synaptic protein defects are also observed in the *Fmr1*<sup>-/-</sup> retina. Indeed, we showed a reduced level of the synaptic scaffold protein PSD95 from 1 DPN up to 6 months without mRNA alteration. This data also confirmed that the absence of Fmrp in the retina affects the translation and not the mRNA transcription (Darnell et al., 2005, 2011). In addition, we assume that other proteins could participate (contribute) to this early retinal immaturity phenotype in synergy with PSD95 since other synaptic proteins, such as Syt1a, had been shown deregulated in the *Fmr1*<sup>-/-</sup> retinas (Rossignol et al., 2014). Interestingly, all these impairments are associated, at least in adulthood, with retinal neuronal immaturity (Rossignol et al., 2014) without gross retinal structural modifications.

Early *Fmr1*<sup>-/-</sup> retinal defects in protein expression lead coherently to abnormalities in retinal function in young and adult mice, as observed by ERG. ERG is defined as the specific response of the retina to light and represents the electrophysiological manifestations from Rhodopsin activation by light into electrophysiological message sent through the optic nerve to the brain (Fox and Rubinstein, 1989; Fulton et al., 1999). Our study highlighted similar alterations at all tested ages. The drop of a-wave amplitude is consistent with the decrease of Rhodopsin expression and reflects a reduced activation of photoreceptor cells in response to a light stimulation. Indeed, the direct relationship between Rhodopsin content and a-wave amplitude had been previously described (Liang et al., 2004; Price et al., 2012). The photoreceptor less activated, the signal transmitted to the inner retina is reduced leading to a decrease of the b-wave amplitude. However, the increased  $B_{\max}/A_{\max}$  amplitude ratio in *Fmr1*<sup>-/-</sup> compared to WT mice suggests a higher signal amplification in the transmission between photoreceptors and the inner retina. These results suggest an over activation in response to a given light intensity, from an electrophysiological point of view. This alteration is associated with a lower contrast sensitivity as shown by the increase in the parameter  $n$  (Ranchon et al., 1999). Moreover, retinal inner cells are also impacted in *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice since OPs, reflecting spatial and temporal integration of the retinal information by bipolar

cells (Wachtmeister, 1998; Akula et al., 2007) are decreased. It reinforced our previous observation on synaptic defect in *Fmr1*<sup>-/-</sup> (Rossignol et al., 2014). In summary, in *Fmr1*<sup>-/-</sup> our results demonstrate a collapse in the capacity of retinal neurons to relay correctly visual signal, from youth with no evolution to adulthood. Consequently, we assume that the misperception of contrast, texture and moving stimuli described as the consequence of visual cerebral integration defects in FXS patients (Kogan et al., 2008; Farzin et al., 2011) must have a significant retinal component, as suggested by our retinal function data.

The early molecular retinal phenotype of the *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice is a major result of our work since it occurs before the EO. Indeed, EO is a crucial step for cerebral cortical maturation (Gandhi et al., 2008) since the primary visual cortex undergoes considerable synaptogenesis after EO (Blue and Parnavelas, 1983; Gandhi et al., 2005). This retinal signal leads to central visual synapses maturation through the redistribution of PSD95 in cerebral dendrites (Yoshii et al., 2003). Thus, induction of cerebral visual system maturation is essentially due to the retinal signal, resulting from retinal light sensing due to Rhodopsin, rods photopigment, retinal neuronal connections partially due to the synaptic protein PSD95 and also the retinal ganglion cells spontaneous activity (Blue and Parnavelas, 1983; Tian, 2004; Gandhi et al., 2005). In *Fmr1*<sup>-/-</sup> retinas, we found that PSD95 and Rhodopsin proteins are depleted at 1 DPN, so even before EO. Since these protein defects are similar before EO and at adulthood with, at least in adult ages, a retinal neuronal immaturity (Rossignol et al., 2014), it seems straightforward to hypothesize that retinal function alterations observed at adulthood are also present even before EO. Therefore, when EO occurs, retinal light sensing is already altered. It becomes obvious that in *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice, the retinal signal for cerebral maturation is damaged. Since loss of Fmrp leads to PSD95 alteration in *Fmr1*<sup>-/-</sup> brains (Zhu et al., 2011) and to PSD95 and Rhodopsin defects in *Fmr1*<sup>-/-</sup> retinas, we assume that the cerebral visual phenotype is the synergistic consequence of both retinal and cerebral alterations. Our results are consistent with the defects in spatiotemporal visual processing in FXS patients due to primary visual cortex immaturity (Kogan et al., 2008; Farzin et al., 2011; Berman et al., 2012). Therefore, we assume that the altered retinal perception of light stimuli is critically involved in the whole visual sensorial FXS phenotype.

## FXS Sensorial Phenotype: Hypersensitivity or Dys-Sensitivity?

Early in life, FXS patients present auditory, olfactory, nociceptive and visual abnormalities (Casamassimo et al., 1986; Lachiewicz et al., 1994), creating a wide range of phenotypical dysregulations in sensory responses. These sensorial perturbations may participate in occurrence of major behavioral troubles in FXS as suggested recently (Carreno-Munoz et al., 2018). According to our hypothesis, the term “sensorial hypersensitivity”, literally suggesting a higher sensorial response, should be avoided. Indeed, hypersensitivity phenotypes have been demonstrated for audition aspects as well as for visual responses since *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice present hyper arousal excitability for auditory processing

and exacerbated transmission between photoreceptors and the inner retina (as observed in our experiment), respectively. But tactile nociception after local acute inflammation is lowered (Price et al., 2007; Busquets-Garcia et al., 2013), and *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice present a significant decrease in odorant sensitivity (Schilit Nitenson et al., 2015). Consequently, we propose that the most relevant terminology to characterize this complex sensorial spectrum is “dys-sensitivity phenotype” instead of “hyper-sensitivity phenotype”. To go further, we assume that peripheral as well as central components of senses should be investigated in sensorial sensitivity. Based on our results on vision, we clearly highlighted that the retinal altered response is involved in the overall visual defect of *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice. We have demonstrated for the first time that the retinal phenotype of *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice is an early and stable phenotype characterized by a global lower visual performance.

Finally, the wide panel of sensorial troubles in audition, olfaction, nociceptive response and vision leads probably to a misunderstanding of the outside environment by FXS patients. Therefore, we assume that the entire neurosensorial system, from the stimulus perception to stimulus integration, is altered and critically involved in the overall FXS phenotype. The current challenge may be to discriminate between peripheral and central components on the cognitive and behavioral phenotypes of FXS.

## CONCLUSION

FXS patients present global sensorial abnormalities, which were, up to now, associated to cerebral neuronal immaturity. Our study based on the *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice (murine model of FXS) demonstrates

## REFERENCES

- Akula, J. D., Mocko, J. A., Moskowitz, A., Hansen, R. M., and Fulton, A. B. (2007). The oscillatory potentials of the dark-adapted electroretinogram in retinopathy of prematurity. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 5788–5797. doi: 10.1167/iovs.07-0881
- Bakker, C. E., Verheij, C., Willemsen, R., van der Helm, R., Oerlemans, F., Vermey, M., et al. (1994). *Fmr1* knockout mice: a model to study fragile X mental retardation. The Dutch-Belgian Fragile X Consortium. *Cell* 78, 23–33. doi: 10.1016/0092-8674(94)90569-x
- Berman, R. F., Murray, K. D., Arque, G., Hunsaker, M. R., and Wenzel, H. J. (2012). Abnormal dendrite and spine morphology in primary visual cortex in the CGG knock-in mouse model of the fragile X premutation. *Epilepsia* 53, 150–160. doi: 10.1111/j.1528-1167.2012.03486.x
- Bilousova, T. V., Dansie, L., Ngo, M., Aye, J., Charles, J. R., Ethell, D. W., et al. (2009). Minocycline promotes dendritic spine maturation and improves behavioural performance in the fragile X mouse model. *J. Med. Genet.* 46, 94–102. doi: 10.1136/jmg.2008.061796
- Blue, M. E., and Parnavelas, J. G. (1983). The formation and maturation of synapses in the visual cortex of the rat. I. Qualitative analysis. *J. Neurocytol.* 12, 599–616. doi: 10.1007/bf01181526
- Busquets-Garcia, A., Gomis-González, M., Guegan, T., Agustán-Paván, C., Pastor, A., Mato, S., et al. (2013). Targeting the endocannabinoid system in the treatment of fragile X syndrome. *Nat. Med.* 19, 603–607. doi: 10.1038/nm.3127
- Carreno-Munoz, M. I., Martins, F., Medrano, M. C., Aloisi, E., Pietropaolo, S., Dechaud, C., et al. (2018). Potential involvement of impaired BKCa channel function in sensory defensiveness and some behavioral disturbances induced by unfamiliar environment in a mouse model of fragile X syndrome. *Neuropsychopharmacology* 43, 492–502. doi: 10.1038/npp.2017.149

that retina, the visual perception tissue, presents early molecular and electrophysiological defects in young and adult mice. The molecular defects are settled even before EO, the decisive signal triggering for the central visual area maturation. Thus, our work on vision provides evidence that altered peripheral perception is a crucial component of the sensory processing defects of *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice. This peripheral dys-sensitivity is as important as the central sensorial defect in the FXS pathology.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

OP, IR-C and CF: designed research study. OP, IR-C, MA, A-LM-B and CF: data analysis. OP, CF, AP, AB, RR, GM-D, A-LM-B and CM-D: conducted experiments. OP, CF, AP, AB, RR, GM-D, J-CB, CM-D, DL, BH, AM, JP and SB: discussed data. OP, CF, MA and SB: writing manuscript.

## FUNDING

This research was supported by CHR of Orléans, CNRS of Orléans, University of Orléans, FEDER 35106 and FRAXA Research Foundation USA. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the animal facility staff (SMARTY platform) located at the Institute for Neurosciences of Montpellier (Réseau des Animaleries de Montpellier) for the expert care of mice colonies.

- Casamassimo, P. S., Shellhart, W. C., and Hagerman, R. (1986). Fragile X syndrome: a review. *J. Oral. Med.* 41, 228–233.
- Chang, H. H., Lin, D. P., Chen, Y. S., Liu, H. J., Lin, W., Tsao, Z. J., et al. (2011). Intravitreal homocysteine-thiolactone injection leads to the degeneration of multiple retinal cells, including photoreceptors. *Mol. Vis.* 17, 1946–1956.
- Darnell, J. C., Mostovetsky, O., and Darnell, R. B. (2005). FMRP RNA targets: identification and validation. *Genes Brain Behav.* 4, 341–349. doi: 10.1111/j.1601-183x.2005.00144.x
- Darnell, J. C., Van Driesche, S. J., Zhang, C., Hung, K. Y., Mele, A., Fraser, C. E., et al. (2011). FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. *Cell* 146, 247–261. doi: 10.1016/j.cell.2011.06.013
- Dong, C. J., and Hare, W. A. (2000). Contribution to the kinetics and amplitude of the electroretinogram b-wave by third-order retinal neurons in the rabbit retina. *Vision Res.* 40, 579–590. doi: 10.1016/s0042-6989(99)00203-5
- Dorrell, M. I., Aguilar, E., Weber, C., and Friedlander, M. (2004). Global gene expression analysis of the developing postnatal mouse retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 1009–1019. doi: 10.1167/iovs.03-0806
- Farzin, F., Rivera, S. M., and Whitney, D. (2011). Resolution of spatial and temporal visual attention in infants with fragile X syndrome. *Brain* 134, 3355–3368. doi: 10.1093/brain/awr249
- Fox, D. A., and Rubinstein, S. D. (1989). Age-related changes in retinal sensitivity, rhodopsin content and rod outer segment length in hooded rats following low-level lead exposure during development. *Exp. Eye Res.* 48, 237–249. doi: 10.1016/s0014-4835(89)80073-9
- Frischman, L. J. (2006). “Origins of the electroretinogram,” in *Principles and Practice of Clinical Electrophysiology of Vision*, 2nd Edn. eds J. R. Heckenlively and G. B. Arden (Cambridge, MA: MIT Press), 139–183.
- Fulton, A. B., Dodge, J., Hansen, R. M., and Williams, T. P. (1999). The rhodopsin content of human eyes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 1878–1883.

- Gandhi, S. P., Cang, J., and Stryker, M. P. (2005). An eye-opening experience. *Nat. Neurosci.* 8, 9–10. doi: 10.1038/nn0105-9
- Gandhi, S. P., Yanagawa, Y., and Stryker, M. P. (2008). Delayed plasticity of inhibitory neurons in developing visual cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 105, 16797–16802. doi: 10.1073/pnas.0806159105
- Gauducheau, M., Lemaire-Mayo, V., D'Amato, F. R., Oddi, D., Crusio, W. E., and Pietropaolo, S. (2017). Age-specific autistic-like behaviors in heterozygous *Fmr1*-KO female mice. *Autism Res.* 10, 1067–1078. doi: 10.1002/aur.1743
- Granit, R. (1933). The components of the retinal action potential in mammals and their relation to the discharge in the optic nerve. *J. Physiol.* 77, 207–239. doi: 10.1113/jphysiol.1933.sp002964
- Guimarães-Souza, E. M., Perche, O., Morgans, C. W., Duvoisin, R. M., and Calaza, K. C. (2016). Fragile X Mental Retardation Protein expression in the retina is regulated by light. *Exp. Eye Res.* 146, 72–82. doi: 10.1016/j.exer.2015.11.025
- Hagerman, P. J., and Hagerman, R. J. (2015). Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1338, 58–70. doi: 10.1111/nyas.12693
- Hébert, B., Pietropaolo, S., Mème, S., Laudier, B., Laugeray, A., Doisne, N., et al. (2014). Rescue of fragile X syndrome phenotypes in *Fmr1* KO mice by a BKCa channel opener molecule. *Orphanet J. Rare Dis.* 9:124. doi: 10.1186/s13023-014-0124-6
- Irwin, S. A., Galvez, R., and Greenough, W. T. (2000). Dendritic spine structural anomalies in fragile-X mental retardation syndrome. *Cereb. Cortex* 10, 1038–1044. doi: 10.1093/cercor/10.10.1038
- Jagodzinska, J., Sarzi, E., Cavalier, M., Seveno, M., Baecker, V., Hamel, C., et al. (2017). Optical coherence tomography: imaging mouse retinal ganglion cells *in vivo*. *J. Vis. Exp.* 127:e55865. doi: 10.3791/55865
- Kogan, C. S., Turk, J., Hagerman, R. J., and Cornish, K. M. (2008). Impact of the Fragile X mental retardation 1 (*FMR1*) gene premutation on neuropsychiatric functioning in adult males without fragile X-associated Tremor/Ataxia syndrome: a controlled study. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 147B, 859–872. doi: 10.1002/ajmg.b.30685
- Lachiewicz, A. M., Spiridigliozzi, G. A., Gullion, C. M., Ransford, S. N., and Rao, K. (1994). Aberrant behaviors of young boys with fragile X syndrome. *Am. J. Ment. Retard.* 98, 567–579.
- Lamb, T. D., and Pugh, E. N. Jr. (1992). G-protein cascades: gain and kinetics. *Trends Neurosci.* 15, 291–298. doi: 10.1016/0166-2236(92)90079-n
- Liang, Y., Fotiadis, D., Maeda, T., Maeda, A., Modzelewska, A., Filipek, S., et al. (2004). Rhodopsin signaling and organization in heterozygote rhodopsin knockout mice. *J. Biol. Chem.* 279, 48189–48196. doi: 10.1074/jbc.M408362200
- McNaughton, C. H., Moon, J., Strawderman, M. S., Maclean, K. N., Evans, J., and Strupp, B. J. (2008). Evidence for social anxiety and impaired social cognition in a mouse model of fragile X syndrome. *Behav. Neurosci.* 122, 293–300. doi: 10.1037/0735-7044.122.2.293
- Merenstein, S. A., Sobesky, W. E., Taylor, A. K., Riddle, J. E., Tran, H. X., and Hagerman, R. J. (1996). Molecular-clinical correlations in males with an expanded *FMR1* mutation. *Am. J. Med. Genet.* 64, 388–394. doi: 10.1002/(sici)1096-8628(19960809)64:2<388::aid-ajmg31>3.3.co;2-s
- Nimchinsky, E. A., Oberlander, A. M., and Svoboda, K. (2001). Abnormal development of dendritic spines in *FMR1* knock-out mice. *J. Neurosci.* 21, 5139–5146.
- Penagarikano, O., Mulle, J. G., and Warren, S. T. (2007). The pathophysiology of fragile x syndrome. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 8, 109–129. doi: 10.1146/annurev.genom.8.080706.092249
- Perche, O., Doly, M., and Ranchon-Cole, I. (2009). Calpains are activated by light but their inhibition has no neuroprotective effect against light-damage. *Exp. Eye Res.* 89, 989–994. doi: 10.1016/j.exer.2009.08.012
- Price, T. J., Rashid, M. H., Millicamps, M., Sanoja, R., Entrena, J. M., and Cervero, F. (2007). Decreased nociceptive sensitization in mice lacking the fragile X mental retardation protein: role of mGluR1/5 and mTOR. *J. Neurosci.* 27, 13958–13967. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4383-07.2007
- Price, B. A., Sandoval, I. M., Chan, F., Nichols, R., Roman-Sanchez, R., Wensel, T. G., et al. (2012). Rhodopsin gene expression determines rod outer segment size and rod cell resistance to a dominant-negative neurodegeneration mutant. *PLoS One* 7:e49889. doi: 10.1371/journal.pone.0049889
- Ranchon, I., Gorrand, J. M., Cluzel, J., Droy-Lefaix, M. T., and Doly, M. (1999). Functional protection of photoreceptors from light-induced damage by dimethylthiourea and Ginkgo biloba extract. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 1191–1199.
- Rossignol, R., Ranchon-Cole, I., Pâris, A., Herzine, A., Perche, A., Laurenceau, D., et al. (2014). Visual sensorial impairments in neurodevelopmental disorders: evidence for a retinal phenotype in Fragile X Syndrome. *PLoS One* 9:e105996. doi: 10.1371/journal.pone.0105996
- Schilit Nitenson, A., Stackpole, E. E., Truszkowski, T. L., Midroit, M., Fallon, J. R., and Bath, K. G. (2015). Fragile X mental retardation protein regulates olfactory sensitivity but not odorant discrimination. *Chem. Senses* 40, 345–350. doi: 10.1093/chemse/bjv019
- Tang, B., Wang, T., Wan, H., Han, L., Qin, X., Zhang, Y., et al. (2015). *Fmr1* deficiency promotes age-dependent alterations in the cortical synaptic proteome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 112, E4697–E4706. doi: 10.1073/pnas.1502258112
- Tian, N. (2004). Visual experience and maturation of retinal synaptic pathways. *Vision Res.* 44, 3307–3316. doi: 10.1016/j.visres.2004.07.041
- Wachtmeister, L. (1998). Oscillatory potentials in the retina: what do they reveal. *Prog. Retin. Eye Res.* 17, 485–521. doi: 10.1016/s1350-9462(98)00006-8
- Wang, X., Mu, Y., Sun, M., and Han, J. (2017). Bidirectional regulation of fragile X mental retardation protein phosphorylation controls rhodopsin homeostasis. *J. Mol. Cell Biol.* 9, 104–116. doi: 10.1093/jmcb/mjw041
- Wolff, P. H., Gardner, J., Paccla, J., and Lappen, J. (1989). The greeting behavior of fragile X males. *Am. J. Ment. Retard.* 93, 406–411.
- Yoshii, A., Sheng, M. H., and Constantine-Paton, M. (2003). Eye opening induces a rapid dendritic localization of PSD-95 in central visual neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 100, 1334–1339. doi: 10.1073/pnas.0335785100
- Yu, J., Lei, K., Zhou, M., Craft, C. M., Xu, G., Xu, T., et al. (2011). KASH protein Syne-2/Nesprin-2 and SUN proteins SUN1/2 mediate nuclear migration during mammalian retinal development. *Hum. Mol. Genet.* 20, 1061–1073. doi: 10.1093/hmg/ddq549
- Zhu, Z. W., Xu, Q., Zhao, Z. Y., Gu, W. Z., and Wu, D. W. (2011). Spatiotemporal expression of PSD-95 in *Fmr1* knockout mice brain. *Neuropathology* 31, 223–229. doi: 10.1111/j.1440-1789.2010.01165.x

**Conflict of Interest Statement:** J-CB was employed by company KeyObs.

The other authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Perche, Felgerolle, Ardourel, Bazinet, Pâris, Rossignol, Meyer-Dilhet, Mausset-Bonnefont, Hébert, Laurenceau, Montécot-Dubourg, Menuet, Bizot, Pichon, Ranchon-Cole and Briault. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## Etude 2 – Quelles sont les caractéristiques comportementales visuelles altérées en absence de protéine FMRP ?

*Travaux publiés dans Frontiers in Behavioral Neuroscience le 2 octobre 2019*

### 2.1 Objectifs de l'étude

Les résultats précédemment obtenus au laboratoire et publiés en 2014 et 2018 démontrent clairement l'existence d'un réel phénotype rétinien en absence de la protéine FMRP (Rossignol et al., 2014; Perche et al., 2018). Ce phénotype induit un défaut dans la perception de la lumière et la transmission dans la rétine interne de l'information visuelle. Par conséquent, les informations visuelles émises par la rétine à destination des aires cérébrales sont erronées (Rossignol et al., 2014; Perche et al., 2018). Ces informations vont rejoindre des aires cérébrales, elles aussi souffrant de troubles générant des anomalies dans le traitement et l'intégration des informations visuelles, telles que le cortex visuel, la voie magnocellulaire du noyau latéral géniculé ou encore le colliculus (Irwin et al., 2002; Kogan et al., 2004b; Kay et al., 2018). **En résumé, en absence de protéine FMRP, le système visuel est altéré de sa composante perceptive jusque dans ses composantes intégratives.** Ceci participe aux troubles de la vision quelque peu décrits chez les patients atteints du syndrome de l'X fragile, enfants comme adultes (Kogan et al., 2004a; Farzin et al., 2008, 2011). Des études ont rapporté des difficultés dans la compréhension des contrastes, des textures, et des stimuli en mouvement (Kogan et al., 2004a; Farzin et al., 2008, 2011). Cependant, la description de ces troubles n'a pas été approfondie chez le patient humain. Les cliniciens ont la plupart du temps attribué ces déficits de compétences visuelles à des troubles de l'attention (Kogan et al., 2004a; Farzin et al., 2011). De plus, **les anomalies sensorielles visuelles n'ont jamais été étudiées chez un modèle animal du FXS. Ceci est d'autant plus dommageable que la vision est un sens employé par la souris dans de nombreuses tâches et comportements** (Hoy et al., 2016).

La preuve étant désormais faite que la souris *Fmr1* KO présente un phénotype significatif dans des composantes majeures de son système visuel, **les questions émergent de nos travaux précédents concernent l'impact de ce phénotype sur le comportement de la lignée murine *Fmr1* KO.**

Tout d'abord en ce qui concerne **les capacités visuelles** en elles-mêmes : Cette lignée présente-t-elle des anomalies visuelles ? Quels sont les traits visuels dont les performances sont altérées par l'absence de la protéine FMRP dans le système visuel ? Quelles sont les caractéristiques de ces altérations ?

Mais également en ce qui concerne le **comportement global** : Les altérations affectant les compétences visuelles impactent-elles d'autres comportements de la souris *Fmr1* KO ? En particulier, les

tâches cognitives impliquent-elles la vision, et leurs performances sont-elles par conséquent compromises par des altérations de la vision ?

Les réponses à ces questions apporteraient des éléments nouveaux sur les compétences du système visuel en cas d'absence de FMRP, et une description précise des troubles visuels associés à l'absence de cette protéine. Elles apporteraient également un regard nouveau sur les anomalies comportementales décrites chez la souris *Fmr1* KO, et totalement attribuées à d'autres causes sans envisager une participation des troubles sensoriels visuels. **La description du phénotype comportemental visuel de la souris *Fmr1* KO, réalisée pour la première fois, apportera donc des éléments de compréhension sur les incapacités visuelles causées par l'absence de la protéine FMRP, et sur les troubles comportementaux d'une manière globale, ceux-ci étant potentiellement liés aux capacités visuelles.**

## 2.2 Stratégie expérimentale

Le travail réalisé ici consiste donc à mettre au point et employer des tests comportementaux permettant d'évaluer des aspects très précis des capacités visuelles des souris. La difficulté rencontrée ici est que le modèle murin étudié est affecté par des troubles cognitifs, en particulier des troubles de la mémoire, et des troubles neuro-associés tels que le déficit d'attention. Si ces différentes compétences sont requises pour accomplir le test, les déficits de la souris *Fmr1* KO dans ces domaines peuvent biaiser les conclusions tirées lors de l'analyse comportementale. **Le défi est donc d'utiliser des tests impliquant exclusivement les reflex et instincts liés à la vision de la souris, sans nécessiter aucune capacité de mémoire, d'analyse ou de réflexion. Ainsi, si une anomalie du comportement est mise en évidence chez la souris *Fmr1* KO, elle peut être associée à un trouble de la vision.**

Notre choix s'est alors porté sur 2 tests comportementaux existants. Le premier, nommé **Visual Cliff**, permet d'évaluer la capacité de la souris à percevoir **la profondeur et la perspective** (Fox, 1965; Glynn et al., 2003). Brièvement, la souris testée est libre de se déplacer dans un dispositif contenant une zone où se présente une situation de « vide » sous ses pattes. Instinctivement, si la souris perçoit le vide sous ses pattes, elle fuira cette zone du dispositif pour préférer une zone « sans danger ». Ainsi, ce test se base sur un instinct naturel chez la souris : si la souris est en mesure de percevoir la profondeur, alors elle fuira. Le deuxième test, nommé **Optomotor Drum** ou **optomètre**, permet d'évaluer la capacité de la souris à percevoir **le contraste et le mouvement** (Cowey and Franzini, 1979; Kretschmer et al., 2013). Brièvement, le dispositif consiste en un haut cylindre dont la surface interne est recouverte d'un motif rayé verticalement de noir et de blanc. La souris est placée au centre de ce cylindre, sans contention, et le cylindre tourne lentement autour de la souris. Le test utilise le reflex optocinétique de la souris, équivalent au réflexe de nystagmus humain : si un objet passe dans le champ de vision, alors le regard le suit de manière involontaire. Ainsi, si les capacités visuelles de la souris testée sont suffisantes pour détecter la présence d'un objet contrasté en mouvement dans le champ de vision, la souris effectuera par



reflex un mouvement de suivi du stimulus. Pour être tout à fait précis, la souris effectuera un mouvement très net avec sa tête, nommé réponse optomotrice. Il a été démontré que cette réponse optomotrice est le reflet du réflexe optocinétique chez la souris, et est donc parfaitement utilisable pour étudier ce reflex de nystagmus chez les modèles murins (Kretschmer et al., 2017). Nous avons également adapté l'*optomotor drum* pour étudier le comportement de la souris face à des stimuli plus ou moins contrastés, et ainsi analyser ses capacités de discrimination des contrastes. **Les deux tests employés impliquent donc la vision de la souris, qui montrera ses compétences par des comportements instinctifs ou de l'ordre du reflex, sans faire appel à des capacités cognitives. Nous étudions ici 3 traits visuels : la perception de la perspective, la sensibilité au contraste et la compréhension des mouvements.** Enfin, la participation des capacités de perception visuelle à la réussite d'une tâche comportementale visant à évaluer les capacités cognitives de la souris sera évaluée. Cela permettra de **déterminer si l'altération des capacités visuelles de la souris *Fmr1* KO joue un rôle dans ses performances lors de la réalisation d'une telle tâche de cognition.** Afin de rester cohérent avec notre précédente étude, et de mettre en évidence une éventuelle évolution des capacités visuelles de la souris *Fmr1* KO au cours de sa vie, **nous avons réalisé ces tâches sur des animaux de 1 mois, 3 mois et 6 mois.**

### 2.3 Résultats principaux de l'étude

Pour la toute première fois, les aspects de sensibilité visuelle de la souris *Fmr1* KO ont été étudiés, sans que ne soient mis en œuvre ses capacités cognitives. **L'examen que nous avons mené a révélé de réelles altérations des capacités visuelles de la souris *Fmr1* KO. Ces altérations se caractérisent par une diminution de la perception de la perspective, une sensibilité moindre aux mouvements, et des anomalies de perception et discrimination des contrastes.** Ce phénotype comportemental visuel, très marqué, impacte très certainement les performances des souris *Fmr1* KO lors de la réalisation d'autres tâches comportementales. Par exemple, ici, nous avons montré qu'une tâche de reconnaissance d'un objet implique la perception de la forme et du contraste. Il est donc évident qu'un animal ayant des difficultés visuelles connaîtra des difficultés à réaliser efficacement cette tâche. Cependant, nous ne pouvons pas juger de l'importance de l'impact de la diminution des capacités visuelles sur les performances réalisées lors d'une telle tâche. Il n'en reste pas moins que **la diminution des compétences visuelles liées à la perception des contrastes, mouvement et perspective chez la souris *Fmr1* KO biaise la reconnaissance et l'évaluation de son environnement, ce qui impacte certainement son comportement global.**



# Visual Behavior Impairments as an Aberrant Sensory Processing in the Mouse Model of Fragile X Syndrome

Chloé Felgerolle<sup>1,2†</sup>, Betty Hébert<sup>1,2†</sup>, Maryvonne Ardourel<sup>1,2</sup>, Géraldine Meyer-Dilhet<sup>1,2</sup>, Arnaud Menuet<sup>1,2</sup>, Kimberley Pinto-Morais<sup>1,2</sup>, Jean-Charles Bizot<sup>3</sup>, Jacques Pichon<sup>1,2</sup>, Sylvain Briault<sup>1,2,4</sup> and Olivier Perche<sup>1,2,4\*</sup>

<sup>1</sup>UMR7355, CNRS, Orléans, France, <sup>2</sup>Experimental and Molecular Immunology and Neurogenetics, University of Orléans, Orléans, France, <sup>3</sup>Key-Obs, Orléans, France, <sup>4</sup>Department of Genetics, Regional Hospital, Orléans, France

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Gregg Stanwood,  
Florida State University, United States

### Reviewed by:

Dilja Krueger-Burg,  
University Medical Center Göttingen,  
Germany

Giulia Poggi,  
University of Zurich, Switzerland

### \*Correspondence:

Olivier Perche  
olivier.perche@chr-orleans.fr

†Co-first authors

### Specialty section:

This article was submitted to  
Pathological Conditions, a section of  
the journal *Frontiers in Behavioral  
Neuroscience*

**Received:** 13 June 2019

**Accepted:** 12 September 2019

**Published:** 02 October 2019

### Citation:

Felgerolle C, Hébert B, Ardourel M, Meyer-Dilhet G, Menuet A, Pinto-Morais K, Bizot J-C, Pichon J, Briault S and Perche O (2019) Visual Behavior Impairments as an Aberrant Sensory Processing in the Mouse Model of Fragile X Syndrome. *Front. Behav. Neurosci.* 13:228. doi: 10.3389/fnbeh.2019.00228

Fragile X Syndrome (FXS), the most common inherited form of human intellectual disability (ID) associated with autistic-like behaviors, is characterized by dys-sensitivity to sensory stimuli, especially vision. In the absence of Fragile Mental Retardation Protein (FMRP), both retinal and cerebral structures of the visual pathway are impaired, suggesting that perception and integration of visual stimuli are altered. However, behavioral consequences of these defects remain unknown. In this study, we used male *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice to further define visual disturbances from a behavioral perspective by focusing on three traits characterizing visual modality: perception of depth, contrasts and movements. We performed specific tests (Optomotor Drum, Visual Cliff) to evaluate these visual modalities, their evolution from youth to adulthood, and to assess their involvement in a cognitive task. We show that *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice exhibit alteration in their visual skills, displaying impaired perspective perception, a drop in their ability to understand a moving contrasted pattern, and a defect in contrasts discrimination. Interestingly, *Fmr1*<sup>-/-</sup> phenotypes remain stable over time from adolescence to late adulthood. Besides, we report that color and shape are meaningful for the achievement of a cognitive test involving object recognition. Altogether, these results underline the significance of visual behavior alterations in FXS conditions and relevance of assessing visual skills in neuropsychiatric models before performing behavioral tasks, such as cognitive assessments, that involve visual discrimination.

**Keywords:** Fragile X Syndrome, *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice, FMRP, sensory sensitivity, visual abilities, depth perception, contrast sensitivity

## INTRODUCTION

Fragile X Syndrome (FXS) is the most common inherited form of human intellectual disability (ID) affecting approximately 1 in 4,000 males (Penagarikano et al., 2007; Abrahams and Geschwind, 2008; Hunter et al., 2014). This X-linked disorder is characterized by moderate to severe mental retardation, autistic-like behavior, facial abnormalities and macroorchidism

**Abbreviations:** FXS, Fragile X Syndrome; ID, Intellectual Disability; ASD, Autism Spectrum Disorder; FMRP, Fragile Mental Retardation Protein; FMRI, Fragile Mental Retardation 1; ERG, Electroretinogram; WT, Wild-type; NOR, Novel Object Recognition; PI, Preference Index; HT, Head-tracking; ITI, Intertrial interval; RGB, Red Green Blue color value.

(Penagarikano et al., 2007; Hagerman et al., 2017). FXS is caused by the absence of Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP) due to transcriptional silencing of the *Fragile X Mental Retardation 1 (FMR1)* gene. This FMRP defect leads to numerous synaptic protein alterations (Liao et al., 2008; Klemmer et al., 2011), neuronal dendrite spine immaturity and brain synaptic impairments (Vanderklish and Edelman, 2005; Liao et al., 2008) and thus to cognitive, communication, social and behavioral impairments (Pietropaolo et al., 2011). Besides, FXS patients also present abnormal sensory processing named sensory hypersensitivity (Minshew et al., 1997; Baron-Cohen et al., 2009), characterized by early life strong aversion for visual social contact (over 90% of FXS children), tactile contact or increased noise sensitivity (Lachiewicz et al., 1994; Merenstein et al., 1996).

Among sensory impairments, vision seems particularly affected in FXS patients. Some studies suggested that they provide spatiotemporal visual processing alterations, such as reduced contrast sensitivity for visual stimuli presented at high temporal frequencies as well as altered visual sensitivity for both static (texture difference) and moving stimuli (Kogan et al., 2004b; Farzin et al., 2008). These deficits used to be associated with brain neuronal impairments, in particular in the primary visual cortex, the integrative part of visual system (Kogan et al., 2004a; Farzin et al., 2011). However, we have previously demonstrated that in physiological conditions FMRP is also expressed in the retina, the first structure responsible for light perception (Rossignol et al., 2014; Perche et al., 2018). Subsequently, it has been demonstrated that FMRP is a crucial protein involved in the retinal light sensory (Guimarães-Souza et al., 2016; Wang et al., 2017). Accordingly, using the validated murine FXS model employing *Fmr1*<sup>-/-</sup> mouse strain (Bakker et al., 1994), we have shown that FMRP deficiency in the retina generates significant abnormalities in proteins contents and cellular alterations leading to defected signal transmission between photoreceptor cells and the inner retina, measured by the electroretinogram (ERG) technique (Rossignol et al., 2014; Perche et al., 2018). Moreover, FMRP absence leads to several deficits in visual subcircuits of the Superior Colliculus (SC; Kay et al., 2018), a midbrain structure regulating eye and head movements. Therefore, absence of FMRP seems to lead to a global visual system defect starting from light perception by the neural retina to visual information integration in cerebral visual areas.

Furthermore, it has been shown that *Fmr1*<sup>-/-</sup> mouse strain exhibits sensorial impairments, in addition to behavioral and cognitive alterations similar to those observed in FXS patients (Bakker et al., 1994; Nimchinsky et al., 2001; Yan et al., 2004; Dolen et al., 2007; Spencer et al., 2011; Hebert et al., 2014; Ghilan et al., 2018), concomitantly displaying auditory, olfactory and tactile disorders (Larson et al., 2008; Arnett et al., 2014; Rotschafer and Cramer, 2017). However, to our knowledge, the visual skills of *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice have not been investigated using specific visual tests yet. Therefore, we here aimed to study visual aspects of sensory disorders occurring in *Fmr1*<sup>-/-</sup> mouse strain, especially knowing molecular, cellular and functional defects in *Fmr1*<sup>-/-</sup> visual system. Of note, vision is an important sense

for mice, bringing crucial information for environmental and social understanding (Hoy et al., 2016). Consequently, the visual modality is particularly important when performing behavioral tests in mice. For instance, learning and memorization tests, but also sociability, repetitive behavior or anxiety tests must involve visuospatial skills. It is, therefore, necessary to evaluate the contribution of visual modality on the results obtained during behavioral tests, especially since many of the reported *Fmr1*<sup>-/-</sup> mouse strain behavioral phenotype were described in test involving visual modality.

Our project aimed to better characterize visual disturbances in *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice from a behavioral point of view. We focused on three traits that characterize visual modality: the perception of contrasts, movements, and depth. Specific tests were carried out in order to carry out specific tests to evaluate visual modalities (Optomotor Drum, Visual Cliff), their evolution from youth to adulthood, and to assess their involvement in a cognitive task.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

*Fmr1*<sup>-/-</sup> and their wild-type (WT) males littermates were generated by breeding heterozygous *Fmr1*<sup>-/+</sup> females from C57BL/6J background with C57BL/6J males. Mice were weaned at 21 days of age and co-housed with their same-sex littermates. Genotype was determined as previously described (Bakker et al., 1994). Food and water were provided *ad libitum*. Animals were maintained under controlled temperature (22°C) and humidity (55%) conditions with a 12:12 h dim light–dark cycle (50 lux, lights on at 7 a.m.). All experimental protocols received full review and approval by the regional animal care and use committee (Comité Régional d’Ethique à l’Expérimentation Animale—CREEA—TSA-DM Therapie1100) prior to conducting the experiments.

### Experimental Design

Investigation of *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice visual phenotype was focused on two main aspects: the depth perception, using the Visual Cliff test, and the contrast and motion understanding, using the Optomotor Drum device. This examination was carried out at three different ages, from adolescence to adulthood, to describe this behavioral phenotype, but also its age of onset and its potential evolution through ages in the absence of FMRP. Therefore, male mice were tested at different ages (1 month, 3 months and 6 months old, respectively), representing adolescence, maturity and the end of mature adulthood. Two groups of animals were used for the Visual Cliff test (WT  $n = 25$ , *Fmr1*<sup>-/-</sup>  $n = 22$  for 3 months old, WT  $n = 20$ , *Fmr1*<sup>-/-</sup>  $n = 26$  for 6 months old), and three groups for Optomotor Drum test (WT  $n = 12$ , *Fmr1*<sup>-/-</sup>  $n = 18$  for 1 month old, WT  $n = 15$ , *Fmr1*<sup>-/-</sup>  $n = 13$  for 3 months old and WT  $n = 14$ , *Fmr1*<sup>-/-</sup>  $n = 14$  for 6 months old). In addition, we sharpened our understanding of contrast discrimination using a contrast-shaded Optomotor test (3 months old WT  $n = 48$ , *Fmr1*<sup>-/-</sup>  $n = 42$ ). Each animal performed only one contrast condition (lambda: WT  $n = 16$ , *Fmr1*<sup>-/-</sup>  $n = 10$ ; beta: WT  $n = 7$ , *Fmr1*<sup>-/-</sup>  $n = 6$ ; gamma: WT  $n = 10$ , *Fmr1*<sup>-/-</sup>  $n = 14$ ; omega: WT  $n = 6$ , *Fmr1*<sup>-/-</sup>  $n = 7$ ;

psi: WT  $n = 9$ ,  $Fmr1^{-/y}$   $n = 6$ ). Eventually, the implication of visual abilities in a cognitive task involving object recognition was investigated. Three months old mice underwent the Novel Object Recognition (NOR) test and a modified device (WT  $n = 9$ ,  $Fmr1^{-/y}$   $n = 13$ ). These two last tests were performed only at one age on the basis of previous results from two first tests.

## Optomotor Drum Visual Test

Vision of contrast and motion was assessed with an Optomotor Drum apparatus as previously described (Cowey and Franzini, 1979; Benkner et al., 2013; Kretschmer et al., 2013) with slight modifications. The device is a large rotating circular drum ( $\varnothing$  30 cm; height 50 cm; **Figure 1A**). Rotation (constant velocity of  $12^\circ/\text{s}$ ) was controlled thanks to an electric motor allowing to change the direction of rotation by reversing voltage polarity. In the middle of the cylinder, an elevated stationary metallic platform (20 cm above the drum bottom; diameter: 12 cm) was used to place the tested mouse. The inner side of the drum was covered with a vertical pattern composed of 2 cm-wide black and white stripes, printed on removable paper panels fitting with the cylinder. Homogenous luminance in the apparatus was controlled by lux meter at the height of mouse eyes and was set at 10 lux.

When testing, mouse was placed on the central platform (**Figure 1A**) and the drum remained motionless during the first 2 min. Then there was a clockwise turn for 2 min, followed by a counterclockwise turn for 2 min. Reversion was immediate to prevent mouse from habituation of the stimulus motion. Recording was also performed when the drum was not moving allowing to check that the mouse did not show spontaneous head movements which may be confounded with head-tracking (HT) movements recorded during test. Habituation to the apparatus without stripes on the drum was performed 24 h before the test. Apparatus was cleaned with 70% ethanol and water between each mouse. All tests were carried out by a single operator blind to mice genotypes.

Videos were recorded by an appropriate video software (EthoVision XT, Noldus, Netherlands), and analyzed by an operator using a video processing software (TheObserver, Noldus, Netherlands). Number and total time duration of HT were counted for each direction of rotation, as well as the latency of the first HT. A single operator, blind to mice genotypes, conducted all analysis.

## Contrast-Shaded Optomotor Drum Test

We investigate  $Fmr1^{-/y}$  mice contrast sensitivity in order to sharpen our understanding of their vision of contrasts. Contrast sensitivity is the property of vision that measures a local difference in luminance necessary to detect a target. In fact, luminance is the physical value linked to the visual sensation of lightness emitted by a surface. It is defined as the power of a visible light emitted in a surface spot and in a particular direction, expressed by unit of area. Thus, in identical conditions of luminosity, a very light surface would have a high luminance whereas a perfectly black surface would have a null luminance.

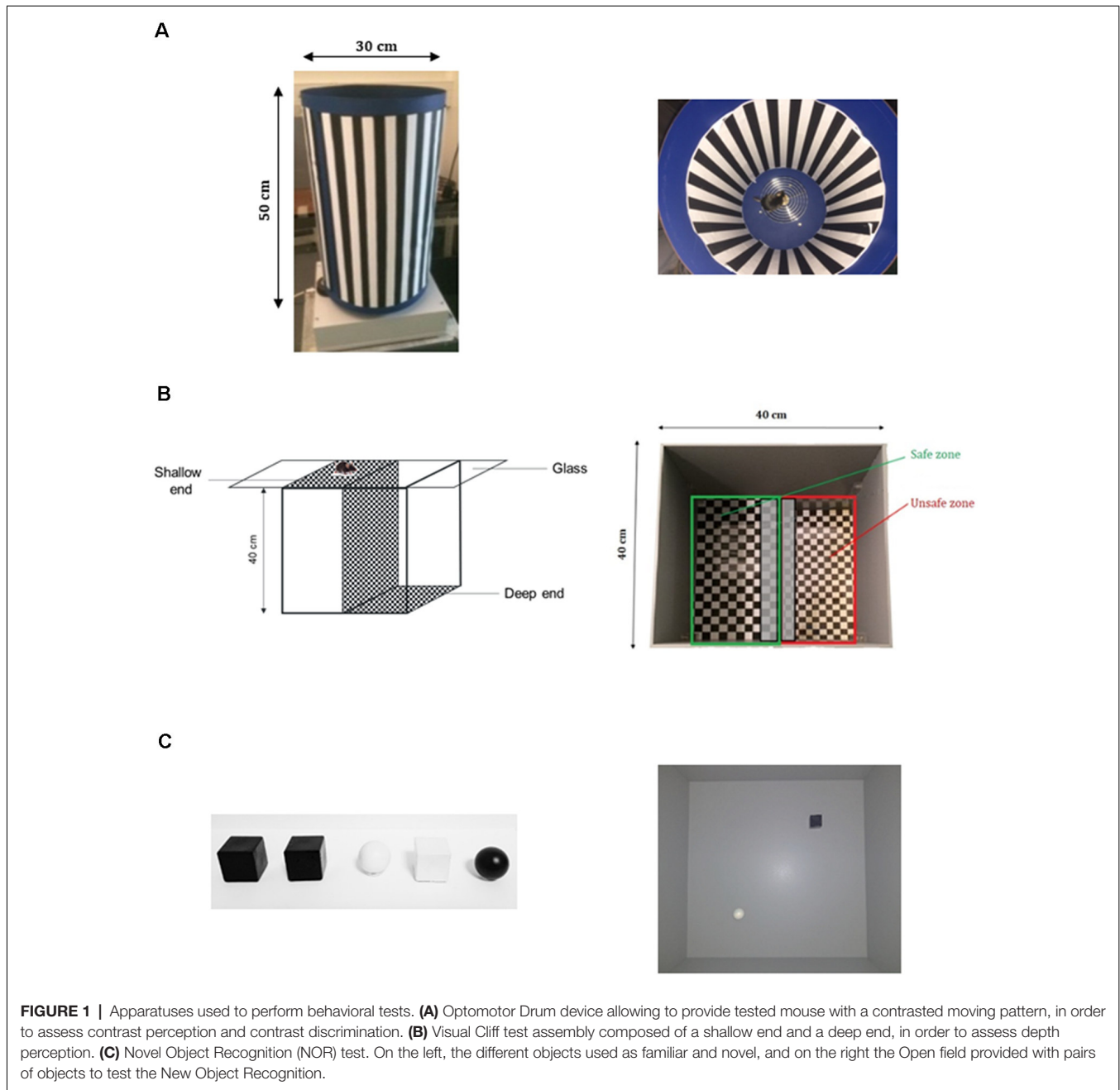
To investigate mice behavioral responses toward various contrasted conditions, we created an alternative test using the

concept of the Optomotor Drum. The same apparatus was used in similar conditions as described previously.

The only difference was in the pattern provided to the tested mouse. Herein, instead of a maximal contrasted pattern (black and white pattern classically used), vertical stripes were composed of a less contrasted pattern, creating shades of gray. We chose to quantify the “gray level,” and so the contrast created, using the Red Green Blue color value (RGB) color system. Briefly, this system constructs all colors as a combination of Red, Green and Blue, and allows to “express” them as three numbers, with values from 0 to 255. Typically, white is (255;255;255) and black is (0;0;0). In the RGB system, grays are expressed with the three same figures in their details. So, the advantage of using the RGB system is that grays are easily expressed. Therefore, we utilized this color system to design a gray scale (**Figure 2A**) and have chosen five shades of gray to composed new contrast-shaded patterns. Each pattern was composed of 2 cm wide vertical stripes alternating one of the chosen grays and black or white (**Figure 2B**). Therefore, in our conditions, contrast may be defined as the luminance difference between the two shades of gray used to compose a pattern, since a dark gray has a weak luminance and a light gray has a high luminance. This definition is similar to the one previously used in a study of contrast sensitivity using Optomotor Drum where the authors defined contrast as the difference in luminance between peak and valley of a sine-wave pattern (Umino and Solessio, 2013). We quantified the level of contrast of each pattern by calculating the difference between RGB numbers of the two colors of its stripes and the result was divided by 255 (e.g., if we used (x;x;x) and (y;y;y) with  $x < y$ , the contrast was  $C = (y - x)/255$ ). By convention, contrast was negative when, as compared to the standard condition ( $\lambda$ ), black was conserved and white had been darkened. Following these rules, we composed four contrast-shaded patterns, named beta, gamma, omega and psi (**Figure 2C**). Gray colors used were printed in a controlled manner, allowing us to perfectly monitor the contrast of the newly created pattern. These contrasted-pattern tests were processed and analyzed exactly as the standard Optomotor Drum test.

## Visual Cliff Test

Depth perception was assessed by Visual Cliff test (**Figure 1B**) as previously described (Fox, 1965; Glynn et al., 2003), with slight modifications. The apparatus consisted of three plastic boxes: two boxes (length: 20 cm; width: 40 cm; height: 40 cm) were placed side by side on the floor. The first box had its open side directed upward, and a checkboard pattern with black and white squares (2 cm  $\times$  2 cm) was settled on its bottom (at the ceiling of the box). The second box had its open side directed downward, and the checkboard pattern was placed on its top. The whole device was covered with a Plexiglas panel. The third box, bottomless and roofless (length: 40 cm; width: 40 cm; height: 40 cm) was placed above. In this setting, the third box represented an open field composed of two equal sections: the section above the first box (length: 20 cm; width: 40 cm) with a cliff of 40 cm discernable by the tested mouse between the Plexiglas panel and the checkerboard-patterned bottom,



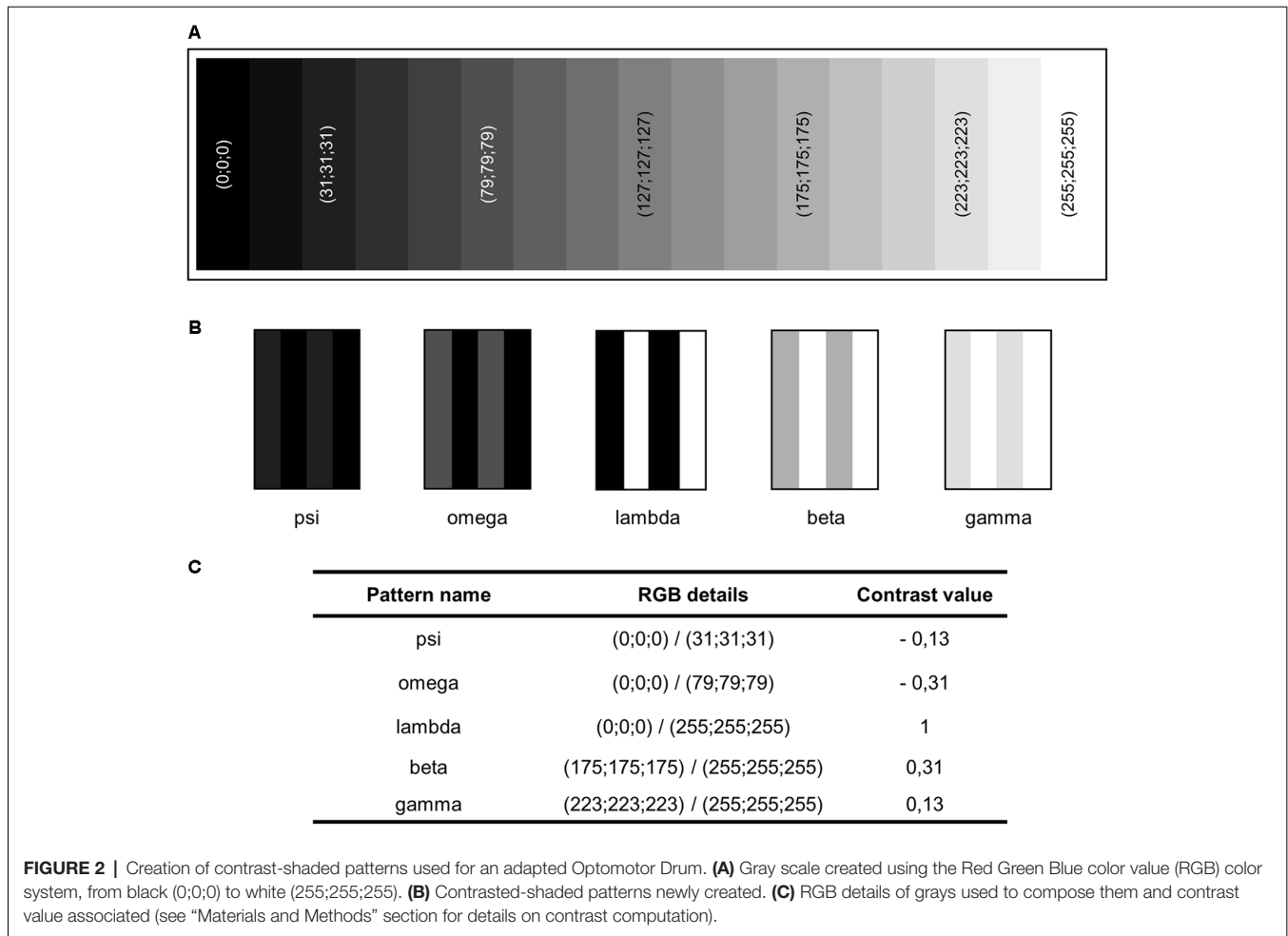
called “deep end” (or “unsafe zone,” red zone on the figure), and the section above the second box (length: 20 cm; width: 40 cm) called “shallow end” (or “safe zone,” green zone on the figure; **Figure 1B**). Homogenous luminance in the apparatus was controlled by lux meter at the height of mouse eyes and was set at 10 lux.

During testing, a mouse was placed in the corner of the shallow end section and was free to move all over the open field for 300 s. Its behavior was recorded by a video camera through appropriate video software (EthoVision XT10, Noldus, Netherlands). Apparatus was cleaned with 70% ethanol and

water between each mouse. A single operator blind to mouse genotypes conducted all assessment.

Videos were analyzed by video-tracking software (EthoVision XT10, Noldus, Netherlands). For the analysis, the open field was separated in two distinct zones: safe and unsafe zones.

Time spent in each zone was counted, and Preference Index (PI) for the safe zone [ $PI = (\text{Time in safe zone} / (\text{Total test time}) \times 100)$ ] was calculated for each mouse. Occurrences in each zone, as well as the total number of crossings between the two zones were also quantified. The total distance moved by the mouse during the test was also recorded.



## Novel Object Recognition Task (NOR)

The NOR task is a cognitive test about visual recognition memory. It is based on mouse innate tendency to preferentially explore novel stimuli, and allows to assess memory without external motivation, rewards or punishment (Ennaceur and Delacour, 1988) by measuring an index of stimulus recognition (Baxter, 2010). Briefly, the standard task (NOR1) consisted of three phases: habituation, familiarization, and choice (Bhattacharya et al., 2012; King and Jope, 2013; Gomis-González et al., 2016; Costa et al., 2018). The mouse was habituated to an empty open-field (40\*40\*40 cm) for 10 min, 48 h and 24 h before the task. This habituation (Phase 1) reduces mouse anxiety linked to the confrontation to a novel environment. The test day, the mouse was first given 3 min to rehabilitate to the empty arena, then a pair of identical objects (black plastic cube; 3\*3\*3 cm) was placed in diagonally opposite corners of the arena, approximately 5 cm from the walls of the box to allow investigation of all sides of the objects (Figure 1C). The mouse was then placed in the unoccupied corner facing the wall and allowed to freely investigate the two objects for 5 min (Phase 2 or familiarization). During the Phase 3 (or choice), objects were substituted by an identical object to the

previous ones and a novel object different in color and shape (white plastic ball; Ø3 cm; Figure 1C). Both objects were changed in order to exclude the contribution of the sense of smell in the object recognition performed by the tested mouse. Once again, the mouse was allowed to freely investigate the two objects during 5 min. These two phases were separated by a 3-min intertrial interval (ITI). The mouse was removed from the open-field and placed in a single-housing cage next to the arena for the duration of the ITI. We alternated the location of the novel object, so that half of the mice saw the novel object on their left and the other half saw it on their right. After each session, the open-field and objects were wiped with 70% ethanol to eliminate olfactory cues. All tests were carried out at 20 lux luminance by a single operator blind to mice genotypes.

In order to investigate how color and shape impact the recognition of novel object, we generated two slightly modified versions of the NOR task, named NOR2 (color-modified version) and NOR3 (shape-modified version). The difference among the three versions relies on the presented objects during the choice phase: during the NOR2 the novel object differed from the familiar by its color (white plastic cube; 3\*3\*3 cm) and during

the NOR3 the novel object differed by its shape (black plastic ball; Ø3 cm; **Figure 1C**).

This object recognition test was set up with black and white objects in order to draw a parallel with the Optomotor Drum test. The idea was to use a contrast between the two objects of the same intensity that black and white stripes of the Optomotor Drum. The texture characteristic of the object was deliberately retained in order to modify only visual characteristics without interfering with the tactile modality.

Videos were analyzed by video-tracking software (EthoVision XT10, Noldus, Netherlands). Object exploration was scored only when the mouse's nose or front paws were in contact with the object. Duration (time) and frequency (number of visits) of object exploration during each phase were recorded, and a discrimination index representing the difference of time exploring each object between the familiarization phase and the choice phase (expressed in percentage of the exploration time during familiarization phase).

## Statistical Analysis

All results are expressed as mean  $\pm$  SEM. Data analysis was performed using Statistica 13.3. For all statistical tests, a confidence interval of 0.95 was initially chosen (i.e.,  $\alpha = 0.05$ ). For all data, we tested the distributions' normality with the Shapiro–Wilk's test, and the homogeneity of variances with Levene's test when an analysis of variance (ANOVA) analyze was required. For Visual Cliff and NOR tests, we used repeated-measures ANOVA followed by *post hoc* Fisher's LSD test when a statistically significant main effect or interaction was detected ( $p < 0.05$ ). For the Visual Cliff test, main factors were zone (Fz), genotype (Fg) and age (Fa). For NOR tests main factors were object (Fo) and genotype (Fg). For Optomotor tests, statistical analysis was conducted using two-way ANOVA with age (Fa), genotype (Fg), or a three-way ANOVA with age (Fa), genotype (Fg) and minute (Fm) as main factors. For contrast-shaded Optomotor, we used a repeated-measures ANOVA followed by *post hoc* Fisher's LSD test with contrast condition (Fc) and genotype (Fg) as main factors. For all tests, when non-parametric tests were required, a Kruskal–Wallis test was realized followed by Wilcoxon's test with a  $p$  correction. In figures, significant differences between groups are noted by \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$  for genotype comparisons, and by # $p < 0.05$ ; ## $p < 0.01$ ; ### $p < 0.001$ ; #### $p < 0.0001$  for intra-groups comparisons.

## RESULTS

### Contrast Perception Impairment in *Fmr1*<sup>-/-</sup> Mice

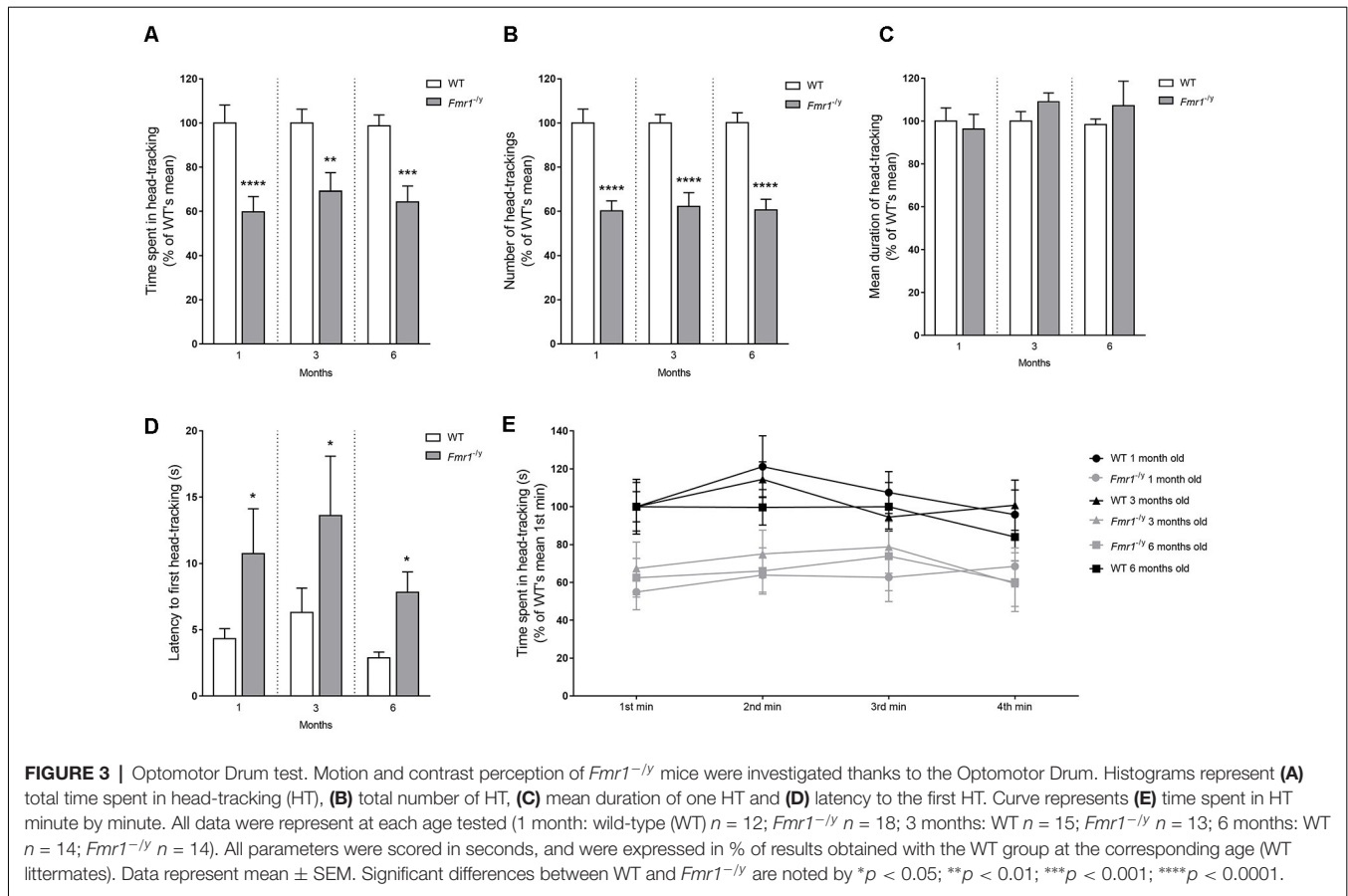
Motion and contrast understanding of *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice were investigated thanks to the Optomotor Drum. This apparatus is based on a natural reflex: a mouse with visual abilities efficient enough to detect a contrasted motion passing through its visual field would have the reflex to follow this stimulus with its head, at least for a brief moment (Mitchiner et al., 1976; Schmucker et al., 2005; Kretschmer et al., 2015). This instinctive

movement, called the optomotor response and illustrated in practice by a HT, reflects the ability to detect and understand a contrasted motion occurring in the visual field, and so is not due to cognitive and computational abilities. This test rests on the optokinetic nystagmus reflex occurring when a visual target moves across the visual field (Mitchiner et al., 1976), reflecting the animal perception of a moving stimulus. Since for rodents the optomotor response is well correlated to the optokinetic reflex (Kretschmer et al., 2017), the Optomotor Drum test has been described to be a robust test to investigate vision of contrasts abilities in mice, allowing data collection without invasive procedure (Thaung et al., 2002). Therefore, this test performed without any motion limitation allows to gain information on the visual abilities without training, exacerbated anxiety, and overall without involvement of mouse cognitive abilities, and has been demonstrated to be a very robust test to discriminate rodents with normal vision from those with visual alterations (Lawrence et al., 2000; Schmucker et al., 2005; Akimov and Rentería, 2012; Umino and Solessio, 2013).

This test was carried out on 1-3- and 6-month-old mice. All mice were able to perform HT, and the operator did not observe any difference in the way HT were performed between genotypes. Parameters recorded were the number of HT and the total time spent in HT, from which were calculated the mean duration of a HT (**Figure 3**). For all these parameters, statistical analysis did not revealed any interaction between age and genotype (duration  $F_{a,g(2,80)} = 0.221$ ,  $p = 0.802$ ; number  $F_{a,g(2,80)} = 0.022$ ,  $p = 0.978$ ; mean duration WT  $\chi^2_{(2)} = 0.295$ ,  $p = 0.863$ ; *Fmr1*<sup>-/-</sup>  $\chi^2_{(2)} = 2.93$ ,  $p = 0.230$ ). However, a genotype effect on both total time spent in HT ( $F_{g(1,80)} = 37.53$ ,  $p < 0.0001$ ) and the number of HT ( $F_{g(1,80)} = 90.84$ ,  $p < 0.0001$ ) was highlighted. Indeed, *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice spent significantly less total time in HT as compared to their WT littermates (1 month:  $p = 0.0001$ ; 3 months:  $p = 0.002$ ; 6 months:  $p = 0.0008$ ; **Figure 3A**), resulting from a significant decrease in number of HT (1 month:  $p < 0.0001$ ; 3 months:  $p < 0.0001$ ; 6 months:  $p < 0.0001$ ; **Figure 3B**). *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice provided a 40% decreased response as compared to WT ones (**Figures 3A,B**). Importantly, there was no genotype effect on the mean duration of an HT. Indeed, no significant difference was obtained for this parameter between WT and *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice (1 month:  $p = 0.433$ ; 3 months:  $p = 0.140$ ; 6 months:  $p = 0.908$ ; **Figure 3C**), highlighting that variation observed in the total time spent in HT was directly linked to the number of HT, and not to a variation in the duration of each HT. This underlines that the ability to perform a correct HT was not altered in *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice and that their head and neck motion did not hinder their task performance. Moreover, similar results were obtained when considering each rotation direction (clockwise and counterclockwise), whatever the age (**Supplementary Figure S1**).

Ultimately, it is important to highlight that decreased total duration and number of HT observed in *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice were similar across all three tested ages, approximately 35%, from 1 to 6 months old.

We recorded the latency to the first HT provided by each mouse, meaning the time between the first HT movement



and the start of the drum rotation. Statistical analysis did not reveal any significant difference between results at 1, 3 and 6 months, whatever the genotype (WT  $\chi^2_{(2)} = 0.806$ ,  $p = 0.668$ ; *Fmr1*<sup>-/-</sup>  $\chi^2_{(2)} = 1.083$ ,  $p = 0.582$ ). One-month-old *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice showed a significant ( $p = 0.015$ ) increase in latency to the first HT in regards to WT. Results remained stable from one age to another (Figure 3D), with a significant difference between WT and *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice in their latency to first HT (3 months:  $p = 0.016$ ; 6 months:  $p = 0.013$ ). These results underline the lower ability of *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice in contrast perception. Moreover, we quantified the time spent in HT at each minute of the test (Figure 3E). In accordance with previous results, statistical analysis showed a genotype effect on this parameter ( $F_{g(1,80)} = 0.699$ ,  $p < 0.0001$ ) without any interaction between age and genotype ( $F_{a,g(2,80)} = 0.299$ ,  $p = 0.742$ ). Moreover, no effect of the minute of the test was noticed ( $F_{m(3,80)} = 2.31$ ,  $p = 0.076$ ) without any significant interaction between genotype and the minute of the test ( $F_{g,m(3,80)} = 0.777$ ,  $p = 0.507$ ). These results indicate that for all three tested ages WT and *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice spent similar time in HT at each minute of the test. These data show that the response to this test remained stable throughout the whole test duration, whatever the genotype. Thus, the overall decreased response of *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice was not due to shorter HT, or to a decrease occurring during the test. *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice had a similar mean

duration of HT than WT, and their response remained stable during the 4 min of the test, whatever the rotation direction of the drum.

*Fmr1*<sup>-/-</sup> mice spent less time in HT than WT ones, due to a reduced number of HT. This decrease was not due to disinterest or a lack of attention span that occurred when mice performed an HT, and throughout the whole test duration. As illustrated by their clearly raised latency to the first HT, *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice showed difficulties in the detection of the contrasted stimulus.

Globally, the lower response of *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice to the Optomotor Drum test highlighted defects in vision of contrast and motion, from youth to adulthood, in a stable way through the ages.

