

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ANALYSE DES MÉCANISMES DE RÉGULATION DE LA LOCALISATION  
SUBCELLULAIRE DE LA PROTÉINE FAM172A

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR  
AZOUZ FATIHA

AVRIL 2021

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.10-2015). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche Pr Nicolas Pilon pour le soutien qu'il m'a apporté durant mon parcours à la maîtrise. Grace à ses précieux conseils, j'ai pu évoluer et progresser régulièrement.

Je remercie tous mes collègues de laboratoire dont Elizabeth Leduc, Félix-Antoine Bérubé-Simard, Benoit Grondin, Ouliana Souchkova, Grégoire Bonnamour, Rodolphe Soret, Tatiana Cardinal, Séphora Sallis, Mostafa Esmael, Sherin Nawaito, Marie Lefèvre et Nejia Lassoued pour leur support et leur aide et de m'avoir accueillie parmi eux depuis ma première journée.

Je remercie toute ma famille surtout la lumière de ma vie, mon père que j'espère qu'il est dans le paradis et ma mère qu'elle n'a jamais cessé de prier pour mon bonheur. Sans oublier de remercier mes petits trésors pour la joie et la raison de vivre qu'ils me donnent, Tasnim, Dhyae-Eddine, Amir et Adam. Finalement, un gros merci pour mon partenaire de vie et mon amour, Hamid Nefidsa, pour son soutien moral. Merci d'être à mes coté et de m'encourager dans tout ce que j'entreprends. Merci simplement d'exister.

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES .....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES .....	ix
RÉSUMÉ .....	x
CHAPITRE I INTRODUCTION .....	1
1.1 Les maladies rares .....	1
1.2 Syndrome CHARGE .....	2
1.2.1 Définition et caractéristiques .....	2
1.2.2 Diagnostic.....	3
1.2.3 Populations affectées et pénétrance.....	5
1.2.4 Viabilité et prise en charge .....	6
1.2.5 Les causes génétiques.....	6
1.2.6 Mécanismes moléculaires.....	8
1.2.7 Chevauchement phénotypique.....	9
1.2.8 Thérapies standards .....	11
1.3 Chd7 .....	11
1.3.1 Structure .....	11
1.3.2 Fonctions .....	12
1.4 Cellules de la crête neurale.....	14
1.4.1 Présentation globale et développement .....	14
1.4.2 Neurocristopathies.....	16
1.5 <i>Toupee</i> modèle murin pour le syndrome CHARGE.....	17
1.5.1 Génération du modèle.....	17
1.5.2 Caractérisation phénotypique .....	18
1.5.3 Le développement des CCN dans les embryons <i>Toupee</i> <sup>Tg/Tg</sup> .....	19
1.5.4 Allèle hypomorphique dans le modèle <i>Toupee</i> .....	20

1.6	FAM172A.....	21
1.6.1	Structure .....	21
1.6.2	Localisation .....	22
1.6.3	Fonction.....	23
1.7	Ago2 .....	25
1.7.1	Complexe Ago2-RISC dans le cytoplasme .....	25
1.7.2	Complexe Ago2-RISC et stress cellulaire .....	26
1.7.3	Rôle d'Ago2 dans le noyau .....	27
1.8	Interactions protéiques FAM172A, AGO2 et CHD7 .....	30
1.9	Fluorescence par complémentarité bimoléculaire (BiFC).....	31
1.10	Traitement à la rapamycine .....	33
1.11	Hypothèses et objectifs.....	34
CHAPITRE II MATÉRIELS ET MÉTHODES .....		36
2.1	Animaux .....	36
2.2	Western Blot : l'expression de la protéine fam172 .....	36
2.2.1	Extraction protéique sur tissus (embryons) .....	36
2.2.2	Préparation des gels et montage .....	37
2.2.3	Migration des protéines dénaturées .....	37
2.2.4	Le transfert sur une membrane de PVDF .....	37
2.2.5	Révélation par anticorps .....	38
2.3	Constructions plasmidiques.....	38
2.3.1	PCR.....	38
2.3.2	Clonage.....	39
2.4	Culture cellulaire et transfection.....	41
2.4.1	Préparation des lignées cellulaires Neuro2a (N2a) et COS7 .....	41
2.4.2	Immunofluorescence .....	42
CHAPITRE III RÉSULTATS .....		43
3.1	Les trois principales isoformes de FAM172A (307 aa, 371 aa et 417 aa).....	43
3.2	Déterminer le patron d'expression spatiotemporel des isoformes de FAM172A durant le développement embryonnaire de la souris.....	43
3.3	Caractériser les mécanismes de régulation de la localisation subcellulaire de FAM172A en fonction des différentes isoformes .....	45