## Contrast Discrimination Alterations in *Fmr1*<sup>-/-</sup> Mice

In order to sharpen our understanding of the defects in vision of contrasts of *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice, we reused the Optomotor Drum to investigate their behavioral response toward various contrasted conditions. The standard test showed that mouse responses remained stable from 1 to 6 months old, whatever the genotype. Therefore, seeking for a refinement of animals used, the Contrast-shaded Optomotor Drum test was performed only at one age (3 months) for all conditions tested. As for the standard test, parameters recorded were the time spent in HT and

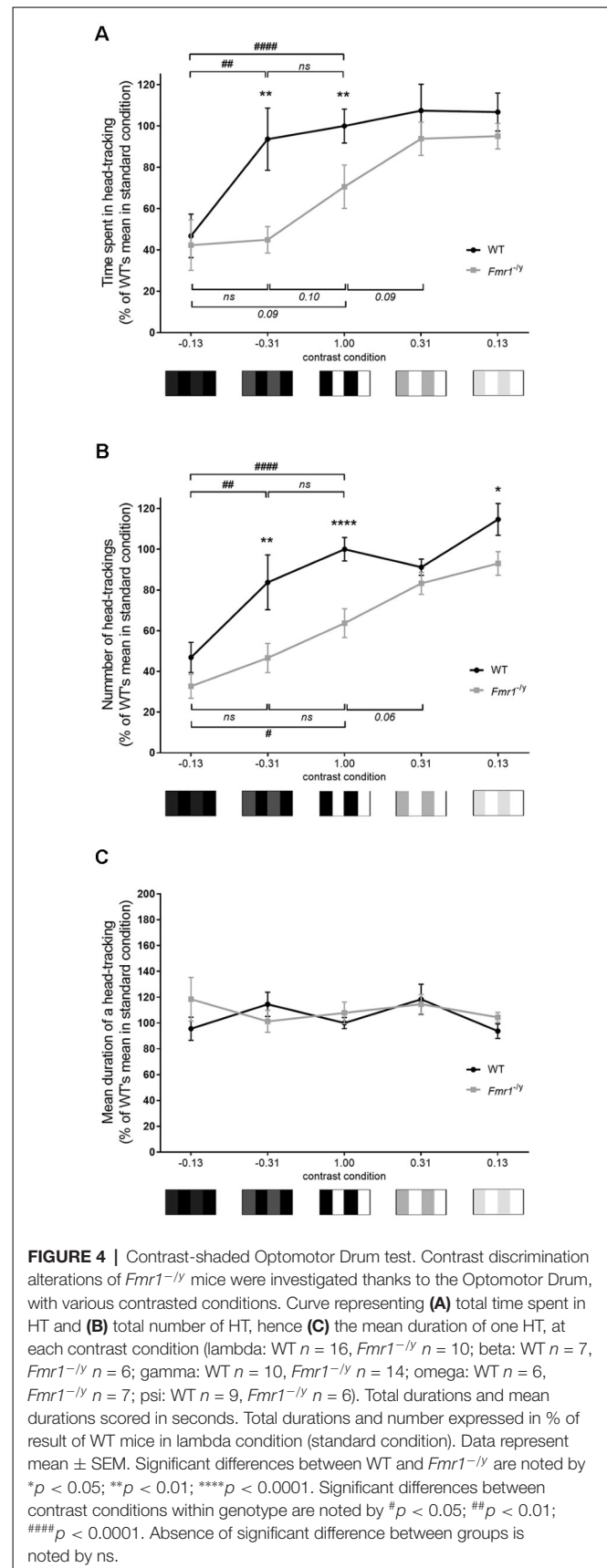


the number of HT, from which the mean duration of a single HT was deduced.

First, it has to be noted that whatever the genotype mice responded to all contrast conditions tested. These conditions did not allow to determine a threshold beyond which contrast would be too weak to be perceived (**Figure 4**).

Then, irrespectively of the genotype, the observed response depended on the contrast used. Indeed, statistical analysis showed an effect of contrast condition ( $F_{c(4,81)} = 10.15$ ,  $p < 0.0001$ ), but also a genotype effect ( $F_{g(1,81)} = 11.49$ ,  $p = 0.001$ ) on the total time spent in HT (**Figure 4A**). The evolution of time spent in HT, in regards to contrasts, differed between genotypes. Indeed, at  $C = -0.31$  WT mice spent significantly more time in HT than at  $C = -0.13$  ( $p = 0.003$ ), reaching a similar duration to the one performed at  $C = 1$  ( $p = 0.653$ ). In contrast, at  $C = -0.31$  *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice spent a similar amount of time in HT to the one performed at  $C = -0.13$  ( $p = 0.874$ ) and a very low amount of time compared to the one recorded in standard condition ( $p = 0.098$ ). Consequently, even if the time spent in HT was similar between both genotypes at  $C = -0.13$  ( $p = 0.772$ ), it became significantly different as contrast reached  $-0.31$  ( $p = 0.003$ ) and remained different when  $C = 1$  ( $p = 0.008$ ), as previously described with the standard Optomotor Drum. Thus, from  $C = -0.13$  to  $C = 1$ , the time spent in HT increased whatever the genotype, but following different patterns for each genotype. Interestingly, mice did not provide these evolutions when contrast varied from 0.13 to 1. Compared to standard condition, WT mice spent a similar time in HT at  $C = 0.31$  ( $p = 0.577$ ) and at  $C = 0.13$  ( $p = 0.569$ ). Thus, WT mice did not decrease their time spent in HT when contrast was reduced. On the contrary, *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice spent more time in HT at  $C = 0.31$  than at 1 ( $p = 0.089$ ), but not at  $C = 0.13$  ( $p = 0.931$ ). Thus, *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice increased their time spent in HT and remained stable when contrast was reduced from 1 to 0.13. Consequently, the difference in the time that mice spent in HT between WT and *Fmr1*<sup>-/-</sup> was not significant anymore at  $C = 0.31$  ( $p = 0.409$ ) nor at 0.13 ( $p = 0.341$ ).

In accordance with results obtained with the standard test, whatever the genotype, the time spent in HT was correlated to the number of HT (**Figure 4B**). Results regarding the number of HT followed identical trends than those described for total duration spent in HT. Indeed, statistical analysis highlighted an impact of contrast ( $F_{c(4,81)} = 20.98$ ,  $p < 0.0001$ ) and of genotype ( $F_{g(1,81)} = 24.15$ ,  $p < 0.0001$ ) on number of HT performed by mice. Whatever the genotype number of HT varied with the contrast tested, and the evolution of the number of HT as a function of the contrast differed between genotypes. At a contrast of  $-0.31$  WT mice performed more HT than at  $-0.13$  ( $p = 0.0019$ ), reaching a score similar to the one performed at  $C = 1$  ( $p = 0.123$ ), whereas, *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice performed a number of HT similar to the one at  $-0.13$  ( $p = 0.255$ ) and lower from the standard condition score ( $p = 0.161$ ). Therefore, even if the number of HT was similar between genotypes at  $C = -0.13$  ( $p = 0.223$ ), it became different as the contrast reached  $-0.31$  ( $p = 0.003$ ) and remained different in standard condition ( $p < 0.0001$ ). Thus, when the contrast increased from  $-0.13$  to 1, the number of HT increased for both genotypes, but at different



rates for each genotype. As for the time spent in HT, evolutions of the number of HT were different when contrast varied from 0.13 to 1. In regards to standard condition, WT mice performed a similar number of HT at  $C = 0.31$  ( $p = 0.375$ ) and at  $C = 0.13$  ( $p = 0.100$ ). Then WT mice did not decrease their number of HT when contrast was reduced. On the contrary, *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice performed a higher number of HT at  $C = 0.31$  than at  $C = 1$  ( $p = 0.060$ ) but not at  $C = 0.13$  ( $p = 0.361$ ). Thus, *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice increased their number of HT and then remained stable when contrast decreased from 1 to 0.13. Based on these results, the mean duration of a HT was calculated. It remained similar between genotypes whatever the contrast condition (**Figure 4C**); thus, results previously obtained were not due to a difference in the duration of an HT between genotypes.

It is interesting to highlight that, irrespective of the genotype, for two patterns with an identical gap in the RGB scale, mice did not provide the same responses. Those depended on whether the contrasted pattern was in light or in dark shades of gray. However, WT and *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice did not provide similar evolution through contrasts, leading to significant differences of response for several contrasts tested. Together, these results show that mice have difficulties distinguishing a sharp contrast in a dark condition. However, as soon as the contrast was somewhat increased WT mice reached their maximal score in contrast detection, whereas *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice did not enhance their response. *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice required a far more increased contrast to enhance their contrast detection ability and leave their basal response. Therefore, *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice display impaired discrimination of contrasts. Results highlighted a shifting in *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice response to increased contrast, with a rise in response postponed on the contrast scale, meaning that *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice have a lower sensitivity to contrast.

## Depth Perception Deficiency in *Fmr1*<sup>-/-</sup> Mice

We assessed depth perception in *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice by subjecting them to the Visual Cliff test, which has been shown to be effective in distinguishing between animals with normal and poor visual abilities (Fox, 1965). Main parameters recorded were the total occurrences and time spent by mice in each zone (safe, unsafe), but also distance moved. Three and 6-months-old mice underwent this test.

### Time and Occurrences

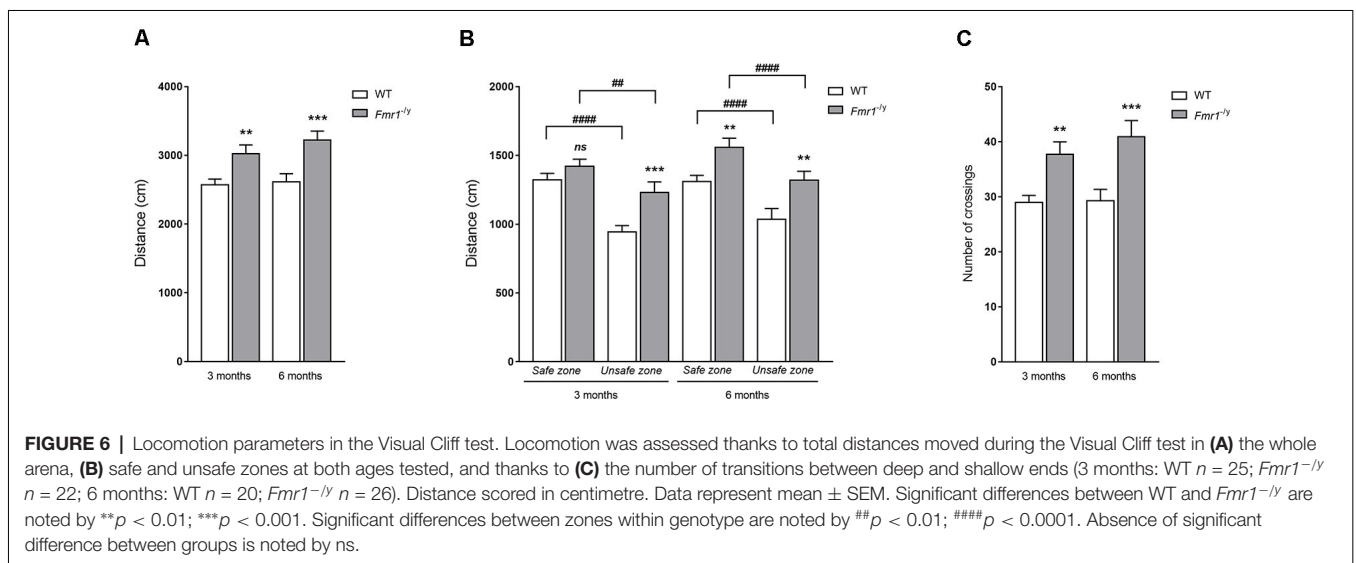
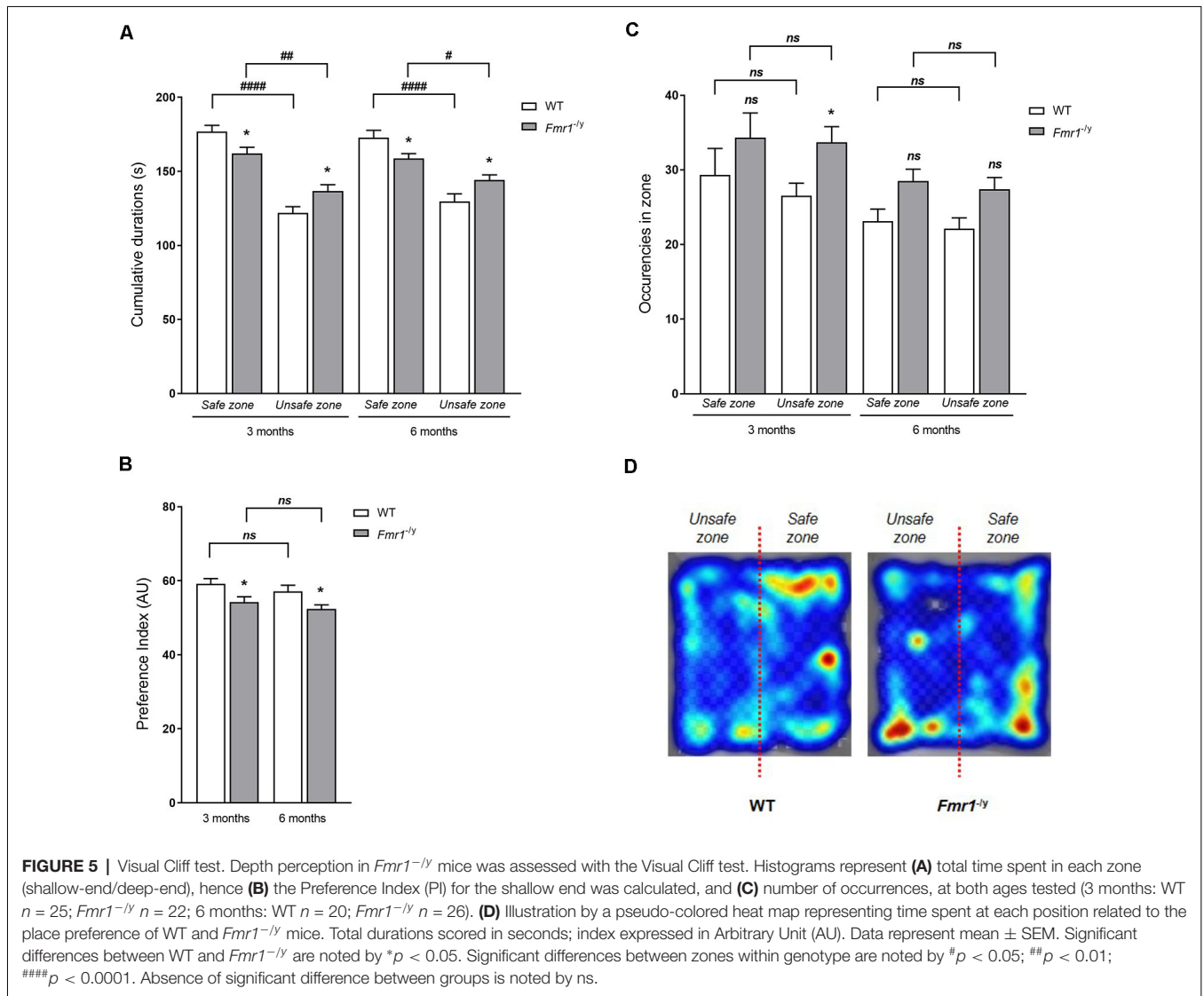
First, age had no impact on occurrences and time in zones or on the PI for the safe zone. Indeed, no significant interaction between zone, genotype and age was noticed (time in zones  $F_{z,a,g(1,90)} = 0.28, p = 0.94$ ; PI,  $F_{a,g(1,90)} = 0.002, p = 0.96$ ; occurrence  $F_{z,a,g(1,90)} = 0.28, p = 0.59$ ). Each genotype provided similar behavioral profiles in regard to occurrences and time spent in zones, and so for PI, whatever the age (**Figures 6A–C**). Moreover, a zone effect ( $F_{z(1,90)} = 67.47, p < 0.0001$ ) was observed on the total time spent in each zone (**Figure 5A**), with more time spent in the safe zone than in the unsafe zone whatever the genotype (3 months: WT  $p < 0.0001$ ; KO  $p = 0.004$ ; 6 months: WT  $p < 0.0001$ ; KO  $p = 0.041$ ). However, a significant interaction between zone and genotype ( $F_{g,z(1,90)} = 12.04, p = 0.0008$ ) was

noticed. Indeed, as compared to WT mice, *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice spent significantly more time in the unsafe zone (3 months:  $p = 0.014$ ; 6 months:  $p = 0.017$ ) and less time in the safe zone (3 months:  $p = 0.014$ ; 6 months:  $p = 0.019$ ; **Figure 5A**). Based on these results, a PI for the safe zone was calculated for each mouse. A genotype effect ( $F_{g(1,90)} = 12.02, p = 0.0008$ ) was observed on PI since *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice had a significantly lower PI than WT mice (3 months:  $p = 0.013$ ; 6 months:  $p = 0.018$ ). This index suggests that *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice showed a decreased preference for the safe zone compared to WT (**Figure 5B**). Regarding occurrences in each zone, a genotype effect ( $F_{g(1,90)} = 8.07, p = 0.005$ ) appeared on entry frequency in safe and unsafe zones (**Figure 5C**). Indeed, as compared to WT mice, *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice performed a higher number of occurrences in the safe zone (3 months:  $p = 0.120$ ; 6 months:  $p = 0.097$ ) as in the unsafe zone (3 months:  $p = 0.030$ ; 6 months old:  $p = 0.102$ ). Moreover, the zone had no effect on the number of occurrences ( $F_{z(1,90)} = 1.69, p = 0.196$ ). The number of entries in each zone were similar between safe and unsafe zones for WT mice (3 months:  $p = 0.174$ ; 6 months:  $p = 0.655$ ) as for *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice (3 months:  $p = 0.771$ ; 6 months:  $p = 0.592$ ; **Figure 5C**), explaining why the interaction between genotype and zone was not statistically significant ( $F_{g,z(1,90)} = 0.242, p = 0.623$ ). Thus, genotype imbalance observed in times spent in each zone is not due to the number of visits in each zone, as illustrated by the heat map recorded for each genotype (**Figure 5D**).

Herein, *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice showed an altered behavior in the Visual Cliff characterized by an increased time in unsafe zone without increase in the number of entries in this zone. It is worth noting that whatever the genotype, mice spent more time in the safe zone than in the unsafe zone. Consequently, our results did not show a loss of the preference for the safe zone, but only a decrease in the preference for the safe zone. This imbalance in the presence in each zone led to a clear decrease of the PI for the safe zone of *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice.

### Locomotion

Regarding locomotion features (**Figure 6**), a genotype effect ( $F_{g(1,90)} = 19.40, p < 0.0001$ ) was observed on the total distance covered during the test without any significant interaction between genotype and age ( $F_{g,a(1,90)} = 0.315, p = 0.576$ ). Indeed, 3-month-old *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice demonstrated a significantly higher distance traveled in regards to WT ones ( $p = 0.007$ ), and 6-month-old mice presented a similar profile, with *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice covering a significantly higher distance than WT ones ( $p = 0.0007$ ; **Figure 6A**). Furthermore, the distance moved in each zone of the apparatus was quantified (**Figure 6B**). A zone effect ( $F_{z(1,90)} = 80.20, p < 0.0001$ ) was noticed, but there was no significant interaction between genotype and zone ( $F_{g,z(1,90)} = 3.79, p = 0.054$ ), nor between zone and age ( $F_{a,z(1,90)} = 0.097, p = 0.756$ ). These results illustrate that mice covered a significantly shorter distance in a deep zone than in a shallow zone, whatever the genotype and age (3 months: WT  $p < 0.0001$ ; *Fmr1*<sup>-/-</sup>  $p = 0.003$ ; 6 months: WT  $p < 0.0001$ ; *Fmr1*<sup>-/-</sup>  $p < 0.0001$ ; **Figure 6B**). A genotype effect was observed ( $F_{g(1,90)} = 17.90, p < 0.0001$ ) on the distance covered in the shallow end as well as in the deep end but statistical analysis



did not show a significant interaction between age and genotype ( $F_{a,g(1,90)} = 0.342$ ,  $p = 0.5604$ ). Indeed, 3-month-old *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice walked a higher distance than WT ones in safe zone ( $p = 0.253$ ) as in unsafe zone ( $p = 0.001$ ), and a similar profile was observed at 6 months old, with *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice traveling a significant higher distance than WT mice in the shallow end ( $p = 0.009$ ) as in the deep end ( $p = 0.001$ ; **Figure 6B**).

Ultimately, the total number of crossings between safe and unsafe zones performed by tested mice was recorded (**Figure 6C**). A genotype effect ( $F_{g(1,90)} = 19.53$ ,  $p < 0.0001$ ) was obtained without any significant interaction between age and genotype ( $F_{g,a(1,90)} = 0.282$ ,  $p = 0.596$ ), illustrating that *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice performed a significantly greater number of crossings between shallow and deep ends than WT mice at both ages (3 months old:  $p = 0.007$ ; 6 months old:  $p = 0.0007$ ).

Together, these results on locomotion were in line with the well-known hyperactive behavior of *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice as described in the literature (Kramvis et al., 2013; Mines, 2013; Sørensen et al., 2015) in regards the distance moved in the arena. *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice covered a significantly longer distance than WT mice, in the shallow end as well as in the deep end. Therefore, as the hyperactivity occurred homogeneously in every zones of the arena, mouse locomotion did not explain the results we obtained in time and frequencies in zones. Even if *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice covered a longer total distance than WT ones during the test, this increase occurred in safe as in unsafe zone. Imbalance in the time spent in zones cannot be attributed to locomotion activity.

Thus, the imbalanced PI for the shallow end is not linked to locomotion phenotype in the *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice. The impaired response to the Visual Cliff test suggested that *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice had difficulties in depth perception, at 3 and 6 months old.

## Involvement of Visual Modalities Impaired in *Fmr1*<sup>-/-</sup> Mice in a Cognitive Task

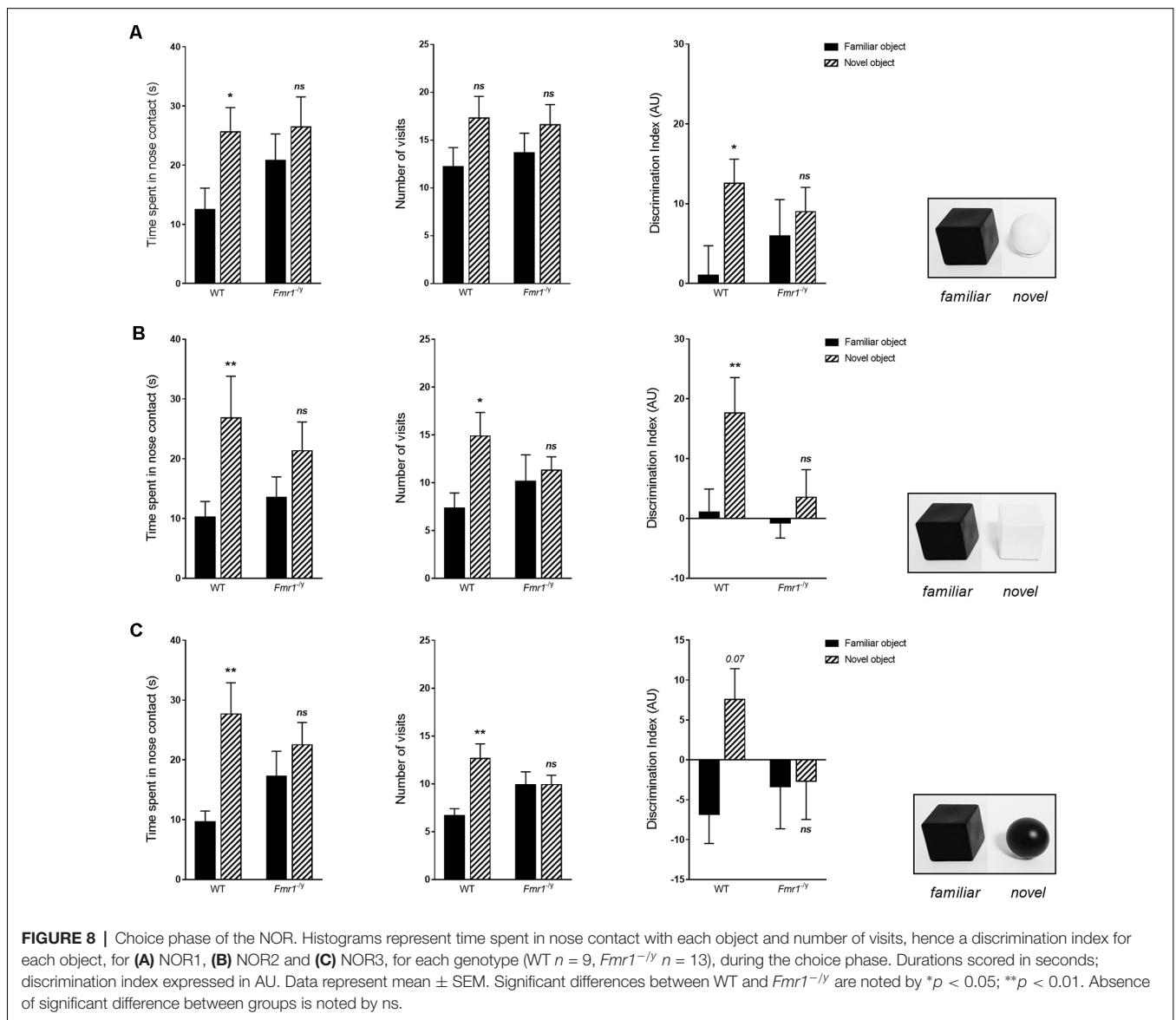
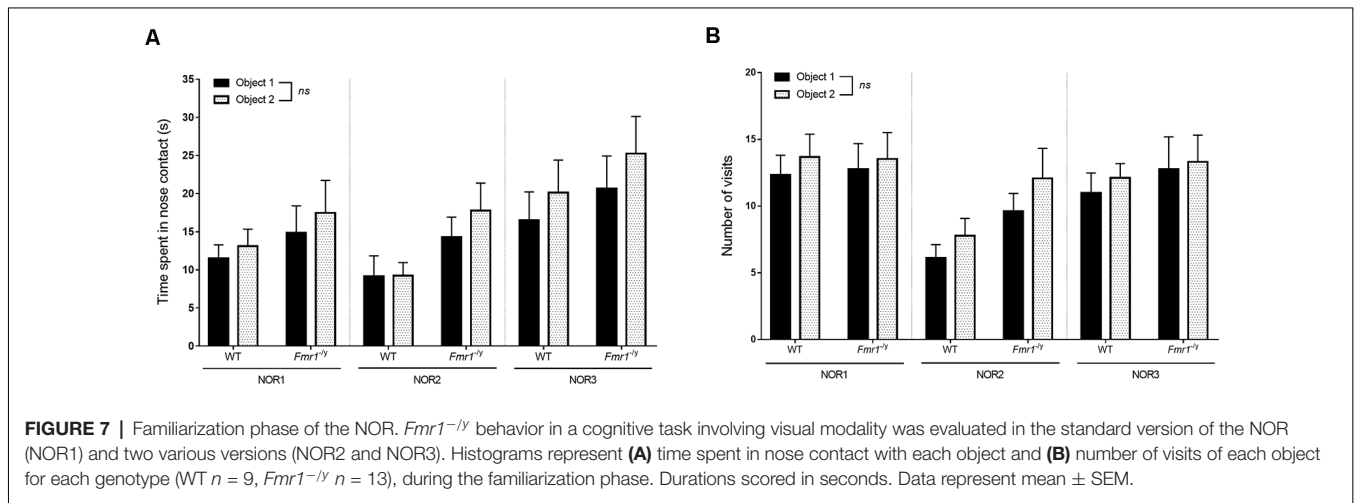
Visual memory recognition was evaluated thanks to the NOR task, in its standard version and in two modified tasks. This test rests on rodents' innate exploratory behavior when they are exposed to a novel and a familiar objects, and allows to assess memory without external motivation, rewards or punishment (Ennaceur and Delacour, 1988) by measuring an index of stimulus recognition (Baxter, 2010). Previous visual tests showed that mouse responses remained stable from 1 to 6 months old, whatever the genotype. Therefore, seeking for a refinement of animals used, NOR tests were performed only at one age (3 months old mice). For each phase, the number of nose contact with each object and the time spent exploring each object presented were recorded, hence a discrimination index for each object was calculated.

For the three versions of the test, the two identical objects presented in the familiarization phase were two black plastic cubes. During this phase, durations spent with objects were not impacted by the object (NOR1  $F_{o(1,20)} = 0.877$ ,  $p = 0.360$ ; NOR2  $F_{o(1,20)} = 1.26$ ,  $p = 0.274$ ; NOR3  $F_{o(1,20)} = 2.01$ ,  $p = 0.170$ ) and did not undergo interaction of the genotype (NOR1  $F_{g,o(1,20)} = 0.004$ ,  $p = 0.826$ ; NOR2  $F_{g,o(1,20)} = 1.187$ ,  $p = 0.288$ ; NOR3  $F_{g,o(1,20)} = 0.025$ ,  $p = 0.873$ ; **Figure 7A**). Indeed, WT and *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice did not spend more time with one object

than with the other. These results were coherent with the number of visits which were not impacted by the object (NOR1  $F_{o(1,20)} = 0.914$ ,  $p = 0.350$ ; NOR2  $F_{o(1,20)} = 3.75$ ,  $p = 0.067$ ; NOR3  $F_{o(1,20)} = 0.241$ ,  $p = 0.628$ ) nor by the genotype (NOR1  $F_{g,o(1,20)} = 0.065$ ,  $p = 0.800$ ; NOR2  $F_{g,o(1,20)} = 0.139$ ,  $p = 0.713$ ; NOR3  $F_{g,o(1,20)} = 0.029$ ,  $p = 0.866$ ; **Figure 7B**). These results suggested that there was no bias caused by a preference for an object due to its location. Moreover, no difference in global exploration was noticed between WT and *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice since both genotypes spent the same total time exploring objects (NOR1  $F_{g(1,20)} = 0.74$ ,  $p = 0.40$ ; NOR2  $F_{g(1,20)} = 3.01$ ,  $p = 0.099$ ; NOR3  $F_{g(1,20)} = 0.64$ ,  $p = 0.63$ ).

After a 3 min ITI, one of the two cubes was replaced by a new object, and the other cube was replaced by a duplicate cube. For the standard version of the test (NOR1), this object (a white plastic ball) differed by its shape and color. During the choice phase, statistical analysis revealed an impact of the object on the time spent in exploration ( $F_{o(1,20)} = 6.875$ ,  $p = 0.016$ ) and on the number of visits ( $F_{o(1,20)} = 5.858$ ,  $p = 0.025$ ). Indeed, WT mice spent significantly more time in contact with the new object ( $p = 0.027$ ), and tended to visit the new object more ( $p = 0.058$ ), whereas *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice did not present difference in their exploration of the two objects (time:  $p = 0.232$ ; number:  $p = 0.183$ ; **Figure 8A**). We obtained results similar to the literature (Bhattacharya et al., 2012; King and Jope, 2013; Gomis-González et al., 2016; Costa et al., 2018), with WT mice spending more time exploring the new object and *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice spending as much time sniffing the familiar object and the new one during the choice phase, although the total time of exploration of objects was similar between both genotypes. The frequency of approach to objects corroborated this result, since WT mice more often visited the new object than the familiar one, whereas *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice explored them similarly. This phenomenon is also represented by the discrimination index which corresponds to the difference of time spent exploring objects between the familiarization phase and the choice phase. Indeed, the discrimination index indicates that the time spent by WT mice sniffing the new object was significantly greater than the time spent in contact with the object replaced during the familiarization phase, even if WT mice explored the unchanged cube in the same proportion. Thus, WT mice have a significantly higher index for the new object vs. the familiar object ( $p = 0.052$ ), whereas this index is similar for the new object and the familiar for *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice ( $p = 0.519$ ; **Figure 8A**), the total time of objects exploration during this phase was similar between genotypes ( $F_{g(1,20)} = 0.675$ ,  $p = 0.420$ ).

For the NOR2 task, the new object was a white plastic cube so that only the color would discriminate the familiar object from the new object. Once again statistical analysis revealed an impact of the object on the time spent in exploration ( $F_{o(1,20)} = 10.97$ ,  $p = 0.003$ ) and on the number of visits ( $F_{o(1,20)} = 6.01$ ,  $p = 0.023$ ). WT mice were able to distinguish the two objects, as illustrated by a higher exploration time of the new object ( $p = 0.008$ ) and a larger number of nose-contact ( $p = 0.011$ ; **Figure 8B**). Consequently, WT mice have a significantly higher index for the new object vs. the familiar object ( $p = 0.004$ ). In contrast, *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice explored the two objects equally (time  $p = 0.1133$ ;



number  $p = 0.617$ ), similar to the one performed during the familiarization phase. Consequently, discrimination index of the two objects was similar for *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice ( $p = 0.329$ ).

For the NOR3 task, the new object was a black ball so that it differed from the familiar object in its shape but not by color. Once again statistical analysis revealed an impact of the object on the time spent in exploration ( $F_{(1,20)} = 11.77, p = 0.002$ ) and on the number of visits ( $F_{(1,20)} = 8.32, p = 0.009$ ). WT mice have a preference for the new object since they spent more time sniffing it ( $p = 0.002$ ) and came more often into contact with it ( $p = 0.001$ ). The discrimination index indicates that WT mice tended to spend more time in contact with the new object during this choice phase ( $p = 0.075$ ). *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice explored the two objects in a similar way (time  $p = 0.240$ ; number  $p = 1.000$ ), similar to the one performed during the familiarization phase, as illustrated by the discrimination index ( $p = 0.914$ ; **Figure 8C**). Interestingly, the discrimination index showed that *Fmr1*<sup>-/-</sup> spend less time exploring the two objects compared to the familiarization phase.

Furthermore, discrimination index of the three versions were statistically different for WT mice ( $\chi^2_{(2)} = 6.88, p = 0.031$ ) but not for *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice ( $\chi^2_{(2)} = 2.92, p = 0.112$ ). More precisely, WT mice exhibited a difference of discrimination index only between the second and the third versions (NOR2-3:  $p = 0.038$ ), and not between other versions (NOR1-2:  $p = 0.213$ ; NOR1-3:  $p = 0.085$ ). This may indicate that color impacts performance more in the NOR test than shape. Besides, it is important to underline that, for each genotype, there was no statistical difference between total durations spent in exploration during choice phases of the 3 versions of the test (WT:  $\chi^2_{(2)} = 1.42, p = 0.489$ ; *Fmr1*<sup>-/-</sup>:  $\chi^2_{(2)} = 1.29, p = 0.231$ ).

Regarding locomotion features, statistical analysis did not underline any difference between genotypes, whatever the phase, for NOR1 (familiarization  $F_{g(1,20)} = 1.591, p = 0.221$ ; choice  $F_{g(1,20)} = 0.125, p = 0.727$ ), NOR2 (familiarization  $F_{g(1,20)} = 0.010, p = 0.920$ ; choice  $F_{g(1,20)} = 0.0004, p = 0.983$ ) and NOR3 (familiarization  $F_{g(1,20)} = 0.928, p = 0.346$ ; choice  $F_{g(1,20)} = 0.020, p = 0.886$ ; **Supplementary Figure S2**). However, the hyperactivity phenotype of *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice was observed during the first day of habituation phase ( $F_{g(1,20)} = 6.37, p = 0.020$ ), where *Fmr1*<sup>-/-</sup> traveled a higher distance than WT. This difference disappeared in the course of the second day of habituation to the open-field.

Altogether, these results indicate that whatever the parameter modified, color or shape, WT mice were able to distinguish the replaced object, unlike *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice which were not able to discriminate the two objects in any version of the test.

## DISCUSSION

Evaluation of visual function and its effect on visually guided behavior is of high importance to better understand and characterize pathologies associated with visual integration and perception defects. In the FXS, absence of FMRP has been associated to visual system defect in patients, characterized by spatiotemporal visual processing alterations (Kogan et al., 2004b; Farzin et al., 2008) as in its murine model at the retinal level

(Rossignol et al., 2014; Perche et al., 2018). However, impact on the visual behavior had never been investigated. Our project aimed to better characterize visual disturbances in *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice from a behavioral perspective.

Contrast perception is a fundamental parameter for functional vision, involved in many tasks and crucial for other visual abilities, such as texture vision (Ginsburg, 2003; Ichihara et al., 2007). In fact, the vision of contrast requires properly measuring a local difference in luminance to detect a target. Contrast perception requires a gain control mechanism occurring in neurons of the early visual system, including retina, lateral geniculate nucleus and V1 cortex (Rathbun et al., 2016). To assess FMRP impact on the vision of contrasts, we implemented the Optomotor Drum test in its standard version (Cowey and Franzini, 1979; Schmucker et al., 2005). Herein, behavioral responses were distinct between WT and *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice. Both genotypes were able to provide a HT in front of the contrasted stimulus, but *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice presented a drop in their response as compared to WT. It is crucial to underline that in this reflex-based test the decrease observed in *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice response might not be due to disinterest or lack of attention, as observed in other behavioral tests (Moon et al., 2006; Casten et al., 2011; Krueger et al., 2011; Kramvis et al., 2013). Indeed, as illustrated by the increased latency to the first HT, *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice showed difficulties in the detection of the target, but when once achieved they followed it in the same way than WT one without variation of HT quality. Therefore, this behavior highlights a clear alteration in *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice abilities to perceive a contrasted stimulus. Interestingly, optomotor response can be affected by alterations of various structures of the visual system. Retina has a clear impact on optokinetic response since Optomotor Drum response is very different between rodents with normal or degenerated retinas (Lawrence et al., 2000; Thuang et al., 2002; Schmucker et al., 2005). Furthermore, the eyes of animals with different retinal states, degenerated or treated, provide different responses to the test (Thomas et al., 2004), clearly indicating that a satisfying retinal perception and transmission, independently to integrative performance, is a crucial parameter for contrast perception. Interestingly, the *Ins2Akita*/+ mouse model of diabetes with significant retinal alterations, particularly aberrant morphology of ganglion cells neurons characterized by enlarged somas, swollen dendrites and dendritic blebbing, presented an abnormal response to optomotor tasks which can be linked to these retinal neuronal injuries (Akimov and Rentería, 2012). Besides, defects in retinal starburst amacrine cells critically affect the optokinetic response in mice (Yoshida et al., 2001). As *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice exhibit those retinal neuronal defects, and provide electrophysiological evidences (*Bmax* and *n* parameters) that their retinas have an altered contrast sensitivity (Rossignol et al., 2014; Perche et al., 2018), these data likely create a link between the retinal absence of FMRP and *Fmr1*<sup>-/-</sup> defects in their perception of contrast and motion. Moreover, even if little is known regarding which cerebral structure mediates the optokinetic head tracking in rodents, the SC, which is known to initiate head and eye movement in orienting behaviors (Wurtz and Albano, 1980), may be involved in the optokinetic response. Thus, cellular and functional impairments in the

SC of *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice must be also involved in their altered optomotor performance. These observations reinforce the link we hypothesize between the absence of FMRP and contrast and motion perception.

Contrast sensitivity is a crucial property of vision that measures a local difference in luminance necessary to detect a target. In our contrast-shaded Optomotor Drum, contrast may be defined as the luminance difference between the two shades of gray used to compose a pattern, since a dark gray has a weak luminance and a light gray has a high luminance. This definition is similar to the one previously used in study of contrast sensitivity using Optomotor Drum, defining the contrast as the difference in luminance between peak and valley of a sine-wave pattern (Umino and Solessio, 2013). Here, we show that whatever the genotype mice have difficulties to distinguish a sharp contrast in dark conditions. However, as soon as the contrast was somewhat increased WT mice reached their maximal score in contrast detection, whereas *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice did not enhance their response. In this sense, *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice showed a lower sensitivity to contrast, since they demanded a far more increased contrast to enhance their contrast detection ability. A more important leap in contrast is necessary for *Fmr1*<sup>-/-</sup> to enhance their response towards contrasts. To go further, we can affirm that, in these conditions, we have highlighted an abnormality in the threshold beyond which mice leave their basal response since this threshold is shifted to a higher contrast for *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice compared to WT mice. *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice have a higher contrasted-threshold than WT to convert a weak response in their maximal response. Surprisingly, the *Fmr1*<sup>-/-</sup> response increase when the contrast was reduced in bright conditions when we could expect it to decrease or stay stable. Even though we remain unable to explain precisely this phenomenon, we can hypothesize that it comes from the difference in visual abilities of rodents between dark and light conditions. As mice are nocturnal mammals, processes that drive their visual abilities are different, depending on the lightness. Herein, this particular result may highlight that, in the *Fmr1*<sup>-/-</sup> mouse, the visual pathway driving discrimination of bright contrasts is less impacted by the absence of FMRP than visual pathway driving discrimination of dark contrasts. This may explain that performance in a bright contrast condition is better than in middle contrast condition. Therefore, we showed, for the first time, a clear hyposensitivity to contrast in the *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice. Moreover, as mentioned above, mice are nocturnal mammals, and so the perception of contrasts in obscurity is an important element for their survival. As *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice showed defects in perception of contrasts in dark conditions, these mice are more likely to present difficulties in their adaptation to their surrounding environment. This hypo-sensitivity to contrast in dark conditions can be coherently linked to electrophysiological alteration highlighted in the *Fmr1*<sup>-/-</sup> retina (Rossignol et al., 2014). ERG study in scotopic conditions revealed that *Fmr1*<sup>-/-</sup> retinas need a higher luminance difference, between the study flash and the background, to initiate a signal transmission in the inner retina, as showed by the *Fmr1*<sup>-/-</sup> delayed b-wave sensitivity curves. Thus, the contrast needed by the retina to initiate a signal transmission is higher in *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice than in

WT. Furthermore, we cannot exclude a brain involvement in such phenotype since a response to contrast is also modulated by the cerebral area of the geniculo-cortical pathway with neurons exhibiting their own gain response to contrast stimulus (Rathbun et al., 2016). Since *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice display molecular and cellular alterations in this pathway, as previously reported, a brain involvement in this contrast sensitivity alteration is highly probable. Once again, these observations reinforce our hypothesis of the link between the absence of FMRP and contrast perception alteration.

Depth perception is an important component of vision enabling three-dimensional visualization of the surrounding environment. It is based on the two-dimensional representation in the retina and requires monocular and binocular inputs (Lashley and Russell, 1934; Walk et al., 1957; DeAngelis et al., 1998). It is also important to note that by determining the depth perception, we evaluate the functional integrity of the retino-geniculo-cortical pathway meaning all the visual axis from the light perception by the retina to the cerebral integration by visual cortex (Fox, 1965; Mazziotti et al., 2017). To understand the role of FMRP on such visual depth perception, the Visual Cliff test was used. As described previously (Baroncelli et al., 2013), wide-type (WT) mice presented an innate tendency to avoid the deep side of the apparatus. However, *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice displayed a clear decrease of the PI for the safe zone, that cannot be attributed to locomotion activity. Therefore, *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice behavior in the Visual Cliff test highlighted a defect in their depth perception. This might affect the hypo-anxiety phenotype obtained with tasks assessing the emotional state of mice, such as the elevated plus maze test as *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice are less able to perceive the depth and, thus, may be less anxious of their environment (Heulens et al., 2012; Chen et al., 2013; Hebert et al., 2014). Interestingly, our results did not show a loss of the preference for the safe zone, but only a decrease in the preference for the safe zone. Thus, *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice are not totally unable to perceive the depth but have a clear impairment in their abilities to distinguish it. We can hypothesize that this phenotype penetrance is linked to the retino-geniculo-cortical pathway state in absence of FMRP. Indeed, it has been clearly demonstrated that modification of this pathway by targeting the retina or the visual brain areas modulate depth perception (Mazziotti et al., 2017; Tzameret et al., 2019). From a molecular standpoint, the decreased efficiency of the retino-geniculo-cortical pathway in *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice must be linked to the impairments of neuron-specific functions such as glutamate/GABA pathways or synaptic transmissions (Davidovic et al., 2011; Doll et al., 2017) due to well described protein deregulation in FXS conditions, such as PSD95, mGlu5, or SNARE complex expression defects (Zhu et al., 2011; Westmark, 2013; Tang et al., 2015; Aloisi et al., 2017). Interestingly, in the *Rbfox1* knockout animals characterized by impairments of the visual neuronal circuits due to SNARE complex protein alteration, a similar depth perception defect was observed (Gu et al., 2018). This observation reinforces our data on the direct link between the absence of FMRP and visual depth perception.

For the first time, *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice were investigated with visual specific behavioral tests. These tests brought into light deficits

in visual abilities, characterized by an altered perception of perspectives and lower abilities in understanding motion and contrast. Besides, this study highlighted the stability of *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice visual behavioral phenotype over time, particularly from adolescence to late adulthood, similarly to molecular and cellular impairments observed in various visual structures of *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice (Nimchinsky et al., 2001; Perche et al., 2018). Exact origins of defects are difficult to pinpoint since downregulation of *Fmr1* takes place in the retina but also in several brain structures that receive and process visual information. We demonstrated that *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice display clear disturbances that are in their way when perceiving their surrounding environment, even in their usual comfort condition of dim light. Therefore, this pioneering investigation raised the question of the involvement of visual abilities when performing other tasks, and in particular behavioral tests used to assess cognitive skills in mice, and how visual disorders may affect performance.

For a long time, many behavioral scientists argued that laboratory mice were nearly blind, or at least did not use vision in behavioral tasks (Baker, 2013). Recently, some studies have shown that vision is important in mice, as exemplified by the accurate capture of prey carried out not only through defensive behaviors (Hoy et al., 2016). Furthermore, many visual-spatial behavioral tasks require the ability to detect and distinguish several clues placed in the experiment room in order to establish a mental map of the room. Thus, an impaired vision can affect mice performance in many behavioral tasks. Cognitive traits of *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice had been investigated with behavioral tasks involving vision of objects or clues. Since our study shows that these mice display abnormalities in visual perception, we investigated the link between visual perception and the achievement of a cognitive task commonly used in laboratories, the NOR test. However, since *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice present an impaired recognition memory, as widely described in the literature (Ventura et al., 2004; Pardo et al., 2017; Yan et al., 2018; Yau et al., 2018), the study of the involvement of vision in this type of test can only be based on the behavior of WT mice.

We performed the NOR in its standard version (NOR1), in which the novel object presented in phase 3 differed from the familiar by its shape and its color (but has the same texture), and then in a modified task, in which the new object differed only by its color or its shape, in order to establish whether these characteristics could contribute to the recognition of the presented object. With the standard version, we obtained results similar to the literature (Bhattacharya et al., 2012; King and Jope, 2013; Gomis-González et al., 2016; Costa et al., 2018), with WT mice showing a preference for the novel object. Furthermore, it appears that whatever the modified feature (color or shape) WT mice were able to distinguish the familiar object from the new one, in the same way that in the NOR1. These results in WT mice indicate that discrimination of two objects is impacted by both color and shape. Furthermore, the comparison of discrimination indexes allowed us to highlight that color seemed a predominant characteristic in the process of visual recognition. Therefore, results we obtained with the two modified versions of the test showed that, beyond to the cognitive aspect, this test involves visual abilities.

In this type of behavioral task, an interaction between the cognitive disorders and visual impairment may exist. Herein, *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice present difficulties in distinguishing an unknown object from a familiar object in all versions of the test, as described in the literature with the standard NOR (Bhattacharya et al., 2012; King and Jope, 2013; Gomis-González et al., 2016; Costa et al., 2018). The previously demonstrated visual impairments in *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice may partly explain this phenotype. Since cognitive defects of the *Fmr1*<sup>-/-</sup> mouse strain is well-described and knowing that these mice present visual impairments, we cannot ignore that visual alterations must affect their NOR performance. Previously, some misleading cognitive studies have been questioned because they did not sufficiently take into account visual disturbances. As an example, the abnormal behavioral response of a mouse model with Huntington's Disease (R6/2) to Morris water maze and Visual Cliff tests had been linked to cognitive impairments known in this pathology (Lione et al., 1999). Nevertheless, eventually researchers discovered that the mutation in mice also leads in to a retinal degenerative anomaly (Ragauskas et al., 2014), and thus affected their behavioral responses. This study clearly demonstrated that it is crucial to first investigate mice visual abilities before performing such behavioral tasks. Therefore, our results underline that it becomes important to consider visual modality disorders when performing various behavioral tests, not only regarding the *Fmr1*<sup>-/-</sup> mouse strain but more broadly for many rodent models of neuropsychiatric pathologies.

Neurosensory abnormalities are a strong phenotype of the FXS conditions. Indeed, odorant sensitivity (Schilit Nitenson et al., 2015) and nociceptive responses after a local acute inflammation (Price et al., 2007; Busquets-Garcia et al., 2013) are significantly lower in the FXS model whereas an excessive excitability of auditory processing (Garcia-Pino et al., 2017) and an exaggerated response to whisker stimulation (He et al., 2017) were observed. Regarding vision, few data were reported and they were associated to cognitive mechanism such as the *Fmr1*<sup>-/-</sup> delayed learning on visual discrimination tasks (Goel et al., 2018). Herein, we clearly highlighted specific visual acuity skills defect. It's interesting to note that an electrophysiological study of *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice retina had shown a hypersensitivity to visual stimuli, in the sense that they provided an exacerbated transmission in the inner retina, together with an altered sensitivity toward contrasts (Rossignol et al., 2014; Perche et al., 2018). Our behavioral results, rather, provided a hyposensitivity to visual stimuli, since *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice were less sensitive to perspective, motion and contrast than WT littermates.

Interestingly, this visual phenotype observed in *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice is reminiscent of visual abnormalities described in FXS patients. Indeed, from childhood patients exhibit pervasive impairments in motion perception (Kogan et al., 2004b), together with deficits in the detection of moving contrasted stimuli (Farzin et al., 2008). Significant impairments have been observed in FXS patients while undergoing visual tests involving dynamics contrasted-or-textured stimuli and are in agreement with the phenotype described herein using the Optomotor Drum test. Furthermore, our present study described a deficit in perspective perception in the absence of FMRP, but to date, no data is available regarding



the specific investigation of this visual trait in FXS patients. Yet, considering our present results, it would be pertinent to address how FXS patients perceive depth and perspective. This skill, together with contrast and motion perceptions, comprised visual abilities which are crucial to development and in performing common tasks, such as locomotion control, gait, orientation and obstacles position planning (Jahn et al., 2001; Rietdyk and Rhea, 2006; Hallemans et al., 2009, 2010). Thus, altered visual skills in FXS patients could contribute to their delayed sensori-motor features (Baranek et al., 2005) and to their impairments in neuropsychological tasks that require drawing skills and fine psychomotor coordination (Crowe and Hay, 1990; Freund and Reiss, 1991; Cornish et al., 1999). Although these tasks are multifactorial and performance is affected by many causes, visual-motor abilities are a common feature and largely affect patients' performance when altered. More importantly, the deficit showed by FXS patients in tasks assessing emotion recognition on faces may reflect information processing and memory deficits rather than dysfunction in emotion-recognition (Turk and Cornish, 1998). Various studies related deficits in scanning path and gaze when patients analyzed a face, with a reduced attention given to the eyes (Dalton et al., 2008; Shaw and Porter, 2013) rather than an absence of recognition or reaction toward an emotion. Decoding facial characteristics, and even more an emotion, is a complex task beginning with the perception of sharp and discrete clues, as slight shadows, folding, and modifications in facial texture. Our study highlighting deficits in contrast, motion and perspective perception in the absence of FMRP, together with previous investigation of visual skills in patients, theorizes that alteration in facial analyses is due to an unclear and unstable perception of face zones and of delicate contrasted and textures clues displayed by an emotion on a face.

In conclusion, our study filled the gap in the sensory investigation of *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice, and reinforces the idea we previously put forward (Perche et al., 2018): *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice exhibit a complex sensorial spectrum which should be called "dys-sensitivity." Interestingly, this visual phenotype observed in *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice is similar of visual abnormalities described in FXS patients (Kogan et al., 2004a; Farzin et al., 2008). Our results strengthen clinicians' theories assuming that sensory anomalies in FXS, or in other neuropsychiatric disorders as Autism Spectrum Disorder (ASD), lead to an incapacity for patients to understand and interact with their environment,

explaining behavioral abnormalities. Moreover, our study underlines the significance of visual behavior alterations in FXS conditions and how relevant it is to assess visual skills in neuropsychiatric models before performing behavioral tasks, such as cognitive assessments.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated for this study are available on request to the corresponding author.

## ETHICS STATEMENT

All experimental protocols received full review and approval by the regional animal care and use committee (Comité Régional d'Ethique à l'Expérimentation Animale—CREEA—TSA-DM Therapie1100) prior to conducting the experiments.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

CF, BH and OP conceived and designed the experiments. CF, BH, GM-D and KP-M performed the behavioral experiments. CF and BH analyzed the data. CF, BH and OP wrote the manuscript. CF, BH, MA, AM, J-CB, JP, SB and OP edited the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## FUNDING

The research was supported by CHR of Orléans, CNRS of Orléans, University of Orléans and regional Centre-Val de Loire grant (FRAXSENS 2017-2020). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Key-Obs for the Optomotor Drum rent.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnbeh.2019.00228/full#supplementary-material>

## REFERENCES

- Abrahams, B. S., and Geschwind, D. H. (2008). Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. *Nat. Rev. Genet.* 9, 341–355. doi: 10.1038/nrg2346
- Akimov, N. P., and Renteria, R. C. (2012). Spatial frequency threshold and contrast sensitivity of an optomotor behavior are impaired in the *Ins2Akita* mouse model of diabetes. *Behav. Brain Res.* 226, 601–605. doi: 10.1016/j.bbr.2011.09.030
- Aloisi, E., Le Corff, K., Dupuis, J., Zhang, P., Ginger, M., Labrousse, V., et al. (2017). Altered surface mGluR5 dynamics provoke synaptic NMDAR dysfunction and cognitive defects in *Fmr1* knockout mice. *Nat. Commun.* 8:1103. doi: 10.1038/s41467-017-01191-2
- Arnett, M. T., Herman, D. H., and McGee, A. W. (2014). Deficits in tactile learning in a mouse model of fragile X syndrome. *PLoS One* 9:e109116. doi: 10.1371/journal.pone.0109116
- Baker, M. (2013). Neuroscience: through the eyes of a mouse. *Nat. News* 502, 156–158. doi: 10.1038/502156a
- Bakker, C. E., Verheij, C., Willemsen, R., van der Helm, R., Oerlemans, F., Vermeij, M., et al. (1994). *Fmr1* knockout mice: a model to study fragile X mental retardation. The Dutch-Belgian Fragile X Consortium. *Cell* 78, 23–33. doi: 10.1016/0092-8674(94)90569-x
- Baranek, G. T., Danko, C. D., Skinner, M. L., Bailey, D. B. Jr., Hatton, D. D., Roberts, J. E., et al. (2005). Video analysis of sensory-motor features in infants with fragile X syndrome at 9–12 months of age. *J. Autism Dev. Disord.* 35, 645–656. doi: 10.1007/s10803-005-0008-7

- Baroncelli, L., Braschi, C., and Maffei, L. (2013). Visual depth perception in normal and deprived rats: effects of environmental enrichment. *Neuroscience* 236, 313–319. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.01.036
- Baron-Cohen, S., Ashwin, E., Ashwin, C., Tavassoli, T., and Chakrabarti, B. (2009). Talent in autism: hyper-systemizing, hyper-attention to detail and sensory hypersensitivity. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 364, 1377–1383. doi: 10.1098/rstb.2008.0337
- Baxter, M. G. (2010). “I’ve seen it all before”: explaining age-related impairments in object recognition. Theoretical comment on Burke et al. (2010). *Behav. Neurosci.* 124, 706–709. doi: 10.1037/a0021029
- Benkner, B., Mutter, M., Ecke, G., and Münch, T. A. (2013). Characterizing visual performance in mice: an objective and automated system based on the optokinetic reflex. *Behav. Neurosci.* 127, 788–796. doi: 10.1037/a0033944
- Bhattacharya, A., Kaphzan, H., Alvarez-Dieppa, A. C., Murphy, J. P., Pierre, P., and Klann, E. (2012). Genetic removal of p70 S6 kinase 1 corrects molecular, synaptic, and behavioral phenotypes in fragile X syndrome mice. *Neuron* 76, 325–337. doi: 10.1016/j.neuron.2012.07.022
- Busquets-García, A., Gomis-González, M., Guegan, T., Agustín-Pavón, C., Pastor, A., Mato, S., et al. (2013). Targeting the endocannabinoid system in the treatment of Fragile X syndrome. *Nat. Med.* 19, 603–607. doi: 10.1038/nm.3127
- Casten, K. S., Gray, A. C., and Burwell, R. D. (2011). Discrimination learning and attentional set formation in a mouse model of Fragile X. *Behav. Neurosci.* 125, 473–479. doi: 10.1037/a0023561
- Chen, X., Sun, W., Pan, Y., Yang, Q., Cao, K., Zhang, J., et al. (2013). Lithium ameliorates open-field and elevated plus maze behaviors and brain phosphoglycogen synthase kinase 3- $\beta$  expression in fragile X syndrome model mice. *Neurosciences* 18, 356–362.
- Cornish, K. M., Munir, F., and Cross, G. (1999). Spatial cognition in males with Fragile-X syndrome: evidence for a neuropsychological phenotype. *Cortex* 35, 263–271. doi: 10.1016/S0010-9452(08)70799-8
- Costa, L., Sardone, L. M., Bonaccorso, C. M., D’Antoni, S., Spatuzza, M., Gulisano, W., et al. (2018). Activation of serotonin 5-HT<sub>7</sub> receptors modulates hippocampal synaptic plasticity by stimulation of adenylate cyclases and rescues learning and behavior in a mouse model of Fragile X syndrome. *Front. Mol. Neurosci.* 11:353. doi: 10.3389/fnmol.2018.00353
- Cowey, A., and Franzini, C. (1979). The retinal origin of uncrossed optic nerve fibres in rats and their role in visual discrimination. *Exp. Brain Res.* 35, 443–455. doi: 10.1007/bf00236763
- Crowe, S. F., and Hay, D. A. (1990). Neuropsychological dimensions of the fragile X syndrome: support for a non-dominant hemisphere dysfunction hypothesis. *Neuropsychologia* 28, 9–16. doi: 10.1016/0028-3932(90)90082-y
- Dalton, K. M., Holsen, L., Abbeduto, L., and Davidson, R. J. (2008). Brain function and gaze fixation during facial-emotion processing in fragile X and autism. *Autism Res.* 1, 231–239. doi: 10.1002/aur.32
- Davidovic, L., Navratil, V., Bonaccorso, C. M., Catania, M. V., Bardoni, B., and Dumas, M.-E. (2011). A metabolomic and systems biology perspective on the brain of the fragile X syndrome mouse model. *Genome Res.* 21, 2190–2202. doi: 10.1101/gr.116764.110
- DeAngelis, G. C., Cumming, B. G., and Newsome, W. T. (1998). Cortical area MT and the perception of stereoscopic depth. *Nature* 394, 677–680. doi: 10.1038/29299
- Dolen, G., Osterweil, E., Rao, B. S., Smith, G. B., Auerbach, B. D., Chattarji, S., et al. (2007). Correction of fragile X syndrome in mice. *Neuron* 56, 955–962. doi: 10.1016/j.neuron.2007.12.001
- Doll, C. A., Vita, D. J., and Broadie, K. (2017). Fragile X mental retardation protein requirements in activity-dependent critical period neural circuit refinement. *Curr. Biol.* 27, 2318.e3–2330.e3. doi: 10.1016/j.cub.2017.06.046
- Ennaceur, A., and Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: behavioral data. *Behav. Brain Res.* 31, 47–59. doi: 10.1016/0166-4328(88)90157-x
- Farzin, F., Rivera, S. M., and Whitney, D. (2011). Resolution of spatial and temporal visual attention in infants with fragile X syndrome. *Brain* 134, 3355–3368. doi: 10.1093/brain/awr249
- Farzin, F., Whitney, D., Hagerman, R. J., and Rivera, S. M. (2008). Contrast detection in infants with fragile X syndrome. *Vision Res.* 48, 1471–1478. doi: 10.1016/j.visres.2008.03.019
- Fox, M. W. (1965). The visual cliff test for the study of visual depth perception in the mouse. *Anim. Behav.* 13, 232–233. doi: 10.1016/0003-3472(65)90040-0
- Freund, L. S., and Reiss, A. L. (1991). Rating problem behaviors in outpatients with mental retardation: use of the Aberrant Behavior Checklist. *Res. Dev. Disabil.* 12, 435–451. doi: 10.1016/0891-4222(91)90037-s
- García-Pino, E., Gessele, N., and Koch, U. (2017). Enhanced excitatory connectivity and disturbed sound processing in the auditory brainstem of fragile X mice. *J. Neurosci.* 37, 7403–7419. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2310-16.2017
- Ghilan, M., Bettio, L., Noonan, A., Brocardo, P. S., Gil-Mohapel, J., and Christie, B. R. (2018). Impaired spatial processing in a mouse model of fragile X syndrome. *Behav. Brain Res.* 350, 72–79. doi: 10.1016/j.bbr.2018.05.012
- Ginsburg, A. P. (2003). Contrast sensitivity and functional vision. *Int. Ophthalmol. Clin.* 43, 5–15. doi: 10.1097/00004397-200343020-00004
- Glynn, D., Bortnick, R. A., and Morton, A. J. (2003). Complexin II is essential for normal neurological function in mice. *Hum. Mol. Genet.* 12, 2431–2448. doi: 10.1093/hmg/dgg249
- Goel, A., Cantu, D. A., Guilfoyle, J., Chaudhari, G. R., Newadkar, A., Todisco, B., et al. (2018). Impaired perceptual learning in a mouse model of Fragile X syndrome is mediated by parvalbumin neuron dysfunction and is reversible. *Nat. Neurosci.* 21, 1404–1411. doi: 10.1038/s41593-018-0231-0
- Gomis-González, M., Busquets-García, A., Matute, C., Maldonado, R., Mato, S., and Ozaita, A. (2016). Possible therapeutic doses of cannabinoid type 1 receptor antagonist reverses key alterations in fragile X syndrome mouse model. *Genes* 7:E56. doi: 10.3390/genes7090056
- Gu, L., Bok, D., Yu, F., Caprioli, J., and Piri, N. (2018). Downregulation of splicing regulator RBFOX1 compromises visual depth perception. *PLoS One* 13:e0200417. doi: 10.1371/journal.pone.0200417
- Guimarães-Souza, E. M., Perche, O., Morgans, C. W., Duvoisin, R. M., and Calaza, K. C. (2016). Fragile X mental retardation protein expression in the retina is regulated by light. *Exp. Eye Res.* 146, 72–82. doi: 10.1016/j.exer.2015.11.025
- Hagerman, R. J., Berry-Kravis, E., Hazlett, H. C., Bailey, D. B. Jr., Moine, H., Kooy, R. F., et al. (2017). Fragile X syndrome. *Nat. Rev. Primer* 3:17065. doi: 10.1038/nrdp.2017.65
- Hallems, A., Beccu, S., Van Loock, K., Ortibus, E., Truijen, S., and Aerts, P. (2009). Visual deprivation leads to gait adaptations that are age- and context-specific: II. Kinematic parameters. *Gait Posture* 30, 307–311. doi: 10.1016/j.gaitpost.2009.05.017
- Hallems, A., Ortibus, E., Meire, F., and Aerts, P. (2010). Low vision affects dynamic stability of gait. *Gait Posture* 32, 547–551. doi: 10.1016/j.gaitpost.2010.07.018
- He, C. X., Cantu, D. A., Mantri, S. S., Zeiger, W. A., Goel, A., and Portera-Cailliau, C. (2017). Tactile defensiveness and impaired adaptation of neuronal activity in the *fmr1* knock-out mouse model of autism. *J. Neurosci.* 37, 6475–6487. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0651-17.2017
- Hebert, B., Pietropaolo, S., Meme, S., Laudier, B., Laugeray, A., Doisne, N., et al. (2014). Rescue of fragile X syndrome phenotypes in *Fmr1* KO mice by a BKCa channel opener molecule. *Orphanet J. Rare Dis.* 9:124. doi: 10.1186/s13023-014-0124-6
- Heulens, I., D’Hulst, C., Van Dam, D., De Deyn, P. P., and Kooy, R. F. (2012). Pharmacological treatment of fragile X syndrome with GABAergic drugs in a knockout mouse model. *Behav. Brain Res.* 229, 244–249. doi: 10.1016/j.bbr.2012.01.031
- Hoy, J. L., Yavorska, I., Wehr, M., and Niell, C. M. (2016). Vision drives accurate approach behavior during prey capture in laboratory mice. *Curr. Biol.* 26, 3046–3052. doi: 10.1016/j.cub.2016.09.009
- Hunter, J., Rivero-Arias, O., Angelov, A., Kim, E., Fotheringham, I., and Leal, J. (2014). Epidemiology of fragile X syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Med. Genet. A* 164A, 1648–1658. doi: 10.1002/ajmg.a.36511
- Ichihara, S., Kitagawa, N., and Akutsu, H. (2007). Contrast and depth perception: effects of texture contrast and area contrast. *Perception* 36, 686–695. doi: 10.1068/p5696
- Jahn, K., Strupp, M., Schneider, E., Dieterich, M., and Brandt, T. (2001). Visually induced gait deviations during different locomotion speeds. *Exp. Brain Res.* 141, 370–374. doi: 10.1007/s002210100884
- Kay, R. B., Gabreski, N. A., and Triplett, J. W. (2018). Visual subcircuit-specific dysfunction and input-specific mispatterning in the superior colliculus of fragile X mice. *J. Neurodev. Disord.* 10:23. doi: 10.1186/s11689-018-9241-1

- King, M. K., and Jope, R. S. (2013). Lithium treatment alleviates impaired cognition in a mouse model of fragile X syndrome. *Genes Brain Behav.* 12, 723–731. doi: 10.1111/gbb.12071
- Klemmer, P., Meredith, R. M., Holmgren, C. D., Klychnikov, O. I., Stahl-Zeng, J., Loos, M., et al. (2011). Proteomics, ultrastructure, and physiology of hippocampal synapses in a fragile X syndrome mouse model reveal presynaptic phenotype. *J. Biol. Chem.* 286, 25495–25504. doi: 10.1074/jbc.M110.210260
- Kogan, C. S., Bertone, A., Cornish, K., Boutet, I., Der Kaloustian, V. M., Andermann, E., et al. (2004a). Integrative cortical dysfunction and pervasive motion perception deficit in fragile X syndrome. *Neurology* 63, 1634–1639. doi: 10.1212/01.wnl.0000142987.44035.3b
- Kogan, C. S., Boutet, I., Cornish, K., Zangenehpour, S., Mullen, K. T., Holden, J. J. A., et al. (2004b). Differential impact of the *FMR1* gene on visual processing in fragile X syndrome. *Brain* 127, 591–601. doi: 10.1093/brain/awh069
- Kramvis, I., Mansvelter, H. D., Loos, M., and Meredith, R. (2013). Hyperactivity, perseveration and increased responding during attentional rule acquisition in the Fragile X mouse model. *Front. Behav. Neurosci.* 7:172. doi: 10.3389/fnbeh.2013.00172
- Kretschmer, F., Kretschmer, V., Kunze, V. P., and Kretzberg, J. (2013). OMR-arena: automated measurement and stimulation system to determine mouse visual thresholds based on optomotor responses. *PLoS One* 8:e78058. doi: 10.1371/journal.pone.0078058
- Kretschmer, F., Sajjo, S., Kretschmer, V., and Badea, T. C. (2015). A system to measure the Optokinetic and Optomotor response in mice. *J. Neurosci. Methods* 256, 91–105. doi: 10.1016/j.jneumeth.2015.08.007
- Kretschmer, F., Tariq, M., Chatila, W., Wu, B., and Badea, T. C. (2017). Comparison of optomotor and optokinetic reflexes in mice. *J. Neurophysiol.* 118, 300–316. doi: 10.1152/jn.00055.2017
- Krueger, D. D., Osterweil, E. K., Chen, S. P., Tye, L. D., and Bear, M. F. (2011). Cognitive dysfunction and prefrontal synaptic abnormalities in a mouse model of fragile X syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 108, 2587–2592. doi: 10.1073/pnas.1013855108
- Lachiewicz, A. M., Spiridigliozzi, G. A., Gullion, C. M., Ransford, S. N., and Rao, K. (1994). Aberrant behaviors of young boys with fragile X syndrome. *Am. J. Ment. Retard.* 98, 567–579.
- Larson, J., Kim, D., Patel, R. C., and Floreani, C. (2008). Olfactory discrimination learning in mice lacking the fragile X mental retardation protein. *Neurobiol. Learn. Mem.* 90, 90–102. doi: 10.1016/j.nlm.2008.01.002
- Lashley, K. S., and Russell, J. T. (1934). The mechanism of vision. XI. A preliminary test of innate organization. *Pedagog. Semin. J. Genet. Psychol.* 45, 136–144. doi: 10.1080/08856559.1934.10534252
- Lawrence, J. M., Sauve, Y., Keegan, D. J., Coffey, P. J., Hetherington, L., Girman, S., et al. (2000). Schwann cell grafting into the retina of the dystrophic RCS rat limits functional deterioration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 518–528.
- Liao, L., Park, S. K., Xu, T., Vanderklis, P., and Yates, J. R. III. (2008). Quantitative proteomic analysis of primary neurons reveals diverse changes in synaptic protein content in *fmr1* knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 105, 15281–15286. doi: 10.1073/pnas.0804678105
- Lione, L. A., Carter, R. J., Hunt, M. J., Bates, G. P., Morton, A. J., and Dunnett, S. B. (1999). Selective discrimination learning impairments in mice expressing the human Huntington's disease mutation. *J. Neurosci.* 19, 10428–10437. doi: 10.1523/jneurosci.19-23-10428.1999
- Mazziotti, R., Lupori, L., Sagona, G., Gennaro, M., Della Sala, G., Putignano, E., et al. (2017). Searching for biomarkers of CDKL5 disorder: early-onset visual impairment in CDKL5 mutant mice. *Hum. Mol. Genet.* 26, 2290–2298. doi: 10.1093/hmg/ddx119
- Merenstein, S. A., Sobesky, W. E., Taylor, A. K., Riddle, J. E., Tran, H. X., and Hagerman, R. J. (1996). Molecular-clinical correlations in males with an expanded *FMR1* mutation. *Am. J. Med. Genet.* 64, 388–394. doi: 10.1002/(SICI)1096-8628(19960809)64:2<388::AID-AJMG31>3.0.CO;2-9
- Mines, M. A. (2013). Hyperactivity: glycogen synthase kinase-3 as a therapeutic target. *Eur. J. Pharmacol.* 708, 56–59. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.02.055
- Minshew, N. J., Goldstein, G., and Siegel, D. J. (1997). Neuropsychologic functioning in autism: profile of a complex information processing disorder. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* 3, 303–316. doi: 10.1017/s135561779703032
- Mitchiner, J. C., Pinto, L. H., and Venable, J. W. (1976). Visually evoked eye movements in the mouse (*Mus musculus*). *Vision Res.* 16, 1169–1171. doi: 10.1016/0042-6989(76)90258-3
- Moon, J., Beaudin, A. E., Verosky, S., Driscoll, L. L., Weiskopf, M., Levitsky, D. A., et al. (2006). Attentional dysfunction, impulsivity and resistance to change in a mouse model of fragile X syndrome. *Behav. Neurosci.* 120, 1367–1379. doi: 10.1037/0735-7044.120.6.1367
- Nimchinsky, E. A., Oberlander, A. M., and Svoboda, K. (2001). Abnormal development of dendritic spines in *FMR1* knock-out mice. *J. Neurosci.* 21, 5139–5146. doi: 10.1523/jneurosci.21-14-05139.2001
- Pardo, M., Beurel, E., and Jope, R. S. (2017). Cotinine administration improves impaired cognition in the mouse model of Fragile X syndrome. *Eur. J. Neurosci.* 45, 490–498. doi: 10.1111/ejn.13446
- Penagarikano, O., Mülle, J. G., and Warren, S. T. (2007). The pathophysiology of fragile X syndrome. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 8, 109–129. doi: 10.1146/annurev.genom.8.080706.092249
- Perche, O., Felgerolle, C., Ardourel, M., Bazinet, A., Pâris, A., Rossignol, R., et al. (2018). Early retinal defects in *Fmr1*<sup>-/-</sup> mice: toward a critical role of visual dys-sensitivity in the Fragile X Syndrome phenotype? *Front. Cell. Neurosci.* 12:96. doi: 10.3389/fncel.2018.00096
- Pietro Paolo, S., Guilleminot, A., Martin, B., D'Amato, F. R., and Crusio, W. E. (2011). Genetic-background modulation of core and variable autistic-like symptoms in *Fmr1* knock-out mice. *PLoS One* 6:e17073. doi: 10.1371/journal.pone.0017073
- Price, T. J., Rashid, M. H., Millecamps, M., Sanoja, R., Entrena, J. M., and Cervero, F. (2007). Decreased nociceptive sensitization in mice lacking the fragile X mental retardation protein: role of mGluR1/5 and mTOR. *J. Neurosci.* 27, 13958–13967. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4383-07.2007
- Ragauskas, S., Leinonen, H., Puranen, J., Rönkkö, S., Nymark, S., Gurevicius, K., et al. (2014). Early retinal function deficit without prominent morphological changes in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *PLoS One* 9:e113317. doi: 10.1371/journal.pone.0113317
- Rathbun, D. L., Alitto, H. J., Warland, D. K., and Usrey, W. M. (2016). Stimulus contrast and retinogeniculate signal processing. *Front. Neural Circuits* 10:8. doi: 10.3389/fncir.2016.00008
- Rietdyk, S., and Rhea, C. K. (2006). Control of adaptive locomotion: effect of visual obstruction and visual cues in the environment. *Exp. Brain Res.* 169, 272–278. doi: 10.1007/s00221-005-0345-y
- Rossignol, R., Ranchon-Cole, I., Pâris, A., Herzine, A., Perche, A., Laurenceau, D., et al. (2014). Visual sensorial impairments in neurodevelopmental disorders: evidence for a retinal phenotype in Fragile X Syndrome. *PLoS One* 9:e105996. doi: 10.1371/journal.pone.0105996
- Rotschafer, S. E., and Cramer, K. S. (2017). Developmental emergence of phenotypes in the auditory brainstem nuclei of *Fmr1* knockout mice. *eNeuro* 4:ENEURO.0264-17.2017. doi: 10.1523/eneuro.0264-17.2017
- Schilit Nitenson, A., Stackpole, E. E., Truszkowski, T. L. S., Midroit, M., Fallon, J. R., and Bath, K. G. (2015). Fragile X mental retardation protein regulates olfactory sensitivity but not odorant discrimination. *Chem. Senses* 40, 345–350. doi: 10.1093/chemse/bjv019
- Schmucker, C., Seeliger, M., Humphries, P., Biel, M., and Schaeffel, F. (2005). Grating acuity at different luminances in wild-type mice and in mice lacking rod or cone function. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 398–407. doi: 10.1167/iovs.04-0959
- Shaw, T. A., and Porter, M. A. (2013). Emotion recognition and visual-scan paths in Fragile X syndrome. *J. Autism Dev. Disord.* 43, 1119–1139. doi: 10.1007/s10803-012-1654-1
- Sørensen, E. M., Bertelsen, F., Weikop, P., Skovborg, M. M., Banke, T., Drasbek, K. R., et al. (2015). Hyperactivity and lack of social discrimination in the adolescent *Fmr1* knockout mouse. *Behav. Pharmacol.* 26, 733–740. doi: 10.1097/fbp.0000000000000152
- Spencer, C. M., Alekseyenko, O., Hamilton, S. M., Thomas, A. M., Serysheva, E., Yuva-Paylor, L. A., et al. (2011). Modifying behavioral phenotypes in *Fmr1* KO mice: genetic background differences reveal autistic-like responses. *Autism Res.* 4, 40–56. doi: 10.1002/aur.168
- Tang, B., Wang, T., Wan, H., Han, L., Qin, X., Zhang, Y., et al. (2015). *Fmr1* deficiency promotes age-dependent alterations in the cortical synaptic proteome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 112, E4697–E4706. doi: 10.1073/pnas.1502258112

- Thaung, C., Arnold, K., Jackson, I. J., and Coffey, P. J. (2002). Presence of visual head tracking differentiates normal sighted from retinal degenerate mice. *Neurosci. Lett.* 325, 21–24. doi: 10.1016/s0304-3940(02)00223-9
- Thomas, B. B., Seiler, M. J., Satta, S. R., Coffey, P. J., and Aramant, R. B. (2004). Optokinetic test to evaluate visual acuity of each eye independently. *J. Neurosci. Methods* 138, 7–13. doi: 10.1016/j.jneumeth.2004.03.007
- Turk, J., and Cornish, K. (1998). Face recognition and emotion perception in boys with fragile-X syndrome. *J. Intellect. Disabil. Res.* 42, 490–499. doi: 10.1046/j.1365-2788.1998.4260490.x
- Tzameret, A., Sher, I., Edelstein, V., Belkin, M., Kalter-Leibovici, O., Solomon, A. S., et al. (2019). Evaluation of visual function in Royal College of Surgeon rats using a depth perception visual cliff test. *Vis. Neurosci.* 36:E002. doi: 10.1017/s095252381800007x
- Umino, Y., and Solessio, E. (2013). Loss of scotopic contrast sensitivity in the optomotor response of diabetic mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 1536–1543. doi: 10.1167/iops.12-10825
- Vanderklish, P. W., and Edelman, G. M. (2005). Differential translation and fragile X syndrome. *Genes Brain Behav.* 4, 360–384. doi: 10.1111/j.1601-183x.2005.00134.x
- Ventura, R., Pascucci, T., Catania, M. V., Musumeci, S. A., and Puglisi-Allegra, S. (2004). Object recognition impairment in *Fmr1* knockout mice is reversed by amphetamine: involvement of dopamine in the medial prefrontal cortex. *Behav. Pharmacol.* 15, 433–442. doi: 10.1097/00008877-200409000-00018
- Walk, R. D., Gibson, E. J., and Tighe, T. J. (1957). Behavior of light- and dark-reared rats on a visual cliff. *Science* 126, 80–81. doi: 10.1126/science.126.3263.80-a
- Wang, X., Mu, Y., Sun, M., and Han, J. (2017). Bidirectional regulation of fragile X mental retardation protein phosphorylation controls rhodopsin homeostasis. *J. Mol. Cell Biol.* 9, 104–116. doi: 10.1093/jmcb/mjw041
- Westmark, C. J. (2013). FMRP: a triple threat to PSD-95. *Front. Cell. Neurosci.* 7:57. doi: 10.3389/fncel.2013.00057
- Wurtz, R. H., and Albano, J. E. (1980). Visual-motor function of the primate superior colliculus. *Annu. Rev. Neurosci.* 3, 189–226. doi: 10.1146/annurev.ne.03.030180.001201
- Yan, Q. J., Asafo-Adjei, P. K., Arnold, H. M., Brown, R. E., and Bauchwitz, R. P. (2004). A phenotypic and molecular characterization of the *fmr1-tm1Cgr* fragile X mouse. *Genes Brain Behav.* 3, 337–359. doi: 10.1111/j.1601-183x.2004.00087.x
- Yan, J., Porch, M. W., Court-Vazquez, B., Bennett, M. V. L., and Zukin, R. S. (2018). Activation of autophagy rescues synaptic and cognitive deficits in fragile X mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 115, E9707–E9716. doi: 10.1073/pnas.1808247115
- Yau, S. Y., Bettio, L., Vetrici, M., Truesdell, A., Chiu, C., Chiu, J., et al. (2018). Chronic minocycline treatment improves hippocampal neuronal structure, NMDA receptor function and memory processing in *Fmr1* knockout mice. *Neurobiol. Dis.* 113, 11–22. doi: 10.1016/j.nbd.2018.01.014
- Yoshida, K., Watanabe, D., Ishikane, H., Tachibana, M., Pastan, I., and Nakanishi, S. (2001). A key role of starburst amacrine cells in originating retinal directional selectivity and optokinetic eye movement. *Neuron* 30, 771–780. doi: 10.1016/s0896-6273(01)00316-6
- Zhu, Z.-W., Xu, Q., Zhao, Z.-Y., Gu, W.-Z., and Wu, D.-W. (2011). Spatiotemporal expression of PSD-95 in *Fmr1* knockout mice brain. *Neuropathology* 31, 223–229. doi: 10.1111/j.1440-1789.2010.01165.x

**Conflict of Interest:** J-CB is employed by company Key-Obs.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Felgerolle, Hébert, Ardourel, Meyer-Dilhet, Menuet, Pinto-Morais, Bizot, Pichon, Briault and Perche. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## Etude 3 – Quelle est la part de l'implication du phénotype rétinien dans le phénotype visuel et global du syndrome de l'X fragile ?

### 3.1 Contexte de l'étude

Les deux premières études ont apporté de nouveaux éléments sur le phénotype visuel du FXS. Tout d'abord, en absence de protéine FMRP, **le système visuel est altéré dans son intégralité**, de la première structure responsable de la perception et du traitement primaire des signaux lumineux, la rétine, jusqu'aux structures cérébrales responsables du traitement et de l'intégration des informations visuelles. En effet, l'absence de protéine FMRP induit des altérations dans la capture des signaux lumineux par les cellules photoréceptrices de la rétine et de la transmission de l'information lumineuse au sein de la rétine interne (Rossignol et al., 2014; Perche et al., 2018). Ainsi, le signal électrique émis en sortie de la rétine est déjà dénaturé. **L'absence de la protéine FMRP engendre des anomalies de fonctionnement de la partie périphérique du système visuel.** De plus, les structures cérébrales impliquées dans la gestion, le traitement et l'intégration des informations lumineuses provenant des rétines sont elles aussi perturbées en absence de FMRP. La couche magnocellulaire du noyau géniculé latéral, le colliculus et le cortex visuel, qui sont des structures majeures impliquées dans ces fonctions visuelles, présentent des anomalies lorsqu'elles sont privées de protéine FMRP (Irwin et al., 2002; Kogan et al., 2004b; Kay et al., 2018). **L'absence de protéine FMRP induit des perturbations dans la composante centrale du système visuel.**

De plus, **l'ensemble des altérations du système visuel concoure à des troubles de la vision.** Ces perturbations sensorielles visuelles se caractérisent par des difficultés de compréhension des mouvements, une diminution de la sensibilité au contraste, et une moindre perception de la perspective. Ces troubles ont été décrits pour part chez le patient atteint du syndrome de l'X fragile, et ont été attribués soit à un déficit d'attention, soit aux altérations cérébrales décrites en absence de la protéine FMRP (Kogan et al., 2004a; Farzin et al., 2008, 2011). D'autre part, l'analyse de la souris *Fmr1* KO a permis d'affiner la connaissance des troubles visuels en absence de la protéine FMRP (Felgerolle et al., 2019). Plus largement, cette dernière étude confirme l'implication des capacités visuelles dans la réalisation d'autres comportements, tels que la mémorisation ou la chasse (Hoy et al., 2016; Felgerolle et al., 2019).

Cependant, à la lumière de nos récentes découvertes, il n'est plus possible d'attribuer l'origine de ces troubles visuels exclusivement aux perturbations cérébrales, comme cela fut le cas jusqu'à présent. La rétine est un tissu clé tant dans la perception des signaux lumineux que dans le traitement primaire des informations visuelles. L'absence de protéine FMRP dans ce tissu neurosensoriel induit l'émission de signaux visuels perturbés avant même d'atteindre les aires cérébrales. **Dès lors, il n'est plus raisonnable d'exclure la participation des perturbations rétiniennes au phénotype visuel du syndrome de l'X fragile.**

### 3.2 Objectifs de l'étude

La question émergente du contexte et de nos précédentes études est alors : **Quel est l'impact de chacune des composantes du système visuel sur le phénotype comportemental du syndrome de l'X fragile ?** Autrement dit, quelle part du phénotype visuel trouverait son origine dans les perturbations rétiniennes causées par l'absence de FMRP, et quelle part serait causée par les altérations cérébrales associées au FXS ? Mais aussi, plus largement, quel(s) aspect(s) du FXS serai(en)t associé(s) aux altérations de l'une des composantes du système visuel ?

La suite des recherches s'est alors concentrée sur le moyen d'apporter des réponses à ces questions. Celles-ci apportent naturellement une dichotomie de la problématique : l'étude des impacts des perturbations rétiniennes en opposition à l'étude des impacts des altérations cérébrales. La thèse étant une aventure limitée dans le temps, un choix était nécessaire afin de concentrer les efforts sur l'un de ces deux axes de recherche. Suite à nos travaux pionniers dans la mise en évidence d'un phénotype rétinien fort chez la souris *Fmr1* KO pouvant impacter la maturation des aires cérébrales (Rossignol et al., 2014; Perche et al., 2018), la suite des travaux de thèse s'est assez naturellement intéressée à l'impact de la composante rétinienne sur le phénotype visuel du syndrome de l'X fragile. Ainsi, la question devenait : **Quelle est la part de l'implication du phénotype rétinien dans le phénotype visuel, et global, du syndrome de l'X fragile ?**

### 3.3 Stratégie expérimentale

Le modèle murin validé du FXS, la souris *Fmr1* KO, connaît une absence d'expression du gène *Fmr1* constitutive dans l'intégralité de ses cellules. Avec pareil modèle biologique, il est impossible d'étudier de manière distincte l'impact de la composante « périphérique » de celui de la composante « centrale » sur le phénotype de l'animal. Il ne permet ainsi pas de répondre à nos questions pour la présente étude. Pour bien faire, il faudrait dichotomiser le système visuel en 2 composantes distinctes, et induire de manière spécifique la mise en silence du gène *Fmr1*. **La stratégie adoptée consiste alors à créer un nouveau modèle animal « FXS tissu-spécifique », dont seule l'une des deux composantes du système visuel voit son expression de *Fmr1* supprimée.** Ce nouveau modèle permettrait alors d'étudier l'ensemble des conséquences de l'absence localisée de la protéine FMRP.

L'ensemble du projet nécessite ainsi la création de deux modèles tissu-spécifiques (Figure 50) :

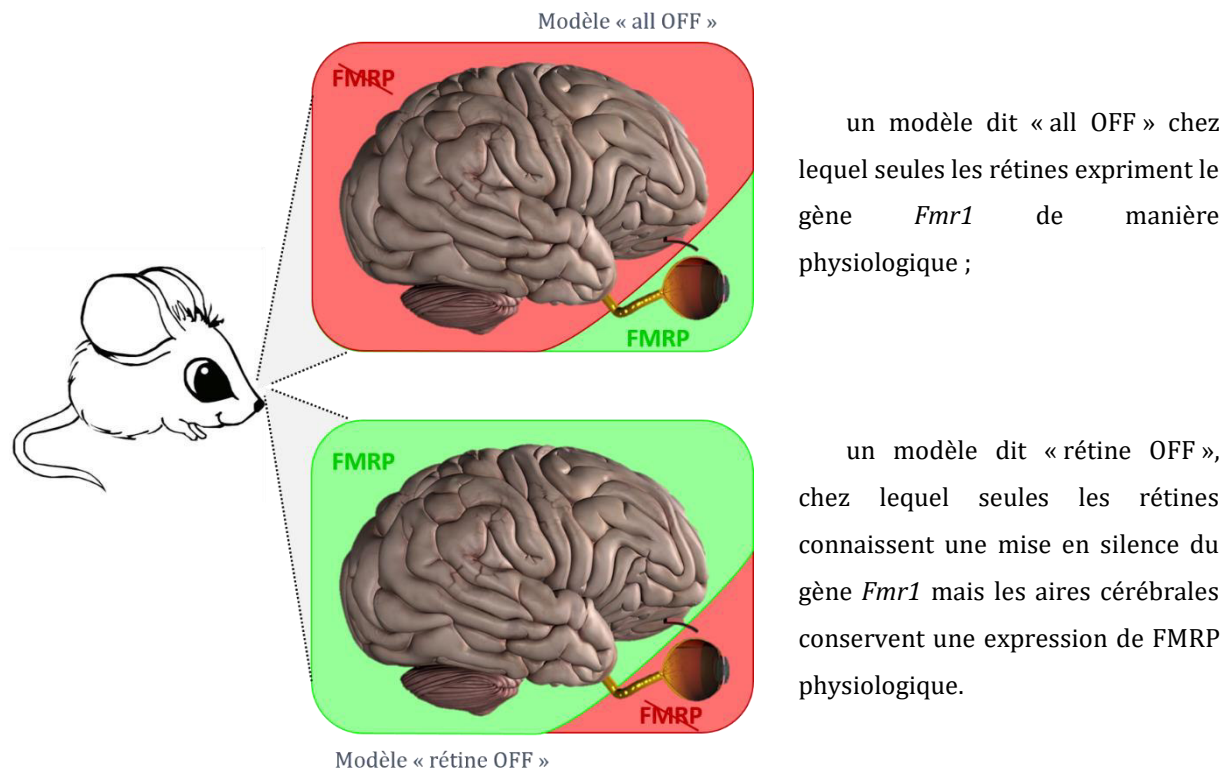


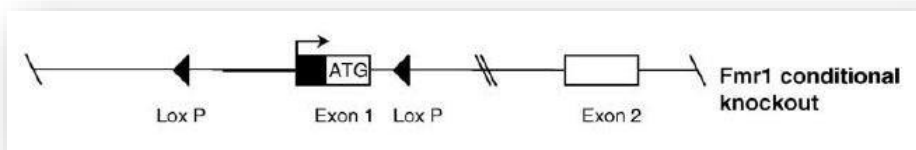
Figure 50 : Modèles FXS-tissu-spécifiques imaginés.

La suite du travail se thèse se concentrera sur la mise en place et l'étude du modèle « FXS rétine-spécifique », dit « rétine OFF ».

#### Mise en place d'un modèle « FXS-rétine-spécifique »

Pour obtenir une mise en silence du gène *Fmr1* de manière tissu-spécifique, nous avons choisi d'utiliser le système Cre-lox pour induire une recombinaison du gène *Fmr1* de manière localisée. Pour ce faire, nous avons choisi de croiser deux lignées murines.

La première lignée est porteuse d'une construction génétique localisée dans la séquence de du gène *Fmr1*. Cette lignée nommée *Fmr1* cKO, ou *Fmr1* cOFF, est un modèle knockout conditionnel. Les souris portent un gène *Fmr1* dont le promoteur et le premier exon sont flanqués de sites *loxP* (pour *locus of X-over P1*) dérivés du bactériophage P1 (Mientjes et al., 2006) (Figure 51). Les séquences des sites *loxP* sont placées de manière à induire l'excision de la partie génique qu'elles encadrent. Ainsi, en présence de l'enzyme de recombinaison Cre recombinase, le promoteur et le premier exon du gène *Fmr1* sont éliminés de la séquence génétique, et le gène *Fmr1* ne peut pas être transcrit. Ceci permet donc de sélectionner les cellules dans lesquelles l'expression de *Fmr1* doit être supprimée, en les ciblant avec une expression de Cre recombinase (Koekkoek et al., 2005).

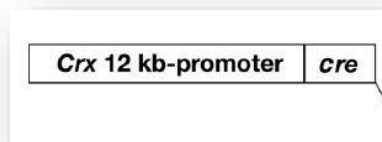


*adapté de Mientjes et al. 2006*

**Figure 51 : Représentation schématique de la construction *Fmr1* cOFF.**

Le promoteur et le premier exon du gène *Fmr1* sont encadrés par deux sites *loxP*. *LoxP* : site locus of X-over dérivé du bactériophage P1 ; ATG : séquence d'initiation de la transcription.

**La deuxième lignée est porteuse de la construction transgénique *Crx-Cre*, et est notée *Tg(Crx-Cre)*.** Cette construction génétique se compose de la séquence du gène d'expression de la Cre recombinase, placée sous le contrôle du promoteur murin du gène *Crx* (Figure 52) (Nishida et al., 2003). Cette construction induit donc une expression de Cre recombinase dans les cellules exprimant les entités activatrices du promoteur du gène *Crx*, c'est-à-dire les cellules exprimant naturellement le gène *Crx*.



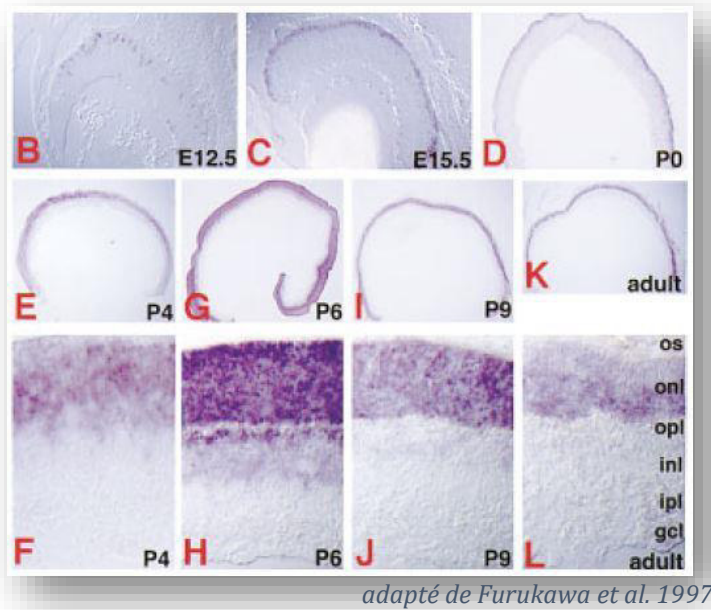
*adapté de Nishida et al. 2003*

**Figure 52 : Représentation de la construction transgénique *Tg(Crx-Cre)*.**

Le gène d'expression de la Cre recombinase est placé sous le contrôle du promoteur murin du gène *Crx*.

Le gène *Crx* code pour la protéine CRX (en anglais, *Cone-rod homeobox*). Cette protéine de la famille des homéoprotéines OTX (en anglais, *Orthodenticle homeobox*) est exprimée dans la rétine, où elle se révèle être capitale dans la différenciation cellulaire au cours du développement de la rétine (Furukawa et al., 1997). La protéine CRX est exprimée dans la rétine dès le 12<sup>ème</sup> jour embryonnaire (E12.5) et son expression perdure jusqu'à l'âge adulte, avec un pic d'expression constaté entre le 4<sup>ème</sup> et le 6<sup>ème</sup> jour de vie de l'animal (P4-P6) (Chen et al., 1997; Furukawa et al., 1997) (Figure 53). La seule autre structure connue pour exprimer CRX est la glande pinéale, structure localisée au niveau cérébral et impliquée dans le cycle circadien, qui exprime un certain nombre de gènes spécifiques des photorécepteurs (Chen et al., 1997). Cette expression demeure néanmoins faible devant celle de la rétine, et ne s'entend pas aux structures environnantes (Chen et al., 1997).





**Figure 53 : Hybridations *in situ* révélant l'expression du gène *Crx* dans la rétine en développement et mature.**

Le signal *Crx* est visible dès le 12<sup>ème</sup> jour embryonnaire (E12.5) (B), perdure jusqu'à la naissance (P0) (C, D) et se maintient jusqu'à l'âge adulte (E à L). Notons le pic d'expression observé entre P4 et P6. OS : segment externe des photorécepteurs ; ONL : couche nucléaire externe ; OPL : couche plexiforme externe ; INL : couche nucléaire interne ; IPL : couche plexiforme interne ; GCL : couche des cellules ganglionnaires.

Ainsi, la construction *Tg(Crx-Cre)* induit une expression de Cre recombinase dans les cellules rétinienne. La présence de Cre recombinase dans les cellules rétinienne d'un animal porteur de ce transgène a été confirmée et observée dès le 15<sup>ème</sup> jour embryonnaire (Nishida et al., 2003) (Figure 54B). L'expression de la protéine CRX ayant été démontrée dès le 12<sup>ème</sup> jour embryonnaire, nous pouvons supposer que la production de Cre recombinase apparaît également dès le 12<sup>ème</sup> jour embryonnaire. A ce stade de développement, les cellules rétinienne ne sont pas encore différenciées (Bassett and Wallace, 2012) (Figure 54A). Ainsi la précocité de l'expression de Cre recombinase permet une recombinaison dans tous les types cellulaires de la rétine. Ceci a été vérifié par l'équipe de Prasov et Glaser : **la recombinaison induite par le *Tg(Crx-Cre)* affecte tous les types cellulaires de la rétine** (Prasov and Glaser, 2012) (Figure 54C).

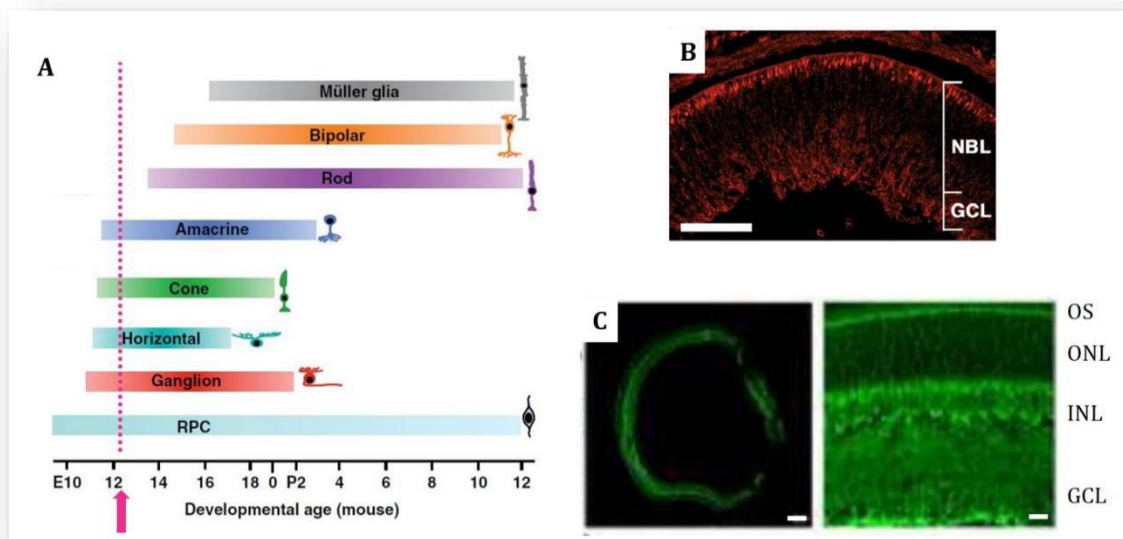


Figure 54 : Recombinaison rétinienne induite par le Tg(*Crx-Cre*).

(A) Chronologie de différenciation des différents types cellulaires de la rétine. Les pointillés (rose) indiquent le début d'expression du gène *Crx*. Adapté de Bassett et al., 2012.

(B) Expression de la protéine Cre recombinase (en rouge) dans les cellules rétinienne dès le 15<sup>ème</sup> jour embryonnaire chez un animal porteur du transgène Tg(*Crx-Cre*). Barre d'échelle : 100  $\mu$ m. Adapté de Nishida et al., 2003.

(C) Mise en évidence de la recombinaison rétinienne obtenue grâce au Tg(*Crx-Cre*). Expression de GFP (Green Fluorescence Protein, en vert) suite au croisement de la lignée Tg(*Crx-Cre*) avec une lignée reportrice R26floxGFP. La recombinaison affecte toutes les couches rétinienne. Barre d'échelle : 50  $\mu$ m. Adapté de Prasov and Glaser, 2012.

NBL : couche neuroblastique ; OS : couche des segments externes des photorécepteurs ; ONL : couche nucléaire externe ; INL : couche nucléaire interne ; GCL : couche des cellules ganglionnaires.

Par conséquent, un animal porteur de ces deux constructions génétiques connaît une expression de Cre recombinase dans les cellules de sa rétine embryonnaire, qui engendre la recombinaison précoce du gène *Fmr1*. Cet animal connaît donc une mise en silence du gène *Fmr1* uniquement dans les cellules de ses rétines. La recombinaison intervenant précocement, l'intégralité des cellules rétinienne contient la version recombinée du gène *Fmr1*. De plus, l'expression spécifiquement rétinienne du gène *Crx* permet de conserver intactes les séquences génétiques des cellules cérébrales.

#### Etude du modèle « FXS-rétine-spécifique »

Le travail sur le nouveau modèle créé consistera en trois grandes étapes.

Il s'agira premièrement de **valider le modèle**, c'est-à-dire vérifier les expressions de *Fmr1* et FMRP aux niveaux rétinien et cérébral afin de vérifier que la stratégie choisie apporte le schéma génétique et protéique souhaité.

Ensuite, la **caractérisation du modèle** consistera en l'étude de la rétine et des aires cérébrales sur les plans moléculaire, cellulaire et fonctionnel, afin de dresser un état des lieux de ces deux composantes du système visuel. Cette étape permettra de révéler la présence d'anomalies, de perturbations, liées à l'absence rétinienne de FMRP.

Enfin, **l'étude comportementale du modèle** permettra de répondre aux questions motrices de ce projet, et de déterminer l'impact de l'absence rétinienne de la protéine FMRP sur le comportement visuel et global de l'animal.

## 3.4 Matériels et Méthodes

### 3.4.1 Génération d'une lignée murine transgénique tissu-spécifique

Les deux lignées murines ont été croisées comme suit. **Des mâles hétérozygotes pour le transgène Tg(Crx-Cre) ont été croisés avec des femelles hétérozygotes pour la construction Fmr1 cOFF.** Les mâles des portées générées peuvent donc présenter 4 génotypes différents :

- n'être porteur d'aucune des deux constructions mâles +/+ ; +/Y
- ne porter que le transgène Tg(Crx-Cre) mâles Tg(Crx-Cre)/+ ; +/Y
- ne porter que la construction Fmr1 cOFF mâles +/+ ; Fmr1 cOFF/Y
- porter les deux constructions simultanément mâles Tg(Crx-Cre)/+ ; Fmr1 cOFF /Y

Afin de simplifier les notations, je prends la liberté de noter ces différents génotypes respectivement **WT, Crx-Cre, cOFF et Crx-Cre/cOFF. Les animaux d'intérêt pour notre étude sont les mâles Crx-Cre/cOFF.**

Cependant, la lignée Fmr1 cOFF utilisée ici est constituée de souris de souche C57BL6, et la lignée Tg(Crx-Cre) est portée sur un fond génétique 129. Les animaux issus du croisement précédemment décrit sont donc de fond mixte 129/C57BL6. Ainsi, les résultats obtenus pour les animaux d'intérêt seront comparés à ceux des animaux littermate, de fond génétique identique. De plus, les résultats ne seront jamais comparés directement à ceux connus chez la souris Fmr1 KO, portée, elle, sur fond génétique C57BL6 pur. La souris Fmr1 KO pourra toutefois être utilisée comme référence phénotypique pour discuter ou appréhender certains résultats.

**Par conséquent, les animaux d'intérêts pour notre étude sont les mâles Crx-Cre/cOFF, et leurs résultats sont comparés aux mâles contrôles littermate WT, Crx-Cre et cOFF.**

### 3.4.2 Génération d'une lignée murine reportrice

Pour contrôler la recombinaison induite par le Tg(Crx-Cre), cette lignée est croisée avec une lignée reportrice afin de révéler les cellules, les tissus, les organes, subissant une recombinaison génétique par action de la Cre recombinase. L'étude de la recombinaison induite par le transgène Tg(Crx-Cre) est réalisée en croisant la lignée Tg(Crx-Cre) avec la lignée reportrice Gt(ROSA)26Sor<sup>tm1.1(CAG-EGFP)</sup>F<sup>sh</sup>, nommée plus couramment RCE (en anglais, ROSA26 CAG-boosted EGFP). Les souris de cette lignée portent une

construction génétique constituée de la séquence d'expression de l'EGFP (en anglais, *Enhanced Green Fluorescence Protein*) en amont de laquelle une séquence STOP est encadrée par deux sites *loxP* (Sousa et al., 2009). L'action de la Cre recombinase sur cette construction a pour effet de supprimer la séquence STOP de la séquence génétique, permettant ainsi l'expression de GFP. Les cellules porteuses de la construction qui ont connu une condition recombinante expriment donc la GFP. Le croisement de la lignée Tg(*Crx-Cre*) avec la lignée reportrice a été réalisé comme suit : un mâle hétérozygote pour le Tg(*Crx-Cre*) est croisé avec une femelle hétérozygote pour la construction RCE. Les mâles des portées générées peuvent donc présenter 4 génotypes différents :

- n'être porteur d'aucune des deux constructions      mâles                    +/+ ; +/+
- ne porter que le transgène Tg(*Crx-Cre*)            mâles    Tg(*Crx-Cre*)/+ ; +/+
- ne porter que la construction RCE                    mâles                    +/+ ; RCE/+
- porter les deux constructions simultanément      mâles    Tg(*Crx-Cre*)/+ ; RCE/+

Afin de simplifier les notations, ces différents génotypes sont notés respectivement WT, Crx-Cre, RCE et Crx-Cre/RCE. **Les animaux Crx-Cre/RCE sont les animaux d'intérêt pour cette partie de l'étude car leurs cellules ayant subi une recombinaison par l'action de la Cre recombinase expriment la GFP.**

### 3.4.3 Animaux

Les souris sont maintenues dans un élevage aux conditions thermiques et hydrométriques contrôlées (22°C, 55% d'humidité), suivant un cycle jour-nuit 12h :12h. La nourriture et l'eau sont fournies *ad libitum*. L'ensemble des procédures décrites ici a reçu l'approbation du comité éthique local (CREEA).

### 3.4.4 Génotypages

Le génotypage des animaux ou des échantillons cellulaires est réalisé suite à une extraction de l'ADN génomique grâce à l'enzyme d'extraction express KAPA du kit KAPA Mouse Genotyping (Clinisciences). L'échantillon d'ADN obtenu subit ensuite une réaction d'amplification par PCR avec des amorces spécifiquement conçus pour amplifier la séquence recherchée dans le génome. Les séquences de ces amorces, du 5' vers le 3', sont : pour le sexage : SMCX-1(CCG CTG CCA AAT TCT TTG G) et SMCA-1 (TGA AGC TTT TGG CTT TGA G) ; pour le Tg(*Crx-Cre*) : Cre2 (AGC ATT GCT GTC ACT TGG TC) et Crx-prom3 (GCT GAA GCT GGA GGA ATA CCC TTT AGA) ; pour la construction *Fmr1* cOFF 3R (CCC ACT GGG AGA GGA TTA TTT GGG) et 2F (GTT GAG CGG CCG AGT TTG TCA G) ; pour la construction RCE : RCE 9655(CCA GGC GGG CCA TTT ACC GTA), RCE 8546 (GGA GCG GGA GAA ATG GAT ATG) et RCE 8545 (AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT) ; pour la PCR 1f : 1F (GCC TCA CAT CCT AGC CCT CTA C), 3R (CCC ACT GGG AGA GGA TTA TTT GGG) et 2F(GTT GAG CGG CCG AGT TTG TCA G) ; pour le contrôle interne *IL2* : IMR42 (CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT) et IMR 43(GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C). La solution obtenue est enfin déposée sur gel d'agarose 2% additionné de bromure d'ethidium (BET) afin de subir une

électrophorèse (110V, 30minutes). La révélation et la capture d'image sont réalisées grâce à une lampe UV assistée par informatique.

#### *3.4.5 Analyse protéique par Western Blot*

Les protéines sont extraites suivant la même procédure que celle décrite dans le précédent article (Perche et al., 2018). Brièvement, pour chaque échantillon, les tissus sont homogénéisés dans du tampon RIPA (10 mM Tris-HCl, pH 7.6; 1 mM EDTA; 0.15 mM NaCl; 1% Igepal; 0.2% SDS) additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéase et de phosphatase (Halt Inhibitor Cocktail, ThermoFisher). Après centrifugation (30minutes, 12000g, 4°C), la concentration protéique du surnageant obtenu est déterminée grâce au kit de dosage BCA (Pierce, Paris, France).

L'analyse du contenu protéique est réalisée par la technique semi-quantitative du Western-Blot selon la même procédure que décrite précédemment (Perche et al., 2018). Quinze  $\mu$ g d'échantillon protéique migrent sur un gel SDS-PAGE, puis la répartition obtenue est transférée sur une membrane de nitrocellulose. Le marquage des protéines d'intérêt est réalisé grâce aux anticorps anti-FMRP-phosphorylée (MyBiosource, lapin, dilués 1 :1000), anti-Rhodopsine (Abcam, souris, dilués 1:500), anti-PSD95 (Sigma, souris, dilués 1:1000), anti-Cre (Abcam, lapin, dilués 1:1000), anti-GFP (Abcam, lapin, 1:4000) et anti- $\beta$ actine (Sigma, souris, 1:4000), suivi d'un marquage avec un anticorps secondaire couplé à l'enzyme HRP (anti-souris ou anti-lapin, dilués 1:4000). La révélation est réalisée grâce à un cocktail de peroxyde d'hydrogène et de luminol (Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent, GELifeSciences). Les bandes immunoréactives sont enregistrées puis analysées et quantifiées grâce à l'imageur PXi4 (Ozyme, Paris, France). Les résultats sont tous normalisés par rapport à la quantité de  $\beta$ -actine mesurée pour l'échantillon sur la membrane en question. Les résultats sont exprimés en pourcentage des animaux WT analysés simultanément.

#### *3.4.6 Analyse transcriptionnelle par RT-qPCR*

Les analyses transcriptionnelles sont réalisées selon la même procédure que précédemment décrite (Perche et al., 2018). Brièvement, les ARN sont extraits en utilisant le Trizol reagent (ThermoFisher), leur quantité est déterminée par technique spectrophotométrique (Nanodrop), puis ils sont rétro-transcrits en ADNc en utilisant le kit SuperScript iii reverse transcriptase (Invitrogen, Life Technologies). La quantification par PCR en temps réelle est réalisée en utilisant des sondes Taqman (Thermofisher) diluée dans un milieu d'expression Master Mix (Applied, Life Technologies) contenant les ADNc. Les résultats sont normalisés par rapport à la quantité d'ActineB (Actb) déterminée simultanément. Les résultats sont calculés en  $2^{\text{exp}(-\Delta\text{Ct})}$ , et exprimés en pourcentage des résultats obtenus avec des animaux WT simultanément.

### 3.4.7 Culture primaire de neurones

Les cultures primaires de neurones sont réalisées à partir de cortex d'embryons de 14 jours (E13.5). Pour chaque animal, les cortex sont disséqués sous loupe binoculaire, en suspension dans du sérum physiologique. La microdissection a également pour objectif de retirer les méninges pour ne conserver que les cortex des embryons. Ces derniers sont transférés dans 1mL de Hank's Balanced Salt Solution (Gibco HBSS, ThermoFisher) sans calcium additionné d'HEPES (10mM). Les tissus sont dilacérés puis reçoivent 1mL de HBSS avec calcium additionné d'HEPES (10mM) et 1mL de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté. La suspension obtenue est centrifugée 5 minutes à 1000g à 4°C. Le surnageant est retiré et le culot cellulaire est mis en suspension dans 1mL de milieu de culture (Neurobasal, Gibco, ThermoFisher) complété avec du supplément B-27 (Gibco, ThermoFisher), de la L-glutamine (2mM) et des antibiotiques (cocktail Penicilline-Streptomycine, Gibco, ThermoFisher). Les cellules sont ensuite mises en culture en plaque de culture 24 puits, 500µL par puits, à raison de 60000 cellules par puits. Les puits ont été préalablement préparés en appliquant un film de poly-L-lysine. Une partie des cellules est mise en culture sur des lamelles de verre, préparées elles-aussi avec un film de poly-L-lysine. Les plaques de culture sont placées dans des étuve de culture, maintenues à 37°C, en saturation humide avec 5% de CO<sub>2</sub>. Les milieux sont renouvelés tous les 3 jours.

Les cellules cultivées directement sur les puits sont destinées à l'extraction des ARN. Les cellules sont traitées avec du Trizol reagent (ThermoFisher), et l'extraction est réalisée de la même manière que lors de l'extraction d'ARN de tissus. Les cellules cultivées sur lamelles de verre sont destinées à l'analyse cytomorphologique. Elles sont fixées à l'aide de paraformaldéhyde (PFA, 2%) avant de subir le marquage.

### 3.4.8 Culture primaire d'astrocytes

Les cultures d'astrocytes sont réalisées à partir de cortex de souriceaux de 3 jours (P3). Pour chaque animal, les cortex sont disséqués sous loupe binoculaire, en suspension dans du sérum physiologique. La microdissection a également pour objectif de retirer les méninges pour ne conserver que les cortex des souriceaux. Les cortex sont placés dans 2mL de milieu de culture DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, ThermoFisher) high glucose complété avec du sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté, de la L-glutamine (2mM), des antibiotiques (cocktail Penicilline-Streptomycine, Gibco, ThermoFisher). Les cellules sont mises en suspension, puis, après comptage, sont diluées dans du milieu de culture complet. Les cellules sont mises en culture dans des plaques 24 puits, 500µL par puits, à raison de 65000 cellules par puits. Les plaques de culture sont placées dans des étuve de culture, maintenues à 37°C, en saturation humide avec 5% de CO<sub>2</sub>. Les milieux sont renouvelés tous les 3 jours.

### *3.4.9 Etudes histologiques par marquages immunohistochimiques*

Les marquages immunohistologiques sont réalisés sur les coupes d'organes d'animaux adultes. Les animaux sont fixés avec une perfusion intracardiaque lente de paraformaldéhyde (PFA, 4%). Les globes oculaires et le cerveau sont prélevés et placés en PFA 4% à 4°C pendant 48h. Les globes oculaires sont ensuite deshydratés par des bains successifs d'éthanol de plus en plus concentrés puis inclus en paraffine. Les cerveaux sont quant à eux placés en solution de sucrose 30% dans le PBS pendant plusieurs jours. Ils sont ensuite inclus en milieu de congélation de tissus (Tissue freezing Tissue-tek OCT compound, Sakura Finetek, VWR). Les globes oculaires sont coupés afin de fournir des coupes de rétines de 6µm sur lames de microscope, et les cerveaux sont coupés au cryostat dans le sens sagittal afin de fournir des coupes de 12µm sur lames de microscope.

Les marquages immunohistologiques sont réalisés suivant la même procédure que celle décrite précédemment (Rossignol et al., 2014). Brièvement, les lames sont traitées avec du tampon citrate pH 6.0 et chauffées pendant 30 minutes. Les lames sont saturées avec une solution de saturation (10% SVF ; 1% BSA ; 0.2% Triton X-100 ; 0.1% azide de sodium) pendant 2 heures, avant d'être incubées avec les anticorps anti-GFP (Abcam ab290, lapin) dilués dans la solution de saturation. Après rinçage, les lames sont incubées dans la solution d'anticorps secondaires (anti-lapin, fluo Alexa, Abcam ab150077), puis dans une solution de DAPI afin de marquer les noyaux cellulaires. Les coupes sont enfin montées entre lame et lamelle en milieu aqueux (Fluoromount, Sigma) et conservées à l'abri de la lumière à 4°C. Les lames sont observées et imagées grâce au microscope à fluorescence (Leica, France) assisté par le logiciel Metamorph. Les photos réalisées aux grossissements 400 et 1000 sont réalisées en immersion.

### *3.4.10 Etude morphologique par coloration membranaire*

La coloration membranaire est réalisée de manière similaire à ce qui a été précédemment publié (Hébert et al., 2014). Brièvement, les cellules fixées sur lamelle de verre reçoivent du marquage Dil (Vybrant Cell-Labeling solution) en solution dans du milieu complet de culture, et sont maintenues ainsi à 37°C pendant 30 minutes. Après rinçage des cellules avec du milieu de culture, les cellules sont également colorées avec du DAPI afin de colorer les noyaux cellulaires, puis montés entre lame et lamelle en milieu aqueux (Fluoromount, Sigma) puis conservées à 4°C. Les cellules sont imagées grâce au microscope à fluorescence (Leica, France) assisté par le logiciel Metamorph. Les photos sont réalisées aux grossissements 400 et 1000, en immersion.

### *3.4.11 Etude de l'électrophysiologie rétinienne par électrorétinogramme*

Les ERG sont réalisés en conditions scotopiques suivant la même procédure que celle décrite précédemment, avec le même appareillage (Rossignol et al., 2014; Perche et al., 2018). Brièvement, les animaux sont placés à l'obscurité toute la nuit précédant la matinée d'expérimentation, et sont protégés

de la lumière avant et pendant toute la manipulation. Les animaux sont anesthésiés, et leurs pupilles sont dilatées grâce à de l'atropine. Une électrode d'argent est placée sur la surface de la cornée, et une électrode de référence est placée sur la langue de l'animal. L'animal est maintenu sur un support chauffant, et placé dans une sphère de Ganzfeld permettant une illumination uniforme de la rétine. Les flashes stroboscopiques sont émis par cette sphère de Ganzfeld. Les luminances s'échelonnent de -3,902 à 1,398 Cd.s.m<sup>-2</sup>. Trois flashes par luminance sont émis, et un signal est enregistré par flash. Les signaux sont moyennés point par point pour chaque luminance. Les deux yeux des animaux sont étudiés afin de s'affranchir d'éventuelles cataractes affectant l'un des deux yeux de l'animal.

### 3.4.12 Etudes comportementales

#### *Optomètre (Optomotor Drum)*

Les tests menés avec l'Optomotor Drum sont réalisés grâce au dispositif décrit précédemment (Felgerolle et al., 2019). La procédure et l'analyse sont menées également de la même manière que celle précédemment décrite (Felgerolle et al., 2019). La souris est placée au centre du cylindre, sur une plateforme surélevée sur laquelle elle est libre de se déplacer. Le cylindre est maintenu immobile pendant 2 minutes, puis est mis en rotation à raison de 2 tours par minutes. Le cylindre tourne dans le sens horaire pendant les 2 premières minutes puis la rotation est inversée pour être maintenue en sens anti-horaire pendant 2 minutes supplémentaires. La rotation est ensuite stoppée, la souris est retirée du dispositif et l'appareil est nettoyé à l'éthanol puis à l'eau avant le passage de la souris suivante. Le test est réalisé en condition lumineuse de 10lux, mesurée sur la face interne du cylindre à hauteur des yeux de la souris. La souris est habituée au dispositif et à la rotation du cylindre 24h avant la réalisation du test, suivant un protocole strictement identique à celui du test mais avec le cylindre dépourvu du stimulus rayé. La souris est filmée durant l'intégralité de la manipulation grâce à une caméra fixée à la vertical au-dessus du cylindre. Le comportement de la souris est ainsi enregistré durant toutes les phases du test. Les vidéos sont analysées grâce au logiciel d'analyse comportementale The Observer XT (Noldus, Pays-Bas) par une personne ne connaissant pas les génotypes des souris. Les mouvements de head-tracking sont comptés et leurs durées mesurées.

#### *Labyrinthe en Y (Y-maze)*

L'étude avec le labyrinthe en Y est réalisée suivant la même procédure que celle décrite précédemment (Hébert et al., 2014). Brièvement, la phase d'exploration ne permettant à la souris d'explorer que 2 bras du labyrinthe dure 5 minutes, et la phase de test ouvrant le bras « inconnu » à la souris dure 2 minutes. Les deux phases sont séparées par une étapes de 10 minutes durant laquelle la souris est isolée dans une cage. Le dispositif est nettoyé à l'éthanol et à l'eau entre chaque phase et chaque souris. Le test est réalisé dans des conditions lumineuses fixées à 10 lux. Les déplacements de la souris sont enregistrés grâce à une caméra placée au-dessus du dispositif et le suivi de la souris est assuré par



le logiciel Ethovision XT (Noldus, Pays-Bas). La distance parcourue, le nombre d'entrées dans les bras ainsi que le temps passé dans chaque bras par la souris sont enregistrés et analysés.

#### *Test de la croix surélevée (Elevated Plus Maze, EPM)*

L'étude avec la croix surélevée est réalisée suivant la même procédure que celle décrite précédemment (Hébert et al., 2014). Brièvement, la souris testée est placée au centre du dispositif de la croix surélevée et laissée libre de se déplacer dans les différents bras (2 fermés et 2 ouverts) pendant 5 minutes. Le déplacement de la souris est enregistré grâce à une caméra située au-dessus du dispositif et est enregistré grâce au logiciel Ethovision XT (Noldus, Pays-Bas). Le dispositif est nettoyé à l'éthanol et à l'eau entre chaque souris testée. Le test est réalisé dans des conditions lumineuses fixées à 10 lux. La distance parcourue, le nombre d'entrées dans chaque bras ainsi que le temps passé dans chaque bras sont comptabilisés.

#### *3.4.13 Analyses Statistiques*

Pour chaque paramètre, l'analyse de la normalité de la distribution est effectuée grâce au test de Shapiro-Wilk ( $\alpha=0,05$ ), à la suite de quoi un test statistique avec comparaison multiple est choisi et appliqué. Pour l'ensemble des données présentées ici, les statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism® 8.2.0. Chaque moyenne de chaque groupe a été comparée à chaque moyenne des autres groupes. Pour les paramètres vérifiant une distribution normale, les données sont analysées en utilisant une ANOVA une voie suivie d'une comparaison multiple de Tukey. Pour les techniques dont les résultats ne permettent pas l'application d'un test paramétrique, le test de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple de Dunn est appliqué. Enfin, pour les expériences ne comparant que 2 groupes, un t-test paramétrique ou non est appliqué. Le choix du test appliqué est indiqué dans la légende des figures. Toutes les données présentées ici sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM, dans le texte comme sur les représentations graphiques. Dans les textes, les P value ( $p$ ) indiquées comparent le résultat du groupe d'animaux d'intérêt à celui du groupe d'animaux WT. Les valeurs sont considérées comme significativement différente dès lors que  $p < 0.05$ . Pour les graphiques : \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

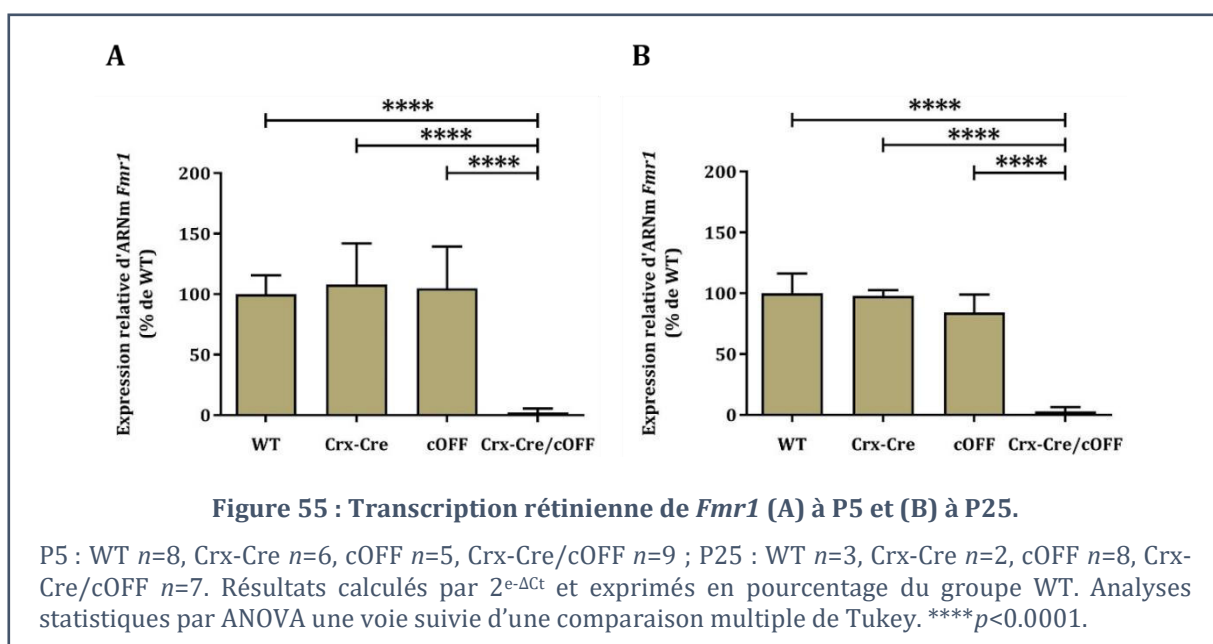
## 3.5 Résultats

### 3.5.1 Etude des rétines du modèle *Crx-Cre/cOFF*

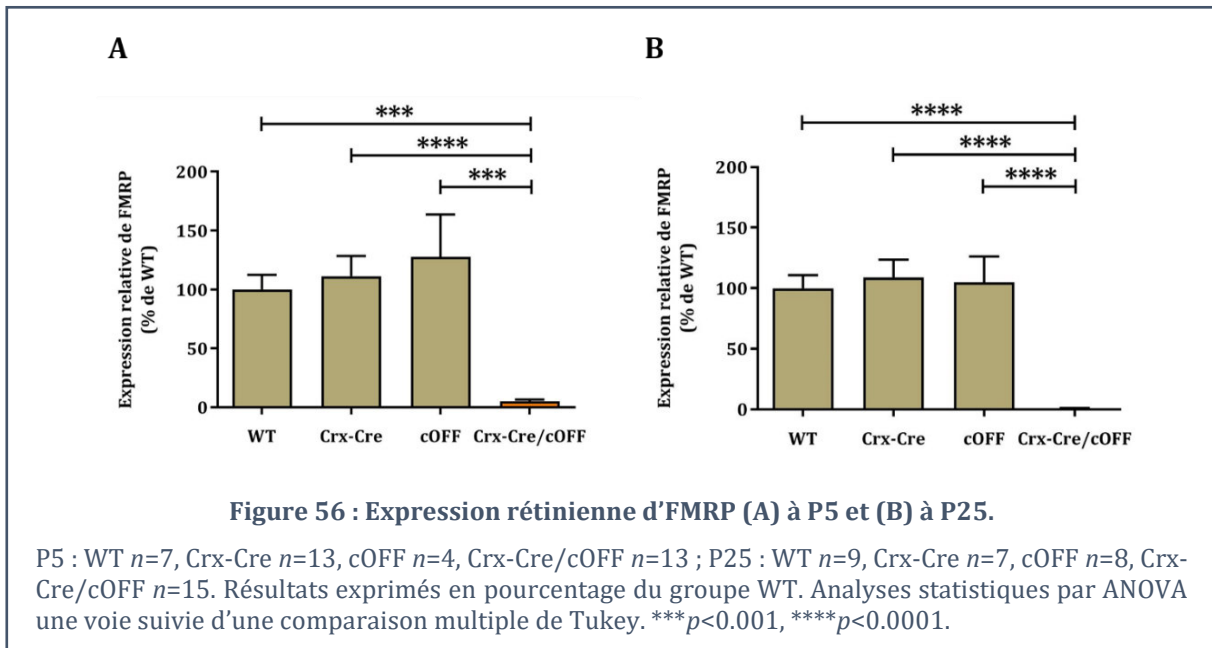
#### Validation des rétines du modèle *Crx-Cre/cOFF*

La validation du modèle créé consiste à vérifier le schéma d'expression du gène *Fmr1* et de la protéine FMRP dans les rétines et le cerveau de l'animal d'intérêt. Au niveau rétinien, l'objectif est d'obtenir une absence totale d'expression du gène *Fmr1* et donc une absence de protéine FMRP. Pour vérifier cela, j'ai réalisé une étude des quantités de transcrits du gène *Fmr1* et de la protéine FMRP dans les rétines d'animaux d'intérêt et de contrôles littermate. J'ai choisi d'étudier ces contenus moléculaires à deux âges. Tout d'abord au 5<sup>ème</sup> jour après la naissance (P5), après le pic d'expression de CRX afin d'obtenir une recombinaison optimale par le Tg(*Crx-Cre*), et avant l'ouverture des yeux afin que les rétines soient encore dans leur état natif et non modifiées par des expériences visuelles. Ensuite au 25<sup>ème</sup> jour après la naissance (P25), afin de travailler sur une rétine mature. De plus, nous pouvons considérer que l'animal arrive à son âge adulte, et donc ses tissus sont peu susceptibles d'évoluer par la suite. Les deux âges choisis correspondent donc l'un à un état natif et l'autre à un état jeune adulte.

A P5, les rétines des animaux d'intérêt ne contiennent pas d'ARNm de *Fmr1* en quantité détectable, alors que les animaux des trois groupes contrôles possèdent des niveaux d'expression de *Fmr1* similaires (WT  $100 \pm 5,5$  %, Crx-Cre  $107,8 \pm 13,9$  %, cOFF  $104,6 \pm 15,6$  %, Crx-Cre/cOFF  $1,9 \pm 1,1$  %) (Figure 55A). Un résultat identique est obtenu avec des animaux âgés de 25 jours (WT  $100 \pm 9,2$  %, Crx-Cre  $97,5 \pm 3,5$  %, cOFF  $84,1 \pm 5,2$  %, Crx-Cre/cOFF  $2,6 \pm 1,4$  %) (Figure 55B). **Ainsi, le croisement des deux lignées induit la mise en silence du gène *Fmr1* dans les rétines de l'animal d'intérêt.**



De manière cohérente, à P5, les rétines des animaux d'intérêt ne présentent pas de quantité détectable de protéine FMRP, tandis que les animaux contrôles montrent des niveaux équivalents de protéine FMRP (WT  $100 \pm 12,4$  %, Crx-Cre  $111,1 \pm 17,3$  %, cOFF  $127,7 \pm 36$  %, Crx-Cre/cOFF  $5,0 \pm 1,6$  %) (Figure 56A). Un résultat identique est obtenu avec des animaux âgés de 25 jours (WT  $100 \pm 10,7$  %, Crx-Cre  $108,9 \pm 14,8$  %, cOFF  $104,7 \pm 21,5$  %, Crx-Cre/cOFF  $0,8 \pm 0,3$  %) (Figure 56B). **Ainsi, le croisement des deux lignées sélectionnées induit une absence de protéine FMRP dans les rétines de l'animal d'intérêt.**



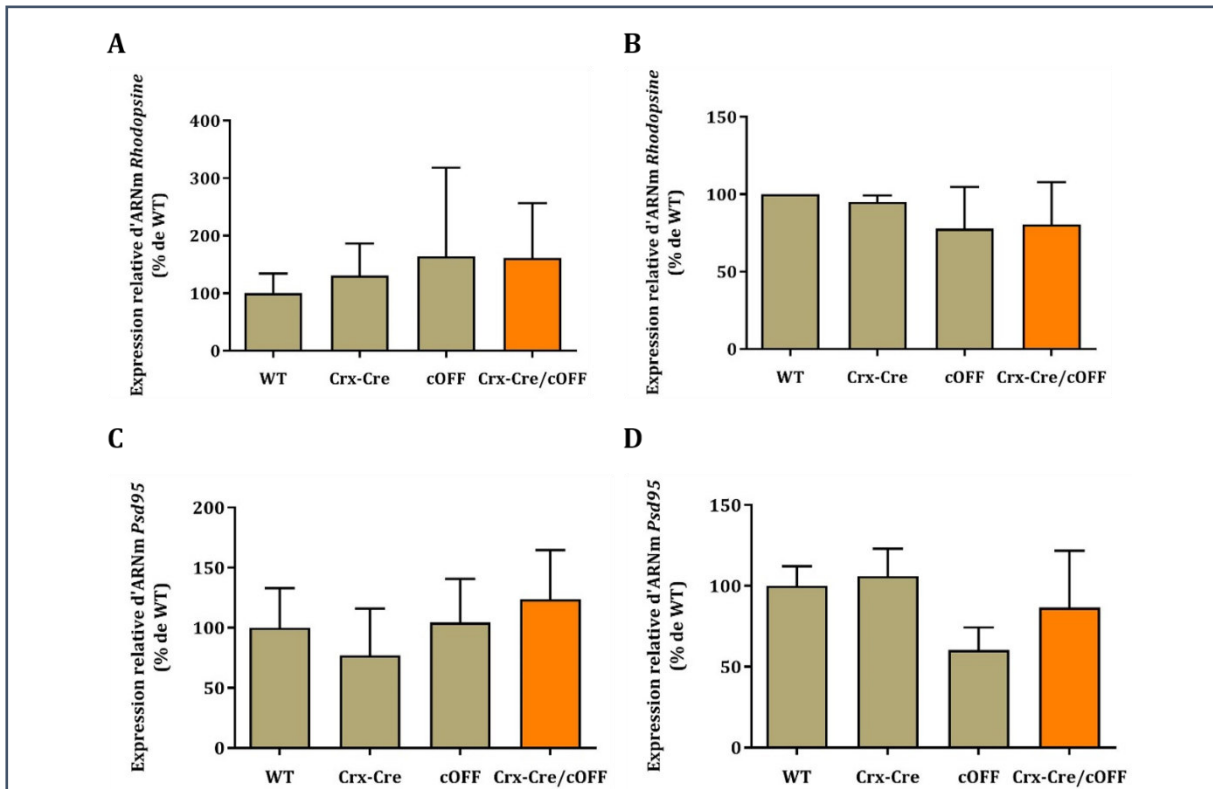
**Le modèle Crx-Cre/cOFF est donc validé au niveau rétinien : aucune expression rétinienne du gène *Fmr1* n'est observée quel que soit l'âge de l'animal. Il correspond donc aux attentes d'un modèle FXS rétine-spécifique.**

#### *Caractérisation moléculaire des rétines du modèle Crx-Cre/cOFF*

L'objectif de la caractérisation moléculaire est de dresser un état des lieux des protéines dont l'expression est modifiée par l'absence de FMRP. En toute logique, le profil protéique de la rétine de l'animal d'intérêt devrait être comparable à celui décrit chez l'animal *Fmr1* KO (Rossignol et al., 2014; Perche et al., 2018). De plus, les anomalies observées dans les quantités de protéines ne doivent pas provenir de défauts de transcription des gènes codants pour ces protéines. En outre, le croisement des deux lignées mutantes n'est pas censé affecter l'expression d'autres gènes que *Fmr1*. C'est pourquoi j'ai réalisé une étude des quantités de protéines mais également une étude des quantités de transcrits codants pour ces protéines. J'ai choisi d'étudier 2 protéines pour cette caractérisation moléculaire. Tout d'abord la rhodopsine, photopigment principal des photorécepteurs, centrale dans la capture des signaux lumineux et dont les quantités sont diminuées en absence de protéine FMRP (Rossignol et al., 2014;

Perche et al., 2018). Puis PSD95, protéine de structure synaptique très impliquée dans le bon fonctionnement des réseaux neuronaux, elle aussi décrite comme dérégulée dans la rétine en absence de protéine FMRP (Rossignol et al., 2014). Les animaux sont étudiés aux mêmes âges que lors de l'étape de validation.

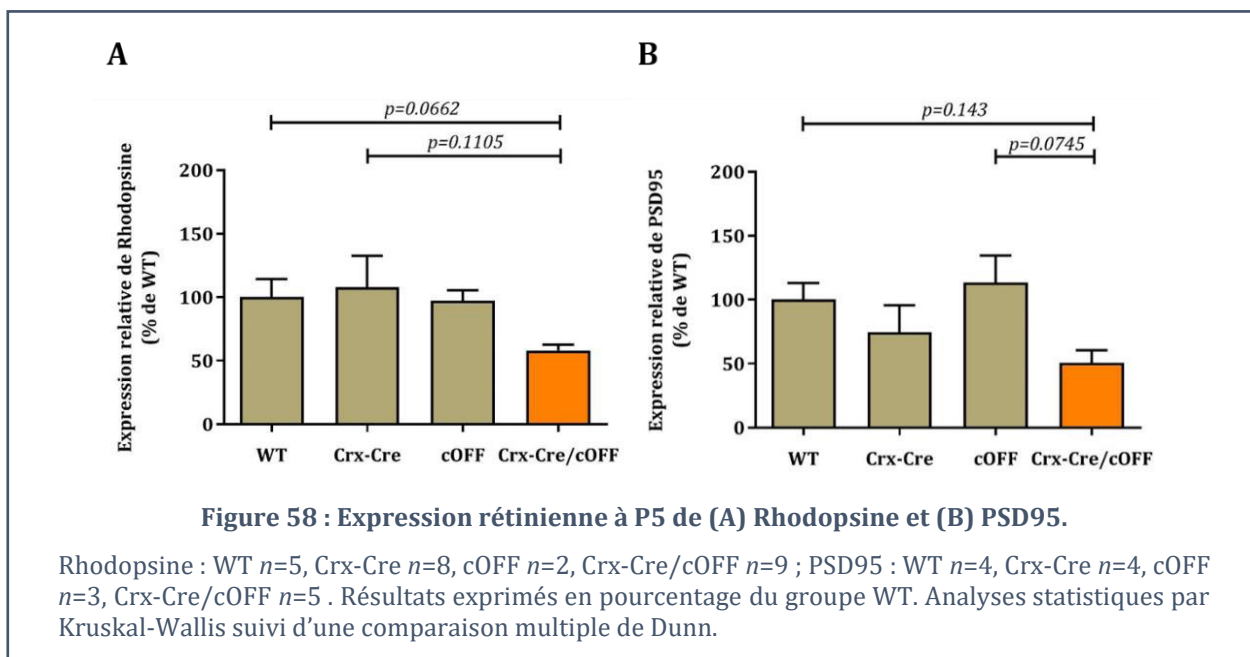
A P5, aucune différence significative n'est observée entre les rétines des animaux d'intérêt et les animaux contrôles dans leurs quantités d'ARNm de *Rhodopsine* (WT 100 ± 15,3 %, Crx-Cre 130,5 ± 39,5 %, cOFF 164 ± 88,9 %, Crx-Cre/cOFF 161,4 ± 35,9 %,  $p = 0.6707$ ) (Figure 57A). De la même manière, les rétines des animaux des différents génotypes ne présentent aucune différence significative dans leurs contenus en ARNm de *Psd95* (WT 100 ± 14,7 %, Crx-Cre 77 ± 22,5 %, cOFF 104,3 ± 18,2 %, Crx-Cre/cOFF 123,6 ± 14,5 %,  $p = 0.6994$ ) (Figure 57C). A P25, aucune différence significative n'est observée entre les rétines des animaux d'intérêt et les animaux contrôles dans leurs quantités d'ARNm de *Rhodopsine* (WT 100 ± 0 %, Crx-Cre 95 ± 3 %, cOFF 77,8 ± 9,5 %, Crx-Cre/cOFF 80,6 ± 10,3 %,  $p > 0.9999$ ) (Figure 57B). De la même manière, les rétines des animaux des différents génotypes ne présentent aucune différence significative dans leurs contenus en ARNm de *Psd95* (WT 100 ± 6,9 %, Crx-Cre 106 ± 12 %, cOFF 60,1 ± 5 %, Crx-Cre/cOFF 86,4 ± 13,3 %,  $p = 0.8493$ ) (Figure 57D).



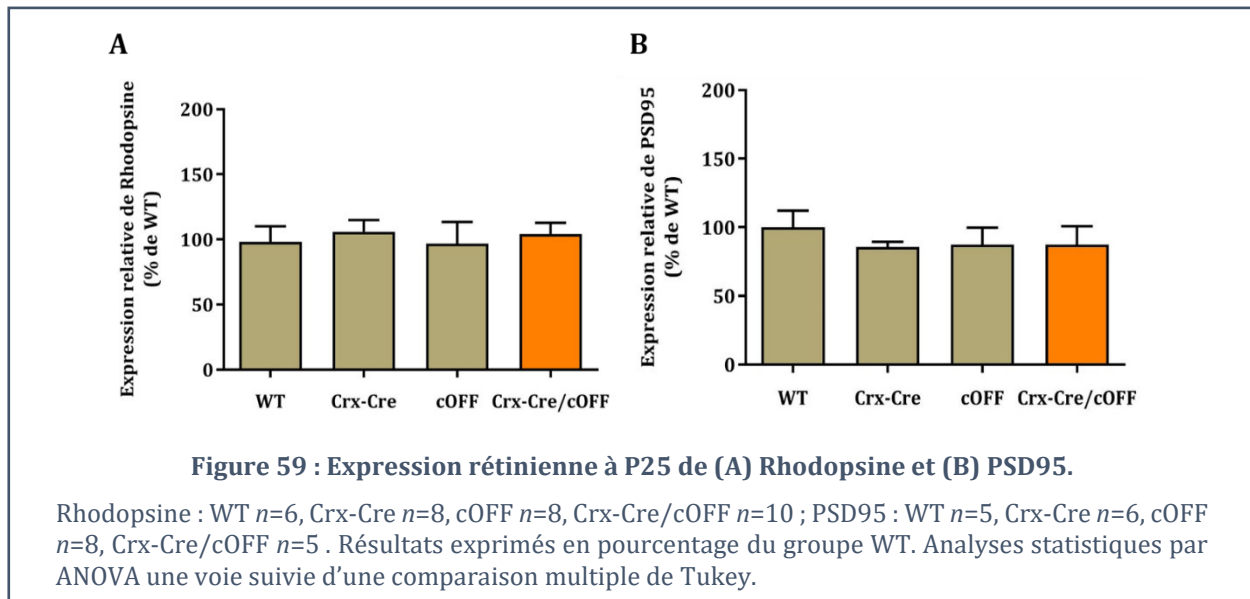
**Figure 57 : Transcription rétinienne de (A) *Rhodopsine* à P5 et (B) à P25, (C) *Psd95* à P5 et (D) à P25.**

*Rhodopsine* P5 : WT n=5, Crx-Cre n=2, cOFF n=3, Crx-Cre/cOFF n=7 ; P25 : WT n=2, Crx-Cre n=2, cOFF n=8, Crx-Cre/cOFF n=7. *Psd95* P5 : WT n=5, Crx-Cre n=3, cOFF n=4, Crx-Cre/cOFF n=8 ; P25 : WT n=3, Crx-Cre n=2, cOFF n=8, Crx-Cre/cOFF n=7. Résultats calculés par  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  et exprimés en pourcentage du groupe WT. Analyses statistiques par ANOVA une voie suivie d'une comparaison multiple de Tukey.

A P5, les rétines des animaux contrôles présentent des niveaux de Rhodopsine similaires (WT  $100 \pm 14,1$  %, Crx-Cre  $107,8 \pm 24,9$  %, cOFF  $97 \pm 8,3$  %). En revanche, celles des animaux d'intérêt montrent des quantités de Rhodopsine diminuées de l'ordre de 40% par rapport aux animaux WT (Crx-Cre/cOFF  $58,2 \pm 4,5$  %,  $p = 0.0662$ ) (Figure 58A). Les rétines des animaux contrôles ont également des quantités de PSD95 similaires (WT  $100 \pm 13$  %, Crx-Cre  $74,7 \pm 20,9$  %, cOFF  $113,5 \pm 21$  %). Ici aussi, les rétines des animaux d'intérêt montrent une diminution de leur quantité de PSD95, de l'ordre de 50% par rapport aux animaux WT (Crx-Cre/cOFF  $50,6 \pm 9,9$  %,  $p = 0.143$ ) (Figure 58B). Ainsi, les animaux Crx-Cre/cOFF âgés de 5 jours connaissent des altérations dans leur contenu protéique rétinien sans modification de la transcription des gènes codant pour ces protéines. Ces altérations se caractérisent notamment par une diminution de 40% de leur contenu en rhodopsine et une diminution de l'ordre de 50% de leur contenu en PSD95. Par conséquent, **à leur naissance, les animaux Crx-Cre/cOFF présentent un phénotype rétinien moléculaire similaire à celui décrit chez l'animal *Fmr1* KO** (Rossignol et al., 2014; Perche et al., 2018).



De manière surprenante, à P25, aucune différence de contenu rétinien en protéine rhodopsine n'est observée entre les différents groupes (WT  $100 \pm 11,9$  %, Crx-Cre  $106 \pm 8,9$  %, cOFF  $96,7 \pm 16,7$  %, Crx-Cre/cOFF  $104,1 \pm 8,7$  %,  $p = 0.9856$ ) (Figure 59A). Ce phénomène est également observé pour ce qui concerne le contenu en protéines PSD95 (WT  $100 \pm 12$  %, Crx-Cre  $85,8 \pm 3,7$  %, cOFF  $87,4 \pm 12,4$  %, Crx-Cre/cOFF  $84,5 \pm 13,3$  %,  $p = 0.8907$ ) (Figure 59B).



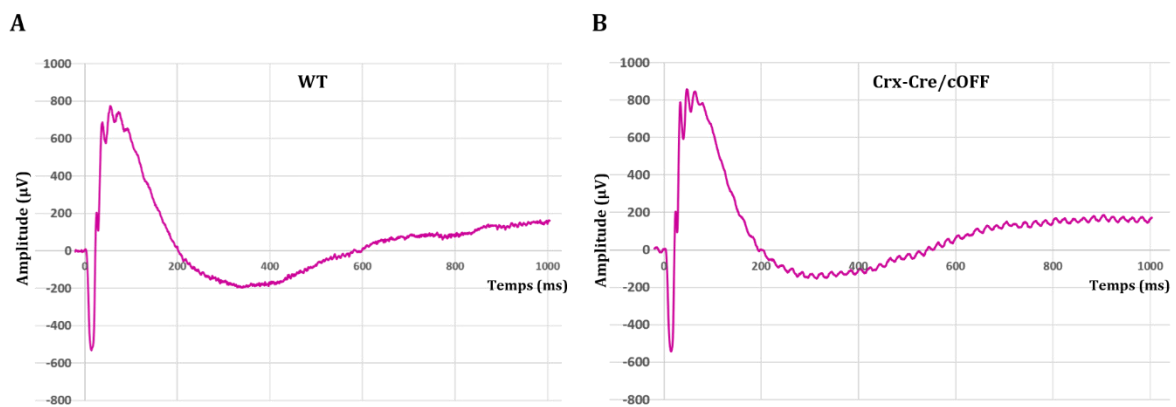
Ainsi, à P25, les animaux d'intérêt ne présentent plus les anomalies protéiques rétinienne observées à P5. Leur profil protéique rétinien n'est pas cohérent avec celui décrit précédemment en cas d'absence de la protéine FMRP (Rossignol et al., 2014; Perche et al., 2018). Ce résultat suggère que d'autres protéines décrites comme dérégulées dans la rétine en absence de FMRP ne le devraient pas dans la rétine de l'animal d'intérêt à son entrée à l'âge adulte. Je pense notamment aux protéines synaptotagmine 1 et mGluR5 dont les contenus sont modifiés dans la rétine de la souris *Fmr1* KO (Rossignol et al., 2014). En extrapolant, nous pouvons imaginer que d'autres protéines dont le contenu rétinien n'a pas encore été étudié chez l'animal *Fmr1* KO mais qui sont dérégulées dans la rétine de cet animal, ne le soient pas ici chez l'animal Crx-Cre/cOFF. Quoi qu'il en soit, **la rétine des animaux d'intérêt ne présente pas le phénotype moléculaire de type « *Fmr1* KO » lors de l'entrée à l'âge adulte.**

**Les résultats obtenus lors de la caractérisation moléculaire ne semblent pas cohérents avec l'absence de protéine FMRP. Le modèle généré n'est donc pas conforme aux attentes, car la rétine en présente pas le phénotype moléculaire « de type *Fmr1* KO » attendu d'un modèle FXS rétinien-spécifique.**

#### *Etude électrophysiologique de la rétine du modèle Crx-Cre/cOFF*

La fonctionnalité rétinienne est étudiée par l'enregistrement d'électrorétinogrammes. Les animaux sont étudiés à 3 mois et à 6 mois.

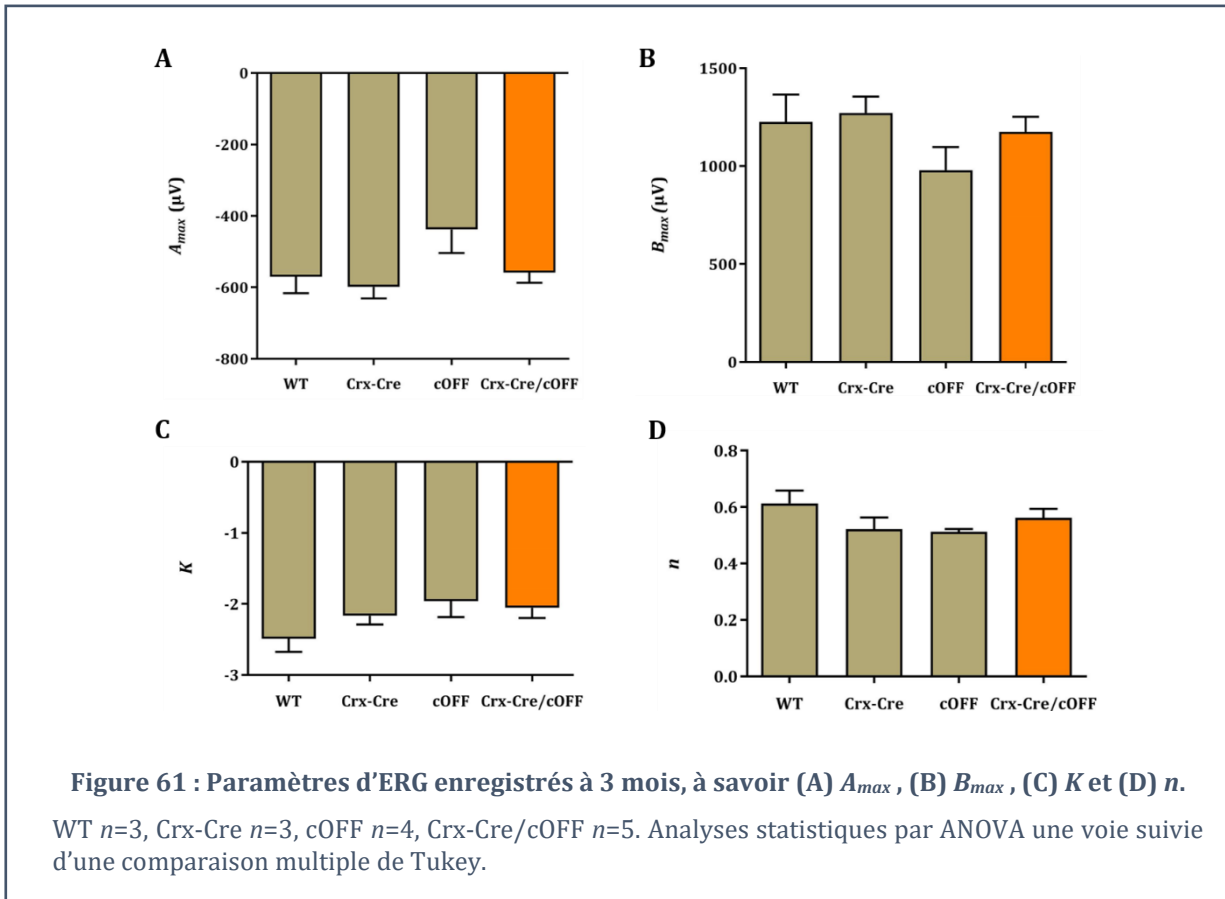
Quel que soit l'âge considéré, les courbes enregistrées sont globalement identiques d'un génotype à l'autre (Figure 60). Les ERG des animaux d'intérêt ne présentent pas d'anomalie globale par rapport à ceux des animaux contrôles, leurs rétines réagissent aux stimuli lumineux.



**Figure 60 : Exemples de courbes d'ERG d'animaux à 3 mois (A) WT et (B) Crx-Cre/cOFF.**

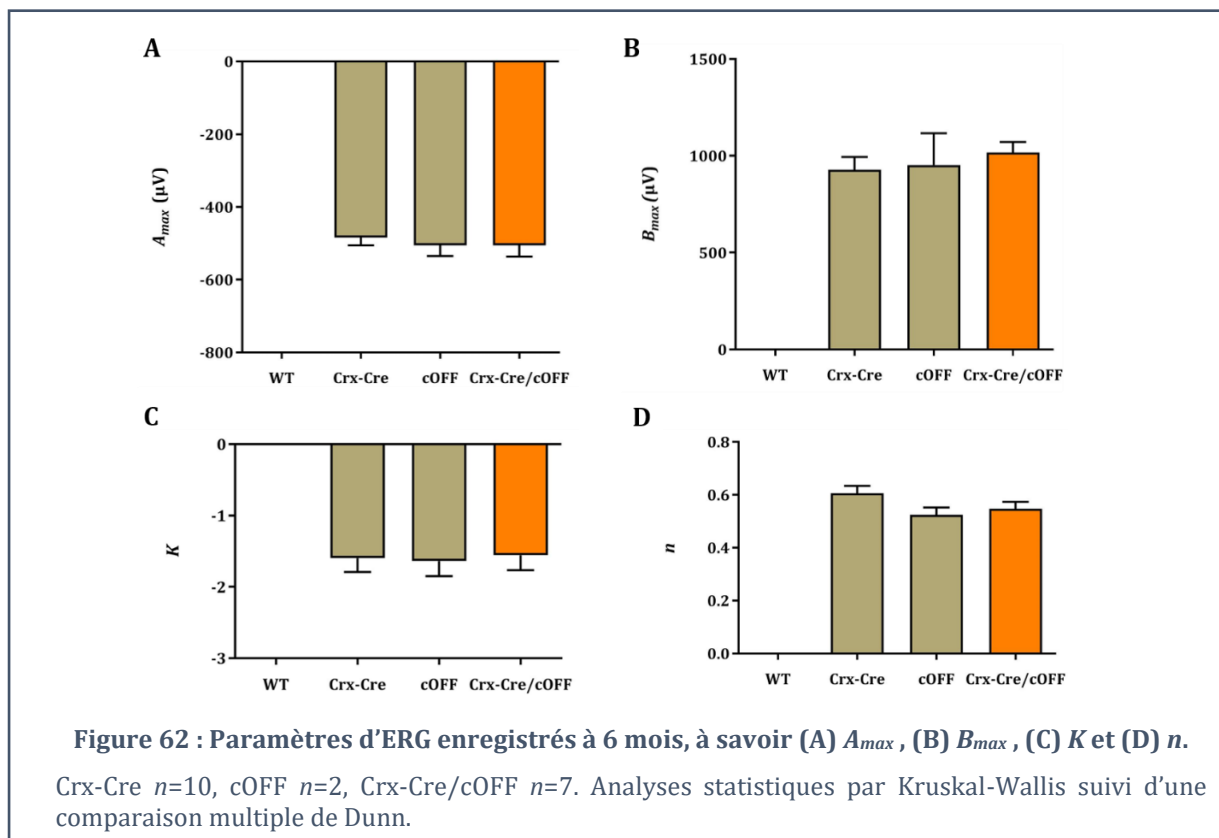
Ici, le stimulus lumineux émis à 0 ms est d'intensité 0 dB, soit  $0,398 \text{ Cd.s.m}^{-2}$ . Cette luminance a permis d'obtenir ici les réponses maximales chez les animaux étudiés.

A 3 mois, l'amplitude maximale de l'onde a ( $A_{max}$ ) des animaux d'intérêt est similaire à celle des groupes contrôles (WT  $-570,4 \pm 45,7 \mu\text{V}$ , Crx-Cre  $-598,8 \pm 32 \mu\text{V}$ , cOFF  $-438,4 \pm 65,8 \mu\text{V}$ , Crx-Cre/cOFF  $-558,7 \pm 28,5 \mu\text{V}$ ,  $p = 0.9978$ ) (Figure 61A). Aucune différence significative n'est observée pour ce paramètre. Il en est de même pour l'amplitude maximale de l'onde B ( $B_{max}$ ), similaire d'un génotype à l'autre (WT  $1226 \pm 139,1 \mu\text{V}$ , Crx-Cre  $1272 \pm 83,4 \mu\text{V}$ , cOFF  $980 \pm 117,5 \mu\text{V}$ , Crx-Cre/cOFF  $1175 \pm 76,8 \mu\text{V}$ ,  $p = 0.9849$ ) (Figure 61B). Les paramètres issus de l'onde b, à savoir  $n$ , la pente de la courbe de sensibilité de l'onde b, et  $K$ , l'intensité lumineuse nécessaire pour atteindre  $B_{max}/2$ , sont également identiques entre les différents génotypes. En effet, le paramètre  $K$  présente des valeurs similaires quel que soit le génotype considéré (WT  $-2,5 \pm 0,2 \text{ dB}$ , Crx-Cre  $-2,2 \pm 0,1 \text{ dB}$ , cOFF  $-2,0 \pm 0,2 \text{ dB}$ , Crx-Cre/cOFF  $-2,1 \pm 0,1 \text{ dB}$ ,  $p = 0.3548$ ) (Figure 61C), et le paramètre  $n$  mesuré chez les animaux d'intérêt est similaire à celui des animaux des groupes contrôles (WT  $0,61 \pm 0,04$ , Crx-Cre  $0,52 \pm 0,04$ , cOFF  $0,51 \pm 0,01$ , Crx-Cre/cOFF  $0,56 \pm 0,03$ ,  $p = 0.6921$ ) (Figure 61D). **Ainsi, à 3 mois, les animaux d'intérêt ne présentent pas d'anomalies majeures de l'ERG.**

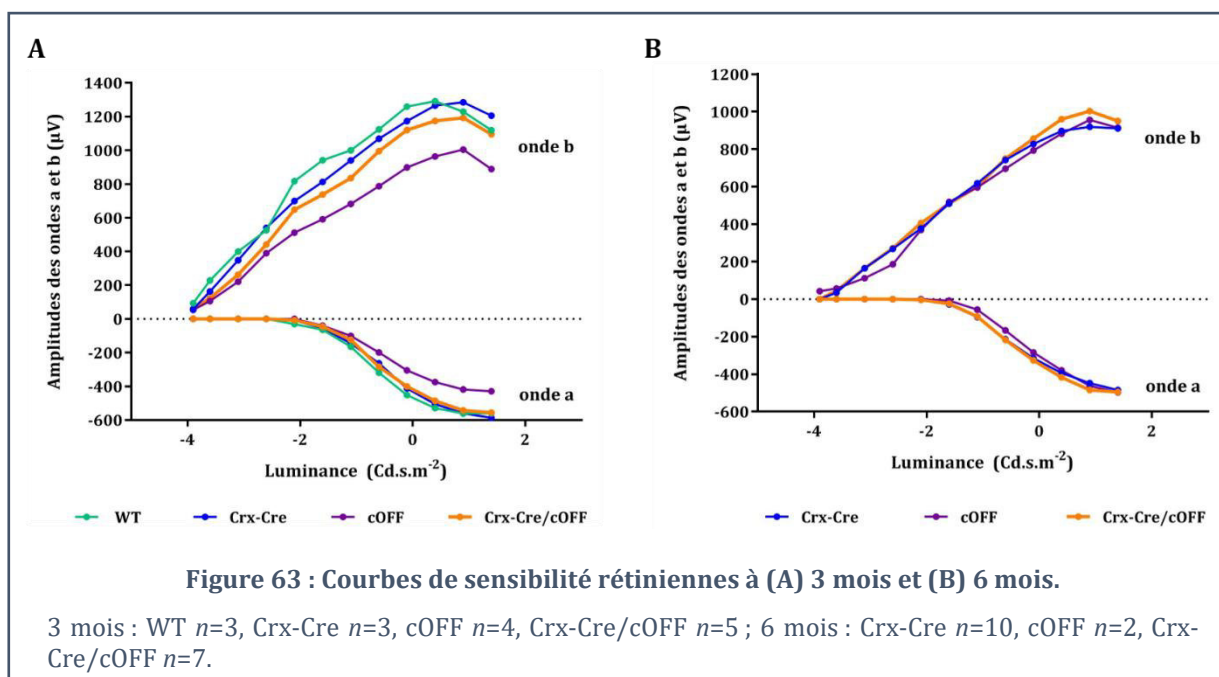


**Un résultat identique est observé à 6 mois.** En effet, les rétines des animaux d'intérêt à cet âge ne montrent pas de différence significative par rapport aux groupes contrôles pour leurs paramètres  $A_{max}$  (Crx-Cre  $-484,2 \pm 21,4 \mu\text{V}$ , cOFF  $-505,7 \pm 29,5 \mu\text{V}$ , Crx-Cre/cOFF  $-505,3 \pm 31,0 \mu\text{V}$ ,  $p > 0.9999$ ),  $B_{max}$  (Crx-Cre  $928,1 \pm 65,7 \mu\text{V}$ , cOFF  $952,7 \pm 164,3 \mu\text{V}$ , Crx-Cre/cOFF  $1017 \pm 54,6 \mu\text{V}$ ,  $p = 0.6207$ ),  $K$  (Crx-Cre  $-1,60 \pm 0,19 \text{ dB}$ , cOFF  $-1,64 \pm 0,21 \text{ dB}$ , Crx-Cre/cOFF  $-1,56 \pm 0,21 \text{ dB}$ ,  $p > 0.9999$ ) et  $n$  (Crx-Cre  $0,61 \pm 0,03$ , cOFF  $0,52 \pm 0,03$ , Crx-Cre/cOFF  $0,55 \pm 0,03$ ,  $p = 0.4179$ )(Figure 62).





Par conséquent, à 3 mois comme à 6 mois, les animaux d'intérêt ne présentent pas de différence par rapport aux groupes contrôles dans leur réponse à une série de stimuli lumineux. Ce phénomène s'illustre par des courbes de sensibilité des ondes a et b similaires entre les animaux d'intérêt et les animaux contrôles, à 3 mois comme à 6 mois (Figure 63).



**Les rétines des animaux d'intérêt ne présentent donc pas d'altération électrophysiologique majeure.** Ces résultats suggèrent que la fonctionnalité rétinienne des animaux d'intérêt n'est pas affectée. La capture de la lumière par les photorécepteurs n'est pas altérée, comme le montre l'onde a, et la transmission des signaux visuels à travers la rétine interne s'effectue de manière identique à celle observée en conditions contrôles, comme le montrent les paramètres de l'onde b. Ces résultats peuvent être expliqués par l'absence de certaines anomalies moléculaires constatées précédemment. En effet, chez les animaux d'intérêt, le contenu rétinien en rhodopsine n'est pas différent de celui des animaux contrôles, ce qui peut expliquer l'absence d'anomalie de l'onde a chez ces animaux (Liang et al., 2004; Price et al., 2012). De même, la quantité de PSD95 n'est pas modifiée dans les rétines des animaux d'intérêt. À l'évidence, les réseaux neuronaux rétiniens de l'animal d'intérêt fonctionnent de manière physiologique, ce qui est cohérent avec une absence d'anomalies dans le contenu de protéines synaptiques de ces rétines. Les résultats obtenus lors de l'étude électrophysiologique étayent l'hypothèse de l'absence d'anomalies dans le contenu d'autres protéines rétiniennes impliquées dans le fonctionnement des circuits neuronaux, telles que les protéines synaptiques. Quoiqu'il en soit, l'absence d'anomalie de l'ERG n'est pas cohérente avec l'absence de protéine FMRP, puisque les études précédentes ont montré des anomalies claires de l'électrophysiologie rétinienne chez l'animal *Fmr1* KO (Rossignol et al., 2014; Perche et al., 2018).

**Les animaux *Crx-Cre/cOFF* ne présentent pas d'anomalies de l'ERG. Ce résultat s'ajoute à l'absence de dérégulations de protéines dont le contenu a pourtant été clairement décrit comme modifié en absence de FMRP, et confirme que les rétines de ces animaux ne présentent pas un phénotype « de type *Fmr1* KO ». Par conséquent, le modèle *Crx-Cre/cOFF* n'est pas conforme aux attentes d'un modèle FXS rétine-spécifique.**

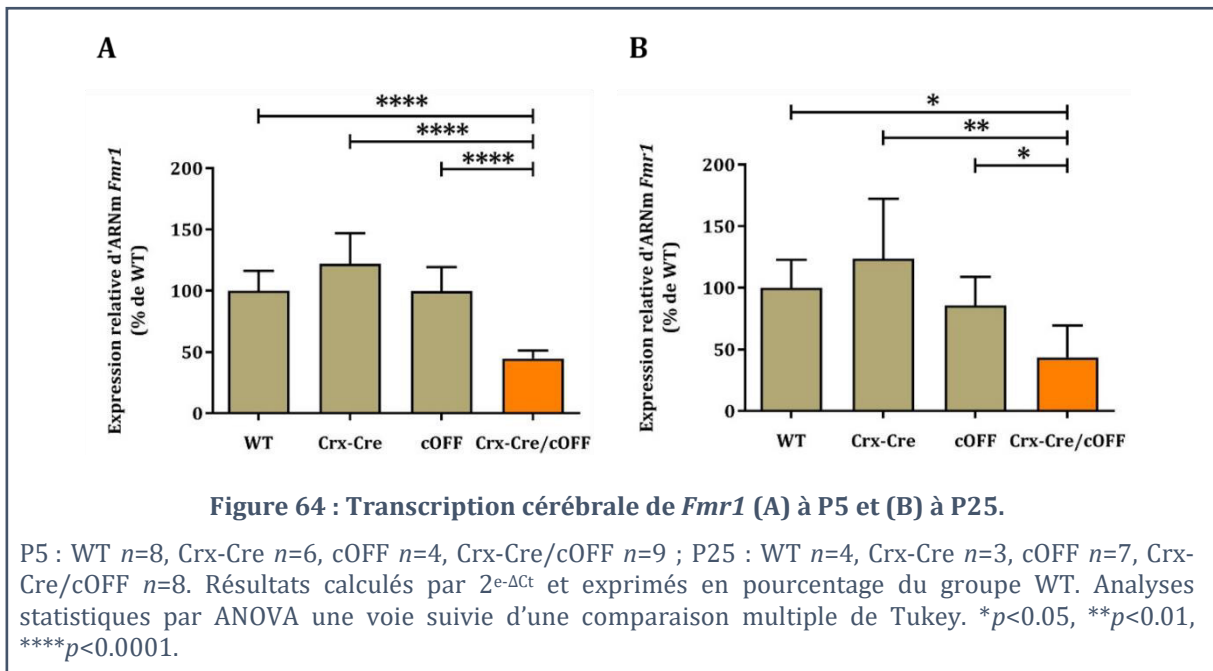
Ainsi, le modèle créé exprime un phénotype rétinien inattendu au vu de la construction génétique mise en place et de l'absence confirmée de la protéine FMRP aux stades post-nataux. **La composante rétinienne du système visuel n'est pas conforme aux attentes du modèle, et ce dernier ne me permettra pas a priori de répondre aux questions qui ont motivées ce projet.** Néanmoins, je me suis toutefois intéressée à la composante cérébrale chez ce modèle, afin d'étudier le plus possible les effets de la construction génétique utilisée ici.

### 3.5.2 Etude du cerveau du modèle *Crx-Cre/cOFF*

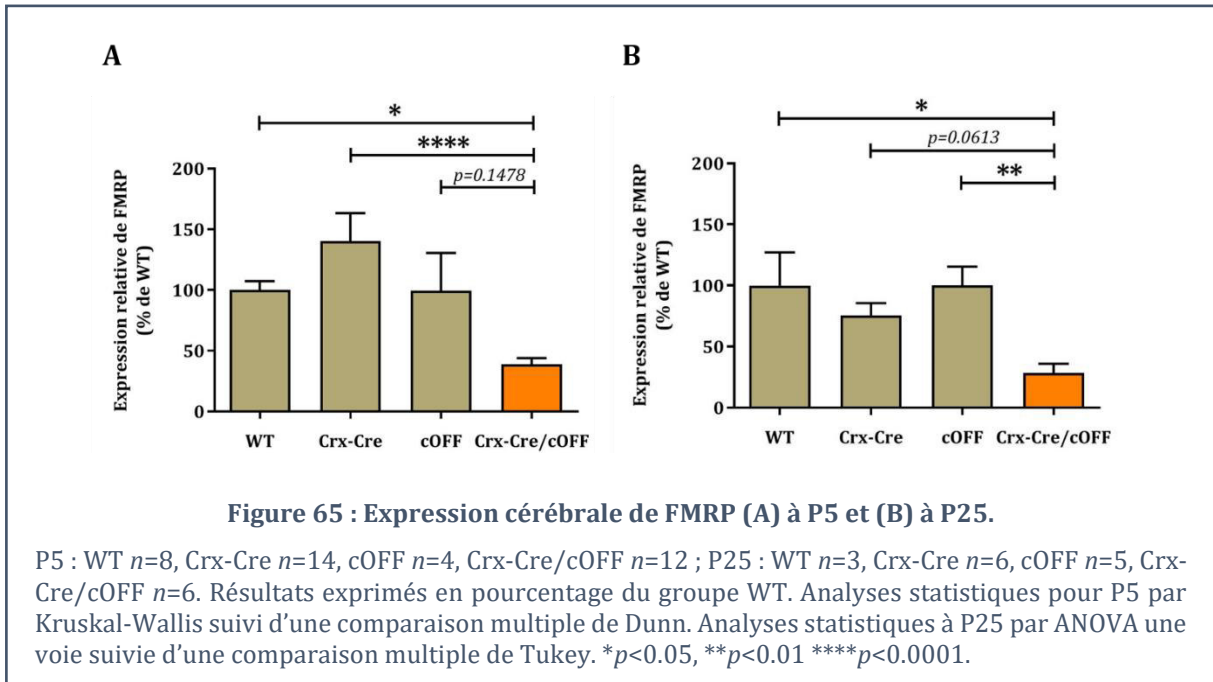
#### *Validation des aires cérébrales du modèle *Crx-Cre/cOFF**

Au niveau cérébral, l'objectif du modèle créé est de conserver l'expression du gène *Fmr1* et de maintenir la quantité de protéine FMRP au niveau physiologique. Pour vérifier cela, de manière identique à la validation des rétines, j'ai réalisé une étude des quantités de transcrits du gène *Fmr1* et de la protéine FMRP dans le cerveau entier d'animaux d'intérêt et de contrôles littermate, aux deux âges sélectionnés.

A P5, les cerveaux des animaux des trois groupes contrôles présentent des niveaux d'expression de *Fmr1* similaires (WT  $100 \pm 5,8$  %, Crx-Cre  $121,8 \pm 10,2$  %, cOFF  $99,5 \pm 9,9$  %) (Figure 64A). Cependant, contre toute attente, les cerveaux d'animaux d'intérêt présentent une diminution significative de leur expression de *Fmr1* de 55% par rapport au groupe contrôle WT (Crx-Cre/cOFF  $44,7 \pm 2,1$  %,  $p < 0.0001$ ) (Figure 64A). Un résultat identique est obtenu avec des animaux âgés de 25 jours (WT  $100 \pm 11,3$  %, Crx-Cre  $123,7 \pm 28$  %, cOFF  $85,7 \pm 8,8$  %, Crx-Cre/cOFF  $43,4 \pm 9,2$  %,  $p = 0.0195$ ) (Figure 64B). **Ainsi, le croisement des deux lignées induit une diminution de l'expression du gène *Fmr1* de l'ordre de 50% dans les cerveaux de l'animal d'intérêt.**

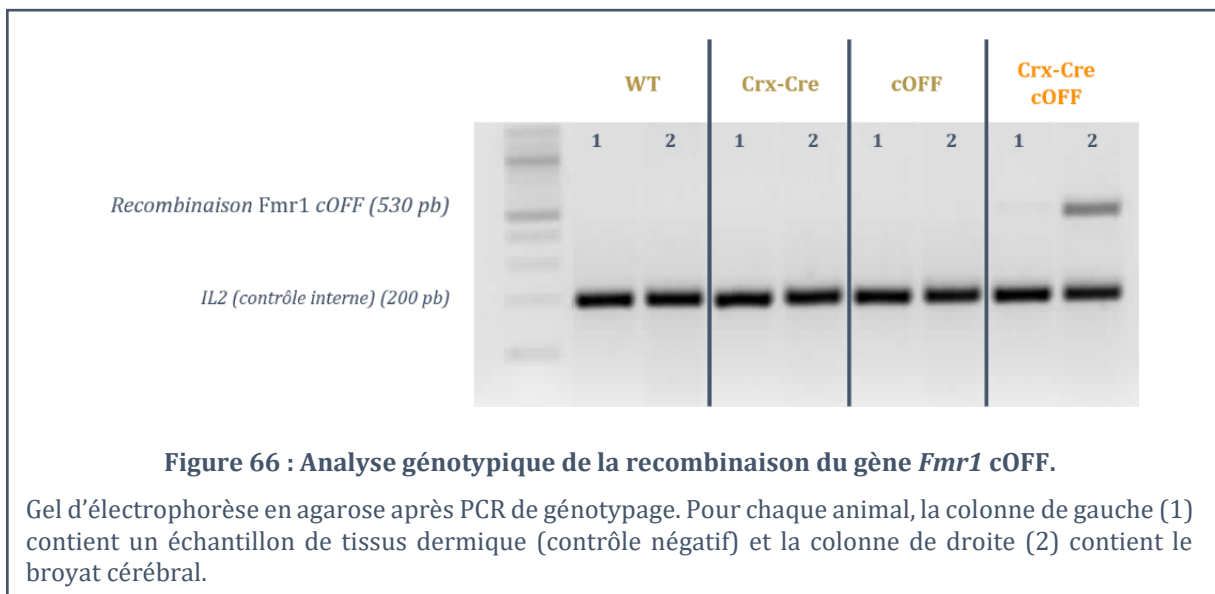


De manière logique, cette diminution de transcription du gène *Fmr1* trouve ses conséquences au niveau protéique. En effet, à P5, les cerveaux des animaux d'intérêt présentent une diminution significative de leur quantité de protéine FMRP par rapport aux groupes contrôles, tandis que les animaux contrôles montrent des niveaux équivalents de protéine FMRP (WT  $100 \pm 7,3$  %, Crx-Cre  $140,2 \pm 23,1$  %, cOFF  $99,5 \pm 31,1$  %, Crx-Cre/cOFF  $39 \pm 4,9$  %,  $p = 0.0111$ ) (Figure 65A). A cet âge, la diminution de la quantité cérébrale de FMRP est de l'ordre de 60% par rapport aux animaux WT. Un résultat identique est obtenu avec des animaux âgés de 25 jours (WT  $100 \pm 27,2$  %, Crx-Cre  $75,4 \pm 10,3$  %, cOFF  $100 \pm 15,4$  %, Crx-Cre/cOFF  $28,3 \pm 7,7$  %,  $p = 0.0165$ ) (Figure 65B). A P25, les cerveaux des animaux d'intérêt contiennent 70% moins de protéine FMRP que ceux des animaux WT. **Le croisement des deux lignées sélectionnées induit une diminution significative de la production de protéine FMRP dans le cerveau de l'animal d'intérêt.**



**Le modèle Crx-Cre/cOFF n'est donc pas validé au niveau cérébral : l'expression physiologique du gène *Fmr1* n'est pas maintenue. Il ne correspond pas aux attentes d'un modèle FXS rétine-spécifique.**

Afin de déterminer si la diminution de l'expression cérébrale du gène *Fmr1* est la conséquence d'une recombinaison du gène dans les cellules cérébrales, ou est lié à l'absence de protéine FMRP au niveau rétinienn, j'ai réalisé une analyse du génotype de cellules cérébrales. Cette analyse permet de déterminer si le matériel génétique des cellules étudiées contient la construction *Fmr1* cOFF dans sa version recombinée. Seul le broyat de l'animal Crx-Cre/cOFF montrent la présence au niveau cérébral de la construction *Fmr1* cOFF sous sa forme recombinée (Figure 66).

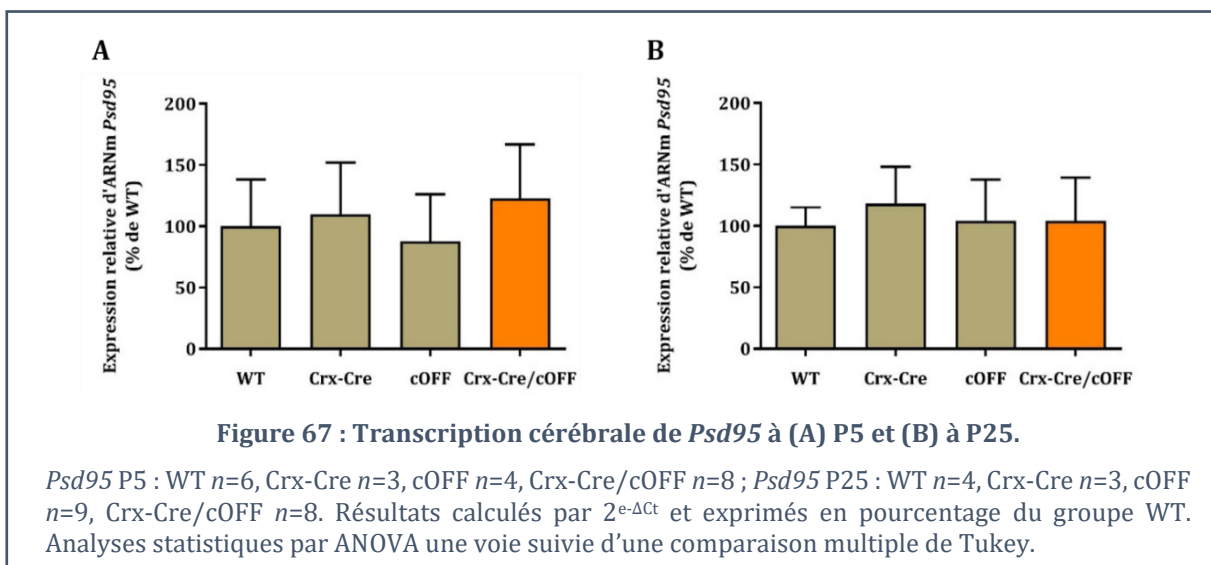


Ce résultat indique donc que la recombinaison du gène *Fmr1* a eu lieu au niveau cérébral. **En conclusion, au niveau cérébral, une partie au moins des cellules connaît une mise en silence de ce gène. D'après les quantifications des ARNm *Fmr1*, le modèle *Crx-Cre/cOFF* connaît une situation d'expression cérébrale globale de *Fmr1* divisée par 2 par rapport à un animal contrôle. Ce modèle n'est donc pas conforme aux attentes d'un modèle FXS rétine spécifique.** Toutefois, il représente une situation originale qui se révèle particulièrement intrigante et intéressante à étudier. En effet, le phénotype moléculaire et cellulaire cérébral a été étudié dans le cas d'individus « sains », i.e. avec une expression à 100% de FMRP, et dans le cas extrême opposé, en conditions FXS avec une absence totale de protéine FMRP. En revanche, la situation intermédiaire, avec une expression cérébrale de FMRP diminuée mais pas annulée n'est pas connue et étudiée. L'animal d'intérêt représente une opportunité d'étudier les conséquences moléculaires et cellulaires de la diminution de la quantité cérébrale de protéine FMRP.

#### *Caractérisation moléculaire cérébrale du modèle *Crx-Cre/cOFF**

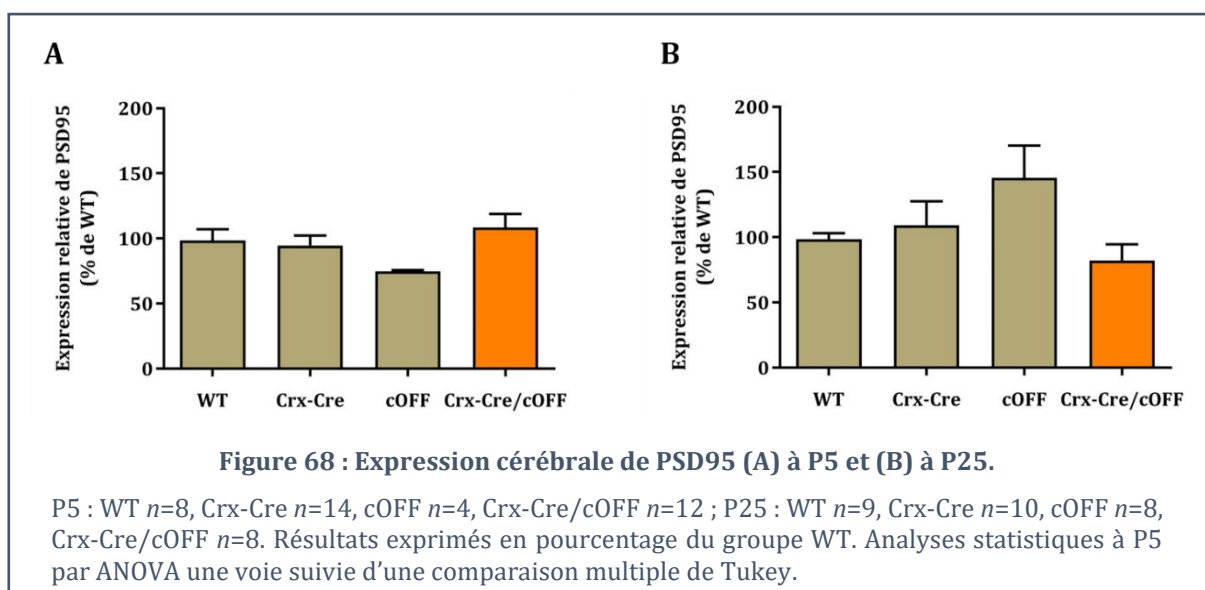
Face à la diminution inattendue du contenu cérébral de FMRP, l'objectif de la caractérisation moléculaire cérébrale est de dresser un état des lieux du contenu cérébral en protéines dont l'expression est connue pour être modifiée par l'absence de FMRP. Tout comme pour la caractérisation rétinienne, j'ai réalisé une étude des quantités de protéines mais également une étude des quantités de transcrits codants pour ces protéines, afin de s'assurer que les anomalies observées dans les quantités de protéines ne proviennent pas de défauts de transcription des gènes codants pour ces protéines. Mon choix s'est porté sur PSD95, protéine connue pour être dérégulée au niveau cérébral en cas d'absence de la protéine FMRP (Muddashetty et al., 2007; Zalfa et al., 2007; Westmark, 2013; Rossignol et al., 2014). Les cerveaux entiers sont étudiés aux mêmes âges que lors de l'étape de validation du modèle.

A P5, aucune différence n'est observée entre les contenus cérébraux d'ARNm de *Psd95* des animaux contrôles et ceux des animaux d'intérêt (WT 100 ± 15,6 %, *Crx-Cre* 109,7 ± 24,4 %, *cOFF* 87,5 ± 19,3 %, *Crx-Cre/cOFF* 122,6 ± 15,6 %,  $p = 0.7428$ ) (Figure 67A).



A P25, tous les groupes étudiés présentent des quantités cérébrales similaires d'ARNm de *Psd95* (WT  $100 \pm 7,6$  %, Crx-Cre  $118 \pm 17,4$  %, cOFF  $103,9 \pm 11,3$  %, Crx-Cre/cOFF  $103,9 \pm 12,5$  %,  $p = 0.9971$ ) (Figure 67B).

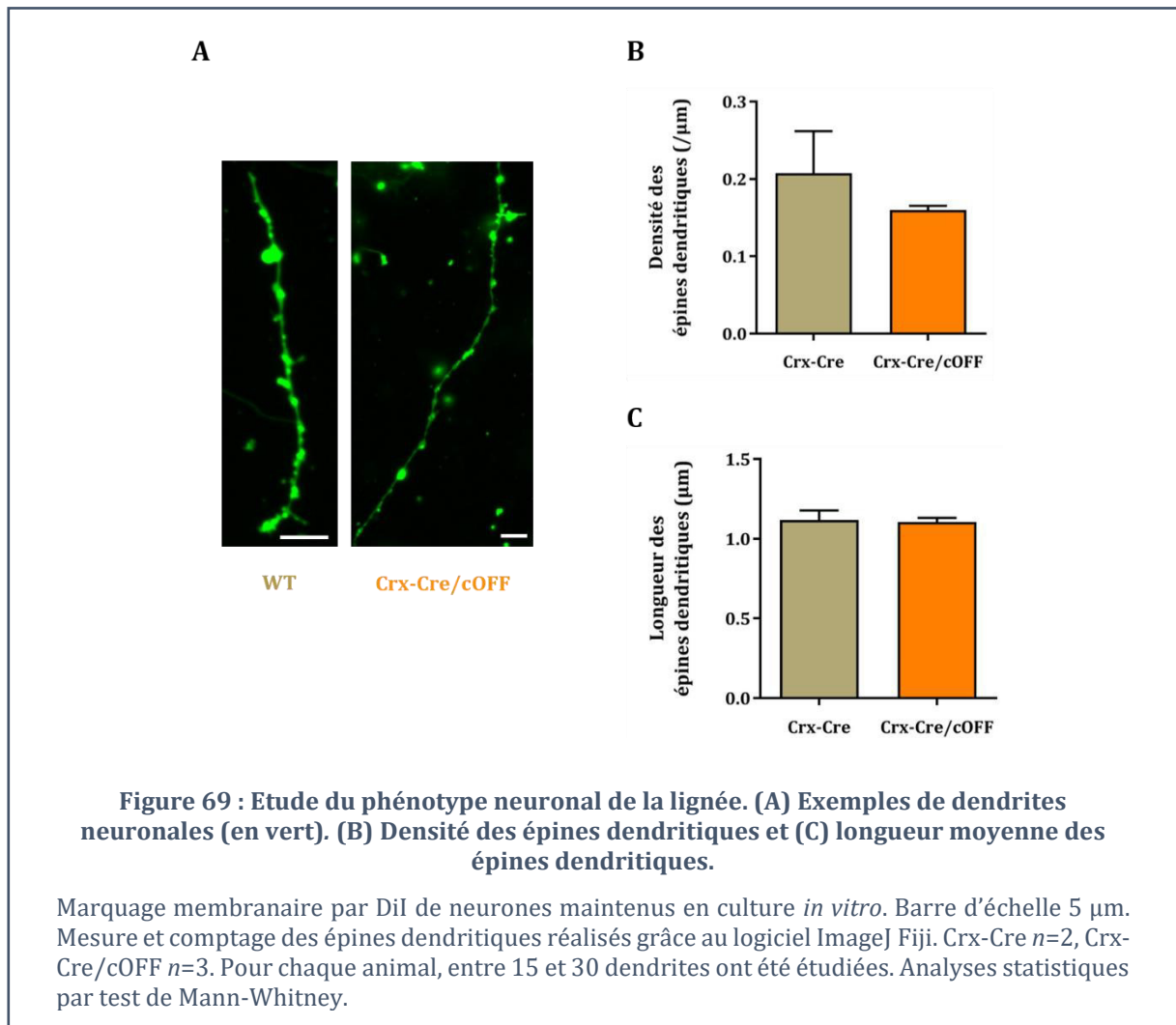
A P5, l'analyse par western blot des contenus protéiques des cerveaux des animaux contrôles et d'intérêt ne montre pas de différence dans les niveaux de PSD95 des différents groupes (WT  $100 \pm 8,7$  %, Crx-Cre  $75 \pm 0,8$  %, cOFF  $94,6 \pm 7,6$  %, Crx-Cre/cOFF  $108,5 \pm 10,4$  %,  $p = 0.863$ ) (Figure 68A). Ce résultat se maintient à P25, les animaux Crx-Cre/cOFF ne montrant aucune différence dans leur contenu cérébral par rapport aux animaux contrôles (WT  $100 \pm 4,6$  %, Crx-Cre  $109,1 \pm 18,6$  %, cOFF  $145,4 \pm 24,8$  %, Crx-Cre/cOFF  $82,22 \pm 13$  %,  $p = 0.906$ ) (Figure 68B).



Ainsi, l'animal Crx-Cre/cOFF ne présente pas l'anomalie moléculaire marqueur de l'absence de la protéine FMRP, caractéristique de la condition du FXS au niveau cérébral. Tout comme pour la rétine, il est aisé d'imaginer que les autres protéines décrites pour être dérégulées au niveau cérébral chez l'animal *Fmr1* KO ne le sont pas ici, chez cet animal. Je pense notamment à *Kcnma1*, *mGluR5* ou encore *Synaptotagmine*. En extrapolant, il est fort probable que l'ensemble des protéines dérégulées en absence de FMRP, *i.e.* virtuellement toutes les protéines dont la traduction est régulée d'une manière ou une autre par FMRP, connaît lui aussi des niveaux physiologiques dans le cerveau des animaux Crx-Cre/cOFF. Quoi qu'il en soit, de manière très factuelle, la protéine marqueur du phénotype moléculaire cérébral du FXS ne connaît pas d'altération de son contenu cérébral, et souligne que le cerveau des animaux Crx-Cre/cOFF ne présente pas les anomalies moléculaires cohérentes avec une altération de la disponibilité de FMRP. **Le cerveau des animaux Crx-Cre/cOFF ne présente pas de dérégulation en protéines comparable à celles observées chez l'animal *Fmr1* KO. D'un point de vue moléculaire, le cerveau de ces animaux n'est pas « de type *Fmr1* KO ».**

### Caractérisation cellulaire cérébrale du modèle Crx-Cre/cOFF

En cas d'absence totale de protéine FMRP au niveau cérébral, le phénotype cellulaire s'illustre par une immaturité neuronale caractérisé par des épines dendritiques présentant une morphologie immature et présentent en plus grand nombre (Irwin et al., 2000; Greenough et al., 2001; Nimchinsky et al., 2001; Galvez and Greenough, 2005). Afin de déterminer si l'animal Crx-Cre/cOFF, dont le contenu cérébral de FMRP est diminué de moitié, présente ce phénotype d'immaturité neuronale, j'ai réalisé des cultures de neurones corticaux des animaux et étudié la densité et la longueur des épines dendritiques de ces neurones. Par rapport aux neurones des groupes contrôles, les neurones des animaux d'intérêt ne présentent pas d'anomalie morphologique globale, ni de densité (Crx-Cre  $0.207 \pm 0.055$  / $\mu\text{m}$ , Crx-Cre/cOFF  $0.160 \pm 0.006$  / $\mu\text{m}$ ,  $p = 0.8$ ) et de longueur de leurs épines dendritiques (Crx-Cre  $1.117 \pm 0.062$   $\mu\text{m}$ , Crx-Cre/cOFF  $1.104 \pm 0.027$   $\mu\text{m}$ ,  $p = 0.8$ ) (Figure 69).



**Ainsi, la diminution de moitié du contenu cérébral global d’FMRP n’affecte pas ici les neurones corticaux des animaux Crx-Cre/cOFF. Ces animaux ne présentent pas le phénotype neuronal « de type *Fmr1* KO » caractérisé par un aspect grêle des dendrites neuronales.**

En résumé, l’animal Crx-Cre/cOFF présente une absence de l’expression du gène *Fmr1* dans ses rétines, associés à une absence de phénotype rétinien une fois l’âge adulte atteint, et une diminution de l’expression du gène *Fmr1* associé à un phénotype moléculaire cérébral de dérégulation de contenus protéiques. Les résultats suggèrent que la diminution de l’expression de FMRP au niveau cérébral est due à une recombinaison de la construction *Fmr1* cOFF, au moins dans une partie des cellules cérébrales. **L’ensemble des résultats obtenus soulève donc la question de la maîtrise de la recombinaison induite par le Tg(*Crx-Cre*) : la recombinaison rétinienne est-elle totale ? Quel est le schéma de recombinaison induit au niveau cérébral ? La suite de l’étude proposée ici s’intéresse donc à l’étude de la recombinaison induite par le Tg(*Crx-Cre*), en particulier au niveau cérébral, où cette recombinaison n’était pas attendue.** Pour apporter des éléments de réponse, la lignée Tg(*Crx-Cre*) est croisée avec une lignée reportrice afin de révéler les cellules, les tissus, les organes, subissant une recombinaison génétique par action de la Cre recombinase.

### 3.5.3 Etude de la recombinaison génétique induite par le Tg(*Crx-Cre*)

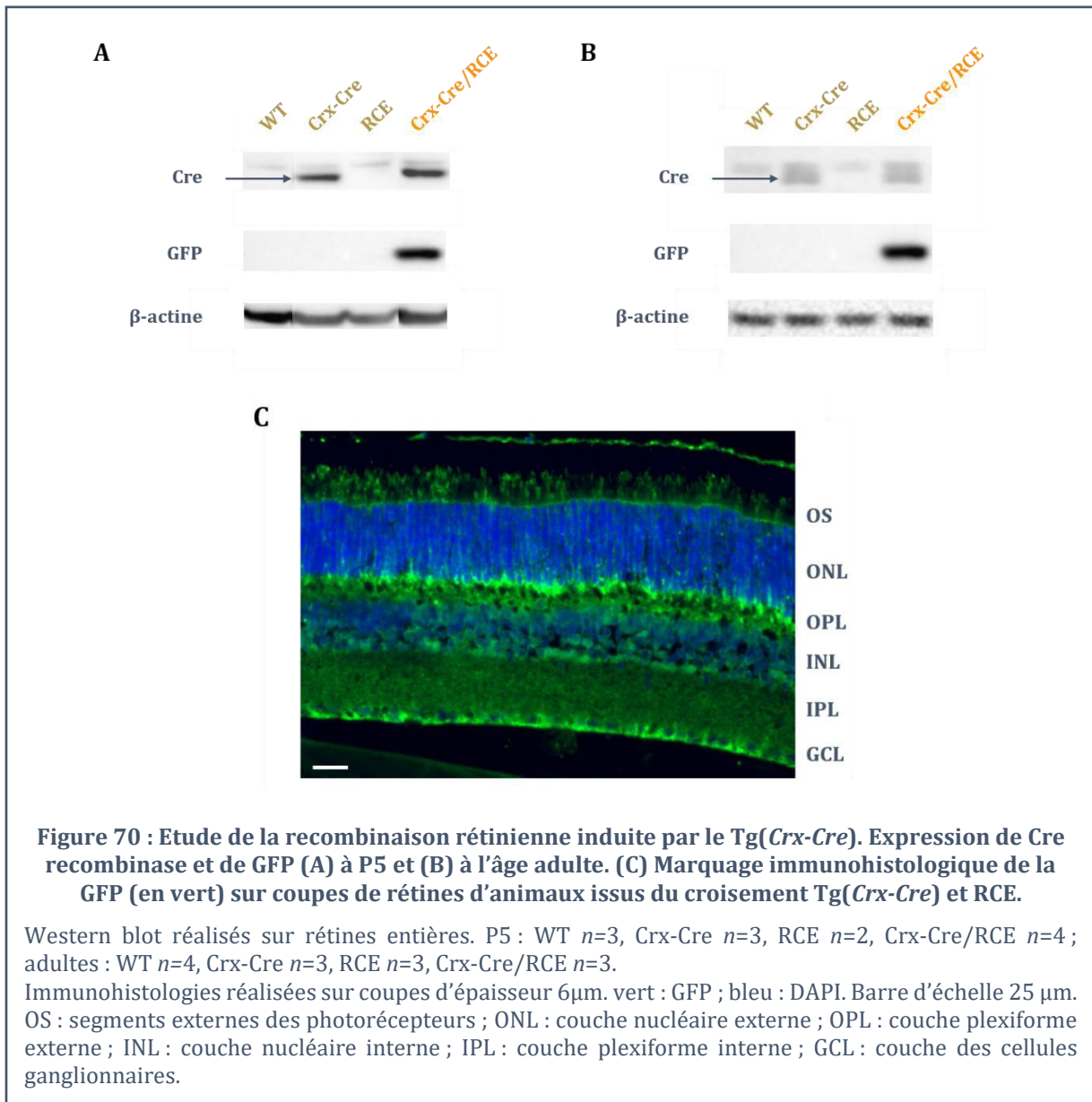
#### *Recombinaison rétinienne*

Le croisement de la lignée Tg(*Crx-Cre*) avec la lignée reportrice RCE permet de déterminer la présence de cellules ayant subi une recombinaison par l’action de Cre recombinase mais également de localiser ces cellules au sein d’un tissu. Les cellules recombinées expriment la protéine GFP (Sousa et al., 2009; Miyoshi et al., 2010).

L’analyse du contenu protéique des rétines d’animaux adultes issus de ce croisement révèle que seules les rétines des animaux Crx-Cre/RCE expriment la GFP (Figures 70A et B). Par ailleurs, nous pouvons vérifier que seuls les animaux porteurs de la construction Tg(*Crx-Cre*) expriment la Cre recombinase à l’âge adulte. Ceci confirme que l’expression rétinienne de cette enzyme se maintient tout au long de la vie de l’animal porteur de ce transgène.

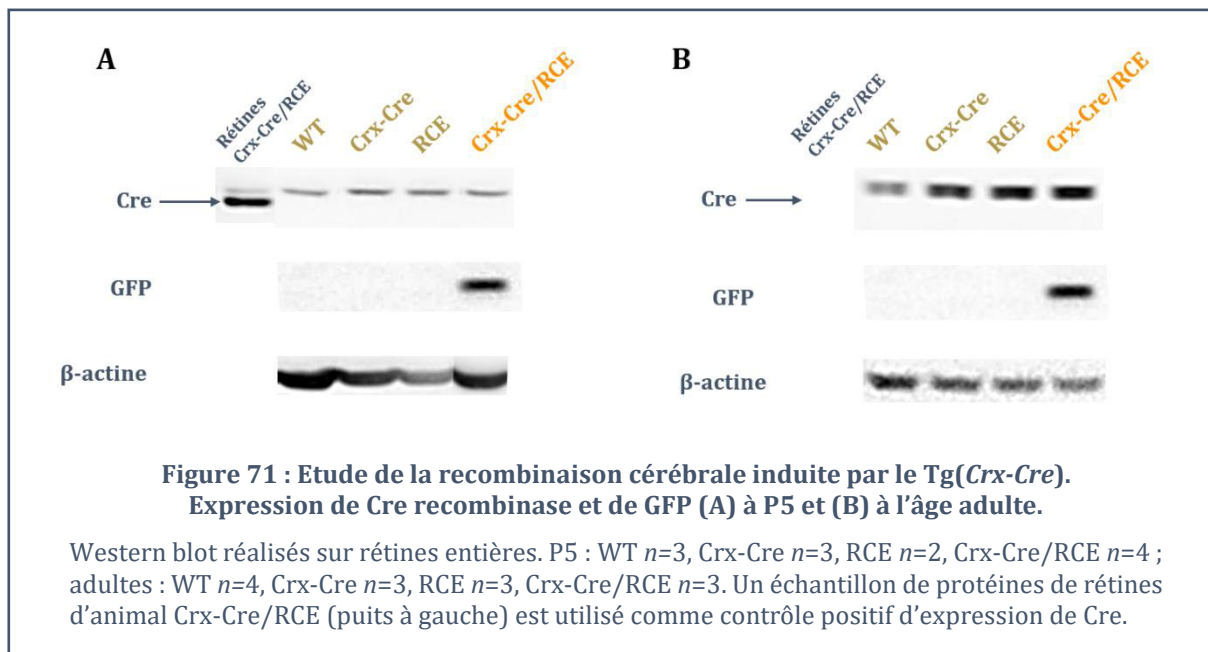
De plus, la protéine GFP est exprimée dans toutes les couches rétinienne des animaux Crx-Cre/RCE (Figure 70C). Aucune expression de GFP n’a été observée sur les coupes des animaux contrôles (non montrées ici). Ce résultat suggère que **la recombinaison génétique induite par le Tg(*Crx-Cre*) affecte toutes les couches cellulaires de la rétine. La recombinaison rétinienne obtenue grâce à ce transgène est donc conforme aux attentes, tous les types cellulaires étant affectés par la recombinaison.**





### Recombinaison cérébrale

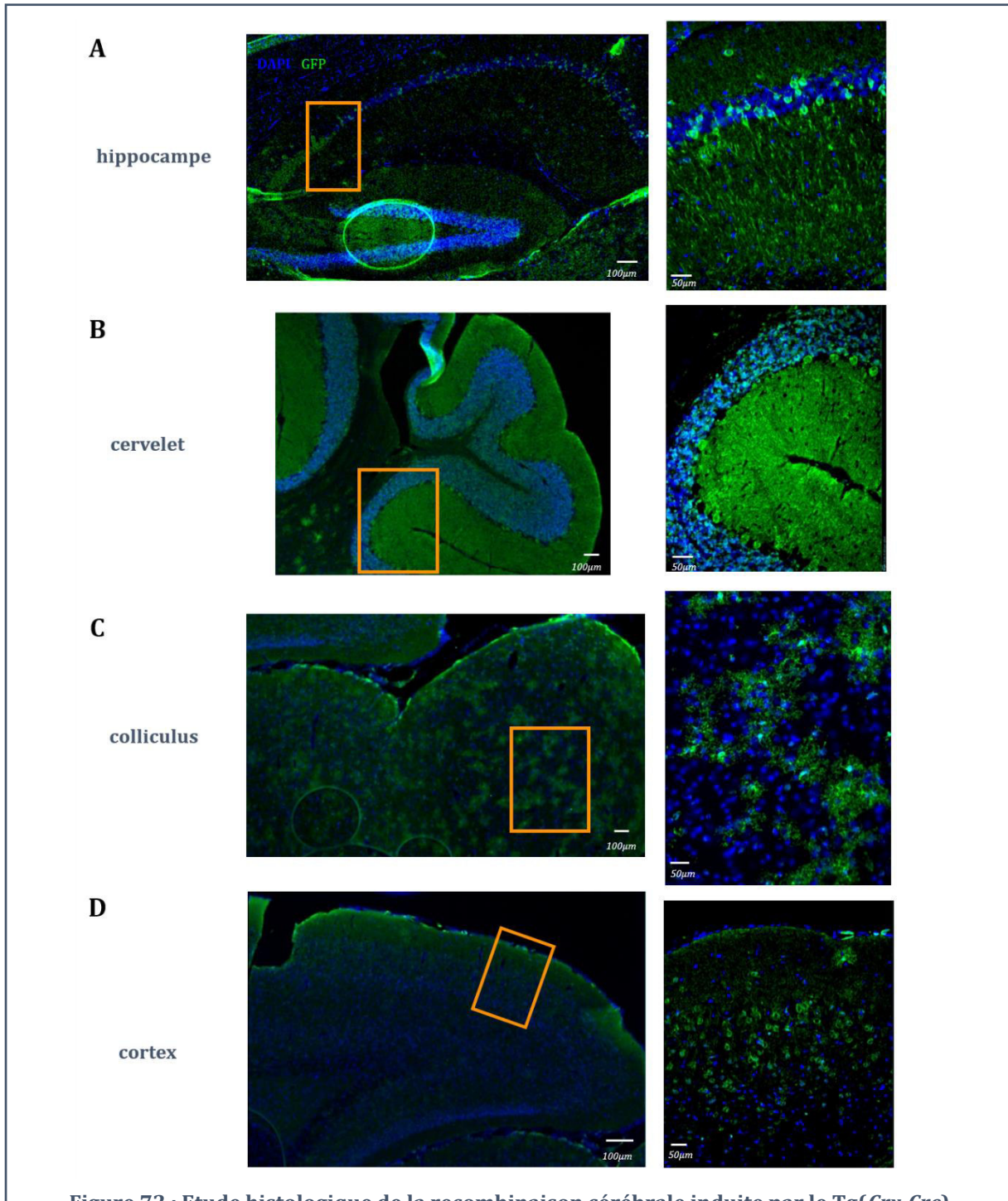
L'analyse du contenu protéique des cerveaux entiers d'animaux adultes issus du croisement entre la lignée Tg(Crx-Cre) et la lignée RCE indique que les cerveaux des animaux Crx-Cre/RCE expriment la protéine GFP (Figure 71). Les animaux contrôles littermate n'expriment pas cette protéine au niveau cérébral. De plus, la protéine Cre n'a été détectée dans aucun échantillon cérébral, quel que soient l'âge et le génotype étudiés. Ce résultat suggère que les cellules cérébrales de l'animal Crx-Cre/RCE, qui expriment la GFP, ont connu une recombinaison avant l'âge adulte, ou descendent de cellules ayant connu des conditions recombinantes. Quoi qu'il en soit, **ces cellules cérébrales portent un génotype affecté par la recombinaison due à la présence de Cre recombinase, même de manière temporaire, dans l'histoire de ces cellules.**



La localisation de ces cellules dans les aires cérébrales nous apporte plusieurs informations. Tout d'abord, les cellules recombinées ne sont pas présentes dans toutes les structures cérébrales. Comme le montre la figure 72, chez l'animal Crx-Cre/RCE, la GFP n'est clairement visible que dans certaines structures et est absente de certaines autres. En particulier, nous pouvons noter l'absence totale de marquage de la protéine GFP dans les bulbes olfactifs, ou dans les aires subcorticales centrales, telles que le noyau accumbens ou le putamen. **La recombinaison induite par le Tg(*Crx-Cre*) n'est pas pancérébrale, mais est structure spécifique.** De plus, les structures montrant une forte expression de GFP sont l'hippocampe, le cervelet et le colliculus. Le cortex visuel exprime également la GFP, ainsi que le cortex somatosensoriel, bien que le marquage de ces aires soit moins prononcé que celui des structures citées précédemment. Par conséquent, le Tg(*Crx-Cre*) induit une recombinaison génétique des cellules de ces aires cérébrales. Nous concentrerons nos observations sur ces aires montrant une présence claire de la protéine GFP.

Il est intéressant de noter que, au sein même de ces structures, la recombinaison n'affecte pas toutes les cellules. Dans l'hippocampe, la recombinaison semble affecter les cellules pyramidales (Figure 72) dans les zones CA1, CA2, et le gyrus denté. Dans le cortex, la recombinaison semble concerner les astrocytes, principalement dans les couches 1 et 2/3, et se raréfie avec la profondeur des couches corticales (Figure 72). Dans le cervelet, la recombinaison semble affecter les cellules de Purkinje, mais semble laisser intacte les autres types cellulaires (Figure 72). Dans le colliculus, la recombinaison semble affecter uniquement des cellules gliales (Figure 72). Bien entendu, ces résultats ne sont que des hypothèses basées sur la morphologie et la localisation des cellules exprimant la GFP. Il conviendrait de réaliser sur ces coupes cérébrales des co-marquages immunohistologiques cellules-spécifiques afin de confirmer ces résultats. Je pense notamment à un co-marquage anti-GFP et anti-NeuN afin de mettre en

évidence les recombinaisons neuronales, et un co-marquage Anti-GFP et anti-GFAP afin de mettre en évidence les recombinaisons gliales.



**Figure 72 : Etude histologique de la recombinaison cérébrale induite par le Tg(*Crx-Cre*).** Marquage immunohistologique de la GFP (en vert) sur coupes de cerveaux d'animaux adultes issus du croisement Tg(*Crx-Cre*) et RCE. (A) hippocampe (B) cervelet (C) colliculus (D) cortex.

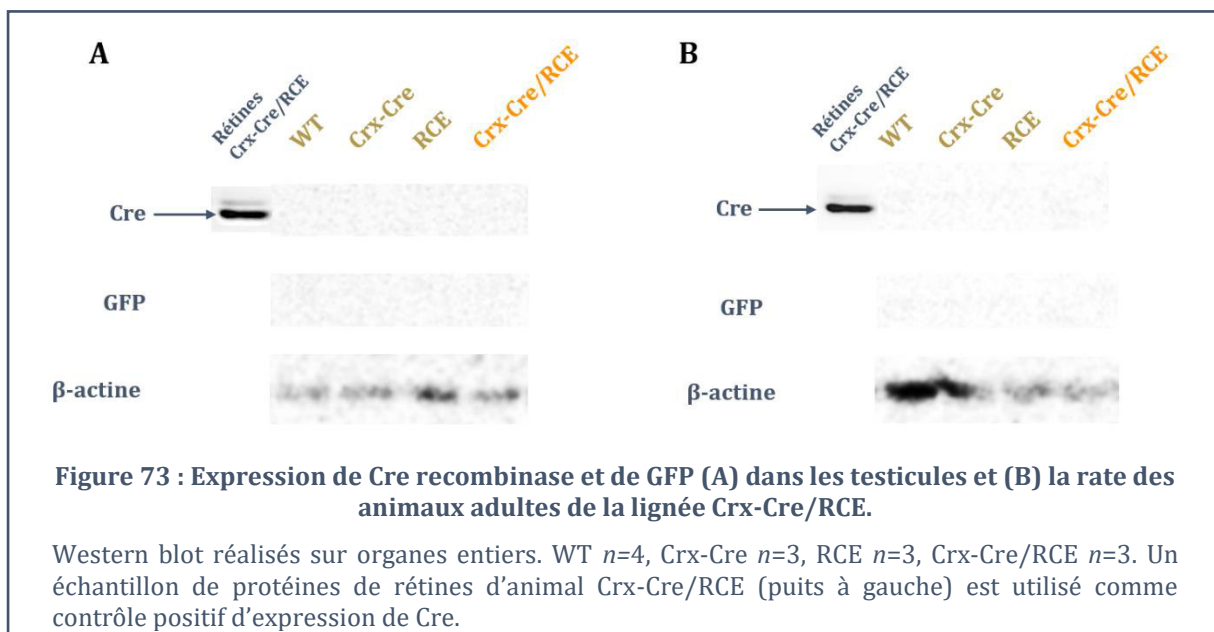
Marquages immunohistologiques réalisées sur coupes d'épaisseur 12µm. vert : GFP ; bleu : DAPI. Pour chaque structure, l'image de gauche est un grossissement x5 et l'image de droite est un grossissement x20 de la zone encadrée en orange sur l'image de gauche. Barres d'échelle : 100µm (grossissement x5), 50µm (grossissement x20).

Ces résultats nous indiquent que **la recombinaison cérébrale induite par le Tg(*Crx-Cre*) crée une situation de mosaïque génétique à différents niveaux. Tout d'abord la recombinaison est spécifique à certaines structures cérébrales. De surcroît, au sein même de ces structures, la recombinaison n'affecte que certains types cellulaires dans certaines zones de la structure. Enfin, au sein même de la population ciblée dans une structure, cette population n'est pas intégralement affectée par la recombinaison. Cette population est elle-même en situation de mosaïcisme. En conclusion, la recombinaison cérébrale induite par le Tg(*Crx-Cre*) est structure et cellule spécifique, et génère par conséquent une mosaïque cellulaire à l'échelle du cerveau.**

#### *Tissus extérieurs au système nerveux*

Afin de vérifier que le Tg(*Crx-Cre*) n'induit pas de recombinaison dans des tissus totalement extérieurs au système visuel, et à plus forte raison au système nerveux, j'ai choisi d'étudier l'expression de la Cre recombinase, et de la GFP dans deux organes « autres » de l'animal *Crx-Cre/RCE*. Tout d'abord, les testicules. Ces organes expriment de manière précoce le gène *Fmr1* en conditions physiologiques, et sont fortement affectés par l'absence de protéine FMRP. Ils montrent un phénotype de macro-orchidie post-pubertaire très marqué chez les patients atteints du syndrome de l'X fragile, qui en fait le troisième symptôme le plus important de cette pathologie (Turner et al., 1975; Lachiewicz and Dawson, 1994). Le deuxième organe est la rate, un organe n'exprimant pas la protéine FMRP en conditions physiologiques et n'étant pas connu pour présenter un phénotype en conditions FXS.

A l'âge adulte, aucun de ces deux organes ne présentent d'expression de Cre recombinase ni de GFP, quel que soit le génotype de l'animal étudié (Figure 73).



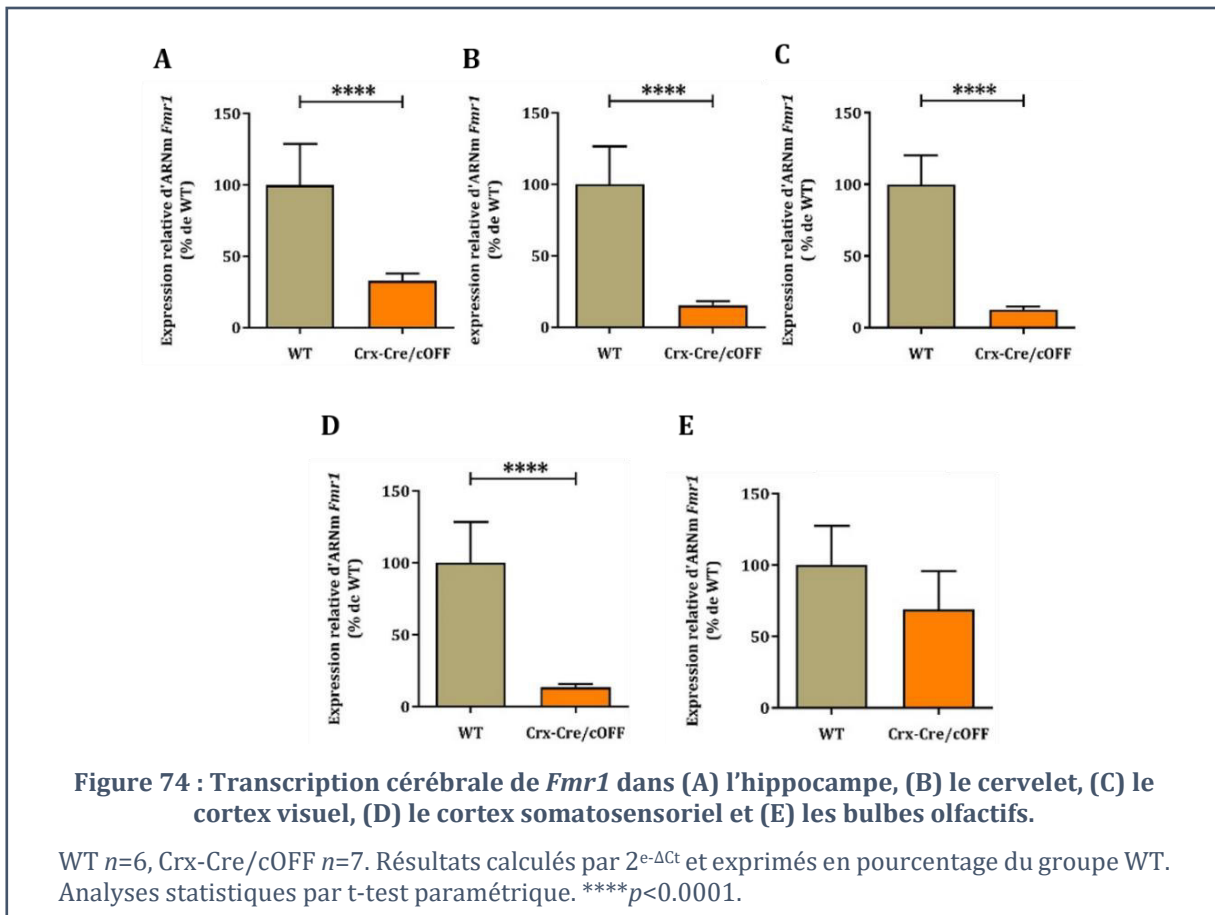
Ce résultat suggère que **les organes extérieurs au système visuel ne sont pas affectés par une expression de Cre recombinase provenant du Tg(*Crx-Cre*), et donc leurs cellules ne connaissent de recombinaison à aucun moment de leur histoire.**

### 3.5.4 Quid du modèle Crx-Cre/cOFF ?

#### Expression cérébrale de *Fmr1*

L'étude de la recombinaison induite par la lignée Tg(*Crx-Cre*) via l'utilisation de la lignée reportrice RCE suggère que seules certaines structures cérébrales sont affectées par la recombinaison. En particulier, la recombinaison subie par l'hippocampe, le cervelet et le cortex semble affecter une large proportion de cellules de ces structures. Afin de vérifier cette hypothèse dans le cas du modèle Crx-Cre/cOFF, le modèle d'intérêt pour notre étude, j'ai réalisé une étude de l'expression du gène *Fmr1* dans chacune de ces structures cérébrales chez cet animal.

A l'âge adulte, par rapport aux animaux WT, les animaux Crx-Cre/cOFF montrent des diminutions significatives de quantités d'ARNm du gène *Fmr1* dans l'hippocampe (WT  $100 \pm 11,8$ , Crx-Cre/cOFF  $32,9 \pm 1,9$ ,  $p < 0.0001$ ), le cervelet (WT  $100 \pm 10,8$ , Crx-Cre/cOFF  $15,3 \pm 1,1$ ,  $p < 0.0001$ ), le cortex dans sa partie visuelle (WT  $100 \pm 8,3$ , Crx-Cre/cOFF  $12,6 \pm 0,8$ ,  $p < 0.0001$ ) comme dans sa partie somatosensorielle et frontale (WT  $100 \pm 11,5$ , Crx-Cre/cOFF  $13,6 \pm 0,8$ ,  $p < 0.0001$ ) (Figure 74). La diminution de transcrits du gène *Fmr1* est de l'ordre de 65% dans l'hippocampe, 85% dans le cervelet, et 85% dans le cortex (Figure 74). En revanche, aucune différence n'est obtenue pour les bulbes olfactifs (WT  $100 \pm 12,2$ , Crx-Cre/cOFF  $69 \pm 11$ ), structure dans laquelle le croisement avec la lignée reportrice n'avait pas mis en évidence de recombinaison (Figure 74E).

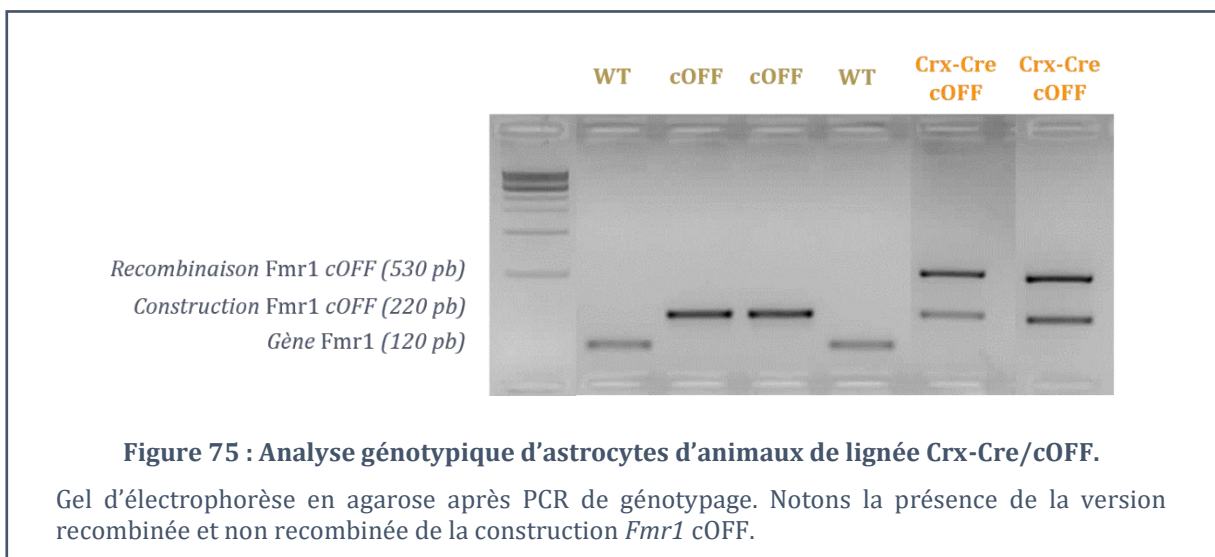


**Figure 74 : Transcription cérébrale de *Fmr1* dans (A) l'hippocampe, (B) le cervelet, (C) le cortex visuel, (D) le cortex somatosensoriel et (E) les bulbes olfactifs.**

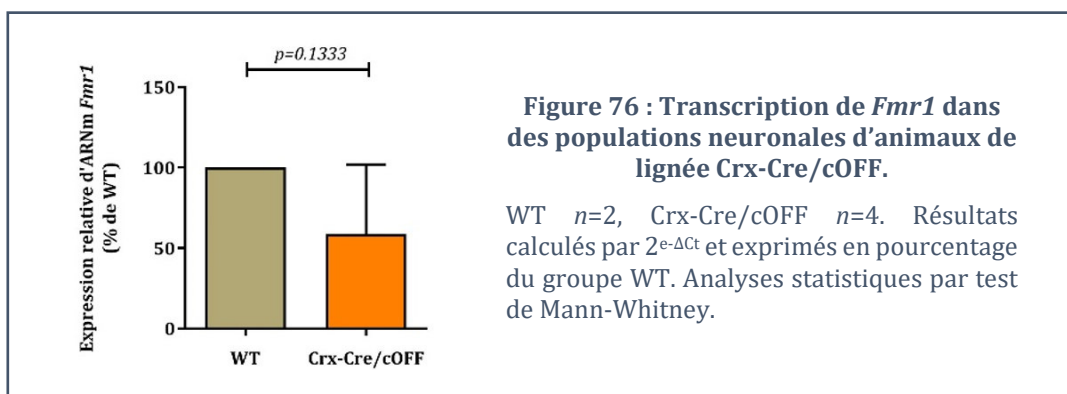
WT  $n=6$ , Crx-Cre/cOFF  $n=7$ . Résultats calculés par  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  et exprimés en pourcentage du groupe WT. Analyses statistiques par t-test paramétrique. \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

De plus, le croisement avec la lignée reportrice suggère une recombinaison mosaïque au sein même des populations cellulaires dans les structures cérébrales. Afin de vérifier cette hypothèse, j'ai réalisé une étude cellule spécifique de deux populations cellulaires corticales : les astrocytes et les neurones. Ces deux populations ont été isolées *ex vivo* et maintenues en culture *in vitro*.

Chez les animaux des génotypes contrôle, la population astrocytaire ne présente qu'un seul allèle du gène *Fmr1* : le gène *Fmr1* ou la construction *Fmr1* cOFF. En revanche, la population astrocytaire des animaux *Crx-Cre/cOFF* contient le gène dans deux versions : la construction *Fmr1* cOFF, recombinée et non recombinée (Figure 75). Ce résultat confirme la mosaïque génétique au sein de la population des astrocytes corticaux : une partie des cellules contient la version recombinée de la construction *Fmr1* cOFF, et l'autre partie la version intacte de cette construction.



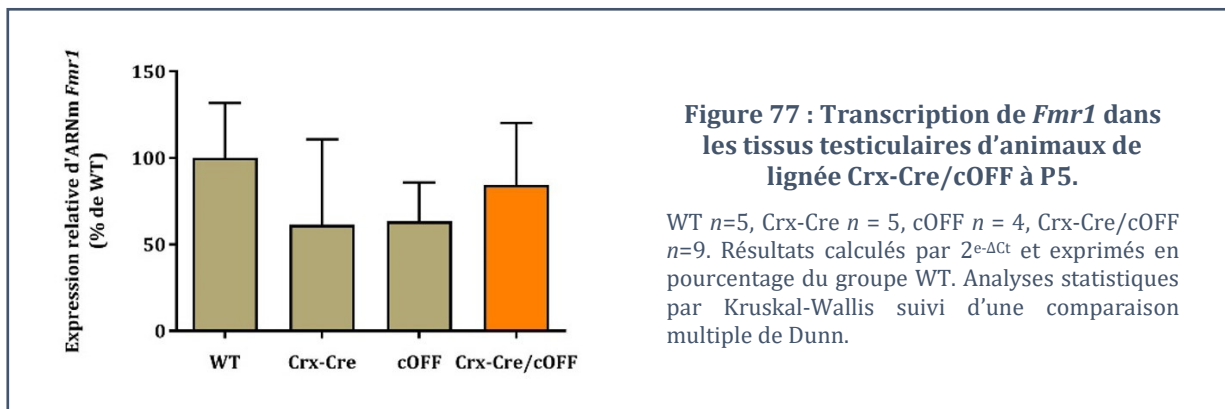
Par rapport aux animaux contrôles, une population neuronale d'animal *Crx-Cre/cOFF* montre une diminution de la quantité d'ARNm *Fmr1* qu'elle transcrit (WT  $100 \pm 0,0$ , cOFF  $84 \pm 16$ , *Crx-Cre/cOFF*  $54,8 \pm 21,5$ ,  $p = 0.1333$ ) (Figure 76). Bien que le résultat obtenu ici révèle pas de différence significative ( $p=0.13$ ), de par un nombre d'individus étudiés trop faible, la tendance à la diminution chez les neurones des animaux *Crx-Cre/cOFF* semble importante, de l'ordre de 40% par rapport aux animaux WT (Figure 76).



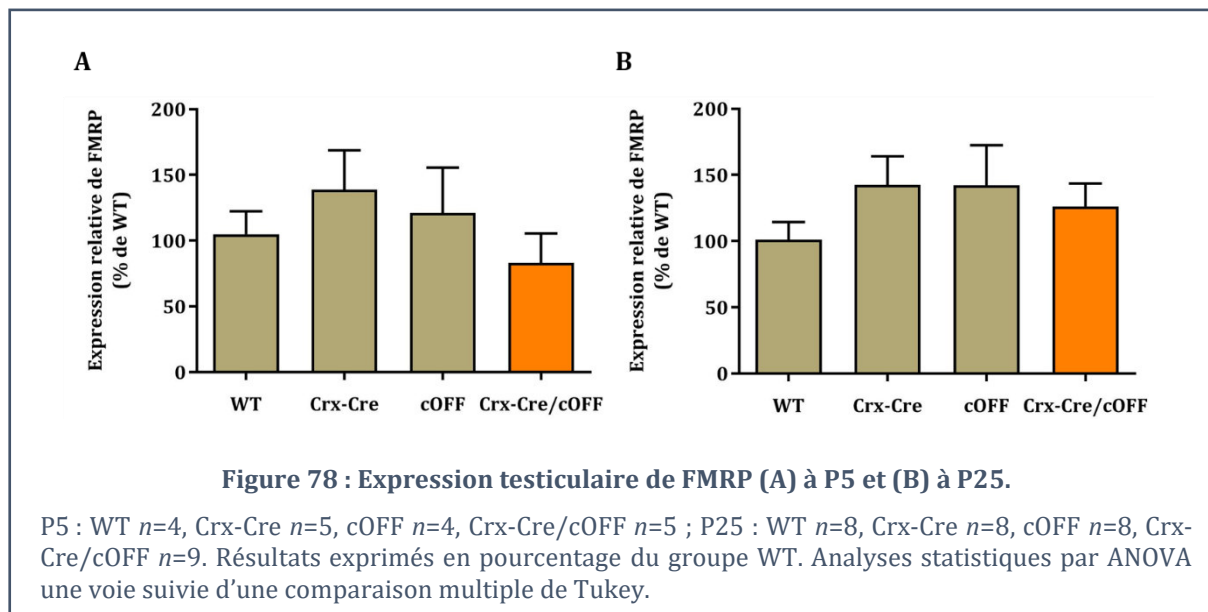
Les résultats obtenus lors de l'étude de la recombinaison induite par le Tg(*Crx-Cre*) au niveau cérébral se confirment lorsque cette lignée transgénique est croisée avec une lignée KO conditionnel. L'animal *Crx-Cre/cOFF* subit une mise en silence du gène *Fmr1* dans certaines structures cérébrales, et les populations cellulaires au sein de ces aires présentent une mosaïque quant à la recombinaison de la construction *Fmr1* cOFF. Par conséquent, au niveau cérébral, la recombinaison induite par le Tg(*Crx-Cre*) est effectivement structure- et cellule-spécifique, et engendre une mosaïque génétique.

#### Expression testiculaire de *Fmr1*

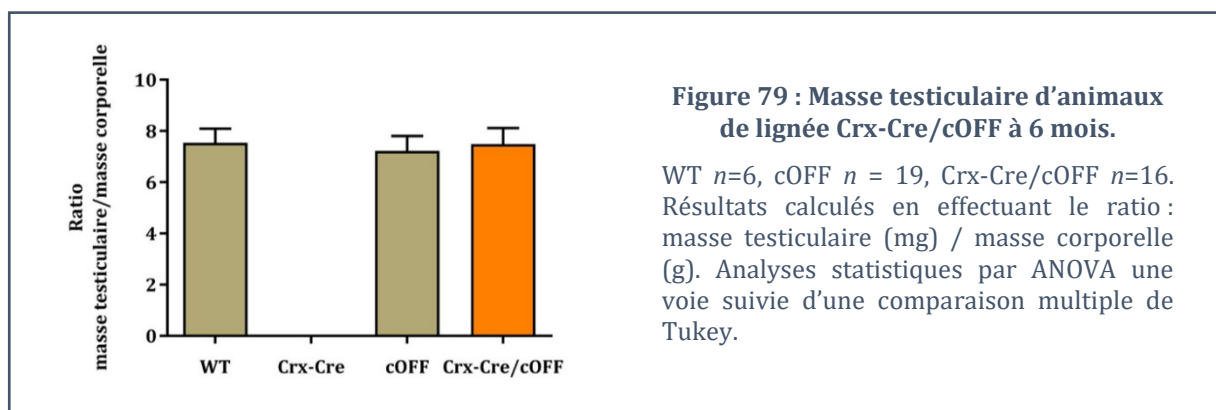
Pour ce qui est des organes ne faisant pas partie du système nerveux, j'ai choisi de confirmer l'absence d'anomalie testiculaire chez les animaux *Crx-Cre/cOFF*. Ce choix fait écho aux symptômes présents dans le syndrome de l'X fragile, les patients présentant une macro-orchidie post-pubertaire (Turner et al., 1975; Bowen et al., 1978; Lachiewicz and Dawson, 1994). La construction choisie pour notre projet ne devrait pas affecter ces tissus, et l'analyse de la recombinaison induite par le transgène Tg(*Crx-Cre*) n'a pas montré d'induction de recombinaison au niveau testiculaire. De manière cohérente avec ces résultats, les animaux *Crx-Cre/cOFF* ne montrent pas de différence dans leur quantité de transcrits du gène *Fmr1* par rapport aux groupes d'animaux contrôles (WT  $100 \pm 14,2$  %, *Crx-Cre*  $61,2 \pm 22,1$  %, cOFF  $63,3 \pm 11,3$  %, *Crx-Cre/cOFF*  $84,2 \pm 12$  %,  $p > 0.9999$ ) à P5 (Figure 77). L'expression du gène *Fmr1* n'est donc pas altérée au niveau testiculaire, ce qui suggère l'absence de recombinaison de la construction *Fmr1* cOFF chez l'animal d'intérêt.



De manière logique, aucune différence significative dans la quantité de protéine FMRP n'est observée parmi les différents génotypes de la lignée, que cela soit à P5 (WT  $100 \pm 17,5$  %, *Crx-Cre*  $138,7 \pm 30$  %, cOFF  $121,1 \pm 34,5$  %, *Crx-Cre/cOFF*  $83,1 \pm 22,3$  %,  $p = 0.9395$ ) ou à P25 (WT  $100 \pm 13,3$  %, *Crx-Cre*  $1142,4 \pm 21,8$  %, cOFF  $142,1 \pm 30,4$  %, *Crx-Cre/cOFF*  $126,1 \pm 17,5$  %,  $p = 0.838$ ) (Figure 78).



Enfin, les animaux Crx-Cre/cOFF adultes ne présentent pas une masse testiculaire anormale par rapport aux autres groupes contrôles (WT  $7,5 \pm 0,2$ , cOFF  $7,2 \pm 0,1$ , Crx-Cre/cOFF  $7,5 \pm 0,2$ ,  $p=0.9866$ ) (Figure 79).



En conclusion, le transgène Tg(*Crx-Cre*) induit une recombinaison affectant toutes les cellules rétiniennes, mais également une recombinaison dans d'autres tissus. Cette dernière affecte les tissus cérébraux, sans toutefois impacter l'intégralité des cellules et des aires cérébrales. La recombinaison cérébrale induite par ce transgène est structure et cellule spécifique, et engendre une mosaïque génétique. Enfin, la recombinaison laisse intacte les organes extérieurs au système nerveux, qu'ils expriment ou non la protéine FMRP en conditions physiologiques, tels que les testicules et la rate. Mes résultats suggèrent ainsi que le transgène Tg(*Crx-Cre*) affecte spécifiquement des tissus impliqués dans le système visuel, mais pas uniquement et spécifiquement la rétine.



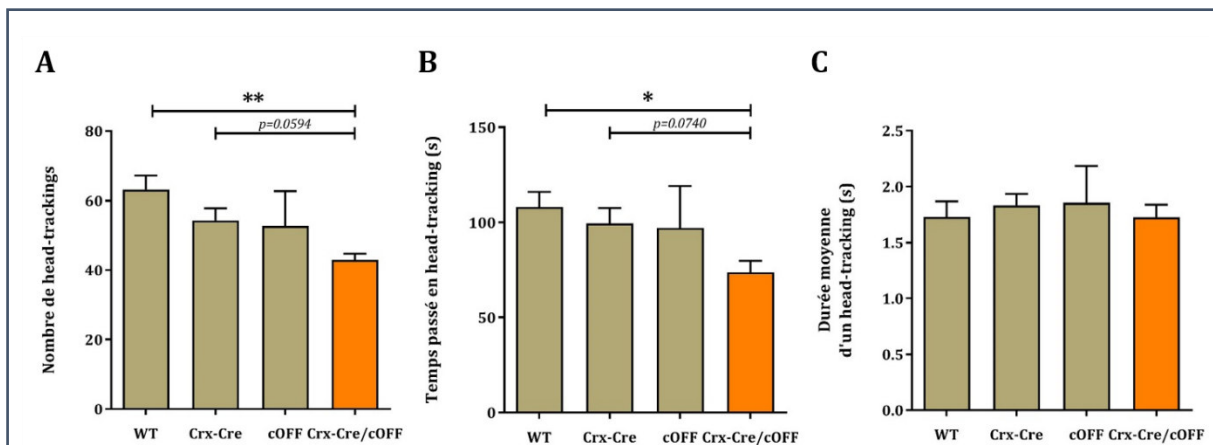
### 3.5.5 Etude du comportement du modèle Crx-Cre/cOFF

Malgré le fait que le modèle Crx-Cre/cOFF ne soit pas conforme à nos attentes de modèle « FXS rétine-spécifique », j'ai réalisé quelques études comportementales comme initialement prévu au début du projet. J'ai sélectionné 3 tests : un test de capacités visuelles, un test de cognition et un test illustrant un trouble neuro-associé, ici l'anxiété.

#### *L'animal Crx-Cre/cOFF présente-t-il des anomalies visuelles ?*

La capacité à comprendre les contrastes et le mouvement est évaluée grâce au test de l'optomètre. Ce test est le même que celui publié dans la précédente étude (Felgerolle et al., 2019), et confronte la souris à un stimulus fortement contrasté en mouvement lent dans son champ de vision. Le nombre de mouvements reflex de la tête, qui suivent le stimulus en mouvement, ainsi que le temps passé à effectuer ces mouvements, sont enregistrés. De ces données nous pouvons également déterminer le temps moyen d'un mouvement de suivi. Cette analyse et les conclusions que nous pouvons en tirer sur les compétences visuelles sont validées par nos pairs lors de notre précédente publication (Felgerolle et al., 2019).

Par rapport aux animaux des groupes contrôles, les animaux d'intérêt présentent une diminution significative du nombre de head-tracking effectués (WT  $63 \pm 4$ , Crx-Cre  $54 \pm 3$ , cOFF  $53 \pm 4$ , Crx-Cre/cOFF  $43 \pm 2$ ,  $p = 0.002$ ) (Figure 80A) associée à une diminution du temps global passé à effectuer ces mouvements de tête (WT  $108,1 \pm 7,9$  s, Crx-Cre  $99,4 \pm 8,1$  s, cOFF  $97,1 \pm 8,3$  s, Crx-Cre/cOFF  $73,8 \pm 6$  s,  $p = 0.0338$ ) (Figure 80B). La diminution du nombre de mouvements effectués est de l'ordre de 33 % par rapport au groupe d'animaux WT. En revanche, aucune différence n'est obtenue entre les groupes en ce qui concerne le temps moyen d'un mouvement de head-tracking (WT  $1,7 \pm 0,1$  s, Crx-Cre  $1,8 \pm 0,1$  s, cOFF  $1,9 \pm 0,1$  s, Crx-Cre/cOFF  $1,7 \pm 0,1$  s,  $p > 0.999$ ) (Figure 80C).



**Figure 80 : Etude de la compréhension des contrastes et mouvements par le test de l'optomètre. (A) Nombre de head-trackings, (B) temps passé en head-tracking et (C) temps moyen d'un mouvement de head-tracking.**

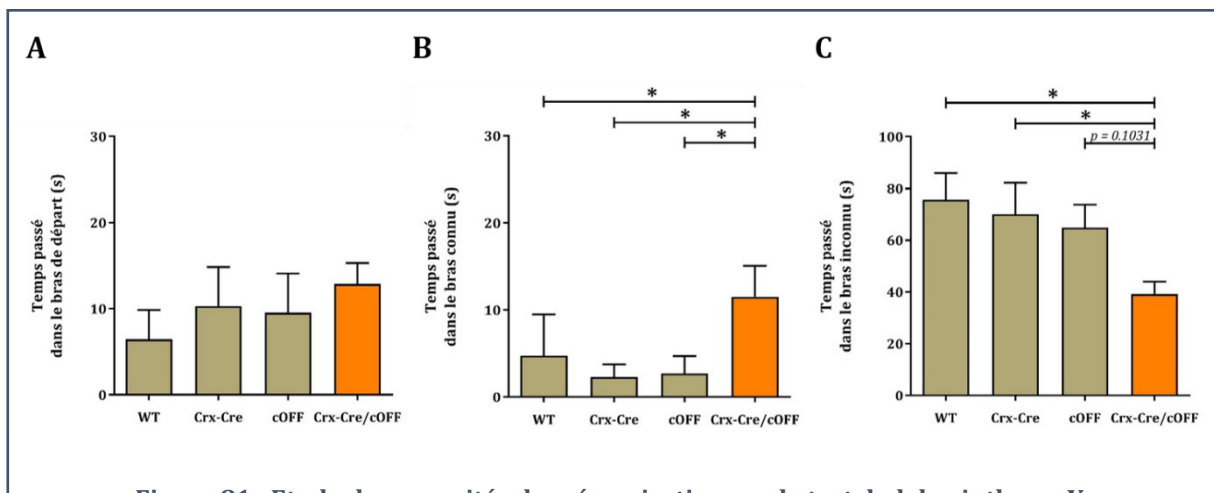
WT  $n=6$ , Crx-Cre  $n=11$ , cOFF  $n=7$ , Crx-Cre/cOFF  $n=9$ . Analyses statistiques par ANOVA une voie suivie d'une comparaison multiple de Tukey. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ .

Ces résultats suggèrent donc que **les animaux Crx-Cre/cOFF présentent des difficultés dans la compréhension des mouvements et des contrastes**. Il est intéressant de noter que la diminution obtenue est du même ordre, bien qu'un peu plus faible, que celle observée précédemment chez les souris *Fmr1* KO (Felgerolle et al., 2019).

*L'animal Crx-Cre/cOFF présente-t-il des anomalies cognitives ?*

Les capacités de mémorisation de l'animal modèle sont étudiées grâce au test du labyrinthe en Y. Ce test met la souris testée face à un environnement connu, car exploré précédemment, et un environnement inconnu. Le temps passé dans chacun de ces environnements, ou zones, est enregistré ainsi que les nombres d'entrées. Par la suite, un indice de préférence pour la nouveauté est calculé, représentant simplement le pourcentage de temps d'exploration passé dans la zone inconnue, ce qui indique si la souris a reconnu que cette zone ne lui est pas familière et a passé du temps à l'explorer plutôt que celle déjà connue.

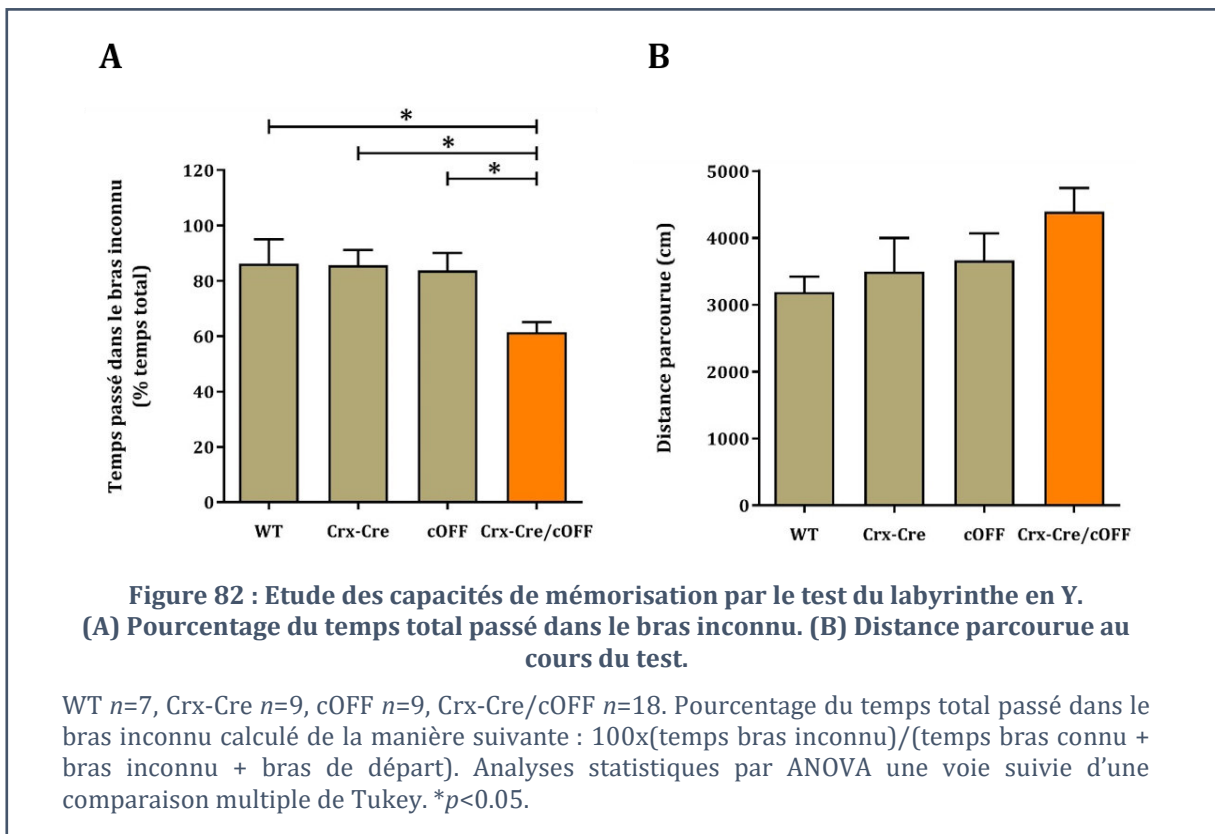
Par rapport aux animaux des groupes contrôles, les animaux Crx-Cre/cOFF ne passent pas plus de temps dans le bras de départ (Figure 81A), mais passent significativement plus de temps dans la zone déjà connue (WT 4,7 ± 4,7 s, Crx-Cre 2,3 ± 1,5 s, cOFF 2,7 ± 2,0 s, Crx-Cre/cOFF 11,5 ± 3,5,  $p = 0.0164$ ) (Figure 81B). Par conséquent, il n'est pas surprenant de constater que les animaux Crx-Cre/cOFF ont tendance à passer significativement moins de temps dans la zone inconnue (WT 75,7 ± 10,2 s, Crx-Cre 70 ± 12,2 s, cOFF 64,9 ± 8,9 s, Crx-Cre/cOFF 39,2 ± 4,7 s,  $p = 0.0195$ ) (Figure 81C).



**Figure 81 : Etude des capacités de mémorisation par le test du labyrinthe en Y. Temps passé dans (A) le bras de départ, (B) dans le bras connu et (C) le bras inconnu.**

WT  $n=7$ , Crx-Cre  $n=9$ , cOFF  $n=9$ , Crx-Cre/cOFF  $n=18$ . Analyses statistiques des données du bras de départ et du bras connu par Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple de Dunn. Analyses statistiques des données du bras inconnu par ANOVA une voie suivie d'une comparaison multiple de Tukey.  $*p<0.05$ .

Ce phénomène s'illustre parfaitement lorsque la préférence à la nouveauté est calculée, et montre que par rapport aux animaux des groupes contrôles, les animaux Crx-Cre/cOFF présentent une diminution significative du pourcentage de temps passé à explorer la zone qui leur est inconnue (WT  $86,2 \pm 8,9 \%$ , Crx-Cre  $85,6 \pm 5,6 \%$ , cOFF  $83,7 \pm 6,4 \%$ , Crx-Cre/cOFF  $61,5 \pm 3,5 \%$ ,  $p = 0.018$ ) (Figure 82A). Ce résultat est obtenu sans qu'aucune différence ne soit observée en ce qui concerne la locomotion des animaux, aucune différence n'étant relevée entre les différents groupes en ce qui concerne la distance parcourue lors de cette phase du test (WT  $3190 \pm 232,1$  cm, Crx-Cre  $3499 \pm 501$  cm, cOFF  $3665 \pm 404$  cm, Crx-Cre/cOFF  $4394 \pm 354$  cm,  $p = 0.201$ ) (Figure 82B).

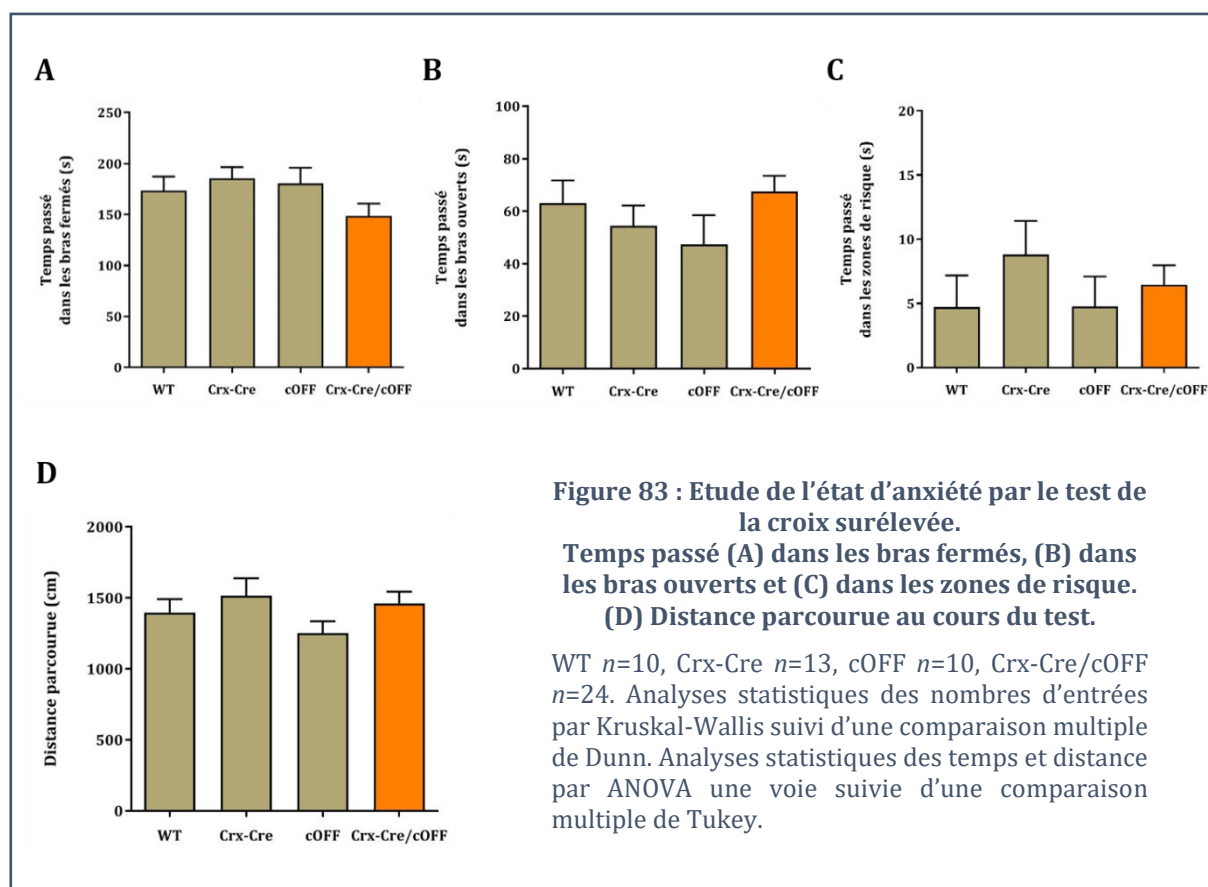


Ces résultats suggèrent donc que **les animaux Crx-Cre/cOFF présentent une altération de leurs capacités cognitives, illustrées ici par des difficultés de mémorisation.**

*L'animal Crx-Cre/cOFF présente-t-il une anomalie de l'anxiété ?*

Le comportement des animaux face à une situation anxiogène est étudiée grâce au test de la croix surélevée. Dans cette situation, l'animal est libre de se déplacer vers une zone « anxiogène » car à découvert et avec un précipice environnant, *i.e.* les bras ouverts, ou de se déplacer vers une zone « rassurante », *i.e.* les bras fermés. De plus, les extrémités des bras ouverts sont considérées comme des zones de risque maximal. Le temps passé dans chacun de ces environnements, ou zones, est enregistré ainsi que les nombres d'entrées.

Aucune différence n'est enregistrée entre les différents groupes d'animaux en ce qui concerne le nombre d'entrées dans les bras fermés (WT  $16 \pm 2$ , Crx-Cre  $15 \pm 1$ , cOFF  $16 \pm 2$ , Crx-Cre/cOFF  $18 \pm 1$ ,  $p > 0.9999$ ) ou dans les bras ouverts (WT  $15 \pm 1$ , Crx-Cre  $17 \pm 2$ , cOFF  $14 \pm 2$ , Crx-Cre/cOFF  $22 \pm 3$ ,  $p = 0.1611$ ), et ceci est associé à un temps passé dans les bras fermés (WT  $173,6 \pm 13,7$  s, Crx-Cre  $185,4 \pm 11$  s, cOFF  $180,6 \pm 15,3$  s, Crx-Cre/cOFF  $148,7 \pm 12,2$  s,  $p = 0.5724$ ) comme dans les bras ouverts (WT  $63,1 \pm 8,6$  s, Crx-Cre  $54,4 \pm 7,7$  s, cOFF  $47,3 \pm 11,1$  s, Crx-Cre/cOFF  $67,5 \pm 6$  s,  $p = 0.9794$ ) similaires entre les différents génotypes (Figures 83A, B et C). Par conséquent aucune différence n'est observée non plus en ce qui concerne les zones de risques, que ce soit dans le nombre de fois où les souris se sont aventurées dans ces zones (WT  $1,9 \pm 0,4$ , Crx-Cre  $4 \pm 0,6$ , cOFF  $2 \pm 0,4$ , Crx-Cre/cOFF  $2,7 \pm 0,6$ ,  $p > 0.9999$ ) ou dans le temps que les souris y ont passé (WT  $4,7 \pm 2,5$  s, Crx-Cre  $8,8 \pm 2,6$  s, cOFF  $4,8 \pm 2,3$  s, Crx-Cre/cOFF  $6,4 \pm 1,5$  s,  $p > 0.9999$ ) (Figures 83A, B et C). Enfin, ce comportement est associé à une distance parcourue similaire entre les animaux des différents génotypes (Figure 83D).



Ces résultats suggèrent donc que **les animaux Crx-Cre/cOFF ne présentent pas d'anomalie de l'anxiété.**

Il aurait été intéressant d'évaluer les composantes sociales du comportement des animaux Crx-Cre/cOFF afin de compléter le tableau des investigations en lien avec le phénotype comportemental

connu chez la souris *Fmr1* KO. **Cependant, les résultats ici obtenus lors de l'étude comportementale des animaux Crx-Cre/cOFF suggèrent que ces animaux ne présentent pas de phénotype d'anxiété, ni d'hyperactivité. En revanche, ils semblent souffrir d'un déficit de mémoire. Ce résultat questionne sur les capacités cognitives d'une manière générale de cette lignée murine, qu'il serait intéressant d'investiguer plus en profondeur, avec d'autres tests cognitifs tels que ceux présentés lors de la description comportementale du modèle *Fmr1* KO (partie 2 de l'Introduction). Par-dessus tout, il est très intéressant de constater que les animaux présentent des difficultés de perception des contrastes et des mouvements. Ce résultat suggère que les animaux Crx-Cre/cOFF ont bel et bien des altérations visuelles. Il serait alors intéressant de poursuivre la caractérisation du phénotype visuel de ces animaux, telle que réalisée dans l'étude précédente, avec des tests permettant d'évaluer la capacité de compréhension de la profondeur et de la perspective, mais aussi d'approfondir les connaissances quant à la discrimination des contrastes (Felgerolle et al., 2019).**

### 3.6 Discussion

D'une manière globale, le modèle Crx-Cre/cOFF ne s'est pas révélé conforme aux exigences que nous attendions d'un modèle « FXS-rétine-spécifique ». D'un côté, la rétine n'a pas montré d'anomalies protéiques et fonctionnelles une fois l'animal arrivé à l'âge de jeune adulte. De l'autre côté, les aires cérébrales voient de nombreuses cellules affectées par la recombinaison du gène *Fmr1*, ce qui engendre une perte d'expression de protéine FMRP dans de nombreuses populations cellulaires et structures cérébrales. **Le modèle Crx-Cre/cOFF ne répond donc ni au critère de « rétine de type *Fmr1* KO » ni à celui de « cerveau de type WT ». Il ne nous a donc pas permis de répondre aux questions initiales, qui ont motivé sa création, concernant l'implication des perturbations spécifiquement rétinienne dans le phénotype sensoriel visuel du syndrome de l'X fragile.** Toutefois, il soulève de nombreuses interrogations.

En premier lieu, **au niveau rétinien.** Il est surprenant de constater une absence de transcrits du gène *Fmr1* et de protéine FMRP, quel que soit l'âge étudié, d'observer quelques jours après la naissance des perturbations protéiques cohérentes avec celles décrites chez le modèle *Fmr1* KO (Perche et al., 2018), et de constater un rétablissement des taux protéiques quelques jours plus tard, qui se maintiendront à des niveaux physiologiques une fois arrivé à l'âge adulte. Ce rétablissement protéique, sans qu'il n'y ait de réexpression de FMRP, soulève des questions dont les réponses seront cruciales pour la compréhension du phénotype rétinien, et visuel, du FXS. Avec notre stratégie, la recombinaison rétinienne du gène *Fmr1* a lieu au 12<sup>ème</sup> jour embryonnaire. Il existe donc une expression extrêmement précoce de protéines FMRP, antérieure à ce stade embryonnaire. La protéine FMRP étant très impliquée dans le développement cellulaire, et en particulier des tissus neuronaux, **nous ne pouvons pas exclure qu'une expression très précoce de FMRP soit suffisante pour mettre en place des mécanismes de**

**régulation protéiques et cellulaires qui perdureront même après la mise en silence du gène *Fmr1*, et qui tendront vers une correction des défauts causés par l'absence de FMRP aux stades postnataux. Cela implique donc que les premiers stades embryonnaires sont les âges cruciaux de l'expression de FMRP : les actions menées par FMRP à ces stades de développement très précoces sont capitales car elles permettraient à la rétine de présenter des profils protéique et fonctionnel normaux à l'âge adulte.**

De plus, il ne faut pas oublier que les deux âges postnataux entre lesquels nous avons constaté un échappement du phénotype rétinien (P5 et P25) sont séparés par un phénomène très impactant pour le système visuel : l'ouverture des yeux. Ainsi, **nous ne pouvons pas exclure la participation de mécanismes qui se mettraient en action à l'ouverture des yeux au rétablissement du phénotype rétinien montré par l'animal *Crx-Cre/cOFF* aux premiers jours de sa vie.**

Ensuite, la diminution de la quantité de FMRP (de l'ordre de 50%) au niveau cérébral était très surprenante au vu des choix de lignée que nous avons effectués lors de l'élaboration de la stratégie de travail. Cette diminution est constatée à tous les âges postnataux étudiés, et résulte d'une diminution de la transcription du gène *Fmr1* à l'échelle du cerveau total. Rapidement, cet indice nous a dirigé vers l'existence de recombinaison du gène *Fmr1* dans les structures cérébrales, ce qui a été confirmé par l'étude de la recombinaison induite par le transgène *Tg(Crx-Cre)*. Cependant, nous n'avons détecté aucune présence de Cre recombinase dans le cerveau total, quel que soit l'âge étudié, ce qui indique que la présence de versions recombinées du gène *Fmr1* dans les aires cérébrales est la conséquence de phénomènes antérieurs à la naissance des animaux. Il est connu que la rétine et le cerveau partagent une origine embryonnaire commune (Pei and Rhodin, 1970; Kaneko, 1979), dans le tube neural, ces deux structures étant issues de la même vésicule primaire, le prosencéphale. Certaines structures cérébrales, telles que le thalamus et l'hypothalamus, partagent même la même vésicule secondaire que la rétine (Darribère, 2003). Ce n'est que lors des dernières étapes de séparation du tube neural que cerveau et rétines se voient séparés sur le plan anatomique (Darribère, 2003). **Nos résultats suggèrent que les cellules des aires concernées par cette recombinaison du gène *Fmr1* sont des cellules ayant partagé la même histoire embryonnaire que les cellules rétinienne, et que leur différenciation et migration sont ultérieures à la recombinaison induite par le *Tg(Crx-Cre)*, c'est-à-dire après le 12<sup>ème</sup> jour embryonnaire** (Chen et al., 1997; Furukawa et al., 1997; Nishida et al., 2003).

**De plus, il est intéressant de noter la variété des populations cellulaires cérébrales qui semblent affectées par la recombinaison induite par le *Tg(Crx-Cre)*.** Cette variété reste toutefois à confirmer avec des marquages spécifiques des différents types cellulaires. Mais nos résultats, notamment les marquages immunohistochimiques des coupes de cerveaux des animaux reporteurs *Crx-Cre/RCE*, suggèrent que les types cellulaires affectés par la recombinaison sont différents d'une structure à l'autre : tantôt les neurones semblent ciblés (dans l'hippocampe et le cervelet), tantôt les cellules gliales semblent affectées (dans le cortex et le colliculus).

C'est pourquoi il est très difficile de tirer de ce modèle quelle que conclusion que ce soit sur l'impact de l'absence de la protéine FMRP au niveau cérébral, tant les variations dans la recombinaison sont grandes d'une structure à l'autre. Le type cellulaire, mais aussi la proportion de cellules recombinées dans cette population cellulaire, varient d'une structure à l'autre. L'animal *Crx-Cre/cOFF* ne possède pas un cerveau « de type WT », de par la diminution de l'expression de FMRP à l'échelle du cerveau total, mais ne montre pas non plus un cerveau « de type *Fmr1* KO », de par l'absence d'anomalies protéiques (PSD95) et cellulaires (immaturité neuronale) marqueurs du FXS. Nous pouvons affirmer que **ce modèle possède un cerveau « à mi-chemin » entre les deux conditions extrêmes**. Un tel phénotype, avec une expression de FMRP diminuée de moitié à l'échelle du cerveau est unique. Dans la littérature, un seul exemple d'étude d'une expression parcellaire de FMRP au niveau cérébral a été menée. En effet, l'équipe d'Arsenault et collaborateurs a réalisé, *via* l'injection de vecteur d'expression au niveau cortical, une expression de FMRP dans le cerveau d'animaux *Fmr1* KO (Arsenault et al., 2016). Cette technique a permis de rétablir une expression de FMRP de l'ordre de 55% dans le cortex, 115% dans le cortex préfrontal, 80% dans l'hippocampe et 35% dans le striatum (pourcentages de l'expression obtenue chez un animal WT dans ces différentes structures) (Arsenault et al., 2016). A l'âge adulte, les cortex de ces animaux ont montré un rétablissement de leurs quantités de PSD95 et de MECP2 (deux protéines marqueurs du phénotype moléculaire cérébral du FXS de par la dérégulation de leurs niveaux en absence de protéine FMRP) à des niveaux équivalents à ceux d'animaux WT (Arsenault et al., 2016). **Nos résultats sont donc cohérents avec ceux de l'équipe d'Arsenault et collaborateurs : une expression, même partielle, de FMRP dans une région cérébrale peut suffire à rétablir le phénotype protéique de l'animal *Fmr1* KO dans cette structure**. Cependant, il convient de souligner une différence majeure entre nos travaux et ceux d'Arsenault : dans cet article, l'expression de FMRP est exclusivement neuronale, de par la construction utilisée dans le vecteur d'expression (Arsenault 2016). C'est pourquoi il convient d'être prudent dans notre comparaison, étant donné que nous n'avons pas démontré de manière claire que la recombinaison obtenue avec le *Tg(Crx-Cre)* cible un type cellulaire dans les structures que nous avons étudiées. De plus, nous avons étudié les taux de PSD95 à l'échelle du cerveau entier, et pas structure par structure. A l'image des travaux réalisés par Arsenault et collaborateurs, il serait intéressant de poursuivre le travail sur la caractérisation cérébrale du modèle *Crx-Cre/cOFF* structure par structure en quantifiant les niveaux de FMRP et de protéines marqueurs du phénotype moléculaire du FXS, telles que PSD95 et MECP2 (Arsenault et al., 2016). Je pense notamment au cortex, à l'hippocampe, au colliculus et au cervelet, les structures qui ont montré une recombinaison importante due au *Tg(Crx-Cre)*. De plus, si l'une de ces structures se révèle affectée par la recombinaison de *Fmr1* uniquement dans ces cellules gliales, il serait intéressant d'étudier les conséquences sur les taux de protéines neuronales, et de comparer à ceux obtenus par Arsenault et collaborateurs pour cette même structure.

Ainsi, d'après nos résultats, lorsque nous ciblons de manière très précoce un gène dont l'expression est décrite comme « rétine-spécifique », nous retrouvons des conséquences dans plusieurs structures

cérébrales. Ceci suggère que de très nombreuses cellules cérébrales partagent une histoire commune avec les cellules rétiniennes. **Nos résultats confirment donc le lien embryologique très fort qui existe entre la rétine et les aires cérébrales** (Pei and Rhodin, 1970; Kaneko, 1979; Darrivière, 2003). Il semble que certaines structures cérébrales soient particulièrement liées, embryologiquement, aux cellules rétiniennes. En particulier, nos résultats suggèrent que certaines structures cérébrales sont composées de cellules issues des mêmes tissus embryonnaires que la rétine, et que la séparation et la migration vers les régions cérébrales de ces cellules s'effectuent après le 12<sup>ème</sup> jour embryonnaire chez la souris. Nos résultats ont montré ce lien pour des structures visuelles, ce qui est cohérent avec l'idée de l'établissement d'un réseau visuel à partir d'un même groupe de cellules, mais également pour des structures annexes, telles que l'hippocampe et le cervelet. Des investigations plus poussées sur le cerveau des animaux *Crx-Cre/cOFF* adultes pourraient compléter ces informations en s'intéressant à d'autres structures cérébrales, notamment celles impliquées dans le système visuel (LGN et régions d'intégration visuelle secondaires).

D'après nos résultats, pour créer un modèle FXS rétine-spécifique, il faudrait donc réussir une mise en silence « rétinienne » du gène *Fmr1* de manière très précoce, dès les tous premiers jours de la vie embryonnaire. En supposant que nous trouvions une stratégie qui nous permette une telle prouesse, nous serons confrontés de nouveau à une perte de l'expression du gène *Fmr1* dans un grand nombre de cellules cérébrales, car celles-ci partagent une histoire embryonnaire importante avec les cellules rétiniennes. Pour s'affranchir de ces recombinaisons cérébrales indésirables, il faudrait alors procéder dans l'autre sens : induire une mise en silence du gène *Fmr1* dans les cellules rétiniennes juste après la naissance, une fois le système visuel en place et les migrations cellulaires terminées entre la rétine et les régions cérébrales. Mais nos résultats suggèrent que l'expression de FMRP pendant les premiers stades embryonnaires suffit à induire une absence de phénotype rétinien à l'âge adulte, et ce malgré l'absence de protéine FMRP à l'âge adulte. **Il semblerait donc que nous soyons dans une impasse pour créer un modèle « FXS-rétine spécifique »** : nos résultats suggèrent que l'action précoce de FMRP et les origines embryonnaires de la rétine et du cerveau très intimement liées empêcheront toujours la création d'un tel modèle.

Toutefois, l'étude comportementale du modèle *Crx-Cre/cOFF* complète de manière intéressante la caractérisation du modèle *Crx-Cre/cOFF*. Malgré un phénotype moléculaire et cellulaire atypique, ce modèle montre des perturbations comportementales significatives face à certaines tâches.

En premier lieu, l'animal *Crx-Cre/cOFF* présente une diminution de ses capacités à percevoir le contraste dynamique. Ceci est d'autant plus étonnant que la rétine de cet animal ne présente aucune anomalie électrophysiologique. En revanche, il présente une recombinaison du gène *Fmr1* KO, certes mosaïque mais bien présente, dans des structures clés du système visuel (cortex visuel et colliculus). La recombinaison du gène *Fmr1* n'a pas pu être étudiée dans le LGN pour des raisons de limitations techniques. **Ce résultat suggère ainsi qu'une perte ou une diminution de l'expression de FMRP dans les structures cérébrales du système visuel est suffisante pour induire une diminution des**



**capacités visuelles de perception des contrastes et du mouvement.** Cela n'exclut pas que des anomalies rétiniennes altèrent elles aussi les performances lors du test de l'optomètre, comme cela a été démontré à de nombreuses reprises dans la littérature (Covey and Franzini, 1979; Lawrence et al., 2000; Lund et al., 2001; Thang et al., 2002; Thomas et al., 2004; Schmucker et al., 2005; Akimov and Rentería, 2012). De plus, lorsque nous comparons la diminution des performances de la souris *Fmr1* KO (de l'ordre de 40%) (Felgerolle et al., 2019) à celle obtenue ici avec le modèle Crx-Cre/cOFF (de l'ordre de 30%) par rapport à leur propre WT littermate, nous permet d'émettre l'hypothèse que, en absence de protéine FMRP, le phénotype rétinien vient aggraver la perte de sensibilité aux contrastes et aux mouvements due aux anomalies des aires visuelles cérébrales. Bien entendu, cela n'induit pas une relation purement cumulative des phénotypes rétiniens et cérébraux, mais **la différence de pénétrance phénotypique constatée ici entre les deux modèles, avec un unique test, tend à confirmer que les aires visuelles cérébrales (colliculus et cortex visuel) ne sont pas les seules structures du système visuel impliquées dans la perception des contrastes et des mouvements.**

Ensuite, le modèle Crx-Cre/cOFF semble souffrir de troubles de la mémoire, comme suggéré par les résultats obtenus avec l'emploi du test du labyrinthe en Y. Par rapport à tous les autres groupes contrôles, les animaux Crx-Cre/cOFF montrent une nette diminution de leur préférence pour la région inconnue du test, ce qui indique qu'ils n'ont pas distingué cette dernière des régions familières. Cette anomalie de la mémoire spatiale peut être associée à la diminution de l'expression de FMRP dans les régions hippocampiques. En effet, un lien a été démontré entre les performances d'un animal lors du test du labyrinthe en Y et l'intégrité de son hippocampe (Wetzel et al., 1980; Paul et al., 2009; Carrillo-Mora et al., 2010). Face à une perte de l'expression de FMRP, il y a fort à parier que les régions hippocampiques du modèle Crx-Cre/cOFF présentent des dérégulations de protéines synaptiques associées à des anomalies cellulaires d'immaturité synaptique, similaires à celles démontrées chez la souris *Fmr1* KO (Xu et al., 2012; Aloisi et al., 2017; Jawaid et al., 2018). **Le phénotype comportemental de troubles de la mémoire est donc cohérent avec les résultats obtenus lors de la caractérisation cérébrale du modèle Crx-Cre/cOFF. Sur cet aspect, le modèle Crx-Cre/cOFF montre donc un phénotype « de type *Fmr1* KO ».**

Enfin, le modèle Crx-Cre/cOFF n'a pas montré de caractère hyper- ou hypo-anxieux lors du test de la croix surélevée, ni d'hyperactivité lors des tests d'exploration (croix surélevée et labyrinthe en Y). L'hypo-anxiété et l'augmentation de l'activité locomotrice sont pourtant deux traits phénotypiques comportementaux forts du modèle *Fmr1* KO (Goebel-Goody et al., 2012; Hébert et al., 2014). Nos résultats suggèrent donc que les structures causant ces phénotypes lorsqu'elles sont privées de FMRP ne sont pas affectées par la recombinaison du gène *Fmr1* chez le modèle Crx-Cre/cOFF. Ainsi, **le modèle Crx-Cre/cOFF n'est pas « de type *Fmr1* KO » dans tous ses aspects comportementaux.** Ceci peut être relié au caractère mosaïque de la recombinaison du gène *Fmr1*, affectant préférentiellement certaines structures et certaines populations cellulaires au sein de ces structures. **Toutefois, nous pouvons souligner que, parmi les comportements étudiés ici, les perturbations observées sont cohérentes**

avec les structures que nous avons identifiées comme porteuses du gène *Fmr1* recombiné, et qui par conséquent souffrent d'une diminution de leur contenu en protéine FMRP.

En résumé, le modèle Crx-Cre/cOFF ne nous permet pas de répondre aux questions qui ont motivé sa création, concernant la part de l'implication du phénotype rétinien dans le phénotype sensoriel visuel, et global du syndrome de l'X fragile. Ce travail a néanmoins soulevé des interrogations concernant les connaissances biologiques liées à l'embryologie du système visuel, et du système nerveux en général. Enfin, il semble capital de souligner que, contrairement à ce que la littérature suggère, le Tg(*Crx-Cre*) n'induit pas une recombinaison localisée aux structures rétiniennes. Certes, nous avons confirmé que l'ensemble des couches rétiniennes est affecté par la recombinaison induite par ce transgène (Prasov and Glaser, 2012), mais nous avons également montré que d'autres structures sont affectées par la recombinaison génétique. Ainsi, il convient d'être vigilant lors de l'utilisation de cette lignée transgénique. Elle est utile si l'étude menée concerne des effets rétiens, localisés dans la rétine, mais elle ne peut pas être utilisée pour une étude visant à investiguer des conséquences de perturbations rétiniennes sur un phénotype plus large. A plus forte raison, cette lignée ne peut en aucun cas être utilisée afin d'étudier les conséquences comportementales d'anomalies rétiniennes, puisque les aires cérébrales seront elles aussi affectées par la recombinaison génétique.

# Chapitre 3

## Discussion

Le syndrome de l’X fragile est la première cause de déficience mentale héréditaire monogénique liée au chromosome X. L’origine moléculaire de cette pathologie se trouve dans la mise en silence du gène *FMR1*, engendrant une absence d’expression de la protéine FMRP. L’absence de cette protéine induit de nombreuses perturbations moléculaires et cellulaires, notamment au niveau synaptique, et trouve la majeure partie de ses conséquences au niveau cérébral. La déficience mentale est le symptôme central de cette pathologie, autour duquel vient se construire un phénotype unique, comprenant tout un ensemble de troubles syndromiques. Outre la déficience mentale, les patients montrent également des troubles de type autistique, qui se caractérisent par des anomalies de la sphère sociale, un regard fuyant, des troubles de la communication, des stéréotypies ou encore un refus du contact tactile (Hagerman et al., 1991; Kaufmann et al., 2004; Schneider et al., 2009). Ce comportement « autistique » est le deuxième signe clinique le plus connu, la majorité des patients présentant au moins un critère de trouble du spectre autistique (Brock and Hatton, 2010). De plus, les patients montrent des perturbations de la sphère sensorielle (Miller et al., 1999). **Ce phénotype sensoriel affecte l’intégralité des patients, ce qui en fait un symptôme clinique majeur de la pathologie.** En effet, de nombreux indices comportementaux mettent en évidence l’existence de troubles sensoriels, de divers ordres et de diverses intensités, chez ces patients. Le refus du contact tactile, par exemple, est très marqué chez les patients dès leur enfance, 80% d’entre eux ayant une très forte aversion pour tout contact tactile (Hagerman et al., 1991). De même, les patients ont un regard fuyant, refusant tout contact visuel avec un interlocuteur et ne fixant pas un visage de manière prolongée (Cohen et al., 1989, 1991). En plus de refléter une anxiété sociale prononcée, ces phénotypes peuvent être l’illustration de perturbations purement sensorielles de la perception et de l’intégration des stimuli environnants.

C’est pourquoi il est assez surprenant de constater que l’étude de ces altérations est encore récente, et demeure parcellaire. En particulier, seules quelques études ont démontré l’existence de troubles visuels chez les patients atteints du FXS, caractérisés par des anomalies de compréhension des contrastes, textures et mouvements (Kogan et al., 2004a; Farzin et al., 2008). Les praticiens ont souvent associé ces troubles à un défaut d’attention des patients, mais aussi aux anomalies cellulaires décrites précédemment dans le cortex visuel et le LGN des patients (Greenough et al., 2001; Irwin et al., 2001; Kogan et al., 2004b). Toutefois, la composante cérébrale du système visuel ne saurait fonctionner sans l’apport de la composante « périphérique », jouant un rôle central dans la perception lumineuse : la rétine. C’est dans ce contexte que le laboratoire avait démontré que la rétine exprime elle aussi la protéine FMRP en conditions physiologiques, et, par conséquent, connaît des altérations en cas d’absence de la protéine FMRP (Rossignol et al., 2014). L’étude des rétines de la souris *Fmr1* KO, modèle murin validé du syndrome de l’X fragile, a démontré des altérations moléculaires et cellulaires, induisant des anomalies significatives de la fonctionnalité rétinienne chez les animaux à l’âge adulte (Rossignol et al., 2014). A n’en pas douter, ces anomalies rétinienne participent au phénotype sensoriel visuel du syndrome de l’X fragile. C’est pourquoi le travail de cette thèse vise à approfondir les connaissances à la fois du phénotype rétinien causé par l’absence de la protéine FMRP, mais également du phénotype visuel du syndrome de l’X fragile d’un point de vue comportemental, afin d’en faire une description plus précise.

## Les anomalies neurodéveloppementales de la rétine, origine des perturbations de l'ensemble de l'axe visuel ?

A l'âge adulte, la souris *Fmr1* KO présente un phénotype rétinien caractérisé par des anomalies protéiques et cellulaires significatives, associées à une perturbation de plusieurs paramètres électrophysiologiques (Rossignol et al., 2014). La preuve était là que la rétine est, au même titre que les aires cérébrales du système visuel, perturbée par l'absence de la protéine FMRP. Au cours de ce travail de thèse, nous avons apporté une information cruciale pour la compréhension du phénotype visuel du FXS : le phénotype rétinien est en place dès la naissance de l'individu, et demeure stable jusqu'à l'âge adulte (Perche et al., 2018). En effet, nous avons montré que les anomalies protéiques rétiniennes sont présentes dès la naissance, avec le même profil qu'à l'âge adulte, et se maintiennent ainsi à tous les âges étudiés (Perche et al., 2018). La précocité des anomalies moléculaires, affectant notamment des protéines clés du fonctionnement rétinien (Rhodopsine et PSD95), appuie fortement l'hypothèse que l'ensemble des altérations cellulaires et électrophysiologiques rétiniennes décrites à l'âge adulte est en place à la naissance, ce qui n'a pas pu être montré à tous les âges pour cause de limitations techniques (l'ERG ne peut être réalisé qu'à partir de 1 mois). Nos résultats suggèrent donc que les perturbations de la fonctionnalité rétinienne observées à l'âge adulte existent dès la naissance. Ainsi, **dès l'ouverture des yeux, le système visuel connaît un défaut de perception de l'information visuelle. L'expérience visuelle vécue par l'individu est altérée dès les premières secondes où celui-ci « voit », dès le processus de genèse du signal visuel au niveau rétinien.** Ainsi, dans ces conditions, la rétine n'aura de cesse d'émettre des informations visuelles dont la qualité est altérée, ce qui impacte nécessairement les expériences visuelles « instantanément », à l'instant où elles sont vécues, mais également les capacités visuelles de l'individu sur le long terme.

En effet, il a été démontré que les premières informations visuelles générées par les tout premiers signaux lumineux perçus lors de l'ouverture des yeux jouent un rôle dans la maturation des aires visuelles cérébrales. Concrètement, l'ouverture des yeux induit une réorganisation protéique au niveau des synapses des neurones du cortex visuel et du colliculus supérieur (Yoshii et al., 2003). En particulier, la protéine PSD95 des neurones de ces structures est rapidement redistribuée de manière à augmenter la quantité de cette protéine dans leurs zones synaptiques (Yoshii et al., 2003), ceci permettant l'activation de complexes protéiques associés à PSD95 induisant la maturation des épines dendritiques (Yoshii et al., 2003). Ainsi, dans les neurones du colliculus, PSD95 présent au niveau synaptique se lie aux récepteurs NMDA afin de les activer, ce qui lève la mise en silence des synapses dites « silencieuses » (Lu and Constantine-Paton, 2004; Zhao et al., 2013). Ainsi, les courants passant par les récepteurs AMPA se voient augmenter, et les mécanismes de LTP commencent à être observés seulement après l'ouverture des yeux (Lu and Constantine-Paton, 2004). La migration de PSD95 au niveau synaptique est donc un mécanisme indispensable à la réalisation de la LTP du colliculus en développement (Zhao et al., 2013). Par conséquent, un renforcement et un affinement des circuits neuronaux des structures visuelles centrales se mettent en place après l'ouverture des yeux, afin de tendre vers un fonctionnement optimal du

système visuel (Lu and Constantine-Paton, 2004). **L'ouverture des yeux est donc un événement crucial de la maturation des aires visuelles cérébrales, et la qualité des signaux lumineux reçus par ces structures est un élément déterminant dans la réalisation des mécanismes sous-jacents.**

Ainsi, une qualité moindre du signal visuel émis par la rétine dès l'ouverture des yeux, à destination des aires cérébrales du système visuel, impacte la maturation optimale de ces aires. C'est pourquoi nos résultats, démontrant des altérations rétiniennes dès la naissance de la souris *Fmr1* KO, représentent une donnée capitale dans la compréhension des perturbations visuelles en absence de la protéine FMRP : certes, les aires visuelles présentent des anomalies moléculaires « directement » dues à l'absence de FMRP (perturbation des mécanismes de traduction, des interactions protéines-protéines, ...), mais il est probable qu'à ces altérations directes viennent s'ajouter des perturbations plus indirectes, dues à l'absence de FMRP au niveau rétinien, avant même l'ouverture des yeux. **L'absence de FMRP au niveau rétinien renforcerait alors les perturbations cérébrales des aires visuelles, en impactant les mécanismes de maturation de ces aires.** Par conséquent, le phénotype cérébral observé à l'âge adulte est probablement dû, en partie, aux anomalies « périphériques » précoces causées par l'absence de FMRP.

### Phénotypes rétinien et cérébral : quelles conséquences, et qui fait quoi ?

En absence de protéine FMRP, des anomalies rétiniennes s'ajoutent aux anomalies des aires visuelles cérébrales, et composent un système visuel perturbé dans l'intégralité de ses structures (Irwin et al., 2000; Kogan et al., 2004b; Rossignol et al., 2014; Kay et al., 2018; Perche et al., 2018). Dès lors, il ne fut pas surprenant de constater des troubles des capacités visuelles des souris *Fmr1* KO qui s'illustrent sur le plan comportemental (Felgerolle et al., 2019).

#### *Altération de la perception de la perspective*

**Ainsi, la capacité à percevoir et appréhender la profondeur s'est révélée être perturbée chez la souris *Fmr1* KO.** Sans être totalement incapable de discerner le vide, ces souris ont montré une incompréhension de l'environnement « dangereux » dans lequel elles se trouvaient : la perception du vide sous leurs pattes semblait sous-optimale par rapport à celle des animaux contrôles. Ce résultat nous indique que l'absence de la protéine FMRP perturbe le fonctionnement de la voie rétino-géniculocorticale. En effet, la vision de la perspective repose sur une parfaite intégrité des composants de cet axe visuel, allant de la perception par la rétine jusqu'à l'intégration au niveau cortical (Fox, 1965; Mazziotti et al., 2017). Il a été clairement démontré que modifier cette voie en ciblant la rétine ou le cortex visuel modifie la perception de la profondeur et de la perspective (Mazziotti et al., 2017; Tzameret et al., 2019). Ainsi, les perturbations fonctionnelles corticales (Irwin et al., 2002; Galvez and Greenough, 2005) comme rétiniennes (Rossignol et al., 2014; Perche et al., 2018) connues par la souris *Fmr1* KO participent à une diminution de la perception de la perspective. Sans pouvoir distinguer précisément la participation du phénotype rétinien de celle du phénotype cérébral, nous pouvons associer ce phénotype

comportemental à une déstabilisation moléculaire de l'ensemble de l'axe rétino-géniculo-cortical. A titre d'exemple, la souris *Rbfox1* KO, modèle animal présentant une anomalie de ses complexes protéiques SNARE, montre des anomalies de ses circuits neuronaux visuels et un défaut de perception de la profondeur (Gu et al., 2018). Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que la diminution de la perception de la perspective observée chez la souris *Fmr1* KO est la conséquence de défauts dans l'expression de protéines telles que PSD95, mGluR5 ou le complexe SNARE, décrits chez ce modèle murin (Zhu et al., 2011; Westmark, 2013; Tang et al., 2015; Aloisi et al., 2017). Ces dérégulations protéiques perturbent la transmission synaptique des neurones de l'axe visuel, ce qui impacte l'efficacité de la voie rétino-géniculo-corticale (Davidovic et al., 2011; Doll et al., 2017). En soumettant le modèle *Crx-Cre/cOFF* au test du *visual cliff*, nous aurions pu étudier la participation de la composante rétinienne au phénotype de diminution de perception de la profondeur, car ce modèle ne présente pas d'anomalie de l'ERG mais une diminution cérébrale de l'expression du gène *Fmr1*. Malheureusement, les limitations temporelles et techniques de la thèse n'ont pas permis de réaliser cet ensemble de tests. Quoiqu'il en soit, **l'absence de protéine FMRP induit une diminution des capacités visuelles permettant la perception des perspectives et de la profondeur.**

La vision de la perspective est une composante cruciale pour la visualisation en trois dimensions, compétence visuelle clé pour la gestion de l'espace environnant, en permettant l'appréhension des distances et des reliefs. Ainsi, la perception altérée de la profondeur chez les souris *Fmr1* KO influence très probablement la vision de leur environnement, et donc leur comportement en réaction à cet environnement. Ceci nous amène à nous interroger sur le comportement décrit comme « hypo-anxieux » chez cette lignée murine : dans des situations anxiogènes pour une souris sauvage, la souris *Fmr1* KO semble ne pas comprendre le danger. Ce comportement est le plus souvent investigué en utilisant le test de la croix surélevée, mettant la souris face à une situation de stress imminent que sont les bras ouverts, exposés à une lumière directe mais surtout entourés par « du vide ». Par rapport aux animaux contrôles, les souris *Fmr1* KO passent non seulement plus de temps dans les bras ouverts, mais par-dessus tout s'aventurent aux extrémités de ces bras ouverts, là où le danger est maximal car entourés par le vide (Heulens et al., 2012; Chen et al., 2013; Hébert et al., 2014). Ce comportement a été interprété comme une diminution du caractère anxieux chez la souris *Fmr1* KO. Cependant, à la lumière de nos récents résultats, montrant la diminution de la capacité à percevoir le vide de cette souris, **il est fortement probable que ce comportement « hypo-anxieux » soit le reflet d'un défaut de perception de la profondeur** : la souris *Fmr1* KO n'est certainement pas en mesure de percevoir convenablement à tout instant le vide environnant. Cela participerait au caractère hypo-anxieux de cette lignée murine, qui n'est sans doute pas en capacité de voir un danger environnant, et qui la rend, de ce fait, « inconsciente » face à une situation anxiogène pour une souris sauvage. Certes, il n'est pas exclu que pour des raisons physiologiques et fonctionnelles la souris *Fmr1* KO soit moins anxieuse. Mais nos résultats démontrent que la perception de l'espace est altérée chez cette souris, et cela influence certainement la manière dont la souris agit face à une situation considérée comme anxiogène. **Il convient donc d'être prudent quant**

### **aux conclusions basées sur des tests impliquant la vision d'un stimulus anxiogène, et de prendre en compte les difficultés visuelles éprouvées par la souris *Fmr1* KO.**

La vision de la perspective est également nécessaire, à plus petite échelle, pour la vision des formes des objets faisant partie de l'environnement. En effet, en modifiant le test comportemental de la reconnaissance de nouvel objet, nous avons montré que la forme d'un objet est une caractéristique suffisante pour que la souris distingue deux objets, et reconnaisse un objet connu (Felgerolle 2019). Une vision optimale en trois dimensions est donc un paramètre crucial pour la reconnaissance et, par extension, la mémorisation des objets composants un environnement. Ainsi, il est probable que la souris *Fmr1* KO éprouve des difficultés à visualiser efficacement les objets lors de ce test, ce qui impacte nécessairement leur mémorisation. Par conséquent, nous pouvons affirmer que les performances de ces souris lors du test de reconnaissance de nouvel objet sont influencées par les difficultés visuelles de ces souris. **Nous pouvons alors remettre en question la force du phénotype cognitif décrit chez la souris *Fmr1* KO grâce à l'utilisation de tests comportementaux mettant en œuvre l'exploration d'objets, comme le test de reconnaissance d'objet.** La diminution de la perception de la perspective chez ce modèle altère la vision et donc la mémorisation des objets rencontrés, ce qui impacte nécessairement ses performances de reconnaissance d'objet, et donc ses performances au test. Ainsi, lors de l'utilisation de telles tâches comportementales, impliquant la vision, il convient d'être vigilant dans le choix des objets sélectionnés, qui doivent présenter des structures tri-dimensionnelles suffisamment discernables par les souris pour ne pas biaiser les résultats et conclusions de ces tests.

Quoi qu'il en soit, l'absence de protéine FMRP diminue la capacité de perception de la profondeur. A ce jour, il n'existe aucune donnée publiée concernant l'étude de la compréhension des perspectives chez les patients atteints du FXS. Bien que les systèmes visuels murins et humains présentent quelques différences, **nos travaux indiquent que les patients pourraient connaître eux aussi des difficultés de vision de la profondeur, de la perspective, et des distances.** Il serait intéressant d'examiner ces compétences visuelles chez les patients afin de compléter la description sensorielle visuelle du syndrome de l'X fragile.

### *Défaut de perception du contraste et du mouvement*

**La perception du contraste et du mouvement est également altérée chez la souris *Fmr1* KO.** Cette dernière n'est pas totalement insensible aux stimuli contrastés en mouvement, mais présente une très nette diminution de sa réponse comportementale par rapport aux animaux contrôles (de l'ordre de 40%) (Felgerolle et al., 2019). Ce phénomène n'est pas dû à un désintérêt de la souris pour le test, qui pourrait s'installer au cours de la réalisation de la tâche, ni à une perte de qualité du comportement lorsque celui-ci est réalisé (Felgerolle et al., 2019). Nos résultats démontrent clairement que les souris *Fmr1* KO ont des difficultés dans la détection, dans la perception même des stimuli leur faisant face. **Les souris *Fmr1* KO connaissent donc bien une diminution de leur capacité à percevoir le contraste dynamique.** L'origine exacte d'une anomalie de réponse au test de l'optomètre n'est pas identifiée, et



peut être de différente nature. La littérature a surtout mis en évidence le rôle de l'intégrité de la rétine dans les performances au test de l'optomètre. En effet, des modèles animaux de pathologies rétinienne présentent une altération dans leur réponse au test par rapport aux animaux contrôles (Lawrence et al., 2000; Thaung et al., 2002; Schmucker et al., 2005). La réponse de chaque œil d'un même animal peut être différente selon l'état de sa rétine, physiologique ou dégradée, démontrant l'importance de l'intégrité de la composante perceptive du système visuel, indépendamment de celui de la composante cérébrale, dans la perception des contrastes dynamiques (Thomas et al., 2004). A titre d'exemple, la souris *Ins2Akita/+*, un modèle murin de diabète avec des anomalies morphologiques de ses cellules ganglionnaires, caractérisées par des épines dendritiques gonflées et des dendrites à l'aspect grêle, montre une réponse perturbée au test de l'optomètre qui peut être attribuée à ces défauts cellulaires rétiniens (Akimov and Rentería, 2012). La souris *Fmr1* KO montrant un phénotype cellulaire rétinien similaire à celui de ce modèle diabétique, et des perturbations de paramètres de l'ERG liés à la sensibilité au contraste (Rossignol et al., 2014; Perche et al., 2018), nous pouvons affirmer que les anomalies rétinienne des souris *Fmr1* KO participent aux défauts de perception des contrastes dynamiques. Cependant, au niveau cérébral, le colliculus supérieur est une structure sous-corticale fortement impliquée dans la perception du mouvement, et dans les mouvements des yeux et de la tête (Wurtz and Albano, 1980), suggérant que cette aire cérébrale participe à la réponse optocinétique. La souris *Fmr1* KO présentant des anomalies cellulaires et fonctionnelles dans son colliculus supérieur (Kay et al., 2018), en plus de celles dans son cortex visuel (Irwin et al., 2002), il est fort probable que ces anomalies cérébrales participent aux perturbations de sa réponse optocinétique. Ainsi, chez ce modèle, **la composante rétinienne comme la composante sous-corticale sont très certainement impliquées, de manière synergique, dans le défaut de perception du contraste et du mouvement.**

Cependant, l'étude comportementale du modèle *Crx-Cre/cOFF* a mis en évidence une anomalie de la perception des contrastes et mouvements chez ce modèle animal. Ce résultat était pour le moins surprenant, devant l'absence de phénotype fonctionnel rétinien à l'âge adulte. Avec une électrophysiologie rétinienne normale mais des aires visuelles cérébrales (colliculus supérieur et cortex visuel) clairement affectées par la recombinaison du gène *Fmr1*, cet animal présente une réponse diminuée de l'ordre de 30% dans nos conditions expérimentales. Par conséquent, il nous renseigne sur l'implication de ces composantes cérébrales du système visuel dans les performances réalisées avec le test de l'optomètre. Ce modèle suggère pour la première fois que **la diminution spécifique de l'expression du gène *Fmr1* dans les aires visuelles cérébrales (colliculus supérieur et cortex visuel) est suffisante pour induire une perte de la perception et de la compréhension des contrastes et des mouvements.** D'une manière générale, il nous éclaire quant à l'importance de l'intégrité des aires visuelles cérébrales dans la compréhension des contrastes et des mouvements : **tout comme la rétine, les aires visuelles, corticales ou non, sont impliquées dans la perception des stimuli contrastés et en mouvement, et leurs éventuelles anomalies suffisent à impacter la réponse comportementale face à ces stimuli.**

Pour aller plus loin, la diminution de la réponse à ce test est légèrement plus faible avec le modèle *Crx-Cre/cOFF* (sans anomalie fonctionnelle rétinienne) que chez le modèle *Fmr1* KO (présentant une perturbation sensible de l'électrophysiologie rétinienne). Certes, le fond génétique de ces deux modèles n'est pas le même, ce qui induit une différence phénotypique comportementale entre les deux lignées murines. Mais les animaux ont été comparés à leurs propres WT littermate, et les résultats exprimés par rapport à leurs WT respectifs, ce qui atténue l'effet souche sur la comparaison que nous faisons ici. Cette comparaison nous permet d'émettre l'hypothèse que, en absence de protéine FMRP, le phénotype rétinien vient aggraver la perte de sensibilité aux contrastes et aux mouvements due aux anomalies des aires visuelles cérébrales. Bien entendu, cela n'induit pas une relation purement cumulative des phénotypes rétiens et cérébraux. De plus, pour des raisons techniques, les aires visuelles du noyau géniculé latéral n'ont pas été étudiées chez le modèle *Crx-Cre/cOFF*. Toutefois, **la différence de pénétrance phénotypique constatée ici entre les deux modèles, avec un unique test, tend à confirmer que les aires visuelles cérébrales (colliculus et cortex visuel) ne sont pas les seules structures du système visuel impliquées dans la perception des contrastes et des mouvements.**

Par ailleurs, les résultats obtenus chez la souris *Fmr1* KO sont cohérents avec les quelques études du phénotype visuel effectuées chez l'homme (Kogan et al., 2004a; Farzin et al., 2008, 2011). L'ensemble de ces résultats confirment que l'absence de protéine FMRP conduit à une diminution de la capacité de perception des contrastes et des mouvements. Cette belle cohérence entre nos résultats murins et les résultats humains étaye un peu plus la validité du modèle *Fmr1* KO pour l'étude du FXS et de ses multiples facettes, et renforcent les hypothèses de transposition au patient FXS des phénotypes observés chez ce modèle animal.

### *Diminution de la sensibilité aux contrastes*

Enfin, nous avons mis en évidence **une diminution de la capacité à discriminer les contrastes chez les souris *Fmr1* KO**, en jouant sur les niveaux de contrastes des stimuli utilisés dans le test de l'optomètre. Concrètement, ces souris sont moins sensibles à une augmentation du contraste du stimulus qui leur est opposé : elles ont besoin d'une plus grande différence de contraste que les souris contrôles pour augmenter leur niveau de réponse et sortir de leur réponse basale. En ce sens, nous pouvons parler de **seuil de sensibilité au contraste plus haut chez les souris *Fmr1* KO**. Cette observation nous conduit à penser que les mécanismes visuels qui permettent la discrimination de deux luminances sont altérés en absence de la protéine FMRP.

Bien qu'il soit impossible d'attribuer le caractère rétinien et/ou cérébral de cette anomalie, nous pouvons établir un parallèle intéressant avec un résultat obtenu lors de l'étude du phénotype rétinien du FXS. En effet, l'étude électrophysiologique de la rétine de la souris *Fmr1* KO a montré une courbe de sensibilité de l'onde b avec un profil « décalé » sur l'axe des luminances par rapport à celle des animaux WT (Rossignol et al., 2014). Ceci signifie que la luminance du flash minimale nécessaire pour initier une réponse rétinienne est plus élevée chez la souris *Fmr1* KO que chez la souris sauvage. Autrement dit, la

rétine de la souris *Fmr1* KO demande une plus grande différence entre la luminance du flash et celle du fond lumineux pour induire la transmission d'une information au sein de ses couches internes. En ce sens, la rétine *Fmr1* KO possède un seuil de discrimination du contraste plus élevé. A n'en pas douter, ce **phénotype rétinien participe à la diminution de la sensibilité aux contrastes montrée par la souris *Fmr1* KO**. De plus, chez la souris, deux voies visuelles majoritaires divergent dès les premières synapses rétiniennes, et ne se rejoignent qu'une fois arrivées dans le cortex visuel primaire : la voie ON et la voie OFF (Murakami et al., 1975; Slaughter and Miller, 1981; Schiller, 1982; Nakajima et al., 1993). La voie ON est connue pour être meilleure que la voie OFF pour transmettre les faibles contrastes (Zaghloul et al., 2003; Liang and Freed, 2010), et lorsque le contraste augmente, l'inhibition qu'elle exerce sur la voie OFF se réduit, ce qui augmente la réponse des aires visuelles pour des contrastes plus élevés (Manookin et al., 2008; Liang and Freed, 2010). Ces mécanismes rétiniens s'illustrent très bien chez la souris *nob*, dont les voies rétiniennes ganglionnaires ON sont mises en silence grâce à l'absence d'expression des récepteurs GRM6 (Sarnaik et al., 2014). De manière intéressante, des enregistrements électrophysiologiques ont montré que le cortex primaire de ces souris voient sa sensibilité au contraste diminuée (Sarnaik et al., 2014), en association avec une augmentation du seuil de sensibilité au contraste observée chez ces souris lors d'une étude comportementale de leur réflexe optomoteur (Pinto et al., 2007). Nous pouvons dresser un parallèle intéressant avec les résultats obtenus dans notre étude, et **émettre l'hypothèse que les voies rétiniennes ON de la souris *Fmr1* KO sont perturbées en absence de la protéine FMRP**. Ceci est cohérent avec les anomalies cellulaires constatées dans la rétine des souris *Fmr1* KO (Rossignol et al., 2014; Perche et al., 2018), et suggère que les cellules ganglionnaires ON de ce modèle voient leur fonctionnalité affectée par l'absence de protéine FMRP. **Cette anomalie de la voie rétinienne ON aurait un impact jusque dans les aires corticales visuelles, en diminuant leur sensibilité au contraste**. Cela n'exclut pas l'existence potentielle de perturbations des voies OFF chez les souris *Fmr1* KO, mais à ce jour les anomalies de ces voies n'ont été que très peu étudiées, et le peu de littérature disponible ne nous permet pas d'étayer pareille hypothèse. Quoi qu'il en soit, **le phénotype rétinien semble crucial dans l'altération de la sensibilité aux contrastes de la souris *Fmr1* KO**. Pour pouvoir tester une éventuelle implication des anomalies cérébrales à ce phénotype, il aurait été intéressant de tester les animaux *Crx-Cre/cOFF*, présentant des altérations des aires visuelles cérébrales mais sans perturbation de l'ERG, avec les stimuli diversement contrastés. Malheureusement, des limitations techniques et temporelles n'ont pas permis de réaliser cet ensemble de test dans le temps imparti à la thèse.

Cela dit, nous n'avons obtenu ce résultat que lorsque les gris utilisés étaient sombres (proches du noir) et non lorsqu'ils étaient clairs (proches du blanc). Tout d'abord, à notre grande surprise, les performances des souris WT ne diminuent pas avec l'affaiblissement du contraste des stimuli lorsque ceux-ci sont composés de couleurs claires (blanc et gris très clair) (Felgerolle et al., 2019). Ce résultat suggère que les voies de signalisations visuelles mises en jeu face à des couleurs claires et face à des couleurs sombres ne sont pas les mêmes, en conditions physiologiques. Toutefois, à ce jour, ce comportement étonnant reste encore à être élucidé. En parallèle, la souris *Fmr1* KO ne montre, elle aussi, aucune diminution de ces performances dans la discrimination des contrastes clairs, bien que ses

performances aient tendance à rester légèrement plus faibles que celles des souris sauvages (Felgerolle et al., 2019). Quoi qu'il en soit, ces résultats nous renseignent plus finement sur l'anomalie de vision des contrastes : **l'absence de protéine FMRP dans le système visuel induit une diminution globale de la sensibilité au contraste.**

La discrimination des contrastes est une caractéristique visuelle nécessaire à la distinction des éléments qui composent l'environnement. En effet, nous avons montré grâce à un test de reconnaissance de nouvel objet légèrement modifié que la couleur, ici la nuance de gris (noir ou blanc), est une caractéristique utilisée par la souris sauvage pour reconnaître un objet (Felgerolle et al., 2019). La discrimination optimale des contrastes est donc un paramètre crucial pour la compréhension de l'environnement, la distinction d'objets et leur mémorisation (Hoy et al., 2016; Felgerolle et al., 2019). **Nous pouvons dès lors émettre l'hypothèse que le phénotype cognitif décrit chez la souris *Fmr1* KO est impacté par la diminution de leur capacité de discrimination des contrastes, altérant la perception d'objets et de l'environnement, en plus d'être le reflet des perturbations neuronales affectant les aires de la cognition.** A titre d'illustration, certaines tâches comportementales visant à évaluer les paramètres cognitifs chez la souris nécessitent la mémorisation d'éléments visuels, tels que des objets ou des indices placés dans la pièce expérimentale (piscine de Morris, labyrinthe en Y, reconnaissance de nouveaux objets, ...). Lors de telles tâches, les souris *Fmr1* KO ont montré des performances diminuées, attribuées alors à des déficits cognitifs en lien avec le phénotype cellulaire cérébral (Consortium et al., 1994; Bilousova et al., 2009; Bhattacharya et al., 2012; King and Jope, 2013; Hébert et al., 2014; Costa et al., 2018). Toutefois, la souris *Fmr1* KO présentant une diminution de ses capacités visuelles, et notamment de sa capacité à discriminer des contrastes, il est envisageable que cette souris ne soient pas en capacité de distinguer de manière optimale les indices visuels utilisés. **Ainsi, il est fort probable que les performances des souris *Fmr1* KO lors de tels tests soient altérées par leur phénotype visuel.** Ceci conduit à réinterpréter les résultats obtenus avec des tests impliquant les capacités visuelles chez les animaux *Fmr1* KO, et plus largement d'autres modèles animaux de pathologie de la sphère neuropsychiatrique. Ainsi, il convient de s'assurer que les animaux testés sont en capacité de distinguer les indices visuels utilisés, en vérifiant que la pathologie en question n'affecte pas le système visuel et que les indices sont suffisamment contrastés pour être discernables, sans quoi les conclusions du test peuvent être biaisées par le phénotype visuel des animaux. **Le contraste des indices visuels est, dès lors, un paramètre à prendre en compte lors de la mise en place d'un test comportemental.**

A ce jour, aucune donnée n'est disponible concernant une étude des capacités de discrimination des contrastes chez les patients atteints du FXS. En se basant sur nos résultats, il serait intéressant d'investiguer ce paramètre visuel chez les patients. L'existence d'une anomalie de discrimination des contrastes chez les patients FXS est d'autant plus plausible que ceux-ci montrent des anomalies structurales de leur noyau géniculé latéral, et des anomalies cellulaires concernant les neurones magnocellulaires (Kogan et al., 2004b), et il est généralement admis que le système magnocellulaire humain est impliqué dans la détection et la discrimination des stimuli achromatiques à faible contraste (Alexander et al., 2001). Une discrimination altérée des contrastes pourrait influencer plusieurs

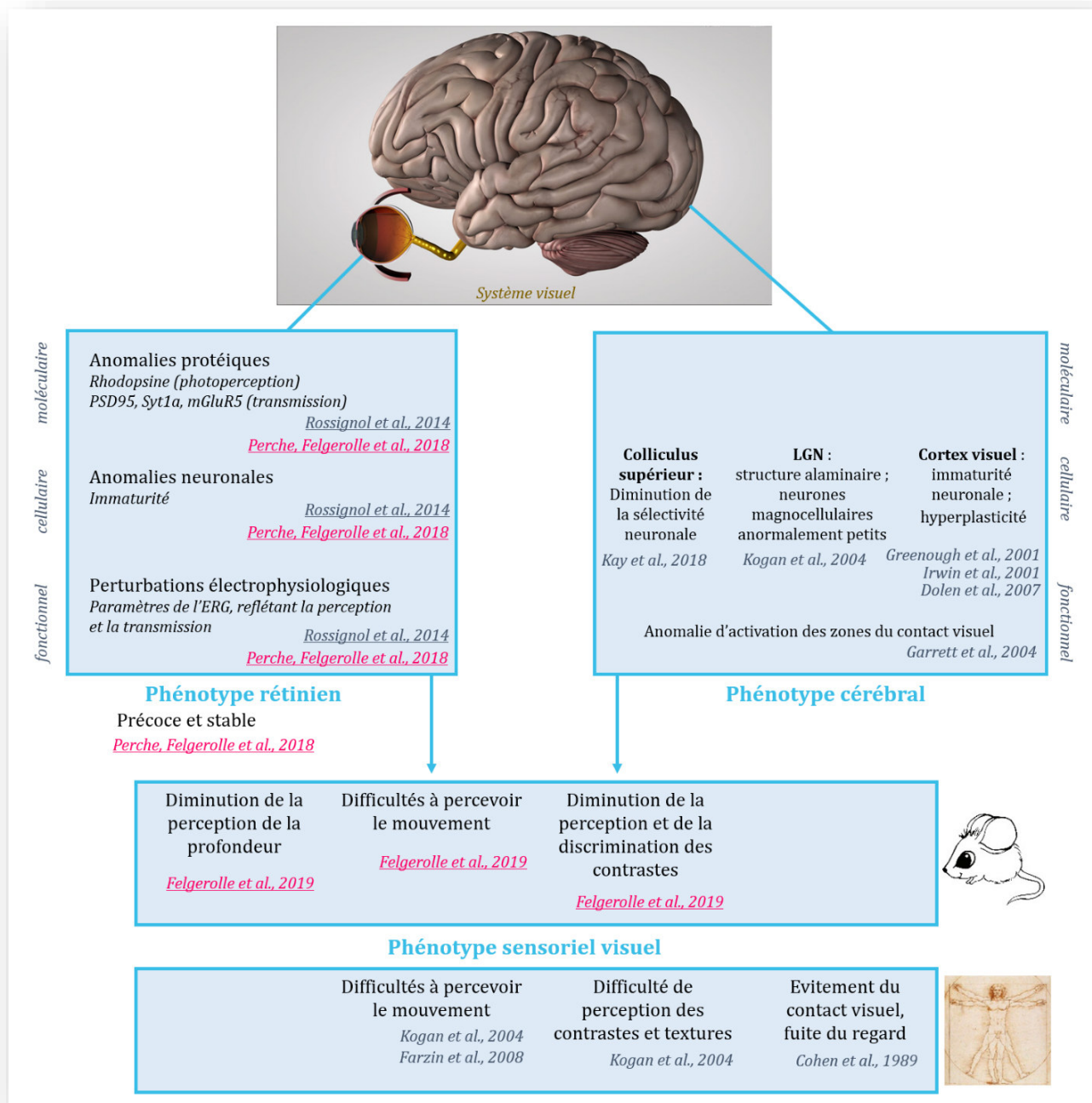
comportements et expliquer certaines incapacités. Nous pourrions imaginer un test très basique, ne nécessitant pas de réflexion et d'analyse, uniquement basé sur la vision de formes simples connues du patient, dessinées de manière plus ou moins contrastée. **En se basant sur nos résultats obtenus chez la souris *Fmr1* KO, les patients atteints du FXS connaissent probablement une diminution de leur capacité de discrimination des contrastes, qu'il serait intéressant d'étudier à l'avenir.** Cette caractéristique pourrait devenir un nouveau marqueur phénotypique simple à évaluer, avec des tests non contraignants et non invasifs.

### *Dernier trait visuel : quid de la vision des couleurs ?*

Pour être tout à fait complet quant à l'investigation des traits visuels, nous aurions dû compléter notre travail par une étude de la vision des couleurs en absence de la protéine FMRP. Cependant, la vision des couleurs chez la souris est totalement différente de celle de l'humain, de par l'absence de macula chez la souris et la très grande différence de composition rétinienne en types de photorécepteurs (Jacobs et al., 2004; Denman et al., 2018). Une étude sensée et pertinente de troubles de la perception des couleurs n'est alors pas envisageable sur un modèle murin de la pathologie. En revanche, l'absence de FMRP au niveau rétinien impacte les photorécepteurs (Rossignol et al., 2014). Cela peut concerner les photorécepteurs de type cône. Il semble alors pertinent d'imaginer que les patients atteints du FXS connaissent des troubles de la vision des couleurs.

### **Connaissance du phénotype visuel du Syndrome de l'X Fragile : où en sommes-nous aujourd'hui ?**

Les résultats obtenus lors du premier axe du travail de thèse ont confirmé l'existence d'un phénotype visuel fort dans le syndrome de l'X fragile. Chez la souris *Fmr1* KO, l'existence d'un phénotype rétinien important, précoce et stable s'ajoute à celle d'un phénotype cérébral pour composer un système visuel altéré dans ses composantes perceptives et intégratives. Cette souris montre alors des anomalies de ses capacités visuelles, caractérisées par une diminution de sa perception des contrastes, des mouvements et de la profondeur. **Nos résultats viennent compléter le tableau des connaissances sur le phénotype sensoriel visuel du FXS. Notre travail pionnier sur la rétine appuie le caractère crucial de l'étude des composantes « périphériques » des systèmes sensoriels pour apprécier l'intégralité des perturbations sensorielles mais aussi les liens de cause à effet qui peuvent exister entre elles** (Figure 84).



**Figure 84 : Bilan des connaissances relatives au phénotype sensoriel visuel du syndrome de l’X fragile après ce travail de thèse.**

Les anomalies phénotypiques comportementales sont mentionnées en précisant si leurs observations ont été notées chez le patient FXS ou chez le modèle murin (annotations par illustrations). Les publications issues de notre équipe sont soulignées. Les publications générées au cours de ce travail de thèse sont notées en rose. LGN : noyau géniculé latéral.

Les phénotypes rétinien (« périphérique ») et cérébral (« central ») concourent à un ensemble de perturbations visuelles, en absence de protéine FMRP. Notons la cohérence des phénotypes humains et murins obtenus par des études comportementales.

## Vers une terminologie plus juste : parlons de dys-sensibilité

Le phénotype visuel du syndrome de l'X fragile se caractérise par une diminution globale des capacités visuelles : la perception du mouvement est diminuée, la vision de la perspective est altérée, la perception et la discrimination des contrastes et textures sont amoindries (Kogan et al., 2004a; Farzin et al., 2008; Felgerolle et al., 2019). Toutes ces caractéristiques composent ce qu'il convient d'appeler **une hypo-sensibilité sensorielle visuelle dans le syndrome de l'X fragile**. Lorsque nous replaçons la vision parmi les autres sens, perturbés eux aussi en absence de protéine FMRP, nous pouvons remarquer qu'elle n'est pas seule à subir une diminution de ses capacités. Comme décrit précédemment, l'absence de FMRP engendre une diminution de la sensibilité olfactive, des troubles de la discrimination des odeurs et par conséquent des défauts d'apprentissages olfactifs (Larson et al., 2008; Schilit Nitenson et al., 2015; Daroles et al., 2016). **Les capacités olfactives sont donc elles aussi diminuées en conditions de FXS, et nous pouvons là encore parler d'hypo-sensibilité**. Ceci contraste avec les informations concernant le toucher : l'évitement des stimuli tactiles, l'aversion pour les contacts même les plus anodins, allant jusqu'au refus de tout contact (Cascio, 2010; Juczewski et al., 2016; He et al., 2017), illustrent d'un point de vue comportemental l'hyperexcitabilité du système somatosensoriel, rendant toute stimulation tactile gênante, voire insupportable. Par conséquent **il convient ici de parler d'hyper-sensibilité tactile**. De manière similaire, les processus de gestion de l'information auditive s'avèrent très sensibles, comme l'illustrent l'augmentation du réflexe de sursaut suite à un son et surtout les impressionnantes crises de convulsions qui peuvent être déclenchées chez les souris *Fmr1* KO face à une forte stimulation auditive (Musumeci et al., 2000, 2007; Chen and Toth, 2001; Nielsen et al., 2002). Ainsi, dans le syndrome de l'X fragile, **l'audition montre un profil d'hyper-sensibilité**. Afin de compléter le tableau sensoriel de cette pathologie, il convient de souligner que le goût n'a pas été étudié. Cependant, une étude a relevé une attirance pour la nourriture sucrée plus élevée chez la souris *Fmr1* KO que chez les animaux WT (Spencer et al., 2011). Ceci va de concert avec l'attirance des jeunes patients pour les sucreries et la nourriture très relevée que les parents reportent régulièrement lors d'enquêtes comportementales. Ces comportements peuvent indiquer, là aussi, des perturbations du système gustatif, qui pousse à relever de manière importante l'alimentation afin de « sentir » un goût. **Ceci laisse suggérer que la sphère gustative est hypo-sensible dans le syndrome de l'X fragile**. Par conséquent, devant ce bilan sensoriel, il ne paraît plus raisonnable d'utiliser le terme « hyper-sensibilité ». **Le phénotype sensoriel du syndrome de l'X fragile est un phénotype complexe, composé d'hyper- et d'hypo- sensibilités. C'est pourquoi, à la suite des descriptions sensorielles visuelles que nous avons réalisées, il semble plus approprié d'employer le terme de dys-sensibilité pour qualifier le phénotype sensoriel du syndrome de l'X fragile.**

## Phénotype visuel : des conséquences bien au-delà de simples « problèmes de vue »

Le phénotype visuel du syndrome de l'X fragile est ainsi en place dès les premiers stades de la vie de l'individu affecté. Farzin et collaborateurs avaient démontré la présence de l'altération de la vision dynamique chez des enfants FXS (Farzin et al., 2011), et l'ensemble de nos résultats portent à croire que ces jeunes patients connaissent également une altération de leur vision de la perspective ainsi que des difficultés de perception et de discrimination des contrastes (Perche et al., 2018; Felgerolle et al., 2019). Si de telles perturbations sont, indéniablement, source de difficultés au quotidien à l'âge adulte, elles revêtent une importance tout autre lors de l'enfance. En effet, les capacités visuelles sont particulièrement cruciales pendant l'enfance, la vision étant la première modalité sensorielle utilisée pour inspecter et apprendre de son environnement (Farzin et al., 2011). Connaitre des difficultés de perception du monde, causées par une vision défaillante, peut ainsi impacter le développement d'un individu sur le plan cognitif et comportemental (West et al., 2002). Par exemple, d'un point de vue scolaire et académique : des troubles de la vision impactent les **apprentissages** fondamentaux, en compliquant la mémorisation de par une vision non optimale du monde environnant, des objets et de divers stimuli visuels (écrits, chiffres, ...). Plus généralement, les problèmes de vision lors de l'enfance compliquent considérablement l'apprentissage de tâches basiques, d'actions communes et quotidiennes, ce qui peut expliquer les difficultés quotidiennes connues par les patients adultes (Raspa et al., 2018). Les troubles de la vision de la perspective et du mouvement peuvent également participer aux **troubles moteurs** décrits chez les patients (Wisniewski et al., 1985; West et al., 2002; Alanay et al., 2007). En effet, le sens de l'équilibre, l'apprentissage de la marche, le contrôle de sa démarche et de sa posture, l'adaptation aux obstacles, sont des actions qui nécessitent une vision optimale des distances, des objets de l'environnement, et une vision fine de la perspective (Rietdyk and Rhea, 2006; Halleman et al., 2009, 2010). La perception du mouvement est également essentielle pour l'orientation et la locomotion fine (Assaiante et al., 1989; Jahn et al., 2001). Ce qui nous emmène vers la motricité fine : les compétences en dessin, la manipulation de petits objets, la précision des gestes lors de tâches psychomotrices qui nécessitent de la précision, sont autant de tâches décrites comme altérées chez les jeunes patients FXS (Crowe and Hay, 1990; Freund and Reiss, 1991; Cornish et al., 1999). L'acquisition de l'écriture, qui nécessite une gestion fine des petites distances et des mouvements, et donc un développement optimal de la motricité fine dès la petite enfance, n'est pas maîtrisée chez une large proportion de patient FXS (Raspa et al., 2018). Ainsi, le phénotype visuel des patients, caractérisé par une diminution de la perception de la perspective, des contrastes fins et des mouvements, participe certainement à leurs retards développementaux et à leurs **incapacités psychomotrices**. Pour finir, il a été montré que les déficits des patients FXS lors de tâches de reconnaissance d'émotion sur des visages seraient le reflet de défauts de gestion de l'information plutôt qu'un trouble de la reconnaissance d'une émotion (Turk and Cornish, 1998). Plusieurs études ont relevé des anomalies dans la manière dont les patients « scannent » un visage lors de ces tâches, notamment une réduction très nette de l'attention portée aux yeux (Dalton



et al., 2008; Shaw and Porter, 2013). Décoder une émotion est une tâche complexe qui débute par une observation de fins et discrets indices, tels qu'un plissement de peau, une ombre, une modification de l'aspect de la peau, et nécessite donc une vision fine des textures et des contrastes (West et al., 2002; Dinon and Boucart, 2005). L'absence de **réciprocité émotionnelle** de patients pourrait alors provenir d'une incapacité purement sensorielle à percevoir ces indices visuels fins sur un visage. D'une manière plus globale, la relation avec d'autres individus passe par des canaux de communication non verbaux, et en particulier la vision. Le phénotype visuel des patients impacte certainement leur perception et leur compréhension des stimuli sociaux, dès le plus jeune âge, ce qui affecte le développement de relations sociales et de **comportements sociaux**.

**C'est pourquoi il y a fort à parier que le phénotype visuel du FXS impacte au-delà de la vision en elle-même** : de nombreuses capacités motrices, cognitives et sociales sont influencées par la vision de notre monde, la perception de notre environnement et la compréhension des nombreux indices visuels qu'il comporte. **Le phénotype visuel peut ainsi détériorer une réponse optimale face à une situation, de par ses conséquences « à l'instant t », mais aussi (et surtout ?) de par les conséquences qu'il aura eues au cours de l'enfance de l'individu, lors du développement, l'apprentissage et la mise en place des réponses à adopter et des compétences sous-jacentes.**

Ainsi, les comportements « anormaux » des patients atteints du syndrome de l'X fragile pourraient s'expliquer, en partie, par une perception perturbée de leur environnement et de ses composants (objets, mouvements, partenaires sociaux). Ceci vaut pour les stimulations visuelles, mais nous pouvons étendre le sujet aux autres sens, notamment l'audition et le toucher, deux canaux de communication et d'apprentissage largement utilisés chez l'humain. Le comportement des patients est adapté à leur propre perception de la réalité, altérée d'une manière propre à chaque individu. Enfin, de manière un peu provocatrice, ne pourrait-on envisager que des comportements sociaux décrits comme autistiques chez les patients FXS soient, en partie, dus à une perception du monde altérée ? Peut-on attendre d'une personne qui a une perception du monde particulière, différente de celle des autres individus, d'avoir un comportement « adapté » ?

## Redonner du sens aux sens

**Nos résultats plaident donc pour une vraie prise en compte du phénotype visuel, et plus largement sensoriel, dans le syndrome de l'X fragile.** Les sens sont le reflet de processus et de mécanismes liés au système nerveux central, et peuvent apporter des connaissances essentielles pour la compréhension de la physiopathologie de cette maladie. **Plus largement, nos résultats participent à un mouvement de réelle prise en considération des phénotypes sensoriels dans les maladies de la sphère neuropsychiatrique, encore bien faible mais qui commence à émerger, et de leur considération comme des outils à part entière dans l'étude d'une pathologie.** A titre d'exemple, une récente étude a démontré qu'il était possible de différencier des malades de Parkinson de personnes atteintes de tremblements (liés à l'âge) par un test de vision des couleurs (Piro et al., 2018). De manière

similaire, la vision des couleurs de patients atteints de sclérose en plaque révèle la sévérité de la maladie : les perturbations de la vision des couleurs chez ces patients suivent l'activité dégénérative, mesurée par des marqueurs cérébraux de la perte axonale, et non l'activité inflammatoire (Martínez-Lapiscina et al., 2014). Le test de vision de couleur étant non invasif, et facile à réaliser et analyser, les auteurs plaident pour une utilisation de ce test comme marqueur de la sévérité de la maladie, et son inclusion dans le suivi de patients lors d'études prospectives et d'essais cliniques (Martínez-Lapiscina et al., 2014). Les résultats que nous avons obtenus lors de l'étude du phénotype visuel du FXS suggèrent que les patients présentent des perturbations de leurs capacités visuelles, qui pourraient être elles aussi investiguées de manière simple et non invasive. Parmi les traits visuels potentiellement altérés d'après nos résultats, le plus drastique s'est avéré être la diminution de la discrimination des contrastes. De plus, celui-ci est le plus simple à étudier chez des patients souffrant de troubles cognitifs et comportementaux, car les tests requièrent peu de temps et sont non invasifs. A l'image de ce que les auteurs précédemment cités proposent, nous pourrions imaginer investiguer la vision des contrastes chez les patients FXS, en utilisant un test simple de type Mars letter ou Pelli-Robson (présentant des lettres, ce qui peut être inadapté face à certains patients) ou Lea test (présentant des objets simples). Ces tests présentent l'avantage d'être statiques, donc les résultats ne seraient pas perturbés par une altération de la vision du mouvement, et sont moins anxiogènes pour des patients souffrant de troubles d'attention et d'hyperactivité. Si l'altération chez le patient s'avère exister, et est démontrée de manière robuste, **nous pourrions envisager que le défaut de sensibilité au contraste devienne un marqueur phénotypique du syndrome de l'X fragile. Pour tester cette hypothèse, une étude clinique est en cours de mise en place sur la base de nos travaux.**

Pour finir, il semble important de souligner que nos études ont redonné une place centrale à la rétine, trop souvent considérée comme « périphérique ». La rétine est une partie intégrante du système nerveux central et elle partage de nombreuses caractéristiques avec les tissus cérébraux, de par leur origine embryonnaire commune (Kaneko, 1979). Loin d'être parfaitement identiques, les contenus protéiques de la rétine et des aires cérébrales partagent de nombreux points communs (London et al., 2013; Chiquita et al., 2019). Il n'est donc pas surprenant de retrouver les phénotypes moléculaires et cellulaires cérébraux du syndrome de l'X fragile au niveau rétinien. Nos résultats suggèrent que nous pourrions élargir le champ à d'autres maladies de la sphère neuropsychiatrique, et faire l'hypothèse que les perturbations moléculaires et cellulaires cérébrales de ces pathologies se retrouvent également au niveau rétinien. La rétine présente le fabuleux avantage d'être facile d'accès, en comparaison des aires cérébrales, et peut être étudiée *in vivo* grâce aux nouvelles techniques d'imagerie. **Elle peut être une fenêtre sur le système nerveux central, et apporter de précieuses informations sur ce dernier, en conditions physiologiques comme pathologiques.** La rétine et le cerveau étant fortement liés, nous pouvons imaginer que les neurodégénérescence cérébrales se déroulent également en parallèle dans la rétine (Jindal, 2015). C'est pourquoi, depuis quelques années, les techniques d'investigation *via* la rétine se sont quelque peu développées, et sont à ce jour utilisées pour diagnostiquer des maladies neurologiques. Par exemple, l'OCT (technique d'imagerie *in vivo*) permet de détecter des modifications

de l'épaisseur et du volume de la macula, un signe clinique de plusieurs maladies neurodégénératives parmi lesquelles la sclérose en plaque (London et al., 2013). L'OCT peut être utilisée pour diagnostiquer de manière anticipée la survenue de la sclérose en plaque, en détectant une névrite optique qui permettra au patient d'être orienté vers un praticien pour des examens ciblés de la sclérose en plaques (Naismith et al., 2009; Frohman et al., 2010). De manière similaire, l'OCT peut mettre en évidence un amincissement de la couche des fibres nerveuses de la rétine, symptôme considéré comme un événement précoce de la maladie d'Alzheimer (Paquet et al., 2007; Kesler et al., 2011; Chiquita et al., 2019). L'utilisation de l'OCT pour un suivi longitudinal de patients est aussi envisagée pour suivre l'évolution d'autres pathologies de neurodégénérescence, comme la schizophrénie (Chu et al., 2012). D'un point de vue plus moléculaire, il a été récemment démontré chez une souris modèle de la maladie d'Alzheimer que des plaques de Béta-amyloïde sont détectables dans la rétine avant qu'elles ne le soient dans le cerveau (Koronyo-Hamaoui et al., 2011). L'imagerie *in vivo* de la rétine représente ainsi un formidable outil pour le diagnostic précoce de la maladie, et pour le suivi des effets d'une stratégie thérapeutique, la réduction des plaques rétinienne ayant suivi celle des plaques cérébrales (Koronyo-Hamaoui et al., 2011). Ainsi, **l'étude de la rétine par imagerie se révèle être une voie d'accès vers les processus et les mécanismes ayant lieu au sein du cerveau, sain comme malade, mais aussi un moyen supplémentaire de diagnostic** (London et al., 2013). Nos résultats viennent donc appuyer un peu plus l'importance d'investiguer la rétine dans les maladies de la sphère neuropsychiatrique, et le rôle de « fenêtre » sur les aires cérébrales qu'elle représente, avec toutes les opportunités et les possibilités qui s'ouvrent en conséquence.

# Conclusion

La connaissance des conséquences de l'absence de la protéine FMRP sur le système visuel se voit ainsi étendue à la fin de ce travail de thèse. Notamment en ce qui concerne le phénotype rétinien du syndrome de l'X fragile, dont la précocité impacte, à n'en pas douter, la maturation des aires visuelles situées en aval de la rétine dans le système visuel. Ces structures, dont certains mécanismes clés pour leur développement dépendent des signaux visuels émis par la rétine, reçoivent dès les premiers instants des informations perturbées, mettant en jeu leur maturation optimale. Ainsi, le phénotype rétinien impacte les capacités visuelles de manière « directe », en percevant et transmettant des informations visuelles perturbées, mais aussi de manière « indirecte », en impactant la fonctionnalité intégrative des aires visuelles cérébrales. Le phénotype de ce tissu « périphérique » n'est donc pas anecdotique.

Ce travail souligne également l'importance du phénotype visuel dans le syndrome de l'X fragile. Pour la première fois, les conséquences de l'absence de la protéine FMRP sur les capacités visuelles ont été clairement décrites. Au-delà des troubles de la vision qu'elles engendrent, les perturbations visuelles créent des incapacités à réaliser de manière optimale des tâches du quotidien, de mémorisation, de motricité, ou de sociabilité. A n'en pas douter, ces anomalies visuelles présentent dès le plus jeune âge sont un frein aux développements cognitif, moteur, émotionnel et social du jeune patient. Il semble donc capital de prendre en compte ces anomalies visuelles, et sensorielles, afin d'améliorer la compréhension des symptômes cliniques du syndrome de l'X fragile, leur développement et leur évolution au cours de la vie des patients. En particulier, il y a fort à parier que des comportements « autistiques » sont les conséquences de perturbations sensorielles qui déforment le ressenti des patients vis-à-vis du monde qui les entoure.

L'ensemble de ces résultats accentue l'importance d'étudier les troubles visuels, et plus largement sensoriels, dans les pathologies de la sphère neuropsychiatrique. Les systèmes sensoriels apportent de précieuses informations sur les conséquences cellulaires et fonctionnelles d'une maladie, et leurs manifestations externes représentent un moyen d'accéder à des troubles internes. Au-delà des aspects comportementaux, qui trahissent la présence de troubles sensoriels, nous pouvons aussi souligner les qualités de voie d'accès que représentent les organes sensoriels « périphériques ». Loin d'être des satellites relégués au rôle de purs capteurs et transmetteurs des stimuli sensoriels, ils sont des parties intégrantes du système nerveux, effectuant une première phase d'intégration des signaux, et partagent des caractéristiques physiologiques avec les structures cérébrales. Leurs localisations anatomiques les rendent faciles d'accès, et en font de formidables outils d'études du système nerveux, sain et pathologique. Il est enthousiasmant de constater que les techniques, notamment d'imagerie, utilisant la rétine comme tissu d'intérêt pour le diagnostic et le suivi thérapeutique tendent à se développer. Nos résultats s'inscrivent dans cette tendance, et viennent étayer un peu plus la philosophie qui redonne une place centrale à la rétine, comme une fenêtre sur notre cerveau.

# Perspective

## De la nécessité d'étudier Otx2 dans le FXS

### *Petit tour dans la littérature du système visuel*

#### *Période critique et maturation du cortex visuel*

Les circuits neuronaux cérébraux sont modulés par l'expérience durant une phase précoce de la vie postnatale appelée période critique. Dans le cortex visuel primaire, ce développement est déclenché par la maturation fonctionnelle de connexions locales inhibitrices, menée par le développement d'un ensemble d'interneurones (Hensch, 2005). Dans le cortex visuel, le circuit inhibiteur comprend des interneurones qui expriment la parvalbumine (PV), une protéine fixatrice de calcium. Ces cellules, appelées cellules PV (Hensch, 2005), projettent leurs axones pour entourer les corps des cellules pyramidales avec leurs terminaux synaptiques porteurs de GABA (Huang and Di Cristo, 2008). Les cellules pyramidales du cortex visuel ont besoin de cet entourage pour définir leur période de plasticité durant le développement postnatal (Hensch, 2005). C'est donc bien le développement du réseau inhibiteur au cours de stades précoces postnataux qui permet la maturation des aires corticales visuelles. Certaines études se sont alors interrogées sur les mécanismes déclencheurs et les signaux qui initieraient de tels processus

#### *De la détermination d'un partenaire moléculaire crucial, Otx2, ...*

Une famille particulière de protéines intervient dans la signalisation postnatale du système nerveux en développement, et peut agir comme facteur de transcription : ce sont les homéoprotéines (Prochiantz et al., 2014; Prochiantz and Di Nardo, 2015). Les homéoprotéines se caractérisent par leur long domaine de liaison à l'ADN, ainsi que par leurs séquences permettant leur sécrétion et leur internalisation cellulaire (Joliot and Prochiantz, 2004; Prochiantz et al., 2014). Cette famille contient une protéine retenant l'attention depuis quelques années : la protéine Otx2. Celle-ci est exprimée très tôt dans les stades embryonnaires, et joue un rôle crucial en particulier dans la régionalisation du système nerveux central, mais aussi dans la neurogénèse des neurones dopaminergique du cerveau en développement (Bebby and Lamonerie, 2013). Mais le rôle d'Otx2 qui retient l'attention se situe plutôt dans son action durant la période critique de plasticité cérébrale, en lien avec les cellules PV.

Chez une souris sauvage, avant la période critique de la plasticité cérébrale, la protéine Otx2 ainsi que la parvalbumine (PV) sont faiblement présentes dans le cortex visuel. Leurs niveaux vont s'intensifier simultanément, au niveau des interneurones GABAergiques PV, lors de l'entrée dans la période critique (Sugiyama et al., 2008). Dans le cas où la souris est privée d'expérience visuelle (élevage dans le noir ou énucléation), les niveaux corticaux d'Otx2 et de PV sont quasi nuls lors de la période critique durant laquelle devrait avoir lieu la plasticité corticale, là où les niveaux de ces protéines sont à leur maximal en

conditions physiologiques (Sugiyama et al., 2008). De plus, dans ce cas de privation d'expérience visuelle, le réseau péri-neuronal (PNN, en anglais *PeriNeuronal Net*) entourant les cellules PV est fortement dégradé (Bernard and Prochiantz, 2016). En revanche, l'infusion corticale d'Otx2 permet un rétablissement des niveaux d'Otx2 et de PV dans les cellules PV, mais aussi du PNN autour de ces cellules (Sugiyama et al., 2008; Bernard and Prochiantz, 2016). **Ces résultats illustrent le rôle de promoteur de la maturation des cellules PV et de leur environnement que joue Otx2 dans le cortex visuel.** D'autres expériences réalisées par l'équipe de Sugiyama s'ajoutent à ces résultats pour confirmer que **Otx2 active la période critique de plasticité corticale via la maturation fonctionnelle des circuits inhibiteurs.** L'ensemble de ces résultats affirme donc que **la protéine Otx2 est nécessaire à un processus de maturation des aires corticales visuelles (la maturation des cellules PV), qui active l'entrée dans la période critique de plasticité corticale, et la présence de cette protéine est conditionnée par la survenue d'expériences visuelles** (Sugiyama et al., 2008).

#### *... vers la preuve de la participation centrale de la rétine*

Cependant, il fut très surprenant de constater que si le cortex visuel montre bien la présence de la protéine Otx2, il ne contient aucun transcrite du gène *Otx2*. Dans le système visuel, les ARNm d'*Otx2* sont détectés uniquement dans les régions sous-corticales (LGN et colliculus supérieur) et dans la rétine (Sugiyama et al., 2008). **La protéine Otx2 présente dans le cortex visuel, et nécessaire à ses processus de maturation et de plasticité, n'est pas synthétisée dans le cortex** (Sugiyama et al., 2008). En tant qu'homéoprotéine, Otx2 contient dans la séquence de son homéodomaine des signaux de sécrétion et d'internalisation, qui peuvent lui permettre d'être transférée de cellule en cellule (Joliot and Prochiantz, 2004). Il serait donc tout à fait possible que les protéines Otx2 présentes dans le cortex visuel soient synthétisées dans la rétine et/ou les aires sous-corticales puis migrent vers le cortex visuel. Pour montrer la migration d'Otx2 dans le système visuel, l'expérience phare de l'article de Sugiyama et collaborateurs consiste à injecter de la protéine Otx2 marquée avec de la biotine dans la rétine de l'animal. Quelques jours plus tard, des imageries ont révélé la présence d'Otx2 biotinylée dans les cellules PV du cortex visuel de l'animal injecté (Sugiyama et al., 2008). La preuve était faite que la protéine Otx2 présente dans la rétine migre vers le cortex visuel pour permettre la maturation et la plasticité des aires corticales visuelles. Ce transfert a été démontré et validé par différentes expériences par la suite (Sugiyama et al., 2008). L'ensemble des résultats obtenus par l'équipe de Sugiyama démontre que **la protéine Otx2 est synthétisée hors du cortex, et en particulier dans la rétine, puis est transférée vers le cortex visuel pour y induire la maturation des circuits inhibiteurs.** Enfin, l'équipe a démontré que **le transfert d'Otx2 de la rétine vers le cortex visuel ne peut s'effectuer que lorsque le système visuel connaît des expériences visuelles** (Sugiyama et al., 2008).

#### *Environnement cellulaire*

La réponse aux questions concernant le transfert d'Otx2 et sa capture spécifique dans les cellules PV pourrait se trouver dans les molécules de la matrice extracellulaire qui entoure les cellules PV. Le PNN représente depuis plusieurs années le centre de l'attention des études de la plasticité cérébrale

(Pizzorusso et al., 2002; Hensch, 2005). En effet, si ce PNN est chimiquement dissous, la période de plasticité peut être ré-ouverte dans un cortex adulte (Pizzorusso et al., 2002). Ceci suggère que le PNN joue un rôle majeur dans la régulation de la fenêtre temporelle de la période de plasticité corticale. Le PNN abrite des composants de la matrice extracellulaire (acide hyaluronique, et certains sucres), qui pourraient expliquer la capture d'Otx2 spécifique aux cellules PV : les sucres présents dans le PNN des cellules PV pourraient piéger Otx2 et faciliter son internalisation (Rebsam and Mason, 2008). Ainsi, **la qualité du PNN entourant les cellules PV impacte la capture et l'internalisation dans les cellules PV des protéines Otx2 qui lui parviennent.**

### *Quel lien avec le syndrome de l'X fragile ou la souris Fmr1 KO ?*

Sur la base des travaux de Sugiyama et collaborateurs, il s'avère donc que la maturation des aires visuelles corticales nécessite **1)** la production rétinienne de la protéine Otx2, et **2)** des « expériences visuelles » suffisamment qualitatives pour assurer un transfert optimal de la protéine Otx2 vers le cortex visuel (Sugiyama et al., 2008). De plus, **3)** les cellules PV sont des interneurons capitaux dans la maturation des circuits inhibiteurs du cortex visuel (Hensch, 2005). En complément, les travaux sur le PNN indiquent que **4)** la qualité du PNN impacte la maturation corticale, sa dégradation ou son absence remettent alors en jeu le déroulé des processus développementaux de la période critique de plasticité corticale (Pizzorusso et al., 2002; Rebsam and Mason, 2008).

Ainsi, il me semble intéressant de transposer ces conditions chez le modèle *Fmr1* KO.

**1)** Tout d'abord, l'absence de protéine FMRP dans la rétine impacte probablement le niveau d'expression de la protéine Otx2. La littérature ne décrit pas si les ARNm d'*Otx2* font partie des messagers dont la traduction est régulée par la protéine FMRP. Toutefois, **devant le grand panel d'ARNm régulés par FMRP, et les anomalies protéiques relevées dans la rétine des souris Fmr1 KO (Rossignol 2014, Perche 2018), il semble qu'il existe un risque non négligeable que la quantité rétinienne de protéine Otx2 soit dérégulée en absence de FMRP.** Par conséquent, la quantité d'Otx2 disponible pour la maturation des aires corticales serait dérégulée.

**2)** Ensuite, la souris *Fmr1* KO montre des anomalies significatives de l'ERG, tant dans ses paramètres de perception des signaux lumineux que dans ses paramètres de transmission de l'information visuelle au sein de la rétine interne (Rossignol et al., 2014; Perche et al., 2018). Par conséquent, l'information visuelle que transmet la rétine aux aires cérébrales est de qualité moindre, pour une même expérience visuelle, chez une souris *Fmr1* KO que chez une souris WT. **Nos résultats concernant la fonctionnalité rétinienne de la souris Fmr1 KO étayent l'hypothèse que les expériences visuelles vécues par le système visuel en absence de protéine FMRP sont de qualité moindre, et altèrent le transfert d'Otx2 vers le cortex visuel.**

**3)** De plus, le cortex somatosensoriel de la souris *Fmr1* KO montre une diminution de la densité et de la distribution spécifique des interneurons PV, et non des autres types d'interneurons (calbindine et calrétinine) (Selby et al., 2007). De la même manière, le développement des cellules PV du cortex auditif de cette lignée s'est révélée altéré (Wen et al., 2018). Aucune donnée n'est disponible concernant le cortex visuel, mais **ces résultats obtenus dans d'autres cortex sensoriels soutiennent l'hypothèse**

**que le cortex visuel des souris *Fmr1* KO présente le même type d'anomalie cellulaire, c'est-à-dire une perturbation de ses interneurons PV.**

**4) Enfin, il a été récemment démontré que le développement du PNN est altéré dans le cortex auditif des souris *Fmr1* KO (Reinhard 2019, Rais 2018). Ce résultat obtenu sur un autre cortex sensoriel suggère que le cortex visuel peut souffrir lui aussi d'une qualité altérée de son PNN.**

**Ainsi, de nombreux indices suggèrent que les aires corticales visuelles peuvent souffrir d'un défaut de maturation en absence de la protéine FMRP, causé par des anomalies concernant le système « Otx2-PV-PNN ». L'absence de FMRP dans la rétine peut déstabiliser tout ce système inhibiteur, et être un élément clé de l'altération de la plasticité du cortex visuel constaté chez la souris *Fmr1* KO (Dolen et al., 2007). C'est pourquoi l'étude du système « Otx2-PV » chez cette souris me semble un projet perspective intéressant pour faire suite aux travaux de notre laboratoire, sur l'implication du phénotype rétinien dans le phénotype sensoriel du FXS.**

#### *Proposition d'étude expérimentale*

Une première étape du travail serait d'étudier les niveaux de protéines Otx2 dans la rétine et dans le cortex visuel de l'animal *Fmr1* KO. Il me semble judicieux de travailler sur des âges décrits comme encadrant la période critique de plasticité corticale (P19 et P40) ainsi qu'un âge connu pour être le pic de cette période critique (P28-29). Si ces niveaux se voient altérés dans l'une de ces structures, une investigation de la parvalbumine et de l'état de maturation des cellules PV du cortex visuel des souris serait intéressant, par exemple par techniques d'immunohistochimie sur des coupes *ex vivo* à ces différents âges. L'état du réseau PNN du cortex visuel des souris *Fmr1* KO nécessiterait aussi notre attention, à différents âges autour de la période critique de plasticité. Les résultats obtenus lors de ces expériences détermineront les directions à donner par la suite, pour approfondir les connaissances de la plasticité corticale en absence de la protéine FMRP.



# Annexes

# Productions scientifiques

## Publications dans des journaux de rang A

**2019** : Felgerolle, C.\*, Hébert, B\*, Ardourel, M., Meyer-Dilhet, G., Menuet, A., Pinto-Morais, K., et al. (2019). Visual Behavior Impairments as an Aberrant Sensory Processing in the Mouse Model of Fragile X Syndrome. *Front. Behav. Neurosci.* 13. doi:10.3389/fnbeh.2019.00228.

**2018** : Perche, O.\*, Felgerolle, C.\*, Ardourel, M., Bazinet, A., Pâris, A., Rossignol, R., et al. (2018). Early Retinal Defects in Fmr1-/-y Mice: Toward a Critical Role of Visual Dys-Sensitivity in the Fragile X Syndrome Phenotype? *Front. Cell. Neurosci.* 12. doi:10.3389/fncel.2018.00096.

\* : co-premiers auteurs

## Articles en préparation

Ardourel M., Felgerolle C., Pâris A., Acar N., Ramchadi K., Ueda N., Rossignol R., Bazinet A., Briault S., Ranchon-Cole I. and Perche O. Dietary supplement enriched in antioxidants and omega-3 impacts Glutamate / Glutamine metabolic cycle in Müller cells culture with or without oxidative stress.

Felgerolle C., Villalonga E., Poidras E., Rossignol R., Cauquis C., Briault S. and Perche O. Genetic recombination using transgenic mice Tg(*Crx-Cre*) targets further than retina.

Felgerolle C., Meyer-Dilhet, G., Menuet A., Bizot J.C., Briault S. and Perche O. Simple investigation of contrasted-motion perception using the Optomotor Drum.

## Communications

### *Communications affichées*

Felgerolle C., Hébert B, Pâris A, Ardourel M, Rossignol R, Bazinet A, Meyer-Dilhet G, Menuet A, Pichon J, Ranchon-Cole I, Briault S et Perche O. *Retinal alterations and visual dys-sensitivity in the Fragile X Syndrome*

Journée scientifique de la SFR FED 4226 Centre Val de Loire, Tours, 12 juin 2019

Felgerolle C., Hébert B, Pâris A, Ardourel M, Rossignol R, Bazinet A, Meyer-Dilhet G, Menuet A, Pichon J, Ranchon-Cole I, Briault S et Perche O. *Retinal alterations and visual dys-sensitivity in the Fragile X Syndrome*

Congrès NeuroFrance 2019, Marseille, du 22 au 24 mai 2019

Felgerolle C., Pâris A, Ardourel M, Bazinet A, Rossignol R, Dilhet G, Menuet A, Pichon J, Ranchon-Cole I, Briault S et Perche O. *Retinal alterations and visual hypersensitivity in the Fragile X Syndrome*  
3ème journée thématique de la société des neurosciences, Strasbourg juin 2018

Felgerolle C, Pâris A, Ardourel M, Bazinet A, Rossignol R, Dilhet G, Menuet A, Pichon J, Ranchon-Cole I, Briault S et Perche O. *Retinal alterations and visual hypersensitivity in the Fragile X Syndrome* Assises de Génétique Humaines, Nantes, du 24 au 26 janvier 2018

Felgerolle C, Pâris A, Ardourel M, Bazinet A, Rossignol R, Dilhet G, Menuet A, Pichon J, Ranchon-Cole I, Briault S et Perche O. *Retinal alterations and visual hypersensitivity in the Fragile X Syndrome* Congrès Biotechnocentre, Seillac, du 12 au 13 octobre 2017

### *Communications orales*

Felgerolle C. (2018) *Etude de l'hypersensibilité sensorielle visuelle dans le Syndrome de l'X Fragile*. Concours international « Ma Thèse en 180s », édition 2018, sélection locale, Orléans.

Felgerolle C. (2018) *Etude de l'hypersensibilité sensorielle visuelle dans le Syndrome de l'X Fragile*. Concours international « Ma Thèse en 180s », édition 2018, sélection régionale, Tours-La Riche.

Felgerolle C. (2018) *Etude de l'hypersensibilité sensorielle visuelle dans le Syndrome de l'X Fragile*. Concours international « Ma Thèse en 180s », édition 2018, sélection nationale, Paris.

# *Prix et récompenses*

## Prix pour communications affichées

**2019 : Prix du poster**, Journée scientifique de la SFR FED 4226 Centre Val de Loire, Tours, 12 juin 2019

**2017 : Prix du poster**, filière C (Chimie et physique du vivant, Systèmes biologiques), 30<sup>e</sup> Colloque Biotechnocentre, Seillac.

## Récompenses pour communications orales

**2018 : Premier prix du jury** (1/12) lors du concours international de communication orale vulgarisée « Ma Thèse en 180s », étape de sélection locale organisée à Orléans.

**2018 : Prix du public et Premier prix du jury** (1/24) lors du concours international de communication orale vulgarisée « Ma Thèse en 180s », étape de sélection régionale organisée à Tours-La Riche.

# *Projets scientifiques*

**2018 :** Participation au concours international « **Ma Thèse en 180s** ». L'objectif est d'expliquer au grand public son sujet de thèse, ses objectifs et ses enjeux, de manière vulgarisée, le tout en moins de 3 minutes. Vulgarisation, communication orale à l'adresse du grand public extérieur au laboratoire et au monde de la recherche scientifique. Réalisation d'interviews journalistiques et radiophoniques.

**2016-2019 :** Participation au projet Investissement d'Avenir « **EDIFICE** » mis en place entre l'Université d'Orléans et le lycée Benjamin Franklin d'Orléans. L'objectif est d'accueillir et d'encadrer un groupe de lycéens, durant leurs trois années de lycée, dans le laboratoire où se déroule la thèse, afin de leur faire découvrir le monde de la recherche et le travail de chercheur. Accueil à raison de 4h toutes les 2 semaines. Organisation des projets, transmission de connaissances, préparation et réalisation de projets d'expérimentations, encadrement des élèves. Réalisation d'une communication orale lors d'un colloque dédié, ainsi que du dossier écrit et oral de l'épreuve de TPE du Baccalauréat.

# *Encadrement*

- 2019** : étudiant en **1<sup>ère</sup> année de BTS** « Biotechnologie », Lycée Jacques Monod. Encadrement de Poidras Etienne pour le projet « Caractérisation moléculaire d'un modèle murin dans le cadre de l'étude du Syndrome de l'X Fragile ».
- 2018** : étudiant en **1<sup>ère</sup> année de Master** « Biochimie, biologie moléculaire et biotechnologies », Université d'Orléans. Encadrement de Villalonga Elodie pour le projet « Participation à la caractérisation d'un nouveau modèle animal dans le cadre de l'étude de l'implication de la rétine dans le phénotype d'hypersensibilité sensorielle visuelle du Syndrome de l'X Fragile ».
- 2017** : étudiant en **1<sup>ère</sup> année de cycle Ingénieur** « Chimie Biologie Santé », Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier (ENSCM). Encadrement de Ueda Natsuko pour le projet « Evaluation de l'impact d'un complément alimentaire sur le fonctionnement rétinien et plus particulièrement sur un type de cellules rétiniennes (cellules de Muller) ».

# *Formations*

- 2019** : Formation « initiation à la gestion comptable et financière », Université d'Orléans, Orléans.
- 2019** : Formations transversales sciences humaines « utilisation du logiciel Zotero », « gérer sa e-réputation » et « droit d'auteurs et open access », Université d'Orléans, Orléans.
- 2018** : Formation « réussir une communication orale » dans le cadre de la participation au concours « Ma Thèse en 180s », Université d'Orléans, Orléans.
- 2017** : Formation à l'expérimentation animale, niveau concepteur (niveau 1) – option rongeurs, Faculté de Pharmacie de Paris, Université Paris Descartes, Paris.
- 2017** : Cycle de conférences du Collège de France « Parole, musique, mathématiques : les langages du cerveau », enseigné par le Dr Dehaene Stanislas, Collège de France, Paris.
- 2017** : Enseignement « pour une histoire de la conception de la lumière », Université d'Orléans, Orléans.
- 2017** : Cycle de conférences « introduction à la chimie médicinale », Université d'Orléans, Orléans.
- 2016** : Cycle de conférences du Collège de France « Neurogénétique de la physiologie auditive », enseigné par le Dr Petit Christine, Collège de France, Paris.

# Bibliographie

- Abitbol, M., Menini, C., Delezoide, A. L., Rhyner, T., Vekemans, M., and Mallet, J. (1993). Nucleus basalis magnocellularis and hippocampus are the major sites of FMR-1 expression in the human fetal brain. *Nat. Genet.* 4, 147–153. doi:10.1038/ng0693-147.
- Abrams, M. T., Kaufmann, W. E., Rousseau, F., Oostra, B. A., Wozozin, B., Taylor, C. V., et al. (1999). FMR1 gene expression in olfactory neuroblasts from two males with fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 82, 25–30.
- Adinolfi, S., Ramos, A., Martin, S. R., Dal Piaz, F., Pucci, P., Bardoni, B., et al. (2003). The N-terminus of the fragile X mental retardation protein contains a novel domain involved in dimerization and RNA binding. *Biochemistry (Mosc.)* 42, 10437–10444. doi:10.1021/bi034909g.
- Adlof, S. M., Klusek, J., Shinkareva, S. V., Robinson, M. L., and Roberts, J. E. (2015). Phonological awareness and reading in boys with fragile X syndrome. *J. Child Psychol. Psychiatry* 56, 30–39. doi:10.1111/jcpp.12267.
- Agulhon, C., Blanchet, P., Kobetz, A., Marchant, D., Faucon, N., Sarda, P., et al. (1999). Expression of FMR1, FXR1, and FXR2 genes in human prenatal tissues. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58, 867–880. doi:10.1097/00005072-199908000-00009.
- Akimov, N. P., and Rentería, R. C. (2012). Spatial frequency threshold and contrast sensitivity of an optomotor behavior are impaired in the Ins2Akita mouse model of diabetes. *Behav. Brain Res.* 226, 601–605. doi:10.1016/j.bbr.2011.09.030.
- Akins, M. R., Leblanc, H. F., Stackpole, E. E., Chyung, E., and Fallon, J. R. (2012). Systematic mapping of fragile X granules in the mouse brain reveals a potential role for presynaptic FMRP in sensorimotor functions. *J. Comp. Neurol.* 520, 3687–3706. doi:10.1002/cne.23123.
- Alanay, Y., Unal, F., Turanlı, G., Alikışıoğlu, M., Alehan, D., Akyol, U., et al. (2007). A multidisciplinary approach to the management of individuals with fragile X syndrome. *J. Intellect. Disabil. Res. JIDR* 51, 151–161. doi:10.1111/j.1365-2788.2006.00942.x.
- Alexander, K. R., Pokorny, J., Smith, V. C., Fishman, G. A., and Barnes, C. S. (2001). Contrast discrimination deficits in retinitis pigmentosa are greater for stimuli that favor the magnocellular pathway. *Vision Res.* 41, 671–683. doi:10.1016/s0042-6989(00)00286-8.
- Allen, C. B., Celikel, T., and Feldman, D. E. (2003). Long-term depression induced by sensory deprivation during cortical map plasticity in vivo. *Nat. Neurosci.* 6, 291–299. doi:10.1038/nn1012.
- Allingham-Hawkins, D. J., Babul-Hirji, R., Chitayat, D., Holden, J. J., Yang, K. T., Lee, C., et al. (1999). Fragile X premutation is a significant risk factor for premature ovarian failure: the International Collaborative POF in Fragile X study--preliminary data. *Am. J. Med. Genet.* 83, 322–325.
- Aloisi, E., Le Corf, K., Dupuis, J., Zhang, P., Ginger, M., Labrousse, V., et al. (2017). Altered surface mGluR5 dynamics provoke synaptic NMDAR dysfunction and cognitive defects in Fmr1 knockout mice. *Nat. Commun.* 8, 1103. doi:10.1038/s41467-017-01191-2.
- Aman, M. G., Singh, N. N., Stewart, A. W., and Field, C. J. (1985). The aberrant behavior checklist: a behavior rating scale for the assessment of treatment effects. *Am. J. Ment. Defic.* 89, 485–491.

- American Psychiatric Association (2000). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Edition, Text Revision (DSM-IV-TR)*. American Psychiatric Association.
- American Psychiatric Association (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5®)*. American Psychiatric Pub.
- Angelis, A., Tordrup, D., and Kanavos, P. (2015). Socio-economic burden of rare diseases: A systematic review of cost of illness evidence. *Health Policy Amst. Neth.* 119, 964–979. doi:10.1016/j.healthpol.2014.12.016.
- Antar, L. N., Afroz, R., Dichtenberg, J. B., Carroll, R. C., and Bassell, G. J. (2004). Metabotropic glutamate receptor activation regulates fragile x mental retardation protein and FMR1 mRNA localization differentially in dendrites and at synapses. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 2648–2655. doi:10.1523/JNEUROSCI.0099-04.2004.
- Antar, L. N., Li, C., Zhang, H., Carroll, R. C., and Bassell, G. J. (2006). Local functions for FMRP in axon growth cone motility and activity-dependent regulation of filopodia and spine synapses. *Mol. Cell. Neurosci.* 32, 37–48. doi:10.1016/j.mcn.2006.02.001.
- Arinami, T., Sato, M., Nakajima, S., and Kondo, I. (1988). Auditory brain-stem responses in the fragile X syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 43, 46–51.
- Arnett, M. T., Herman, D. H., and McGee, A. W. (2014). Deficits in tactile learning in a mouse model of fragile X syndrome. *PLoS One* 9, e109116. doi:10.1371/journal.pone.0109116.
- Arsenault, J., Gholizadeh, S., Niibori, Y., Pacey, L. K., Halder, S. K., Koxhioni, E., et al. (2016). FMRP Expression Levels in Mouse Central Nervous System Neurons Determine Behavioral Phenotype. *Hum. Gene Ther.* 27, 982–996. doi:10.1089/hum.2016.090.
- Ashley, C. T., Sutcliffe, J. S., Kunst, C. B., Leiner, H. A., Eichler, E. E., Nelson, D. L., et al. (1993a). Human and murine FMR-1: alternative splicing and translational initiation downstream of the CGG-repeat. *Nat. Genet.* 4, 244–251. doi:10.1038/ng0793-244.
- Ashley, C. T., Wilkinson, K. D., Reines, D., and Warren, S. T. (1993b). FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding. *Science* 262, 563–566.
- Assaiante, C., Marchand, A. R., and Amblard, B. (1989). Discrete visual samples may control locomotor equilibrium and foot positioning in man. *J. Mot. Behav.* 21, 72–91. doi:10.1080/00222895.1989.10735466.
- Bagni, C., and Greenough, W. T. (2005). From mRNP trafficking to spine dysmorphogenesis: the roots of fragile X syndrome. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 376–387. doi:10.1038/nrn1667.
- Bailey, D. B., Berry-Kravis, E., Wheeler, A., Raspa, M., Merrien, F., Ricart, J., et al. (2016). Mavoglurant in adolescents with fragile X syndrome: analysis of Clinical Global Impression-Improvement source data from a double-blind therapeutic study followed by an open-label, long-term extension study. *J. Neurodev. Disord.* 8, 1. doi:10.1186/s11689-015-9134-5.
- Bailey, D. B., Raspa, M., Olmsted, M., and Holiday, D. B. (2008). Co-occurring conditions associated with FMR1 gene variations: findings from a national parent survey. *Am. J. Med. Genet. A.* 146A, 2060–2069. doi:10.1002/ajmg.a.32439.
- Baker, E. K., Arpone, M., Aliaga, S. M., Bretherton, L., Kraan, C. M., Bui, M., et al. (2019). Incomplete silencing of full mutation alleles in males with fragile X syndrome is associated with autistic features. *Mol. Autism* 10, 21. doi:10.1186/s13229-019-0271-7.

- Bakker, C. E., de Diego Otero, Y., Bontekoe, C., Raghoe, P., Luteijn, T., Hoogeveen, A. T., et al. (2000). Immunocytochemical and biochemical characterization of FMRP, FXR1P, and FXR2P in the mouse. *Exp. Cell Res.* 258, 162–170. doi:10.1006/excr.2000.4932.
- Baranek, G. T., Danko, C. D., Skinner, M. L., Bailey, D. B., Hatton, D. D., Roberts, J. E., et al. (2005). Video analysis of sensory-motor features in infants with fragile X syndrome at 9-12 months of age. *J. Autism Dev. Disord.* 35, 645–656. doi:10.1007/s10803-005-0008-7.
- Baranek, G. T., Roberts, J. E., David, F. J., Sideris, J., Mirrett, P. L., Hatton, D. D., et al. (2008). Developmental trajectories and correlates of sensory processing in young boys with fragile X syndrome. *Phys. Occup. Ther. Pediatr.* 28, 79–98.
- Barnes, E., Roberts, J., Long, S. H., Martin, G. E., Berni, M. C., Mandulak, K. C., et al. (2009). Phonological accuracy and intelligibility in connected speech of boys with fragile X syndrome or Down syndrome. *J. Speech Lang. Hear. Res. JSLHR* 52, 1048–1061. doi:10.1044/1092-4388(2009/08-0001).
- Bassett, E. A., and Wallace, V. A. (2012). Cell fate determination in the vertebrate retina. *Trends Neurosci.* 35, 565–573. doi:10.1016/j.tins.2012.05.004.
- Bear, M. F., Huber, K. M., and Warren, S. T. (2004). The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends Neurosci.* 27, 370–377. doi:10.1016/j.tins.2004.04.009.
- Beby, F., and Lamonerie, T. (2013). The homeobox gene *Otx2* in development and disease. *Exp. Eye Res.* 111, 9–16. doi:10.1016/j.exer.2013.03.007.
- Bender, K. J., Allen, C. B., Bender, V. A., and Feldman, D. E. (2006). Synaptic basis for whisker deprivation-induced synaptic depression in rat somatosensory cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 4155–4165. doi:10.1523/JNEUROSCI.0175-06.2006.
- Berger, R., Bloomfield, C. D., and Sutherland, G. R. (1985). Report of the Committee on Chromosome Rearrangements in Neoplasia and on Fragile Sites. *Cytogenet. Cell Genet.* 40, 490–535. doi:10.1159/000132181.
- Bernard, C., and Prochiantz, A. (2016). *Otx2*-PNN Interaction to Regulate Cortical Plasticity. *Neural Plast.* 2016, 7931693. doi:10.1155/2016/7931693.
- Berry-Kravis, E., Des Portes, V., Hagerman, R., Jacquemont, S., Charles, P., Visootsak, J., et al. (2016). Mavoglurant in fragile X syndrome: Results of two randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *Sci. Transl. Med.* 8, 321ra5. doi:10.1126/scitranslmed.aab4109.
- Berry-Kravis, E. M., Lindemann, L., Jønych, A. E., Apostol, G., Bear, M. F., Carpenter, R. L., et al. (2018). Drug development for neurodevelopmental disorders: lessons learned from fragile X syndrome. *Nat. Rev. Drug Discov.* 17, 280–299. doi:10.1038/nrd.2017.221.
- Berry-Kravis, E., Raspa, M., Loggin-Hester, L., Bishop, E., Holiday, D., and Bailey, D. B. (2010). Seizures in fragile X syndrome: characteristics and comorbid diagnoses. *Am. J. Intellect. Dev. Disabil.* 115, 461–472. doi:10.1352/1944-7558-115.6.461.
- Bhattacharya, A., Kaphzan, H., Alvarez-Dieppa, A. C., Murphy, J. P., Pierre, P., and Klann, E. (2012). Genetic removal of p70 S6 kinase 1 corrects molecular, synaptic, and behavioral phenotypes in fragile X syndrome mice. *Neuron* 76, 325–337. doi:10.1016/j.neuron.2012.07.022.



- Bilousova, T. V., Dansie, L., Ngo, M., Aye, J., Charles, J. R., Ethell, D. W., et al. (2009). Minocycline promotes dendritic spine maturation and improves behavioural performance in the fragile X mouse model. *J. Med. Genet.* 46, 94–102. doi:10.1136/jmg.2008.061796.
- Bodaleo, F., Tapia-Monsalves, C., Cea-Del Rio, C., Gonzalez-Billault, C., and Nunez-Parra, A. (2019). Structural and Functional Abnormalities in the Olfactory System of Fragile X Syndrome Models. *Front. Mol. Neurosci.* 12, 135. doi:10.3389/fnmol.2019.00135.
- Bongmba, O. Y. N., Martinez, L. A., Elhardt, M. E., Butler, K., and Tejada-Simon, M. V. (2011). Modulation of dendritic spines and synaptic function by Rac1: a possible link to Fragile X syndrome pathology. *Brain Res.* 1399, 79–95. doi:10.1016/j.brainres.2011.05.020.
- Bowen, P., Biederman, B., and Swallow, K. A. (1978). The X-linked syndrome of macroorchidism and mental retardation: further observations. *Am. J. Med. Genet.* 2, 409–414. doi:10.1002/ajmg.1320020410.
- Boyle, L., and Kaufmann, W. E. (2010). The behavioral phenotype of FMR1 mutations. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* 154C, 469–476. doi:10.1002/ajmg.c.30277.
- Braat, S., D'Hulst, C., Heulens, I., De Rubeis, S., Mientjes, E., Nelson, D. L., et al. (2015). The GABAA receptor is an FMRP target with therapeutic potential in fragile X syndrome. *Cell Cycle Georget. Tex* 14, 2985–2995. doi:10.4161/15384101.2014.989114.
- Braat, S., and Kooy, R. F. (2015). Insights into GABAergic system deficits in fragile X syndrome lead to clinical trials. *Neuropharmacology* 88, 48–54. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.06.028.
- Brackett, D. M., Qing, F., Amieux, P. S., Sellers, D. L., Horner, P. J., and Morris, D. R. (2013). FMR1 transcript isoforms: association with polyribosomes; regional and developmental expression in mouse brain. *PLoS One* 8, e58296. doi:10.1371/journal.pone.0058296.
- Bringmann, A., Pannicke, T., Grosche, J., Francke, M., Wiedemann, P., Skatchkov, S. N., et al. (2006). Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 25, 397–424. doi:10.1016/j.preteyeres.2006.05.003.
- Brock, M., and Hatton, D. (2010). Distinguishing features of autism in boys with fragile X syndrome. *J. Intellectual Disabil. Res. JIDR* 54, 894–905. doi:10.1111/j.1365-2788.2010.01315.x.
- Brown, M. R., Kronengold, J., Gazula, V.-R., Chen, Y., Strumbos, J. G., Sigworth, F. J., et al. (2010). Fragile X mental retardation protein controls gating of the sodium-activated potassium channel Slack. *Nat. Neurosci.* 13, 819–821. doi:10.1038/nn.2563.
- Brown, P. K., and Wald, G. (1963). VISUAL PIGMENTS IN HUMAN AND MONKEY RETINAS. *Nature* 200, 37–43. doi:10.1038/200037a0.
- Brown, V., Jin, P., Ceman, S., Darnell, J. C., O'Donnell, W. T., Tenenbaum, S. A., et al. (2001). Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. *Cell* 107, 477–487. doi:10.1016/s0092-8674(01)00568-2.
- Bureau, I., Shepherd, G. M. G., and Svoboda, K. (2008). Circuit and plasticity defects in the developing somatosensory cortex of FMR1 knock-out mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 5178–5188. doi:10.1523/JNEUROSCI.1076-08.2008.
- Busquets-Garcia, A., Gomis-Gonzalez, M., Guegan, T., Agustin-Pavon, C., Pastor, A., Mato, S., et al. (2013). Targeting the endocannabinoid system in the treatment of fragile X syndrome. *Nat Med.* doi:10.1038/nm.3127.
- Carreno-Munoz, M. I., Martins, F., Medrano, M. C., Aloisi, E., Pietropaolo, S., Dechaud, C., et al. (2018). Potential Involvement of Impaired BKCa Channel Function in Sensory Defensiveness and Some Behavioral

- Disturbances Induced by Unfamiliar Environment in a Mouse Model of Fragile X Syndrome. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 43, 492–502. doi:10.1038/npp.2017.149.
- Carrillo-Mora, P., Méndez-Cuesta, L. A., Pérez-De La Cruz, V., Fortoul-van Der Goes, T. I., and Santamaría, A. (2010). Protective effect of systemic L-kynurenine and probenecid administration on behavioural and morphological alterations induced by toxic soluble amyloid beta (25-35) in rat hippocampus. *Behav. Brain Res.* 210, 240–250. doi:10.1016/j.bbr.2010.02.041.
- Cascio, C. J. (2010). Somatosensory processing in neurodevelopmental disorders. *J. Neurodev. Disord.* 2, 62–69. doi:10.1007/s11689-010-9046-3.
- Castagnola, S., Bardoni, B., and Maurin, T. (2017). The Search for an Effective Therapy to Treat Fragile X Syndrome: Dream or Reality? *Front. Synaptic Neurosci.* 9, 15. doi:10.3389/fnsyn.2017.00015.
- Castets, M., Schaeffer, C., Bechara, E., Schenck, A., Khandjian, E. W., Luche, S., et al. (2005). FMRP interferes with the Rac1 pathway and controls actin cytoskeleton dynamics in murine fibroblasts. *Hum. Mol. Genet.* 14, 835–844. doi:10.1093/hmg/ddi077.
- Castrén, M. L., and Castrén, E. (2014). BDNF in fragile X syndrome. *Neuropharmacology* 76 Pt C, 729–736. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.05.018.
- Castrén, M., Pääkkönen, A., Tarkka, I. M., Rynnänen, M., and Partanen, J. (2003). Augmentation of auditory N1 in children with fragile X syndrome. *Brain Topogr.* 15, 165–171.
- Ceman, S., O'Donnell, W. T., Reed, M., Patton, S., Pohl, J., and Warren, S. T. (2003). Phosphorylation influences the translation state of FMRP-associated polyribosomes. *Hum. Mol. Genet.* 12, 3295–3305. doi:10.1093/hmg/ddg350.
- Chen, L., and Toth, M. (2001). Fragile X mice develop sensory hyperreactivity to auditory stimuli. *Neuroscience* 103, 1043–1050. doi:10.1016/s0306-4522(01)00036-7.
- Chen, L. Y., Rex, C. S., Babayan, A. H., Kramár, E. A., Lynch, G., Gall, C. M., et al. (2010). Physiological activation of synaptic Rac>PAK (p-21 activated kinase) signaling is defective in a mouse model of fragile X syndrome. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 10977–10984. doi:10.1523/JNEUROSCI.1077-10.2010.
- Chen, S., Wang, Q. L., Nie, Z., Sun, H., Lennon, G., Copeland, N. G., et al. (1997). Crx, a novel Otx-like paired-homeodomain protein, binds to and transactivates photoreceptor cell-specific genes. *Neuron* 19, 1017–1030. doi:10.1016/s0896-6273(00)80394-3.
- Chen, X., Sun, W., Pan, Y., Yang, Q., Cao, K., Zhang, J., et al. (2013). Lithium ameliorates open-field and elevated plus maze behaviors, and brain phospho-glycogen synthase kinase 3-beta expression in fragile X syndrome model mice. *Neurosci. Riyadh Saudi Arab.* 18, 356–362.
- Chiquita, S., Rodrigues-Neves, A. C., Baptista, F. I., Carecho, R., Moreira, P. I., Castelo-Branco, M., et al. (2019). The Retina as a Window or Mirror of the Brain Changes Detected in Alzheimer's Disease: Critical Aspects to Unravel. *Mol. Neurobiol.* 56, 5416–5435. doi:10.1007/s12035-018-1461-6.
- Christie, S. B., Akins, M. R., Schwob, J. E., and Fallon, J. R. (2009). The FXG: a presynaptic fragile X granule expressed in a subset of developing brain circuits. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 1514–1524. doi:10.1523/JNEUROSCI.3937-08.2009.

- Chu, E. M.-Y., Kolappan, M., Barnes, T. R. E., Joyce, E. M., and Ron, M. A. (2012). A window into the brain: an in vivo study of the retina in schizophrenia using optical coherence tomography. *Psychiatry Res.* 203, 89–94. doi:10.1016/j.psychres.2011.08.011.
- Ciaccio, C., Fontana, L., Milani, D., Tabano, S., Miozzo, M., and Esposito, S. (2017). Fragile X syndrome: a review of clinical and molecular diagnoses. *Ital. J. Pediatr.* 43, 39. doi:10.1186/s13052-017-0355-y.
- Cohen, I. L., Fisch, G. S., Sudhalter, V., Wolf-Schein, E. G., Hanson, D., Hagerman, R., et al. (1988). Social gaze, social avoidance, and repetitive behavior in fragile X males: a controlled study. *Am. J. Ment. Retard. AJMR* 92, 436–446.
- Cohen, I. L., Vietze, P. M., Sudhalter, V., Jenkins, E. C., and Brown, W. T. (1989). Parent-child dyadic gaze patterns in fragile X males and in non-fragile X males with autistic disorder. *J. Child Psychol. Psychiatry* 30, 845–856.
- Cohen, I. L., Vietze, P. M., Sudhalter, V., Jenkins, E. C., and Brown, W. T. (1991). Effects of age and communication level on eye contact in fragile X males and non-fragile X autistic males. *Am. J. Med. Genet.* 38, 498–502.
- Comery, T. A., Harris, J. B., Willems, P. J., Oostra, B. A., Irwin, S. A., Weiler, I. J., et al. (1997). Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 5401–5404. doi:10.1073/pnas.94.10.5401.
- Consortium, T. D.-B. F. X., Bakker, C. E., Verheij, C., Willemsen, R., Helm, R. van der, Oerlemans, F., et al. (1994). Fmr1 knockout mice: A model to study fragile X mental retardation. *Cell* 78, 23–33. doi:10.1016/0092-8674(94)90569-X.
- Constantino, J. N., Gruber, C. P., Davis, S., Hayes, S., Passanante, N., and Przybeck, T. (2004). The factor structure of autistic traits. *J. Child Psychol. Psychiatry* 45, 719–726. doi:10.1111/j.1469-7610.2004.00266.x.
- Contractor, A., Klyachko, V. A., and Portera-Cailliau, C. (2015). Altered Neuronal and Circuit Excitability in Fragile X Syndrome. *Neuron* 87, 699–715. doi:10.1016/j.neuron.2015.06.017.
- Cornish, K. M., Munir, F., and Cross, G. (1999). Spatial cognition in males with Fragile-X syndrome: evidence for a neuropsychological phenotype. *Cortex J. Devoted Study Nerv. Syst. Behav.* 35, 263–271.
- Costa, L., Sardone, L. M., Bonaccorso, C. M., D'Antoni, S., Spatuzza, M., Gulisano, W., et al. (2018). Activation of Serotonin 5-HT7 Receptors Modulates Hippocampal Synaptic Plasticity by Stimulation of Adenylate Cyclases and Rescues Learning and Behavior in a Mouse Model of Fragile X Syndrome. *Front. Mol. Neurosci.* 11, 353. doi:10.3389/fnmol.2018.00353.
- Cowey, A., and Franzini, C. (1979). The retinal origin of uncrossed optic nerve fibres in rats and their role in visual discrimination. *Exp. Brain Res.* 35, 443–455. doi:10.1007/bf00236763.
- Crair, M. C., and Malenka, R. C. (1995). A critical period for long-term potentiation at thalamocortical synapses. *Nature* 375, 325–328. doi:10.1038/375325a0.
- Crowe, S. F., and Hay, D. A. (1990). Neuropsychological dimensions of the fragile X syndrome: support for a non-dominant hemisphere dysfunction hypothesis. *Neuropsychologia* 28, 9–16.
- Dalton, K. M., Holsen, L., Abbeduto, L., and Davidson, R. J. (2008). Brain function and gaze fixation during facial-emotion processing in fragile X and autism. *Autism Res. Off. J. Int. Soc. Autism Res.* 1, 231–239. doi:10.1002/aur.32.

- Darnell, J. C., Fraser, C. E., Mostovetsky, O., Stefani, G., Jones, T. A., Eddy, S. R., et al. (2005). Kissing complex RNAs mediate interaction between the Fragile-X mental retardation protein KH2 domain and brain polyribosomes. *Genes Dev.* 19, 903–918. doi:10.1101/gad.1276805.
- Darnell, J. C., Jensen, K. B., Jin, P., Brown, V., Warren, S. T., and Darnell, R. B. (2001). Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. *Cell* 107, 489–499.
- Darnell, J. C., and Richter, J. D. (2012). Cytoplasmic RNA-binding proteins and the control of complex brain function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a012344. doi:10.1101/cshperspect.a012344.
- Darnell, J. C., Van Driesche, S. J., Zhang, C., Hung, K. Y. S., Mele, A., Fraser, C. E., et al. (2011). FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. *Cell* 146, 247–261. doi:10.1016/j.cell.2011.06.013.
- Daroles, L., Gribaudo, S., Doulazmi, M., Scotto-Lomassese, S., Dubacq, C., Mandairon, N., et al. (2016). Fragile X Mental Retardation Protein and Dendritic Local Translation of the Alpha Subunit of the Calcium/Calmodulin-Dependent Kinase II Messenger RNA Are Required for the Structural Plasticity Underlying Olfactory Learning. *Biol. Psychiatry* 80, 149–159. doi:10.1016/j.biopsych.2015.07.023.
- Darribère, T. (2003). *Le développement d'un mammifère : la souris*. Belin. Belin.
- Davidovic, L., Navratil, V., Bonaccorso, C. M., Catania, M. V., Bardoni, B., and Dumas, M.-E. (2011). A metabolomic and systems biology perspective on the brain of the fragile X syndrome mouse model. *Genome Res.* 21, 2190–2202. doi:10.1101/gr.116764.110.
- Davis, J. K., and Broadie, K. (2017). Multifarious Functions of the Fragile X Mental Retardation Protein. *Trends Genet. TIG* 33, 703–714. doi:10.1016/j.tig.2017.07.008.
- De Boulle, K., Verkerk, A. J., Reyniers, E., Vits, L., Hendrickx, J., Van Roy, B., et al. (1993). A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nat. Genet.* 3, 31–35. doi:10.1038/ng0193-31.
- de Vries, B. B., Wiegers, A. M., Smits, A. P., Mohkamsing, S., Duivenvoorden, H. J., Fryns, J. P., et al. (1996). Mental status of females with an FMR1 gene full mutation. *Am. J. Hum. Genet.* 58, 1025–1032.
- Debrey, S. M., Leehey, M. A., Klepitskaya, O., Filley, C. M., Shah, R. C., Kluger, B., et al. (2016). Clinical Phenotype of Adult Fragile X Gray Zone Allele Carriers: a Case Series. *Cerebellum Lond. Engl.* 15, 623–631. doi:10.1007/s12311-016-0809-6.
- DeMarco, B., Stefanovic, S., Williams, A., Moss, K. R., Anderson, B. R., Bassell, G. J., et al. (2019). FMRP - G-quadruplex mRNA - miR-125a interactions: Implications for miR-125a mediated translation regulation of PSD-95 mRNA. *PLoS One* 14, e0217275. doi:10.1371/journal.pone.0217275.
- Deng, P.-Y., Rotman, Z., Blundon, J. A., Cho, Y., Cui, J., Cavalli, V., et al. (2013). FMRP regulates neurotransmitter release and synaptic information transmission by modulating action potential duration via BK channels. *Neuron* 77, 696–711. doi:10.1016/j.neuron.2012.12.018.
- Deng, P.-Y., Sojka, D., and Klyachko, V. A. (2011). Abnormal presynaptic short-term plasticity and information processing in a mouse model of fragile X syndrome. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 10971–10982. doi:10.1523/JNEUROSCI.2021-11.2011.
- Denman, D. J., Luviano, J. A., Ollerenshaw, D. R., Cross, S., Williams, D., Buice, M. A., et al. (2018). Mouse color and wavelength-specific luminance contrast sensitivity are non-uniform across visual space. *eLife* 7. doi:10.7554/eLife.31209.

- Derbis, M., Konieczny, P., Walczak, A., Sekrecki, M., and Sobczak, K. (2018). Quantitative Evaluation of Toxic Polyglycine Biosynthesis and Aggregation in Cell Models Expressing Expanded CGG Repeats. *Front. Genet.* 9. doi:10.3389/fgene.2018.00216.
- Devys, D., Lutz, Y., Rouyer, N., Bellocq, J. P., and Mandel, J. L. (1993). The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. *Nat. Genet.* 4, 335–340. doi:10.1038/ng0893-335.
- D’Hooge, R., Nagels, G., Franck, F., Bakker, C. E., Reyniers, E., Storm, K., et al. (1997). Mildly impaired water maze performance in male Fmr1 knockout mice. *Neuroscience* 76, 367–376. doi:10.1016/s0306-4522(96)00224-2.
- D’Hulst, C., De Geest, N., Reeve, S. P., Van Dam, D., De Deyn, P. P., Hassan, B. A., et al. (2006). Decreased expression of the GABAA receptor in fragile X syndrome. *Brain Res.* 1121, 238–245. doi:10.1016/j.brainres.2006.08.115.
- D’Hulst, C., Heulens, I., Brouwer, J. R., Willemsen, R., De Geest, N., Reeve, S. P., et al. (2009). Expression of the GABAergic system in animal models for fragile X syndrome and fragile X associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *Brain Res.* 1253, 176–183. doi:10.1016/j.brainres.2008.11.075.
- D’Hulst, C., Heulens, I., Van der Aa, N., Goffin, K., Koole, M., Porke, K., et al. (2015). Positron Emission Tomography (PET) Quantification of GABAA Receptors in the Brain of Fragile X Patients. *PLoS One* 10, e0131486. doi:10.1371/journal.pone.0131486.
- D’Hulst, C., and Kooy, R. F. (2007). The GABAA receptor: a novel target for treatment of fragile X? *Trends Neurosci.* 30, 425–431. doi:10.1016/j.tins.2007.06.003.
- Dick, E., and Miller, R. F. (1985). Extracellular K<sup>+</sup> activity changes related to electroretinogram components. I. Amphibian (I-type) retinas. *J. Gen. Physiol.* 85, 885–909. doi:10.1085/jgp.85.6.885.
- Ding, Q., Sethna, F., and Wang, H. (2014). Behavioral analysis of male and female Fmr1 knockout mice on C57BL/6 background. *Behav. Brain Res.* 271, 72–78. doi:10.1016/j.bbr.2014.05.046.
- Dinon, J.-F., and Boucart, M. (2005). Effect of contrast on face perception: Application to ophthalmology (AMD patients). *J. Vis.* 5, 985–985. doi:10.1167/5.8.985.
- Dolen, G., Osterweil, E., Rao, B. S., Smith, G. B., Auerbach, B. D., Chattarji, S., et al. (2007). Correction of fragile X syndrome in mice. *Neuron* 56, 955–62. doi:10.1016/j.neuron.2007.12.001.
- Doll, C. A., Vita, D. J., and Broadie, K. (2017). Fragile X Mental Retardation Protein Requirements in Activity-Dependent Critical Period Neural Circuit Refinement. *Curr. Biol. CB* 27, 2318–2330.e3. doi:10.1016/j.cub.2017.06.046.
- Dorrell, M. I., Aguilar, E., and Friedlander, M. (2002). Retinal vascular development is mediated by endothelial filopodia, a preexisting astrocytic template and specific R-cadherin adhesion. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 3500–3510.
- Dowling, J. E. (1987). The Retina — John E. Dowling. Available at: <https://www.hup.harvard.edu/catalog.php?isbn=9780674061545> [Accessed September 25, 2019].
- Dy, A. B. C., Tassone, F., Eldeeb, M., Salcedo-Arellano, M. J., Tartaglia, N., and Hagerman, R. (2018). Metformin as targeted treatment in fragile X syndrome. *Clin. Genet.* 93, 216–222. doi:10.1111/cge.13039.

- Eberhart, D. E., Malter, H. E., Feng, Y., and Warren, S. T. (1996). The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals. *Hum. Mol. Genet.* 5, 1083–1091. doi:10.1093/hmg/5.8.1083.
- Eichler, E. E., Richards, S., Gibbs, R. A., and Nelson, D. L. (1993). Fine structure of the human FMR1 gene. *Hum. Mol. Genet.* 2, 1147–1153.
- Erickson, C. A., Weng, N., Weiler, I. J., Greenough, W. T., Stigler, K. A., Wink, L. K., et al. (2011). Open-label riluzole in fragile X syndrome. *Brain Res.* 1380, 264–270. doi:10.1016/j.brainres.2010.10.108.
- Esbensen, A. J., Rojahn, J., Aman, M. G., and Ruedrich, S. (2003). Reliability and validity of an assessment instrument for anxiety, depression, and mood among individuals with mental retardation. *J. Autism Dev. Disord.* 33, 617–629.
- Ethridge, L. E., White, S. P., Mosconi, M. W., Wang, J., Byerly, M. J., and Sweeney, J. A. (2016). Reduced habituation of auditory evoked potentials indicate cortical hyper-excitability in Fragile X Syndrome. *Transl. Psychiatry* 6, e787. doi:10.1038/tp.2016.48.
- Ethridge, L. E., White, S. P., Mosconi, M. W., Wang, J., Pedapati, E. V., Erickson, C. A., et al. (2017). Neural synchronization deficits linked to cortical hyper-excitability and auditory hypersensitivity in fragile X syndrome. *Mol. Autism* 8, 22. doi:10.1186/s13229-017-0140-1.
- Famula, J., Basuta, K., Gane, L. W., Hagerman, R. J., and Tassone, F. (2015). Identification of a male with fragile X syndrome through newborn screening. *Intractable Rare Dis. Res.* 4, 198–202. doi:10.5582/irdr.2015.01031.
- Farzin, F., Rivera, S. M., and Whitney, D. (2011). Resolution of spatial and temporal visual attention in infants with fragile X syndrome. *Brain J. Neurol.* 134, 3355–3368. doi:10.1093/brain/awr249.
- Farzin, F., Whitney, D., Hagerman, R. J., and Rivera, S. M. (2008). Contrast detection in infants with fragile X syndrome. *Vision Res.* 48, 1471–1478. doi:10.1016/j.visres.2008.03.019.
- Felgerolle, C., Hébert, B., Ardourel, M., Meyer-Dilhet, G., Menuet, A., Pinto-Morais, K., et al. (2019). Visual Behavior Impairments as an Aberrant Sensory Processing in the Mouse Model of Fragile X Syndrome. *Front. Behav. Neurosci.* 13. doi:10.3389/fnbeh.2019.00228.
- Feng, Y., Gutekunst, C. A., Eberhart, D. E., Yi, H., Warren, S. T., and Hersch, S. M. (1997). Fragile X mental retardation protein: nucleocytoplasmic shuttling and association with somatodendritic ribosomes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 1539–1547.
- Fernandez, E., Rajan, N., and Bagni, C. (2013). The FMRP regulon: from targets to disease convergence. *Front. Neurosci.* 7. doi:10.3389/fnins.2013.00191.
- Ferron, L. (2016). Fragile X mental retardation protein controls ion channel expression and activity. *J. Physiol.* 594, 5861–5867. doi:10.1113/JP270675.
- Ferron, L., Nieto-Rostro, M., Cassidy, J. S., and Dolphin, A. C. (2014). Fragile X mental retardation protein controls synaptic vesicle exocytosis by modulating N-type calcium channel density. *Nat. Commun.* 5, 3628. doi:10.1038/ncomms4628.
- Feuge, J., Scharkowski, F., Michaelsen-Preusse, K., and Korte, M. (2019). FMRP Modulates Activity-Dependent Spine Plasticity by Binding Cofilin1 mRNA and Regulating Localization and Local Translation. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991.* doi:10.1093/cercor/bhz059.

- Finestack, L. H., Richmond, E. K., and Abbeduto, L. (2009). Language Development in Individuals with Fragile X Syndrome. *Top. Lang. Disord.* 29, 133–148.
- Fisch, G. S., Simensen, R. J., and Schroer, R. J. (2002). Longitudinal changes in cognitive and adaptive behavior scores in children and adolescents with the fragile X mutation or autism. *J. Autism Dev. Disord.* 32, 107–114.
- Fox, M. W. (1965). The visual cliff test for the study of visual depth perception in the mouse. *Anim. Behav.* 13, 232–233.
- Frenkel, M. Y., and Bear, M. F. (2004). How monocular deprivation shifts ocular dominance in visual cortex of young mice. *Neuron* 44, 917–923. doi:10.1016/j.neuron.2004.12.003.
- Freund, L. S., and Reiss, A. L. (1991). Cognitive profiles associated with the fra(X) syndrome in males and females. *Am. J. Med. Genet.* 38, 542–547. doi:10.1002/ajmg.1320380409.
- Freund, L. S., Reiss, A. L., and Abrams, M. T. (1993). Psychiatric disorders associated with fragile X in the young female. *Pediatrics* 91, 321–329.
- Frohman, E. M., Balcer, L. J., and Calabresi, P. A. (2010). Multiple sclerosis: can retinal imaging accurately detect optic neuritis? *Nat. Rev. Neurol.* 6, 125–126. doi:10.1038/nrneurol.2010.13.
- Fu, Y.-H., Kuhl, D. P., Pizzuti, A., Pieretti, M., Sutcliffe, J. S., Richards, S., et al. (1991). Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* 67, 1047–1058.
- Furukawa, T., and Hanawa, I. (1955). Effects of some common cations on electroretinogram of the toad. *Jpn. J. Physiol.* 5, 289–300.
- Furukawa, T., Morrow, E. M., and Cepko, C. L. (1997). Crx, a novel otx-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation. *Cell* 91, 531–541. doi:10.1016/s0092-8674(00)80439-0.
- Gabel, L. A., Won, S., Kawai, H., McKinney, M., Tartakoff, A. M., and Fallon, J. R. (2004). Visual experience regulates transient expression and dendritic localization of fragile X mental retardation protein. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 10579–10583. doi:10.1523/JNEUROSCI.2185-04.2004.
- Galvez, R., Gopal, A. R., and Greenough, W. T. (2003). Somatosensory cortical barrel dendritic abnormalities in a mouse model of the fragile X mental retardation syndrome. *Brain Res.* 971, 83–89. doi:10.1016/s0006-8993(03)02363-1.
- Galvez, R., and Greenough, W. T. (2005). Sequence of abnormal dendritic spine development in primary somatosensory cortex of a mouse model of the fragile X mental retardation syndrome. *Am. J. Med. Genet. A.* 135, 155–160. doi:10.1002/ajmg.a.30709.
- Galvez, R., Smith, R. L., and Greenough, W. T. (2005). Olfactory bulb mitral cell dendritic pruning abnormalities in a mouse model of the Fragile-X mental retardation syndrome: further support for FMRP's involvement in dendritic development. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 157, 214–216. doi:10.1016/j.devbrainres.2005.03.010.
- Gandhi, R. M., Kogan, C. S., and Messier, C. (2014). 2-Methyl-6-(phenylethynyl) pyridine (MPEP) reverses maze learning and PSD-95 deficits in Fmr1 knock-out mice. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 70. doi:10.3389/fncel.2014.00070.
- Gandhi, S. P., Cang, J., and Stryker, M. P. (2005). An eye-opening experience. *Nat. Neurosci.* 8, 9–10. doi:10.1038/nn0105-9.

- Ganguly, K., Rejmak, E., Mikosz, M., Nikolaev, E., Knapska, E., and Kaczmarek, L. (2013). Matrix metalloproteinase (MMP) 9 transcription in mouse brain induced by fear learning. *J. Biol. Chem.* 288, 20978–20991. doi:10.1074/jbc.M113.457903.
- Gantois, I., Khoutorsky, A., Popic, J., Aguilar-Valles, A., Freemantle, E., Cao, R., et al. (2017). Metformin ameliorates core deficits in a mouse model of fragile X syndrome. *Nat. Med.* 23, 674–677. doi:10.1038/nm.4335.
- Gantois, I., Pop, A. S., de Esch, C. E. F., Buijsen, R. A. M., Pooters, T., Gomez-Mancilla, B., et al. (2013). Chronic administration of AFQ056/Mavoglurant restores social behaviour in Fmr1 knockout mice. *Behav. Brain Res.* 239, 72–79. doi:10.1016/j.bbr.2012.10.059.
- Garber, K. B., Visootsak, J., and Warren, S. T. (2008). Fragile X syndrome. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 16, 666–672. doi:10.1038/ejhg.2008.61.
- Garrett, A. S., Menon, V., MacKenzie, K., and Reiss, A. L. (2004). Here's looking at you, kid: neural systems underlying face and gaze processing in fragile X syndrome. *Arch. Gen. Psychiatry* 61, 281–288. doi:10.1001/archpsyc.61.3.281.
- Gheusi, G., Lepousez, G., and Lledo, P.-M. (2013). Adult-born neurons in the olfactory bulb: integration and functional consequences. *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 15, 49–72. doi:10.1007/7854\_2012\_228.
- Gillberg, C., Persson, E., and Wahlström, J. (1986). The autism-fragile-X syndrome (AFRAX): a population-based study of ten boys. *J. Ment. Defic. Res.* 30 ( Pt 1), 27–39. doi:10.1111/j.1365-2788.1986.tb01295.x.
- Glynn, D., Bortnick, R. A., and Morton, A. J. (2003). Complexin II is essential for normal neurological function in mice. *Hum. Mol. Genet.* 12, 2431–2448. doi:10.1093/hmg/ddg249.
- Godfraind, J. M., Reyniers, E., De Boule, K., D'Hooge, R., De Deyn, P. P., Bakker, C. E., et al. (1996). Long-term potentiation in the hippocampus of fragile X knockout mice. *Am. J. Med. Genet.* 64, 246–251. doi:10.1002/(SICI)1096-8628(19960809)64:2<246::AID-AJMG2>3.0.CO;2-S.
- Godler, D. E., Amor, D. J., and Slater, H. R. (2014). Methylation analysis in newborn screening for fragile X syndrome. *JAMA Neurol.* 71, 800. doi:10.1001/jamaneurol.2014.142.
- Goebel-Goody, S. M., Wilson-Wallis, E. D., Royston, S., Tagliatela, S. M., Naegele, J. R., and Lombroso, P. J. (2012). Genetic manipulation of STEP reverses behavioral abnormalities in a fragile X syndrome mouse model. *Genes Brain Behav.* 11, 586–600. doi:10.1111/j.1601-183X.2012.00781.x.
- Goldson, E., and Hagerman, R. J. (1993). Fragile X syndrome and failure to thrive. *Am. J. Dis. Child.* 1960 147, 605–607.
- Gomis-González, M., Busquets-Garcia, A., Matute, C., Maldonado, R., Mato, S., and Ozaita, A. (2016). Possible Therapeutic Doses of Cannabinoid Type 1 Receptor Antagonist Reverses Key Alterations in Fragile X Syndrome Mouse Model. *Genes* 7. doi:10.3390/genes7090056.
- Gonçalves, J. T., Anstey, J. E., Golshani, P., and Portera-Cailliau, C. (2013). Circuit level defects in the developing neocortex of Fragile X mice. *Nat. Neurosci.* 16, 903–909. doi:10.1038/nn.3415.
- Gothelf, D., Furfaro, J. A., Hoeft, F., Eckert, M. A., Hall, S. S., O'Hara, R., et al. (2008). Neuroanatomy of fragile X syndrome is associated with aberrant behavior and the fragile X mental retardation protein (FMRP). *Ann. Neurol.* 63, 40–51. doi:10.1002/ana.21243.
- Greenough, W. T. (1984). Structural correlates of information storage in the mammalian brain: a review and hypothesis. *Trends Neurosci.* 7, 229–233. doi:10.1016/S0166-2236(84)80211-8.



- Greenough, W. T., Klintsova, A. Y., Irwin, S. A., Galvez, R., Bates, K. E., and Weiler, I. J. (2001). Synaptic regulation of protein synthesis and the fragile X protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 7101–7106. doi:10.1073/pnas.141145998.
- Greicius, M. D., Boyett-Anderson, J. M., Menon, V., and Reiss, A. L. (2004). Reduced basal forebrain and hippocampal activation during memory encoding in girls with fragile X syndrome. *Neuroreport* 15, 1579–1583. doi:10.1097/01.wnr.0000134472.44362.be.
- Gross, C., Yao, X., Pong, D. L., Jeromin, A., and Bassell, G. J. (2011). Fragile X mental retardation protein regulates protein expression and mRNA translation of the potassium channel Kv4.2. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 5693–5698. doi:10.1523/JNEUROSCI.6661-10.2011.
- Grossman, A. W., Aldridge, G. M., Lee, K. J., Zeman, M. K., Jun, C. S., Azam, H. S., et al. (2010). Developmental characteristics of dendritic spines in the dentate gyrus of Fmr1 knockout mice. *Brain Res.* 1355, 221–227. doi:10.1016/j.brainres.2010.07.090.
- Grossman, A. W., Elisseou, N. M., McKinney, B. C., and Greenough, W. T. (2006). Hippocampal pyramidal cells in adult Fmr1 knockout mice exhibit an immature-appearing profile of dendritic spines. *Brain Res.* 1084, 158–164. doi:10.1016/j.brainres.2006.02.044.
- Gu, L., Bok, D., Yu, F., Caprioli, J., and Piri, N. (2018). Downregulation of splicing regulator RBFox1 compromises visual depth perception. *PLoS One* 13, e0200417. doi:10.1371/journal.pone.0200417.
- Guimarães-Souza, E. M., Perche, O., Morgans, C. W., Duvoisin, R. M., and Calaza, K. C. (2016). Fragile X Mental Retardation Protein expression in the retina is regulated by light. *Exp. Eye Res.* 146, 72–82. doi:10.1016/j.exer.2015.11.025.
- Guzowski, J. F., Knierim, J. J., and Moser, E. I. (2004). Ensemble dynamics of hippocampal regions CA3 and CA1. *Neuron* 44, 581–584. doi:10.1016/j.neuron.2004.11.003.
- Hagerman, P. (2013). Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS): pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 126, 1–19. doi:10.1007/s00401-013-1138-1.
- Hagerman, R. J., Altshul-Stark, D., and McBogg, P. (1987). Recurrent otitis media in the fragile X syndrome. *Am. J. Dis. Child.* 1960 141, 184–187.
- Hagerman, R. J., Amiri, K., and Cronister, A. (1991). Fragile X checklist. *Am. J. Med. Genet.* 38, 283–287.
- Hagerman, R. J., and Hagerman, P. J. (2002). The fragile X premutation: into the phenotypic fold. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 278–283.
- Hall, S. S., Burns, D. D., Lightbody, A. A., and Reiss, A. L. (2008). Longitudinal Changes in Intellectual Development in Children with Fragile X Syndrome. *J. Abnorm. Child Psychol.* 36, 927–939. doi:10.1007/s10802-008-9223-y.
- Hall, S. S., Hustyi, K. M., Hammond, J. L., Hirt, M., and Reiss, A. L. (2014). Using discrete trial training to identify specific learning impairments in boys with fragile X syndrome. *J. Autism Dev. Disord.* 44, 1659–1670. doi:10.1007/s10803-014-2037-6.
- Hallems, A., Beccu, S., Van Loock, K., Ortibus, E., Truijen, S., and Aerts, P. (2009). Visual deprivation leads to gait adaptations that are age- and context-specific: II. Kinematic parameters. *Gait Posture* 30, 307–311. doi:10.1016/j.gaitpost.2009.05.017.
- Hallems, A., Ortibus, E., Meire, F., and Aerts, P. (2010). Low vision affects dynamic stability of gait. *Gait Posture* 32, 547–551. doi:10.1016/j.gaitpost.2010.07.018.

- Hamilton, S. M., Green, J. R., Veeraragavan, S., Yuva, L., McCoy, A., Wu, Y., et al. (2014). Fmr1 and Nlgn3 knockout rats: novel tools for investigating autism spectrum disorders. *Behav. Neurosci.* 128, 103–109. doi:10.1037/a0035988.
- Hargrave, P. A., McDowell, J. H., Feldmann, R. J., Atkinson, P. H., Rao, J. K., and Argos, P. (1984). Rhodopsin's protein and carbohydrate structure: selected aspects. *Vision Res.* 24, 1487–1499. doi:10.1016/0042-6989(84)90311-0.
- Harlow, E. G., Till, S. M., Russell, T. A., Wijetunge, L. S., Kind, P., and Contractor, A. (2010). Critical period plasticity is disrupted in the barrel cortex of FMR1 knockout mice. *Neuron* 65, 385–398. doi:10.1016/j.neuron.2010.01.024.
- Harris, S. W., Hessler, D., Goodlin-Jones, B., Ferranti, J., Bacalman, S., Barbato, I., et al. (2008). Autism profiles of males with fragile X syndrome. *Am. J. Ment. Retard. AJMR* 113, 427–438. doi:10.1352/2008.113:427-438.
- Harrison, C. J., Jack, E. M., Allen, T. D., and Harris, R. (1983). The fragile X: a scanning electron microscope study. *J. Med. Genet.* 20, 280–285. doi:10.1136/jmg.20.4.280.
- Hayashi, M. L., Rao, B. S. S., Seo, J.-S., Choi, H.-S., Dolan, B. M., Choi, S.-Y., et al. (2007). Inhibition of p21-activated kinase rescues symptoms of fragile X syndrome in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 11489–11494. doi:10.1073/pnas.0705003104.
- Hazlett, H. C., Poe, M. D., Lightbody, A. A., Gerig, G., Macfall, J. R., Ross, A. K., et al. (2009). Teasing apart the heterogeneity of autism: Same behavior, different brains in toddlers with fragile X syndrome and autism. *J. Neurodev. Disord.* 1, 81–90. doi:10.1007/s11689-009-9009-8.
- He, C. X., Cantu, D. A., Mantri, S. S., Zeiger, W. A., Goel, A., and Portera-Cailliau, C. (2017). Tactile Defensiveness and Impaired Adaptation of Neuronal Activity in the Fmr1 Knock-Out Mouse Model of Autism. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 37, 6475–6487. doi:10.1523/JNEUROSCI.0651-17.2017.
- He, C. X., and Portera-Cailliau, C. (2013). The trouble with spines in fragile X syndrome: density, maturity and plasticity. *Neuroscience* 251, 120–128. doi:10.1016/j.neuroscience.2012.03.049.
- Hébert, B., Pietropaolo, S., Mème, S., Laudier, B., Laugeray, A., Doisne, N., et al. (2014). Rescue of fragile X syndrome phenotypes in Fmr1 KO mice by a BKCa channel opener molecule. *Orphanet J. Rare Dis.* 9, 124. doi:10.1186/s13023-014-0124-6.
- Heitz, D., Rousseau, F., Devys, D., Saccone, S., Abderrahim, H., Le Paslier, D., et al. (1991). Isolation of sequences that span the fragile X and identification of a fragile X-related CpG island. *Science* 251, 1236–1239. doi:10.1126/science.2006411.
- Hensch, T. K. (2005). Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 877–888. doi:10.1038/nrn1787.
- Herrmann, C. S., Strüber, D., Helfrich, R. F., and Engel, A. K. (2016). EEG oscillations: From correlation to causality. *Int. J. Psychophysiol. Off. J. Int. Organ. Psychophysiol.* 103, 12–21. doi:10.1016/j.ijpsycho.2015.02.003.
- Hersh, J. H., Saul, R. A., and Committee on Genetics (2011). Health supervision for children with fragile X syndrome. *Pediatrics* 127, 994–1006. doi:10.1542/peds.2010-3500.
- Heulens, I., D'Hulst, C., Van Dam, D., De Deyn, P. P., and Kooy, R. F. (2012). Pharmacological treatment of fragile X syndrome with GABAergic drugs in a knockout mouse model. *Behav. Brain Res.* 229, 244–249. doi:10.1016/j.bbr.2012.01.031.

- Heulens, I., Suttie, M., Postnov, A., De Clerck, N., Perrotta, C. S., Mattina, T., et al. (2013). Craniofacial characteristics of fragile X syndrome in mouse and man. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 21, 816–823. doi:10.1038/ejhg.2012.265.
- Higgins, J. J., Hao, J., Kosofsky, B. E., and Rajadhyaksha, A. M. (2008). Dysregulation of large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel expression in nonsyndromal mental retardation due to a cereblon p.R419X mutation. *Neurogenetics* 9, 219–223. doi:10.1007/s10048-008-0128-2.
- Hinds, H. L., Ashley, C. T., Sutcliffe, J. S., Nelson, D. L., Warren, S. T., Housman, D. E., et al. (1993). Tissue specific expression of FMR-1 provides evidence for a functional role in fragile X syndrome. *Nat. Genet.* 3, 36–43. doi:10.1038/ng0193-36.
- Hinton, V. J., Brown, W. T., Wisniewski, K., and Rudelli, R. D. (1991). Analysis of neocortex in three males with the fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 41, 289–294. doi:10.1002/ajmg.1320410306.
- Hoefl, F., Hernandez, A., Parthasarathy, S., Watson, C. L., Hall, S. S., and Reiss, A. L. (2007). Fronto-striatal dysfunction and potential compensatory mechanisms in male adolescents with fragile X syndrome. *Hum. Brain Mapp.* 28, 543–554. doi:10.1002/hbm.20406.
- Hoefl, F., Lightbody, A. A., Hazlett, H. C., Patnaik, S., Piven, J., and Reiss, A. L. (2008). Morphometric spatial patterns differentiating boys with fragile X syndrome, typically developing boys, and developmentally delayed boys aged 1 to 3 years. *Arch. Gen. Psychiatry* 65, 1087–1097. doi:10.1001/archpsyc.65.9.1087.
- Holtmaat, A., Wilbrecht, L., Knott, G. W., Welker, E., and Svoboda, K. (2006). Experience-dependent and cell-type-specific spine growth in the neocortex. *Nature* 441, 979–983. doi:10.1038/nature04783.
- Hooper, S. R., Hatton, D., Sideris, J., Sullivan, K., Hammer, J., Schaaf, J., et al. (2008). Executive functions in young males with fragile X syndrome in comparison to mental age-matched controls: baseline findings from a longitudinal study. *Neuropsychology* 22, 36–47. doi:10.1037/0894-4105.22.1.36.
- Horner, C. H. (1993). Plasticity of the dendritic spine. *Prog. Neurobiol.* 41, 281–321.
- Hou, L., Antion, M. D., Hu, D., Spencer, C. M., Paylor, R., and Klann, E. (2006). Dynamic translational and proteasomal regulation of fragile X mental retardation protein controls mGluR-dependent long-term depression. *Neuron* 51, 441–454. doi:10.1016/j.neuron.2006.07.005.
- Hoy, J. L., Yavorska, I., Wehr, M., and Niell, C. M. (2016). Vision Drives Accurate Approach Behavior during Prey Capture in Laboratory Mice. *Curr. Biol. CB* 26, 3046–3052. doi:10.1016/j.cub.2016.09.009.
- Huang, Z. J., and Di Cristo, G. (2008). Time to change: retina sends a messenger to promote plasticity in visual cortex. *Neuron* 59, 355–358. doi:10.1016/j.neuron.2008.07.029.
- Huber, K. M., Gallagher, S. M., Warren, S. T., and Bear, M. F. (2002). Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 7746–7750. doi:10.1073/pnas.122205699.
- Huber, K. M., Kayser, M. S., and Bear, M. F. (2000). Role for rapid dendritic protein synthesis in hippocampal mGluR-dependent long-term depression. *Science* 288, 1254–1257. doi:10.1126/science.288.5469.1254.
- Huddleston, L. B., Visootsak, J., and Sherman, S. L. (2014). Cognitive aspects of Fragile X syndrome. *Wiley Interdiscip. Rev. Cogn. Sci.* 5, 501–508. doi:10.1002/wcs.1296.
- Hunter, J., Rivero-Arias, O., Angelov, A., Kim, E., Fotheringham, I., and Leal, J. (2014). Epidemiology of fragile X syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Med. Genet. A.* 164A, 1648–1658. doi:10.1002/ajmg.a.36511.

- Irwin, S. A., Galvez, R., and Greenough, W. T. (2000). Dendritic spine structural anomalies in fragile-X mental retardation syndrome. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* 10, 1038–1044. doi:10.1093/cercor/10.10.1038.
- Irwin, S. A., Idupulapati, M., Gilbert, M. E., Harris, J. B., Chakravarti, A. B., Rogers, E. J., et al. (2002). Dendritic spine and dendritic field characteristics of layer V pyramidal neurons in the visual cortex of fragile-X knockout mice. *Am. J. Med. Genet.* 111, 140–146. doi:10.1002/ajmg.10500.
- Irwin, S. A., Patel, B., Idupulapati, M., Harris, J. B., Crisostomo, R. A., Larsen, B. P., et al. (2001). Abnormal dendritic spine characteristics in the temporal and visual cortices of patients with fragile-X syndrome: a quantitative examination. *Am. J. Med. Genet.* 98, 161–167.
- Jacobs, G. H., Williams, G. A., and Fenwick, J. A. (2004). Influence of cone pigment coexpression on spectral sensitivity and color vision in the mouse. *Vision Res.* 44, 1615–1622. doi:10.1016/j.visres.2004.01.016.
- Jacquemont, S., Berry-Kravis, E., Hagerman, R., von Raison, F., Gasparini, F., Apostol, G., et al. (2014). The challenges of clinical trials in fragile X syndrome. *Psychopharmacology (Berl.)* 231, 1237–1250. doi:10.1007/s00213-013-3289-0.
- Jacquemont, S., Hagerman, R. J., Leehey, M., Grigsby, J., Zhang, L., Brunberg, J. A., et al. (2003). Fragile X premutation tremor/ataxia syndrome: molecular, clinical, and neuroimaging correlates. *Am. J. Hum. Genet.* 72, 869–878. doi:10.1086/374321.
- Jahn, K., Strupp, M., Schneider, E., Dieterich, M., and Brandt, T. (2001). Visually induced gait deviations during different locomotion speeds. *Exp. Brain Res.* 141, 370–374. doi:10.1007/s002210100884.
- Jawaid, S., Kidd, G. J., Wang, J., Swetlik, C., Dutta, R., and Trapp, B. D. (2018). Alterations in CA1 hippocampal synapses in a mouse model of fragile X syndrome. *Glia* 66, 789–800. doi:10.1002/glia.23284.
- Jindal, V. (2015). Interconnection between brain and retinal neurodegenerations. *Mol. Neurobiol.* 51, 885–892. doi:10.1007/s12035-014-8733-6.
- Joliot, A., and Prochiantz, A. (2004). Transduction peptides: from technology to physiology. *Nat. Cell Biol.* 6, 189–196. doi:10.1038/ncb0304-189.
- Juczewski, K., von Richthofen, H., Bagni, C., Celikel, T., Fisone, G., and Krieger, P. (2016). Somatosensory map expansion and altered processing of tactile inputs in a mouse model of fragile X syndrome. *Neurobiol. Dis.* 96, 201–215. doi:10.1016/j.nbd.2016.09.007.
- Kaneko, A. (1979). Physiology of the retina. *Annu. Rev. Neurosci.* 2, 169–191. doi:10.1146/annurev.ne.02.030179.001125.
- Kang, J.-Y., Chadchankar, J., Vien, T. N., Mighdoll, M. I., Hyde, T. M., Mather, R. J., et al. (2017). Deficits in the activity of presynaptic  $\gamma$ -aminobutyric acid type B receptors contribute to altered neuronal excitability in fragile X syndrome. *J. Biol. Chem.* 292, 6621–6632. doi:10.1074/jbc.M116.772541.
- Kasai, H., Fukuda, M., Watanabe, S., Hayashi-Takagi, A., and Noguchi, J. (2010). Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends Neurosci.* 33, 121–129. doi:10.1016/j.tins.2010.01.001.
- Kaufmann, W. E., Cortell, R., Kau, A. S. M., Bukelis, I., Tierney, E., Gray, R. M., et al. (2004). Autism spectrum disorder in fragile X syndrome: communication, social interaction, and specific behaviors. *Am. J. Med. Genet. A.* 129A, 225–234. doi:10.1002/ajmg.a.30229.
- Kay, R. B., Gabreski, N. A., and Triplett, J. W. (2018). Visual subcircuit-specific dysfunction and input-specific mispatterning in the superior colliculus of fragile X mice. *J. Neurodev. Disord.* 10, 23. doi:10.1186/s11689-018-9241-1.

- Kesler, A., Vakhapova, V., Korczyn, A. D., Naftaliev, E., and Neudorfer, M. (2011). Retinal thickness in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 113, 523–526. doi:10.1016/j.clineuro.2011.02.014.
- Khan, M. I., Sobocińska, A. A., Czarnecka, A. M., Król, M., Botta, B., and Szczylik, C. (2016). The Therapeutic Aspects of the Endocannabinoid System (ECS) for Cancer and their Development: From Nature to Laboratory. *Curr. Pharm. Des.* 22, 1756–1766. doi:10.2174/1381612822666151211094901.
- Kidd, S. A., Lachiewicz, A., Barbouth, D., Blitz, R. K., Delahunty, C., McBrien, D., et al. (2014). Fragile X syndrome: a review of associated medical problems. *Pediatrics* 134, 995–1005. doi:10.1542/peds.2013-4301.
- Kim, H., Gibboni, R., Kirkhart, C., and Bao, S. (2013). Impaired critical period plasticity in primary auditory cortex of fragile X model mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 15686–15692. doi:10.1523/JNEUROSCI.3246-12.2013.
- King, M. K., and Jope, R. S. (2013). Lithium treatment alleviates impaired cognition in a mouse model of fragile X syndrome. *Genes Brain Behav.* 12, 723–731. doi:10.1111/gbb.12071.
- Klemmer, P., Meredith, R. M., Holmgren, C. D., Klychnikov, O. I., Stahl-Zeng, J., Loos, M., et al. (2011). Proteomics, ultrastructure, and physiology of hippocampal synapses in a fragile X syndrome mouse model reveal presynaptic phenotype. *J. Biol. Chem.* 286, 25495–25504. doi:10.1074/jbc.M110.210260.
- Knafo, S., Grossman, Y., Barkai, E., and Benschalom, G. (2001). Olfactory learning is associated with increased spine density along apical dendrites of pyramidal neurons in the rat piriform cortex. *Eur. J. Neurosci.* 13, 633–638. doi:10.1046/j.1460-9568.2001.01422.x.
- Knapska, E., Lioudyno, V., Kiryk, A., Mikosz, M., Górkiewicz, T., Michaluk, P., et al. (2013). Reward learning requires activity of matrix metalloproteinase-9 in the central amygdala. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 14591–14600. doi:10.1523/JNEUROSCI.5239-12.2013.
- Koekkoek, S. K. E., Yamaguchi, K., Milojkovic, B. A., Dortland, B. R., Ruigrok, T. J. H., Maex, R., et al. (2005). Deletion of FMR1 in Purkinje cells enhances parallel fiber LTD, enlarges spines, and attenuates cerebellar eyelid conditioning in Fragile X syndrome. *Neuron* 47, 339–352. doi:10.1016/j.neuron.2005.07.005.
- Kogan, C. S., Bertone, A., Cornish, K., Boutet, I., Der Kaloustian, V. M., Andermann, E., et al. (2004a). Integrative cortical dysfunction and pervasive motion perception deficit in fragile X syndrome. *Neurology* 63, 1634–1639. doi:10.1212/01.wnl.0000142987.44035.3b.
- Kogan, C. S., Boutet, I., Cornish, K., Zangenehpour, S., Mullen, K. T., Holden, J. J. A., et al. (2004b). Differential impact of the FMR1 gene on visual processing in fragile X syndrome. *Brain J. Neurol.* 127, 591–601. doi:10.1093/brain/awh069.
- Kooy, R. F., D'Hooge, R., Reyniers, E., Bakker, C. E., Nagels, G., De Boule, K., et al. (1996). Transgenic mouse model for the fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 64, 241–245. doi:10.1002/(SICI)1096-8628(19960809)64:2<241::AID-AJMG1>3.0.CO;2-X.
- Koronyo-Hamaoui, M., Koronyo, Y., Ljubimov, A. V., Miller, C. A., Ko, M. K., Black, K. L., et al. (2011). Identification of amyloid plaques in retinas from Alzheimer's patients and noninvasive in vivo optical imaging of retinal plaques in a mouse model. *NeuroImage* 54 Suppl 1, S204–217. doi:10.1016/j.neuroimage.2010.06.020.
- Korsak, L. I. T., Shepard, K. A., and Akins, M. R. (2017). Cell type-dependent axonal localization of translational regulators and mRNA in mouse peripheral olfactory neurons. *J. Comp. Neurol.* 525, 2202–2215. doi:10.1002/cne.24199.

- Kover, S. T., McCary, L. M., Ingram, A. M., Hatton, D. D., and Roberts, J. E. (2015). Language development in infants and toddlers with fragile X syndrome: change over time and the role of attention. *Am. J. Intellect. Dev. Disabil.* 120, 125–144. doi:10.1352/1944-7558-120.2.125.
- Kretschmer, F., Kretschmer, V., Kunze, V. P., and Kretzberg, J. (2013). OMR-arena: automated measurement and stimulation system to determine mouse visual thresholds based on optomotor responses. *PLoS One* 8, e78058. doi:10.1371/journal.pone.0078058.
- Kretschmer, F., Tariq, M., Chatila, W., Wu, B., and Badea, T. C. (2017). Comparison of optomotor and optokinetic reflexes in mice. *J. Neurophysiol.* 118, 300–316. doi:10.1152/jn.00055.2017.
- Kronk, R., Bishop, E. E., Raspa, M., Bickel, J. O., Mandel, D. A., and Bailey, D. B. (2010). Prevalence, nature, and correlates of sleep problems among children with fragile X syndrome based on a large scale parent survey. *Sleep* 33, 679–687. doi:10.1093/sleep/33.5.679.
- Kwon, H., Menon, V., Eliez, S., Warsofsky, I. S., White, C. D., Dyer-Friedman, J., et al. (2001). Functional neuroanatomy of visuospatial working memory in fragile X syndrome: relation to behavioral and molecular measures. *Am. J. Psychiatry* 158, 1040–1051. doi:10.1176/appi.ajp.158.7.1040.
- Lachiewicz, A. M., and Dawson, D. V. (1994). Do Young Boys With Fragile  $\chi$  Syndrome Have Macroorchidism? *Pediatrics* 93, 992–995.
- Lachiewicz, A. M., Dawson, D. V., and Spiridigliozzi, G. A. (2000). Physical characteristics of young boys with fragile X syndrome: reasons for difficulties in making a diagnosis in young males. *Am. J. Med. Genet.* 92, 229–236.
- Lamprecht, R., and LeDoux, J. (2004). Structural plasticity and memory. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 45–54. doi:10.1038/nrn1301.
- Larson, J., Kim, D., Patel, R. C., and Floreani, C. (2008). Olfactory discrimination learning in mice lacking the fragile X mental retardation protein. *Neurobiol. Learn. Mem.* 90, 90–102. doi:10.1016/j.nlm.2008.01.002.
- Latorre, R., and Brauchi, S. (2006). Large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> (BK) channel: activation by Ca<sup>2+</sup> and voltage. *Biol. Res.* 39, 385–401. doi:10.4067/s0716-97602006000300003.
- Laumonnier, F., Roger, S., Guérin, P., Molinari, F., M'rad, R., Cahard, D., et al. (2006). Association of a functional deficit of the BKCa channel, a synaptic regulator of neuronal excitability, with autism and mental retardation. *Am. J. Psychiatry* 163, 1622–1629. doi:10.1176/ajp.2006.163.9.1622.
- Lawrence, J. M., Sauv e, Y., Keegan, D. J., Coffey, P. J., Hetherington, L., Girman, S., et al. (2000). Schwann cell grafting into the retina of the dystrophic RCS rat limits functional deterioration. Royal College of Surgeons. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 518–528.
- Lee, H. Y., Ge, W.-P., Huang, W., He, Y., Wang, G. X., Rowson-Baldwin, A., et al. (2011). Bidirectional regulation of dendritic voltage-gated potassium channels by the fragile X mental retardation protein. *Neuron* 72, 630–642. doi:10.1016/j.neuron.2011.09.033.
- Leigh, M. J. S., Nguyen, D. V., Mu, Y., Winarni, T. I., Schneider, A., Chechi, T., et al. (2013). A randomized double-blind, placebo-controlled trial of minocycline in children and adolescents with fragile x syndrome. *J. Dev. Behav. Pediatr. JDBP* 34, 147–155. doi:10.1097/DBP.0b013e318287cd17.
- LeVay, S., Wiesel, T. N., and Hubel, D. H. (1980). The development of ocular dominance columns in normal and visually deprived monkeys. *J. Comp. Neurol.* 191, 1–51. doi:10.1002/cne.901910102.

- Levenga, J., de Vrij, F. M. S., Buijsen, R. A. M., Li, T., Nieuwenhuizen, I. M., Pop, A., et al. (2011). Subregion-specific dendritic spine abnormalities in the hippocampus of Fmr1 KO mice. *Neurobiol. Learn. Mem.* 95, 467–472. doi:10.1016/j.nlm.2011.02.009.
- Lewis, P., Abbeduto, L., Murphy, M., Richmond, E., Giles, N., Bruno, L., et al. (2006). Cognitive, language and social-cognitive skills of individuals with fragile X syndrome with and without autism. *J. Intellect. Disabil. Res. JIDR* 50, 532–545. doi:10.1111/j.1365-2788.2006.00803.x.
- Liang, Y., Fotiadis, D., Maeda, T., Maeda, A., Modzelewska, A., Filipek, S., et al. (2004). Rhodopsin signaling and organization in heterozygote rhodopsin knockout mice. *J. Biol. Chem.* 279, 48189–48196. doi:10.1074/jbc.M408362200.
- Liang, Z., and Freed, M. A. (2010). The ON pathway rectifies the OFF pathway of the mammalian retina. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 5533–5543. doi:10.1523/JNEUROSCI.4733-09.2010.
- Liao, L., Park, S. K., Xu, T., Vanderklish, P., and Yates, J. R. (2008). Quantitative proteomic analysis of primary neurons reveals diverse changes in synaptic protein content in fmr1 knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 15281–15286. doi:10.1073/pnas.0804678105.
- Lim, J. H., Booker, A. B., and Fallon, J. R. (2005). Regulating fragile X gene transcription in the brain and beyond. *J. Cell. Physiol.* 205, 170–175. doi:10.1002/jcp.20401.
- Lisik, M. Z., Gutmajster, E., and Sieroń, A. L. (2016). Low Levels of HDL in Fragile X Syndrome Patients. *Lipids* 51, 189–192. doi:10.1007/s11745-015-4109-6.
- Liu, Z.-H., Chuang, D.-M., and Smith, C. B. (2011). Lithium ameliorates phenotypic deficits in a mouse model of fragile X syndrome. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 14, 618–630. doi:10.1017/S1461145710000520.
- London, A., Benhar, I., and Schwartz, M. (2013). The retina as a window to the brain—from eye research to CNS disorders. *Nat. Rev. Neurol.* 9, 44–53. doi:10.1038/nrneurol.2012.227.
- Lord, C., Rutter, M., and Le Couteur, A. (1994). Autism Diagnostic Interview-Revised: a revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with possible pervasive developmental disorders. *J. Autism Dev. Disord.* 24, 659–685.
- Lovelace, J. W., Ethell, I. M., Binder, D. K., and Razak, K. A. (2018). Translation-relevant EEG phenotypes in a mouse model of Fragile X Syndrome. *Neurobiol. Dis.* 115, 39–48. doi:10.1016/j.nbd.2018.03.012.
- Lu, R., Wang, H., Liang, Z., Ku, L., O'donnell, W. T., Li, W., et al. (2004). The fragile X protein controls microtubule-associated protein 1B translation and microtubule stability in brain neuron development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 15201–15206. doi:10.1073/pnas.0404995101.
- Lu, W., and Constantine-Paton, M. (2004). Eye opening rapidly induces synaptic potentiation and refinement. *Neuron* 43, 237–249. doi:10.1016/j.neuron.2004.06.031.
- Lubs, H. A. (1969). A marker X chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* 21, 231–244.
- Ludwig, A. L., Espinal, G. M., Pretto, D. I., Jamal, A. L., Arque, G., Tassone, F., et al. (2014). CNS expression of murine fragile X protein (FMRP) as a function of CGG-repeat size. *Hum. Mol. Genet.* 23, 3228–3238. doi:10.1093/hmg/ddu032.
- Lund, R. D., Kwan, A. S., Keegan, D. J., Sauv e, Y., Coffey, P. J., and Lawrence, J. M. (2001). Cell transplantation as a treatment for retinal disease. *Prog. Retin. Eye Res.* 20, 415–449.

- Lyon, E., Laver, T., Yu, P., Jama, M., Young, K., Zoccoli, M., et al. (2010). A simple, high-throughput assay for Fragile X expanded alleles using triple repeat primed PCR and capillary electrophoresis. *J. Mol. Diagn. JMD* 12, 505–511. doi:10.2353/jmoldx.2010.090229.
- Maes, B., Fryns, J. P., Ghesquière, P., and Borghgraef, M. (2000). Phenotypic checklist to screen for fragile X syndrome in people with mental retardation. *Ment. Retard.* 38, 207–215. doi:10.1352/0047-6765(2000)038<0207:PCTSFF>2.0.CO;2.
- Malun, D., and Brunjes, P. C. (1996). Development of olfactory glomeruli: temporal and spatial interactions between olfactory receptor axons and mitral cells in opossums and rats. *J. Comp. Neurol.* 368, 1–16. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19960422)368:1<1::AID-CNE1>3.0.CO;2-7.
- Manookin, M. B., Beaudoin, D. L., Ernst, Z. R., Flagel, L. J., and Demb, J. B. (2008). Disinhibition combines with excitation to extend the operating range of the OFF visual pathway in daylight. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 4136–4150. doi:10.1523/JNEUROSCI.4274-07.2008.
- Martin, J. P., and Bell, J. (1943). A PEDIGREE OF MENTAL DEFECT SHOWING SEX-LINKAGE. *J. Neurol. Psychiatry* 6, 154–157. doi:10.1136/jnnp.6.3-4.154.
- Martinez, L. A., and Tejada-Simon, M. V. (2018). Increased Training Intensity Induces Proper Membrane Localization of Actin Remodeling Proteins in the Hippocampus Preventing Cognitive Deficits: Implications for Fragile X Syndrome. *Mol. Neurobiol.* 55, 4529–4542. doi:10.1007/s12035-017-0666-4.
- Martínez-Lapiscina, E. H., Ortiz-Pérez, S., Fraga-Pumar, E., Martínez-Heras, E., Gabilondo, I., Llufríu, S., et al. (2014). Colour vision impairment is associated with disease severity in multiple sclerosis. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* 20, 1207–1216. doi:10.1177/1352458513517591.
- Masland, R. H. (2012). The neuronal organization of the retina. *Neuron* 76, 266–280. doi:10.1016/j.neuron.2012.10.002.
- Mazziotti, R., Lupori, L., Sagona, G., Gennaro, M., Della Sala, G., Putignano, E., et al. (2017). Searching for biomarkers of CDKL5 disorder: early-onset visual impairment in CDKL5 mutant mice. *Hum. Mol. Genet.* 26, 2290–2298. doi:10.1093/hmg/ddx119.
- Mazzocco, M. M., Pulsifer, M., Fiumara, A., Cocuzza, M., Nigro, F., Incorpora, G., et al. (1998). Brief report: autistic behaviors among children with fragile X or Rett syndrome: implications for the classification of pervasive developmental disorder. *J. Autism Dev. Disord.* 28, 321–328.
- McDuffie, A., Abbeduto, L., Lewis, P., Kover, S., Kim, J.-S., Weber, A., et al. (2010). Autism spectrum disorder in children and adolescents with fragile X syndrome: within-syndrome differences and age-related changes. *Am. J. Intellect. Dev. Disabil.* 115, 307–326. doi:10.1352/1944-7558-115.4.307.
- McNaughton, C. H., Moon, J., Strawderman, M. S., Maclean, K. N., Evans, J., and Strupp, B. J. (2008). Evidence for social anxiety and impaired social cognition in a mouse model of fragile X syndrome. *Behav. Neurosci.* 122, 293–300. doi:10.1037/0735-7044.122.2.293.
- Meredith, R. M., de Jong, R., and Mansvelder, H. D. (2011). Functional rescue of excitatory synaptic transmission in the developing hippocampus in Fmr1-KO mouse. *Neurobiol. Dis.* 41, 104–110. doi:10.1016/j.nbd.2010.08.026.
- Meredith, R. M., Holmgren, C. D., Weidum, M., Burnashev, N., and Mansvelder, H. D. (2007). Increased threshold for spike-timing-dependent plasticity is caused by unreliable calcium signaling in mice lacking fragile X gene FMR1. *Neuron* 54, 627–638. doi:10.1016/j.neuron.2007.04.028.



- Merigan, W. H., and Maunsell, J. H. (1993). How parallel are the primate visual pathways? *Annu. Rev. Neurosci.* 16, 369–402. doi:10.1146/annurev.ne.16.030193.002101.
- Merlin, L. R., Bergold, P. J., and Wong, R. K. (1998). Requirement of protein synthesis for group I mGluR-mediated induction of epileptiform discharges. *J. Neurophysiol.* 80, 989–993. doi:10.1152/jn.1998.80.2.989.
- Michalon, A., Sidorov, M., Ballard, T. M., Ozmen, L., Spooren, W., Wettstein, J. G., et al. (2012). Chronic pharmacological mGlu5 inhibition corrects fragile X in adult mice. *Neuron* 74, 49–56. doi:10.1016/j.neuron.2012.03.009.
- Mientjes, E. J., Nieuwenhuizen, I., Kirkpatrick, L., Zu, T., Hoogeveen-Westerveld, M., Severijnen, L., et al. (2006). The generation of a conditional Fmr1 knock out mouse model to study Fmrp function in vivo. *Neurobiol. Dis.* 21, 549–555. doi:10.1016/j.nbd.2005.08.019.
- Milà, M., Rodriguez-Revena, L., and Matilla-Dueñas, A. (2016). FMR1 Premutation: Basic Mechanisms and Clinical Involvement. *Cerebellum Lond. Engl.* 15, 543–545. doi:10.1007/s12311-016-0808-7.
- Miller, L. J., McIntosh, D. N., McGrath, J., Shyu, V., Lampe, M., Taylor, A. K., et al. (1999). Electrodermal responses to sensory stimuli in individuals with fragile X syndrome: a preliminary report. *Am. J. Med. Genet.* 83, 268–279.
- Miller, R. F., and Dowling, J. E. (1970). Intracellular responses of the Müller (glial) cells of mudpuppy retina: their relation to b-wave of the electroretinogram. *J. Neurophysiol.* 33, 323–341. doi:10.1152/jn.1970.33.3.323.
- Miyoshi, G., Hjerling-Leffler, J., Karayannis, T., Sousa, V. H., Butt, S. J. B., Battiste, J., et al. (2010). Genetic fate mapping reveals that the caudal ganglionic eminence produces a large and diverse population of superficial cortical interneurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 1582–1594. doi:10.1523/JNEUROSCI.4515-09.2010.
- Monaghan, K. G., Lyon, E., Spector, E. B., and erican College of Medical Genetics and Genomics (2013). ACMG Standards and Guidelines for fragile X testing: a revision to the disease-specific supplements to the Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* 15, 575–586. doi:10.1038/gim.2013.61.
- Muddashetty, R. S., Kelić, S., Gross, C., Xu, M., and Bassell, G. J. (2007). Dysregulated metabotropic glutamate receptor-dependent translation of AMPA receptor and postsynaptic density-95 mRNAs at synapses in a mouse model of fragile X syndrome. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 5338–5348. doi:10.1523/JNEUROSCI.0937-07.2007.
- Muddashetty, R. S., Nalavadi, V. C., Gross, C., Yao, X., Xing, L., Laur, O., et al. (2011). Reversible Inhibition of PSD-95 mRNA Translation by miR-125a, FMRP Phosphorylation, and mGluR Signaling. *Mol. Cell* 42, 673–688. doi:10.1016/j.molcel.2011.05.006.
- Munir, F., Cornish, K. M., and Wilding, J. (2000). A neuropsychological profile of attention deficits in young males with fragile X syndrome. *Neuropsychologia* 38, 1261–1270.
- Murakami, M., Otsuka, T., and Shimazaki, H. (1975). Effects of aspartate and glutamate on the bipolar cells in the carp retina. *Vision Res.* 15, 456–458. doi:10.1016/0042-6989(75)90101-7.
- Murthy, V. N. (2011). Olfactory maps in the brain. *Annu. Rev. Neurosci.* 34, 233–258. doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113738.
- Musumeci, S. A., Bosco, P., Calabrese, G., Bakker, C., De Sarro, G. B., Elia, M., et al. (2000). Audiogenic seizures susceptibility in transgenic mice with fragile X syndrome. *Epilepsia* 41, 19–23.

- Musumeci, S. A., Calabrese, G., Bonaccorso, C. M., D'Antoni, S., Brouwer, J. R., Bakker, C. E., et al. (2007). Audiogenic seizure susceptibility is reduced in fragile X knockout mice after introduction of FMR1 transgenes. *Exp. Neurol.* 203, 233–240. doi:10.1016/j.expneurol.2006.08.007.
- Musumeci, S. A., Hagerman, R. J., Ferri, R., Bosco, P., Dalla Bernardina, B., Tassinari, C. A., et al. (1999). Epilepsy and EEG findings in males with fragile X syndrome. *Epilepsia* 40, 1092–1099.
- Myrick, L. K., Deng, P.-Y., Hashimoto, H., Oh, Y. M., Cho, Y., Poidevin, M. J., et al. (2015a). Independent role for presynaptic FMRP revealed by an FMR1 missense mutation associated with intellectual disability and seizures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 949–956. doi:10.1073/pnas.1423094112.
- Myrick, L. K., Hashimoto, H., Cheng, X., and Warren, S. T. (2015b). Human FMRP contains an integral tandem Agenet (Tudor) and KH motif in the amino terminal domain. *Hum. Mol. Genet.* 24, 1733–1740. doi:10.1093/hmg/ddu586.
- Myrick, L. K., Nakamoto-Kinoshita, M., Lindor, N. M., Kirmani, S., Cheng, X., and Warren, S. T. (2014). Fragile X syndrome due to a missense mutation. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 22, 1185–1189. doi:10.1038/ejhg.2013.311.
- Naie, K., and Manahan-Vaughan, D. (2005). Investigations of the protein synthesis dependency of mGluR-induced long-term depression in the dentate gyrus of freely moving rats. *Neuropharmacology* 49 Suppl 1, 35–44. doi:10.1016/j.neuropharm.2005.06.001.
- Naismith, R. T., Tutlam, N. T., Xu, J., Shepherd, J. B., Klawiter, E. C., Song, S.-K., et al. (2009). Optical coherence tomography is less sensitive than visual evoked potentials in optic neuritis. *Neurology* 73, 46–52. doi:10.1212/WNL.0b013e3181aaea32.
- Nakajima, Y., Iwakabe, H., Akazawa, C., Nawa, H., Shigemoto, R., Mizuno, N., et al. (1993). Molecular characterization of a novel retinal metabotropic glutamate receptor mGluR6 with a high agonist selectivity for L-2-amino-4-phosphonobutyrate. *J. Biol. Chem.* 268, 11868–11873.
- Nalavadi, V. C., Muddashetty, R. S., Gross, C., and Bassell, G. J. (2012). Dephosphorylation-induced ubiquitination and degradation of FMRP in dendrites: a role in immediate early mGluR-stimulated translation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 2582–2587. doi:10.1523/JNEUROSCI.5057-11.2012.
- Newman, E. A. (2003). New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci.* 26, 536–542. doi:10.1016/S0166-2236(03)00237-6.
- Nielsen, D. M., Derber, W. J., McClellan, D. A., and Crnic, L. S. (2002). Alterations in the auditory startle response in Fmr1 targeted mutant mouse models of fragile X syndrome. *Brain Res.* 927, 8–17. doi:10.1016/s0006-8993(01)03309-1.
- Nimchinsky, E. A., Oberlander, A. M., and Svoboda, K. (2001). Abnormal development of dendritic spines in FMR1 knock-out mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 21, 5139–5146.
- Nishida, A., Furukawa, A., Koike, C., Tano, Y., Aizawa, S., Matsuo, I., et al. (2003). Otx2 homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development. *Nat. Neurosci.* 6, 1255–1263. doi:10.1038/nn1155.
- Noell, W. K. (1954). The origin of the electroretinogram. *Am. J. Ophthalmol.* 38, 78–90. doi:10.1016/0002-9394(54)90012-4.
- Nolin, S. L., Glicksman, A., Ding, X., Ersalesi, N., Brown, W. T., Sherman, S. L., et al. (2011). Fragile X analysis of 1112 prenatal samples from 1991 to 2010. *Prenat. Diagn.* 31, 925–931. doi:10.1002/pd.2815.

- Nolin, S. L., Glicksman, A., Ersalesi, N., Dobkin, C., Brown, W. T., Cao, R., et al. (2015). Fragile X full mutation expansions are inhibited by one or more AGG interruptions in premutation carriers. *Genet. Med. Off. J. Am. Coll. Med. Genet.* 17, 358–364. doi:10.1038/gim.2014.106.
- Nolin, S. L., Glicksman, A., Houck, G. E., Brown, W. T., and Dobkin, C. S. (1994). Mosaicism in fragile X affected males. *Am. J. Med. Genet.* 51, 509–512. doi:10.1002/ajmg.1320510444.
- Oberlé, I., Rousseau, F., Heitz, D., Kretz, C., Devys, D., Hanauer, A., et al. (1991). Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 252, 1097–1102. doi:10.1126/science.252.5009.1097.
- Osterberg (1937). Topography of the Layer of Rods and Cones in the Human Retina. *J. Am. Med. Assoc.* 108, 232. doi:10.1001/jama.1937.02780030070033.
- Paquet, C., Boissonnot, M., Roger, F., Dighiero, P., Gil, R., and Hugon, J. (2007). Abnormal retinal thickness in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 420, 97–99. doi:10.1016/j.neulet.2007.02.090.
- Paradee, W., Melikian, H. E., Rasmussen, D. L., Kenneson, A., Conn, P. J., and Warren, S. T. (1999). Fragile X mouse: strain effects of knockout phenotype and evidence suggesting deficient amygdala function. *Neuroscience* 94, 185–192. doi:10.1016/s0306-4522(99)00285-7.
- Paribello, C., Tao, L., Folino, A., Berry-Kravis, E., Tranfaglia, M., Ethell, I. M., et al. (2010). Open-label add-on treatment trial of minocycline in fragile X syndrome. *BMC Neurol.* 10, 91. doi:10.1186/1471-2377-10-91.
- Paul, C.-M., Magda, G., and Abel, S. (2009). Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behav. Brain Res.* 203, 151–164. doi:10.1016/j.bbr.2009.05.022.
- Pei, Y. F., and Rhodin, J. A. (1970). The prenatal development of the mouse eye. *Anat. Rec.* 168, 105–125. doi:10.1002/ar.1091680109.
- Penagarikano, O., Mulle, J. G., and Warren, S. T. (2007). The pathophysiology of fragile x syndrome. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 8, 109–129. doi:10.1146/annurev.genom.8.080706.092249.
- Penn, R. D., and Hagins, W. A. (1969). Signal transmission along retinal rods and the origin of the electroretinographic a-wave. *Nature* 223, 201–204. doi:10.1038/223201a0.
- Pepperberg, D. R., and Masland, R. H. (1978). Retinal-induced sensitization of light-adapted rabbit photoreceptors. *Brain Res.* 151, 194–200. doi:10.1016/0006-8993(78)90964-2.
- Perche, O., Felgerolle, C., Ardourel, M., Bazinet, A., Pâris, A., Rossignol, R., et al. (2018). Early Retinal Defects in Fmr1-/y Mice: Toward a Critical Role of Visual Dys-Sensitivity in the Fragile X Syndrome Phenotype? *Front. Cell. Neurosci.* 12, 96. doi:10.3389/fncel.2018.00096.
- Perlman, I. (1995). "The Electroretinogram: ERG," in *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*, eds. H. Kolb, E. Fernandez, and R. Nelson (Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11554/> [Accessed October 25, 2019].
- Pfeiffer, B. E., and Huber, K. M. (2009). The state of synapses in fragile X syndrome. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* 15, 549–567. doi:10.1177/1073858409333075.
- Pieretti, M., Zhang, F. P., Fu, Y. H., Warren, S. T., Oostra, B. A., Caskey, C. T., et al. (1991). Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell* 66, 817–822. doi:10.1016/0092-8674(91)90125-i.

- Pietro Paolo, S., Guilleminot, A., Martin, B., D'Amato, F. R., and Crusio, W. E. (2011). Genetic-background modulation of core and variable autistic-like symptoms in Fmr1 knock-out mice. *PLoS One* 6, e17073. doi:10.1371/journal.pone.0017073.
- Pinto, L. H., Vitaterna, M. H., Shimomura, K., Siepka, S. M., Balannik, V., McDearmon, E. L., et al. (2007). Generation, identification and functional characterization of the nob4 mutation of Grm6 in the mouse. *Vis. Neurosci.* 24, 111–123. doi:10.1017/S0952523807070149.
- Piro, A., Tagarelli, A., Nicoletti, G., Chiriaco, C., Novellino, F., and Quattrone, A. (2018). Color vision as a biological marker able to differentiate two phenotypically similar neurological diseases. *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.* 39, 951–952. doi:10.1007/s10072-017-3219-8.
- Pizzorusso, T., Medini, P., Berardi, N., Chierzi, S., Fawcett, J. W., and Maffei, L. (2002). Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science* 298, 1248–1251. doi:10.1126/science.1072699.
- Prasov, L., and Glaser, T. (2012). Pushing the envelope of retinal ganglion cell genesis: context dependent function of Math5 (Atoh7). *Dev. Biol.* 368, 214–230. doi:10.1016/j.ydbio.2012.05.005.
- Price, B. A., Sandoval, I. M., Chan, F., Nichols, R., Roman-Sanchez, R., Wensel, T. G., et al. (2012). Rhodopsin gene expression determines rod outer segment size and rod cell resistance to a dominant-negative neurodegeneration mutant. *PLoS One* 7, e49889. doi:10.1371/journal.pone.0049889.
- Price, T. J., Rashid, M. H., Millicamps, M., Sanoja, R., Entrena, J. M., and Cervero, F. (2007). Decreased nociceptive sensitization in mice lacking the fragile X mental retardation protein: role of mGluR1/5 and mTOR. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 13958–13967. doi:10.1523/JNEUROSCI.4383-07.2007.
- Prochiantz, A., and Di Nardo, A. A. (2015). Homeoprotein signaling in the developing and adult nervous system. *Neuron* 85, 911–925. doi:10.1016/j.neuron.2015.01.019.
- Prochiantz, A., Fuchs, J., and Di Nardo, A. A. (2014). Postnatal signalling with homeoprotein transcription factors. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 369. doi:10.1098/rstb.2013.0518.
- Purpura, D. P. (1974). Dendritic spine “dysgenesis” and mental retardation. *Science* 186, 1126–1128. doi:10.1126/science.186.4169.1126.
- Pyeritz, R. E., Stamberg, J., Thomas, G. H., Bell, B. B., Zahka, K. G., and Bernhardt, B. A. (1982). The marker Xq28 syndrome (“Fragile-X Syndrome”) in a retarded man with mitral valve prolapse. *Johns Hopkins Med. J.* 151, 231–237.
- Qin, M., Xia, Z., Huang, T., and Smith, C. B. (2011). Effects of chronic immobilization stress on anxiety-like behavior and basolateral amygdala morphology in Fmr1 knockout mice. *Neuroscience* 194, 282–290. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.06.047.
- Quiroz, J. A., Tamburri, P., Deptula, D., Banken, L., Beyer, U., Rabbia, M., et al. (2016). Efficacy and Safety of Basimglurant as Adjunctive Therapy for Major Depression: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Psychiatry* 73, 675–684. doi:10.1001/jamapsychiatry.2016.0838.
- Rais, M., Binder, D. K., Razak, K. A., and Ethell, I. M. (2018). Sensory Processing Phenotypes in Fragile X Syndrome. *ASN Neuro* 10, 1759091418801092. doi:10.1177/1759091418801092.
- Raspa, M., Franco, V., Bishop, E., Wheeler, A. C., Wylie, A., and Bailey, D. B. (2018). A comparison of functional academic and daily living skills in males with fragile X syndrome with and without autism. *Res. Dev. Disabil.* 78, 1–14. doi:10.1016/j.ridd.2018.04.024.

- Rauch, A., Hoyer, J., Guth, S., Zweier, C., Kraus, C., Becker, C., et al. (2006). Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am. J. Med. Genet. A.* 140, 2063–2074. doi:10.1002/ajmg.a.31416.
- Raymond, C. R., Thompson, V. L., Tate, W. P., and Abraham, W. C. (2000). Metabotropic glutamate receptors trigger homosynaptic protein synthesis to prolong long-term potentiation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 969–976.
- Rebsam, A., and Mason, C. A. (2008). Otx2's incredible journey. *Cell* 134, 386–387. doi:10.1016/j.cell.2008.07.029.
- Reichenbach, A., and Bringmann, A. (2010). "Müller Cells in the Healthy Retina," in *Müller Cells in the Healthy and Diseased Retina*, eds. A. Reichenbach and A. Bringmann (New York, NY: Springer New York), 35–214. doi:10.1007/978-1-4419-1672-3\_2.
- Reinhard, S. M., Razak, K., and Ethell, I. M. (2015). A delicate balance: role of MMP-9 in brain development and pathophysiology of neurodevelopmental disorders. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 280. doi:10.3389/fncel.2015.00280.
- Reiss, A. L., and Freund, L. (1990). Fragile X syndrome, DSM-III-R, and autism. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 29, 885–891.
- Reiss, A. L., Mazzocco, M. M., Greenlaw, R., Freund, L. S., and Ross, J. L. (1995). Neurodevelopmental effects of X monosomy: a volumetric imaging study. *Ann. Neurol.* 38, 731–738. doi:10.1002/ana.410380507.
- Reiss, A. L., Patel, S., Kumar, A. J., and Freund, L. (1988). Preliminary communication: neuroanatomical variations of the posterior fossa in men with the fragile X (Martin-Bell) syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 31, 407–414. doi:10.1002/ajmg.1320310220.
- Restivo, L., Ferrari, F., Passino, E., Sgobio, C., Bock, J., Oostra, B. A., et al. (2005). Enriched environment promotes behavioral and morphological recovery in a mouse model for the fragile X syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 11557–11562. doi:10.1073/pnas.0504984102.
- Reyniers, E., Martin, J. J., Cras, P., Van Marck, E., Handig, I., Jorens, H. Z., et al. (1999). Postmortem examination of two fragile X brothers with an FMR1 full mutation. *Am. J. Med. Genet.* 84, 245–249. doi:10.1002/(sici)1096-8628(19990528)84:3<245::aid-ajmg16>3.0.co;2-u.
- Richards, R. I., and Sutherland, G. R. (1994). Simple repeat DNA is not replicated simply. *Nat. Genet.* 6, 114–116. doi:10.1038/ng0294-114.
- Rietdyk, S., and Rhea, C. K. (2006). Control of adaptive locomotion: effect of visual obstruction and visual cues in the environment. *Exp. Brain Res.* 169, 272–278. doi:10.1007/s00221-005-0345-y.
- Rojas, D. C., Benkers, T. L., Rogers, S. J., Teale, P. D., Reite, M. L., and Hagerman, R. J. (2001). Auditory evoked magnetic fields in adults with fragile X syndrome. *Neuroreport* 12, 2573–2576. doi:10.1097/00001756-200108080-00056.
- Rossignol, R., Ranchon-Cole, I., Pâris, A., Herzine, A., Perche, A., Laurenceau, D., et al. (2014). Visual sensorial impairments in neurodevelopmental disorders: evidence for a retinal phenotype in Fragile X Syndrome. *PLoS One* 9, e105996. doi:10.1371/journal.pone.0105996.
- Rotschafer, S. E., Marshak, S., and Cramer, K. S. (2015). Deletion of Fmr1 alters function and synaptic inputs in the auditory brainstem. *PLoS One* 10, e0117266. doi:10.1371/journal.pone.0117266.

- Rotschafer, S. E., Trujillo, M. S., Dansie, L. E., Ethell, I. M., and Razak, K. A. (2012). Minocycline treatment reverses ultrasonic vocalization production deficit in a mouse model of Fragile X Syndrome. *Brain Res.* 1439, 7–14. doi:10.1016/j.brainres.2011.12.041.
- Rotschafer, S., and Razak, K. (2013). Altered auditory processing in a mouse model of fragile X syndrome. *Brain Res.* 1506, 12–24. doi:10.1016/j.brainres.2013.02.038.
- Rudelli, R. D., Brown, W. T., Wisniewski, K., Jenkins, E. C., Laure-Kamionowska, M., Connell, F., et al. (1985). Adult fragile X syndrome. Clinico-neuropathologic findings. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 67, 289–295.
- Sabanov, V., Braat, S., D’Andrea, L., Willemsen, R., Zeidler, S., Rooms, L., et al. (2017). Impaired GABAergic inhibition in the hippocampus of Fmr1 knockout mice. *Neuropharmacology* 116, 71–81. doi:10.1016/j.neuropharm.2016.12.010.
- Sadeh, A., Gruber, R., and Raviv, A. (2002). Sleep, neurobehavioral functioning, and behavior problems in school-age children. *Child Dev.* 73, 405–417.
- Salkoff, L., Butler, A., Ferreira, G., Santi, C., and Wei, A. (2006). High-conductance potassium channels of the SLO family. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 921–931. doi:10.1038/nrn1992.
- SanGiovanni, J. P., and Chew, E. Y. (2005). The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 24, 87–138. doi:10.1016/j.preteyeres.2004.06.002.
- Sarnaik, R., Chen, H., Liu, X., and Cang, J. (2014). Genetic disruption of the On visual pathway affects cortical orientation selectivity and contrast sensitivity in mice. *J. Neurophysiol.* 111, 2276–2286. doi:10.1152/jn.00558.2013.
- Satya-Murti, S., Cacace, A. T., and Hanson, P. A. (1979). Abnormal auditory evoked potentials in hereditary motor-sensory neuropathy. *Ann. Neurol.* 5, 445–448. doi:10.1002/ana.410050506.
- Saul, R. A., and Tarleton, J. C. (1993). “FMR1-Related Disorders,” in *GeneReviews®*, eds. M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. Bean, K. Stephens, et al. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1384/> [Accessed June 19, 2019].
- Scerif, G., Cornish, K., Wilding, J., Driver, J., and Karmiloff-Smith, A. (2004). Visual search in typically developing toddlers and toddlers with Fragile X or Williams syndrome. *Dev. Sci.* 7, 116–130.
- Scerif, G., Cornish, K., Wilding, J., Driver, J., and Karmiloff-Smith, A. (2007). Delineation of early attentional control difficulties in fragile X syndrome: focus on neurocomputational changes. *Neuropsychologia* 45, 1889–1898. doi:10.1016/j.neuropsychologia.2006.12.005.
- Schaefer, T. L., Davenport, M. H., Grainger, L. M., Robinson, C. K., Earnheart, A. T., Stegman, M. S., et al. (2017). Acamprosate in a mouse model of fragile X syndrome: modulation of spontaneous cortical activity, ERK1/2 activation, locomotor behavior, and anxiety. *J. Neurodev. Disord.* 9, 6. doi:10.1186/s11689-017-9184-y.
- Schiff, J. A., Cracco, R. Q., and Cracco, J. B. (1985). Brainstem auditory evoked potentials in Guillain-Barré syndrome. *Neurology* 35, 771–773. doi:10.1212/wnl.35.5.771.
- Schilit Nitenson, A., Stackpole, E. E., Truszkowski, T. L. S., Midroit, M., Fallon, J. R., and Bath, K. G. (2015). Fragile X mental retardation protein regulates olfactory sensitivity but not odorant discrimination. *Chem. Senses* 40, 345–350. doi:10.1093/chemse/bjv019.
- Schiller, P. H. (1982). Central connections of the retinal ON and OFF pathways. *Nature* 297, 580–583. doi:10.1038/297580a0.

- Schmucker, C., Seeliger, M., Humphries, P., Biel, M., and Schaeffel, F. (2005). Grating acuity at different luminances in wild-type mice and in mice lacking rod or cone function. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 398–407. doi:10.1167/iovs.04-0959.
- Schneider, A., Hagerman, R. J., and Hessler, D. (2009). Fragile X syndrome -- from genes to cognition. *Dev. Disabil. Res. Rev.* 15, 333–342. doi:10.1002/ddrr.80.
- Schneider, A., Leigh, M. J., Adams, P., Nanakul, R., Chechi, T., Olichney, J., et al. (2013). Electroconvulsive treatment associated with minocycline treatment in fragile X syndrome. *J. Psychopharmacol. Oxf. Engl.* 27, 956–963. doi:10.1177/0269881113494105.
- Selby, L., Zhang, C., and Sun, Q.-Q. (2007). Major defects in neocortical GABAergic inhibitory circuits in mice lacking the fragile X mental retardation protein. *Neurosci. Lett.* 412, 227–232. doi:10.1016/j.neulet.2006.11.062.
- Sellier, C., Buijsen, R. A. M., He, F., Natla, S., Jung, L., Tropel, P., et al. (2017). Translation of Expanded CGG Repeats into FMRpolyG Is Pathogenic and May Contribute to Fragile X Tremor Ataxia Syndrome. *Neuron* 93, 331–347. doi:10.1016/j.neuron.2016.12.016.
- Shaw, T. A., and Porter, M. A. (2013). Emotion recognition and visual-scan paths in Fragile X syndrome. *J. Autism Dev. Disord.* 43, 1119–1139. doi:10.1007/s10803-012-1654-1.
- Shen, W., Fruttiger, M., Zhu, L., Chung, S. H., Barnett, N. L., Kirk, J. K., et al. (2012). Conditional Müller cell ablation causes independent neuronal and vascular pathologies in a novel transgenic model. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 15715–15727. doi:10.1523/JNEUROSCI.2841-12.2012.
- Sherman, S. L., Jacobs, P. A., Morton, N. E., Froster-Iskenius, U., Howard-Peebles, P. N., Nielsen, K. B., et al. (1985). Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum. Genet.* 69, 289–299.
- Sillman, A. J., Ito, H., and Tomita, T. (1969). Studies on the mass receptor potential of the isolated frog retina. I. General properties of the response. *Vision Res.* 9, 1435–1442. doi:10.1016/0042-6989(69)90059-5.
- Silverman, J. L., Pride, M. C., Hayes, J. E., Puhger, K. R., Butler-Struben, H. M., Baker, S., et al. (2015). GABAB Receptor Agonist R-Baclofen Reverses Social Deficits and Reduces Repetitive Behavior in Two Mouse Models of Autism. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 40, 2228–2239. doi:10.1038/npp.2015.66.
- Sinclair, D., Featherstone, R., Naschek, M., Nam, J., Du, A., Wright, S., et al. (2017a). GABA-B Agonist Baclofen Normalizes Auditory-Evoked Neural Oscillations and Behavioral Deficits in the Fmr1 Knockout Mouse Model of Fragile X Syndrome. *eNeuro* 4. doi:10.1523/ENEURO.0380-16.2017.
- Sinclair, D., Oranje, B., Razak, K. A., Siegel, S. J., and Schmid, S. (2017b). Sensory processing in autism spectrum disorders and Fragile X syndrome-From the clinic to animal models. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 76, 235–253. doi:10.1016/j.neubiorev.2016.05.029.
- Singh, K., Gaur, P., and Prasad, S. (2007). Fragile x mental retardation (Fmr-1) gene expression is down regulated in brain of mice during aging. *Mol. Biol. Rep.* 34, 173–181. doi:10.1007/s11033-006-9032-8.
- Siomi, H., Siomi, M. C., Nussbaum, R. L., and Dreyfuss, G. (1993). The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. *Cell* 74, 291–298.
- Slaughter, M. M., and Miller, R. F. (1981). 2-amino-4-phosphonobutyric acid: a new pharmacological tool for retina research. *Science* 211, 182–185. doi:10.1126/science.6255566.

- Snyder, E. M., Philpot, B. D., Huber, K. M., Dong, X., Fallon, J. R., and Bear, M. F. (2001). Internalization of ionotropic glutamate receptors in response to mGluR activation. *Nat. Neurosci.* 4, 1079–1085. doi:10.1038/nn746.
- Sofola, O., Sundram, V., Ng, F., Kleyner, Y., Morales, J., Botas, J., et al. (2008). The Drosophila FMRP and LARK RNA-binding proteins function together to regulate eye development and circadian behavior. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 10200–10205. doi:10.1523/JNEUROSCI.2786-08.2008.
- Sousa, V. H., Miyoshi, G., Hjerling-Leffler, J., Karayannis, T., and Fishell, G. (2009). Characterization of Nkx6-2-derived neocortical interneuron lineages. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* 19 Suppl 1, i1-10. doi:10.1093/cercor/bhp038.
- Spencer, C. M., Alekseyenko, O., Hamilton, S. M., Thomas, A. M., Serysheva, E., Yuva-Paylor, L. A., et al. (2011). Modifying behavioral phenotypes in Fmr1KO mice: genetic background differences reveal autistic-like responses. *Autism Res. Off. J. Int. Soc. Autism Res.* 4, 40–56. doi:10.1002/aur.168.
- Spencer, C. M., Alekseyenko, O., Serysheva, E., Yuva-Paylor, L. A., and Paylor, R. (2005). Altered anxiety-related and social behaviors in the Fmr1 knockout mouse model of fragile X syndrome. *Genes Brain Behav.* 4, 420–430. doi:10.1111/j.1601-183X.2005.00123.x.
- Sreeram, N., Wren, C., Bhate, M., Robertson, P., and Hunter, S. (1989). Cardiac abnormalities in the fragile X syndrome. *Br. Heart J.* 61, 289–291. doi:10.1136/hrt.61.3.289.
- St Clair, D. M., Blackwood, D. H., Oliver, C. J., and Dickens, P. (1987). P3 abnormality in fragile X syndrome. *Biol. Psychiatry* 22, 303–312.
- Stockard, J. J., Stockard, J. E., and Sharbrough, F. W. (1979). Brain-stem auditory-evoked responses. *Arch. Neurol.* 36, 597–598. doi:10.1001/archneur.1979.00500450091025.
- Strauss, O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol. Rev.* 85, 845–881. doi:10.1152/physrev.00021.2004.
- Sugiyama, S., Di Nardo, A. A., Aizawa, S., Matsuo, I., Volovitch, M., Prochiantz, A., et al. (2008). Experience-dependent transfer of Otx2 homeoprotein into the visual cortex activates postnatal plasticity. *Cell* 134, 508–520. doi:10.1016/j.cell.2008.05.054.
- Tang, B., Wang, T., Wan, H., Han, L., Qin, X., Zhang, Y., et al. (2015). Fmr1 deficiency promotes age-dependent alterations in the cortical synaptic proteome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E4697-4706. doi:10.1073/pnas.1502258112.
- Tassone, F., and Hagerman, P. J. (2003). Expression of the FMR1 gene. *Cytogenet. Genome Res.* 100, 124–128. doi:10.1159/000072846.
- Tassone, F., Hagerman, R. J., Taylor, A. K., Gane, L. W., Godfrey, T. E., and Hagerman, P. J. (2000). Elevated levels of FMR1 mRNA in carrier males: a new mechanism of involvement in the fragile-X syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 66, 6–15.
- Telias, M. (2019). Molecular Mechanisms of Synaptic Dysregulation in Fragile X Syndrome and Autism Spectrum Disorders. *Front. Mol. Neurosci.* 12, 51. doi:10.3389/fnmol.2019.00051.
- Tessier, C. R., and Broadie, K. (2012). Molecular and genetic analysis of the Drosophila model of fragile X syndrome. *Results Probl. Cell Differ.* 54, 119–156. doi:10.1007/978-3-642-21649-7\_7.
- Thaug, C., Arnold, K., Jackson, I. J., and Coffey, P. J. (2002). Presence of visual head tracking differentiates normal sighted from retinal degenerate mice. *Neurosci. Lett.* 325, 21–24. doi:10.1016/s0304-3940(02)00223-9.



- Thomas, B. B., Seiler, M. J., Satta, S. R., Coffey, P. J., and Aramant, R. B. (2004). Optokinetic test to evaluate visual acuity of each eye independently. *J. Neurosci. Methods* 138, 7–13. doi:10.1016/j.jneumeth.2004.03.007.
- Tian, M., Zeng, Y., Hu, Y., Yuan, X., Liu, S., Li, J., et al. (2015). 7, 8-Dihydroxyflavone induces synapse expression of AMPA GluA1 and ameliorates cognitive and spine abnormalities in a mouse model of fragile X syndrome. *Neuropharmacology* 89, 43–53. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.09.006.
- Till, S. M., Wijetunge, L. S., Seidel, V. G., Harlow, E., Wright, A. K., Bagni, C., et al. (2012). Altered maturation of the primary somatosensory cortex in a mouse model of fragile X syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 21, 2143–2156. doi:10.1093/hmg/dds030.
- Todd, P. K., Mack, K. J., and Malter, J. S. (2003). The fragile X mental retardation protein is required for type-I metabotropic glutamate receptor-dependent translation of PSD-95. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 14374–14378. doi:10.1073/pnas.2336265100.
- Touchette, E., Petit, D., Séguin, J. R., Boivin, M., Tremblay, R. E., and Montplaisir, J. Y. (2007). Associations between sleep duration patterns and behavioral/cognitive functioning at school entry. *Sleep* 30, 1213–1219. doi:10.1093/sleep/30.9.1213.
- Tranfaglia, M. R. (2011). The psychiatric presentation of fragile x: evolution of the diagnosis and treatment of the psychiatric comorbidities of fragile X syndrome. *Dev. Neurosci.* 33, 337–348. doi:10.1159/000329421.
- Tsai, N.-P., Wilkerson, J. R., Guo, W., Maksimova, M. A., DeMartino, G. N., Cowan, C. W., et al. (2012). Multiple autism-linked genes mediate synapse elimination via proteasomal degradation of a synaptic scaffold PSD-95. *Cell* 151, 1581–1594. doi:10.1016/j.cell.2012.11.040.
- Turk, J., and Cornish, K. (1998). Face recognition and emotion perception in boys with fragile-X syndrome. *J. Intellect. Disabil. Res. JIDR* 42 ( Pt 6), 490–499.
- Turner, G., Eastman, C., Casey, J., McLeay, A., Procopis, P., and Turner, B. (1975). X-linked mental retardation associated with macro-orchidism. *J. Med. Genet.* 12, 367–371. doi:10.1136/jmg.12.4.367.
- Tzameret, A., Sher, I., Edelstain, V., Belkin, M., Kalter-Leibovici, O., Solomon, A. S., et al. (2019). Evaluation of visual function in Royal College of Surgeon rats using a depth perception visual cliff test. *Vis. Neurosci.* 36, E002. doi:10.1017/S095252381800007X.
- Utari, A., Adams, E., Berry-Kravis, E., Chavez, A., Scaggs, F., Ngotran, L., et al. (2010). Aging in fragile X syndrome. *J. Neurodev. Disord.* 2, 70–76. doi:10.1007/s11689-010-9047-2.
- Van der Molen, M. J. W., Van der Molen, M. W., Ridderinkhof, K. R., Hamel, B. C. J., Curfs, L. M. G., and Ramakers, G. J. A. (2012a). Auditory and visual cortical activity during selective attention in fragile X syndrome: a cascade of processing deficiencies. *Clin. Neurophysiol. Off. J. Int. Fed. Clin. Neurophysiol.* 123, 720–729. doi:10.1016/j.clinph.2011.08.023.
- Van der Molen, M. J. W., Van der Molen, M. W., Ridderinkhof, K. R., Hamel, B. C. J., Curfs, L. M. G., and Ramakers, G. J. A. (2012b). Auditory change detection in fragile X syndrome males: a brain potential study. *Clin. Neurophysiol. Off. J. Int. Fed. Clin. Neurophysiol.* 123, 1309–1318. doi:10.1016/j.clinph.2011.11.039.
- van 't Padje, S., Engels, B., Blondin, L., Severijnen, L.-A., Verheijen, F., Oostra, B. A., et al. (2005). Characterisation of Fmrp in zebrafish: evolutionary dynamics of the fmr1 gene. *Dev. Genes Evol.* 215, 198–206. doi:10.1007/s00427-005-0466-0.

- Veeraragavan, S., Bui, N., Perkins, J. R., Yuva-Paylor, L. A., Carpenter, R. L., and Paylor, R. (2011). Modulation of behavioral phenotypes by a muscarinic M1 antagonist in a mouse model of fragile X syndrome. *Psychopharmacology (Berl.)* 217, 143–151. doi:10.1007/s00213-011-2276-6.
- Verheij, C., Bakker, C. E., de Graaff, E., Keulemans, J., Willemsen, R., Verkerk, A. J., et al. (1993). Characterization and localization of the FMR-1 gene product associated with fragile X syndrome. *Nature* 363, 722–724. doi:10.1038/363722a0.
- Verkerk, A. J., de Graaff, E., De Boule, K., Eichler, E. E., Konecki, D. S., Reyniers, E., et al. (1993). Alternative splicing in the fragile X gene FMR1. *Hum. Mol. Genet.* 2, 399–404. doi:10.1093/hmg/2.4.399.
- Verkerk, A. J., Pieretti, M., Sutcliffe, J. S., Fu, Y.-H., Kuhl, D. P., Pizzuti, A., et al. (1991). Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 65, 905–914.
- Vinueza Veloz, M. F., Buijsen, R. a. M., Willemsen, R., Cupido, A., Bosman, L. W. J., Koekkoek, S. K. E., et al. (2012). The effect of an mGluR5 inhibitor on procedural memory and avoidance discrimination impairments in Fmr1 KO mice. *Genes Brain Behav.* 11, 325–331. doi:10.1111/j.1601-183X.2011.00763.x.
- Wan, L., Dockendorff, T. C., Jongens, T. A., and Dreyfuss, G. (2000). Characterization of dFMR1, a Drosophila melanogaster homolog of the fragile X mental retardation protein. *Mol. Cell. Biol.* 20, 8536–8547. doi:10.1128/mcb.20.22.8536-8547.2000.
- Wang, E. T., Taliaferro, J. M., Lee, J.-A., Sudhakaran, I. P., Rossoll, W., Gross, C., et al. (2016). Dysregulation of mRNA Localization and Translation in Genetic Disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 36, 11418–11426. doi:10.1523/JNEUROSCI.2352-16.2016.
- Wang, G. X., Smith, S. J., and Mourrain, P. (2014). Fmr1 KO and fenobam treatment differentially impact distinct synapse populations of mouse neocortex. *Neuron* 84, 1273–1286. doi:10.1016/j.neuron.2014.11.016.
- Wang, H., Morishita, Y., Miura, D., Naranjo, J. R., Kida, S., and Zhuo, M. (2012). Roles of CREB in the regulation of FMRP by group I metabotropic glutamate receptors in cingulate cortex. *Mol. Brain* 5, 27. doi:10.1186/1756-6606-5-27.
- Wang, J., Ethridge, L. E., Mosconi, M. W., White, S. P., Binder, D. K., Pedapati, E. V., et al. (2017a). A resting EEG study of neocortical hyperexcitability and altered functional connectivity in fragile X syndrome. *J. Neurodev. Disord.* 9, 11. doi:10.1186/s11689-017-9191-z.
- Wang, X., Mu, Y., Sun, M., and Han, J. (2017b). Bidirectional regulation of fragile X mental retardation protein phosphorylation controls rhodopsin homeostasis. *J. Mol. Cell Biol.* 9, 104–116. doi:10.1093/jmcb/mjw041.
- Wei, H., Dobkin, C., Sheikh, A. M., Malik, M., Brown, W. T., and Li, X. (2012). The therapeutic effect of memantine through the stimulation of synapse formation and dendritic spine maturation in autism and fragile X syndrome. *PLoS One* 7, e36981. doi:10.1371/journal.pone.0036981.
- Weiler, I. J., Irwin, S. A., Klintsova, A. Y., Spencer, C. M., Brazelton, A. D., Miyashiro, K., et al. (1997). Fragile X mental retardation protein is translated near synapses in response to neurotransmitter activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 5395–5400. doi:10.1073/pnas.94.10.5395.
- Wen, T. H., Afroz, S., Reinhard, S. M., Palacios, A. R., Tapia, K., Binder, D. K., et al. (2018). Genetic Reduction of Matrix Metalloproteinase-9 Promotes Formation of Perineuronal Nets Around Parvalbumin-Expressing

- Interneurons and Normalizes Auditory Cortex Responses in Developing Fmr1 Knock-Out Mice. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 28, 3951–3964. doi:10.1093/cercor/bhx258.
- Wen, T. H., Lovelace, J. W., Ethell, I. M., Binder, D. K., and Razak, K. A. (2019). Developmental Changes in EEG Phenotypes in a Mouse Model of Fragile X Syndrome. *Neuroscience* 398, 126–143. doi:10.1016/j.neuroscience.2018.11.047.
- West, S. K., Rubin, G. S., Broman, A. T., Muñoz, B., Bandeen-Roche, K., and Turano, K. (2002). How does visual impairment affect performance on tasks of everyday life? The SEE Project. Salisbury Eye Evaluation. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill* 1960 120, 774–780. doi:10.1001/archoph.120.6.774.
- Westmark, C. J. (2013). FMRP: a triple threat to PSD-95. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 57. doi:10.3389/fncel.2013.00057.
- Westmark, C. J., Sokol, D. K., Maloney, B., and Lahiri, D. K. (2016). Novel roles of amyloid-beta precursor protein metabolites in fragile X syndrome and autism. *Mol. Psychiatry* 21, 1333–1341. doi:10.1038/mp.2016.134.
- Wetzel, W., Getsova, V. M., Jork, R., and Matthies, H. (1980). Effect of serotonin on Y-maze retention and hippocampal protein synthesis in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 12, 319–322. doi:10.1016/0091-3057(80)90378-0.
- Wheeler, A. C., Mussey, J., Villagomez, A., Bishop, E., Raspa, M., Edwards, A., et al. (2015). DSM-5 changes and the prevalence of parent-reported autism spectrum symptoms in Fragile X syndrome. *J. Autism Dev. Disord.* 45, 816–829. doi:10.1007/s10803-014-2246-z.
- Wisniewski, K. E., French, J. H., Fernando, S., Brown, W. T., Jenkins, E. C., Friedman, E., et al. (1985). Fragile X syndrome: associated neurological abnormalities and developmental disabilities. *Ann. Neurol.* 18, 665–669. doi:10.1002/ana.410180607.
- Wisniewski, K. E., Segan, S. M., Miezieski, C. M., Sersen, E. A., and Rudelli, R. D. (1991). The Fra(X) syndrome: neurological, electrophysiological, and neuropathological abnormalities. *Am. J. Med. Genet.* 38, 476–480. doi:10.1002/ajmg.1320380267.
- Wolff, P. H., Gardner, J., Lappen, J., Paccia, J., and Meryash, D. (1988). Variable expression of the fragile X syndrome in heterozygous females of normal intelligence. *Am. J. Med. Genet.* 30, 213–225. doi:10.1002/ajmg.1320300121.
- Wurtz, R. H., and Albano, J. E. (1980). Visual-Motor Function of the Primate Superior Colliculus. *Annu. Rev. Neurosci.* 3, 189–226. doi:10.1146/annurev.ne.03.030180.001201.
- Xu, Q., Zhu, Z., Xu, J., Gu, W., and Zhao, Z. (2012). Depressed nNOS expression during spine transition in the developing hippocampus of FMR1 KO mice. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Medicas E Biol.* 45, 1234–1239. doi:10.1590/s0100-879x2012007500158.
- Yan, Q. J., Rammal, M., Tranfaglia, M., and Bauchwitz, R. P. (2005). Suppression of two major Fragile X Syndrome mouse model phenotypes by the mGluR5 antagonist MPEP. *Neuropharmacology* 49, 1053–1066. doi:10.1016/j.neuropharm.2005.06.004.
- Yoshii, A., Sheng, M. H., and Constantine-Paton, M. (2003). Eye opening induces a rapid dendritic localization of PSD-95 in central visual neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 1334–1339. doi:10.1073/pnas.0335785100.
- Youssef, E. A., Berry-Kravis, E., Czech, C., Hagerman, R. J., Hessel, D., Wong, C. Y., et al. (2018). Effect of the mGluR5-NAM Basimglurant on Behavior in Adolescents and Adults with Fragile X Syndrome in a Randomized,

- Double-Blind, Placebo-Controlled Trial: FragXis Phase 2 Results. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 43, 503–512. doi:10.1038/npp.2017.177.
- Yu, Z., Fan, D., Gui, B., Shi, L., Xuan, C., Shan, L., et al. (2012). Neurodegeneration-associated TDP-43 interacts with fragile X mental retardation protein (FMRP)/Staufen (STAU1) and regulates SIRT1 expression in neuronal cells. *J. Biol. Chem.* 287, 22560–22572. doi:10.1074/jbc.M112.357582.
- Zaghloul, K. A., Boahen, K., and Demb, J. B. (2003). Different circuits for ON and OFF retinal ganglion cells cause different contrast sensitivities. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 23, 2645–2654.
- Zalfa, F., Eleuteri, B., Dickson, K. S., Mercaldo, V., De Rubeis, S., di Penta, A., et al. (2007). A new function for the fragile X mental retardation protein in regulation of PSD-95 mRNA stability. *Nat. Neurosci.* 10, 578–587. doi:10.1038/nn1893.
- Zaman, T., De Oliveira, C., Smoka, M., Narla, C., Poulter, M. O., and Schmid, S. (2017). BK Channels Mediate Synaptic Plasticity Underlying Habituation in Rats. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 37, 4540–4551. doi:10.1523/JNEUROSCI.3699-16.2017.
- Zerbi, V., Markicevic, M., Gasparini, F., Schroeter, A., Rudin, M., and Wenderoth, N. (2019). Inhibiting mGluR5 activity by AFQ056/Mavoglurant rescues circuit-specific functional connectivity in Fmr1 knockout mice. *NeuroImage* 191, 392–402. doi:10.1016/j.neuroimage.2019.02.051.
- Zhang, J., Fang, Z., Jud, C., Vansteensel, M. J., Kaasik, K., Lee, C. C., et al. (2008). Fragile X-related proteins regulate mammalian circadian behavioral rhythms. *Am. J. Hum. Genet.* 83, 43–52. doi:10.1016/j.ajhg.2008.06.003.
- Zhang, N., Peng, Z., Tong, X., Lindemeyer, A. K., Cetina, Y., Huang, C. S., et al. (2017). Decreased surface expression of the  $\delta$  subunit of the GABAA receptor contributes to reduced tonic inhibition in dentate granule cells in a mouse model of fragile X syndrome. *Exp. Neurol.* 297, 168–178. doi:10.1016/j.expneurol.2017.08.008.
- Zhang, Y. Q., Bailey, A. M., Matthies, H. J., Renden, R. B., Smith, M. A., Speese, S. D., et al. (2001). Drosophila fragile X-related gene regulates the MAP1B homolog Futsch to control synaptic structure and function. *Cell* 107, 591–603.
- Zhang, Y., and Stone, J. (1997). Role of astrocytes in the control of developing retinal vessels. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38, 1653–1666.
- Zhao, B. S., Roundtree, I. A., and He, C. (2017). Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 31–42. doi:10.1038/nrm.2016.132.
- Zhao, J.-P., Murata, Y., and Constantine-Paton, M. (2013). Eye opening and PSD95 are required for long-term potentiation in developing superior colliculus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 707–712. doi:10.1073/pnas.1215854110.
- Zhu, Z.-W., Xu, Q., Zhao, Z.-Y., Gu, W.-Z., and Wu, D.-W. (2011). Spatiotemporal expression of PSD-95 in Fmr1 knockout mice brain. *Neuropathol. Off. J. Jpn. Soc. Neuropathol.* 31, 223–229. doi:10.1111/j.1440-1789.2010.01165.x.

**Chloé FELGEROLLE**

## **Anomalies sensorielles visuelles du Syndrome de l'X Fragile, contribution rétinienne au phénotype de dys-sensibilité**

Le syndrome de l'X fragile (FXS) est la première cause de déficience intellectuelle monogénique héréditaire liée à l'X (1/3000 garçons). Outre la déficience mentale, les patients présentent des troubles du spectre autistique et des perturbations sensorielles, parmi lesquelles une altération des fonctions visuelles. L'origine moléculaire du FXS se trouve dans la mise en silence du gène *FMR1*, ce dernier ne pouvant plus, par conséquent, exprimer la protéine FMRP. Aux niveaux moléculaire et cellulaire, la perte de FMRP engendre des anomalies structurales et fonctionnelles des synapses, aux niveaux cérébral mais aussi rétinien. Cette thèse tend à approfondir les connaissances des phénotypes rétinien et visuel en absence de protéine FMRP, ainsi que l'étude de la part d'implication de ce phénotype rétinien dans les phénotypes visuel et global du syndrome de l'X fragile.

Nous avons révélé la précocité et la stabilité des anomalies rétiniennes en absence de la protéine FMRP, ce qui confirme la force du phénotype rétinien en conditions FXS, et soulève la question de son influence sur d'autres structures. En parallèle, nous avons montré que l'absence de protéine FMRP engendre des perturbations significatives de plusieurs traits visuels d'un point de vue comportemental. Enfin, une stratégie a été élaborée afin de créer un modèle animal « FXS-rétine-spécifique », dont l'étude renseignerait sur les conséquences de l'absence localisée uniquement à la rétine de la protéine FMRP.

Cette thèse met en lumière l'importance des phénotypes visuel et rétinien du FXS, et apporte de nouvelles connaissances appuyant la place centrale des perturbations sensorielles dans cette pathologie.

Mots clé : Syndrome de l'X Fragile, troubles sensoriels, anomalies visuelles, système visuel, rétine, comportement visuel

## **Sensorial visual impairments in the Fragile X Syndrome, retinal contribution to the dys-sensitivity phenotype**

Fragile X syndrome (FXS) is the leading cause of X-linked hereditary monogenic intellectual disability (1/3000 boys). In addition to mental retardation, patients present autism spectrum disorders and sensory disturbances, including impaired visual functions. The molecular origin of the FXS is the silencing of the *FMR1* gene, which can no longer express the FMRP protein. At the molecular and cellular levels, the loss of FMRP results in structural and functional abnormalities of the synapses, at the brain as well as at the retinal level. This PhD thesis project aims to deepen knowledge of retinal and visual phenotypes in the absence of FMRP protein, as well as the study of the involvement of this retinal phenotype in the visual and global phenotypes of fragile X syndrome.

We have revealed the precocity and stability of retinal abnormalities in the absence of the FMRP protein, which confirms the strength of the retinal phenotype under FXS conditions, and raises the question of its influence on other structures. In parallel, we have shown that the absence of FMRP protein causes significant disturbances of several visual traits in a behavioral standpoint. Finally, a strategy was developed to create an animal model "FXS-retina-specific", the study of which would provide information on the consequences of the absence of the FMRP protein only in the retina.

This PhD thesis project highlights the importance of visual and retinal phenotypes of FXS, and provides new insights supporting the centrality of sensory disturbances in this pathology.

Key words: Fragile X Syndrome, sensory disturbances, visual alterations, visual system, retina, visual behavior.

**Laboratoire d'Immunologie et Neurogénétique  
Expérimentales et Moléculaires  
UMR7355 – CNRS d'Orléans**



**inem**