3.4	La localisation subcellulaire des différentes isoformes de la protéine FAM172A en fonction des conditions de stress .....	47
3.5	Valider certains partenaires d'interaction de FAM172A à l'échelle subcellulaire via l'approche BiFC .....	52
3.5.1	L'isoforme FAM172A 371 aa interagit avec Ago2 .....	53
3.5.2	FAM172A possède un domaine de dimérisation fonctionnel .....	54
CHAPITRE IV DISCUSSION .....		57
4.1	Contribution des isoformes de FAM172A au développement des CCN .....	57
4.2	La localisation subcellulaire de la protéine FAM172A en fonction des différentes isoformes .....	58
4.3	Le stress cellulaire .....	60
4.3.1	L'impact du stress sur la localisation subcellulaire des différentes isoformes de la protéine FAM172A .....	60
4.3.2	L'effet du stress sur la localisation subcellulaire de la protéine FAM172A endogène .....	63
4.4	Valider certains partenaires d'interaction de FAM172A à l'échelle subcellulaire via l'approche BiFC .....	64
4.4.1	L'isoforme de protéine FAM172A 371 aa interagit avec Ago2 .....	64
4.4.2	FAM172A possède un domaine de dimérisation fonctionnel .....	67
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....		69
ANNEXE .....		72
BIBLIOGRAPHIE .....		73

## LISTE DES FIGURES

Figure		Page
1.1	Mutations de CHD7 recensées dans le syndrome CHARGE .....	8
1.2	Schéma des étapes de développement des CCN.....	16
1.3	Caractéristiques majeures et mineures du syndrome CHARGE présentées par <i>FVB Toupee<sup>Tg/Tg</sup></i> .....	19
1.4	Site d'insertion du transgène chez les souris <i>Toupee</i> .....	21
1.5	Isoformes murines de FAM172A. ....	22
1.6	Mécanismes d'action du complexe Ago2-RISC pour inhiber la traduction des protéines. ....	26
1.7	Le complexe Ago2-RISC est une navette cytoplasme-noyau.....	27
1.8	Remodelage de la chromatine médié par Ago2. ....	28
1.9	L'implication de FAM172A dans l'épissage alternatif médié par Ago2. ....	31
1.10	Principe du BiFC bicolore en utilisant la propriété de la complémentation. ....	33
3.1	Analyse d'abondance d'isoformes de la protéine FAM172A durant le développement embryonnaire.....	44
3.2	Localisation subcellulaire des différentes isoformes de FAM172A dans des conditions optimales. ....	46
3.3	La distribution de la localisation subcellulaire des différentes isoformes de FAM172A dans des conditions optimales. ....	47
3.4	Localisation subcellulaire de l'isoforme 371aa de FAM172A dans des conditions de stress. ....	49
3.5	Localisation subcellulaire de l'isoforme 417aa de FAM172A dans des conditions de stress. ....	50
3.6	La distribution de la localisation subcellulaire de l'isoformes 417aa de FAM172A dans des conditions de stress. ....	51

3.7	Localisation subcellulaire de FAM172A endogène dans des conditions de stress.....	52
3.8	FAM172A interagit directement avec Ago2.....	54
3.9	La dimérisation de la protéine FAM172A .....	56
A1	Analyse de l'abondance des isoformes de FAM172A durant le développement embryonnaire.....	72



## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Évolution des critères pour le diagnostic du syndrome CHARGE.....	4
1.2 Dernière mise à jour des règles d'inclusion de syndrome CHARGE.....	5
1.3 Exemples de neurocristopathies classées selon le type et le compartiment affecté. ....	17

## LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

Aa	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ago2	« Argonaute RISC Catalytic Component 2 »
Arb2	« Argonaute-binding Protein 2 »
ARN	Acide ribonucléique
CCN	Cellules de la crête neurale
Chd7	« Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7 »
C-terminal	Carboxy-terminal
E9.5	Jour embryonnaire 9.5
Fam172a	« Family With Sequence Similarity 172 Member A »
FBS	« Fetal Bovine Serum », sérum bovin fœtal
G4	Gata4, « GATA Binding Protein 4 »
IPP	Interactions protéine-protéine
mi-ARN	Micro-ARN
O/N	Overnight, pendant la nuit
PBS	« Phosphate-buffered saline », tampon phosphate salin
RE	Réticulum endoplasmique
RISC	« RNA-induced silencing complex »
SDS	Dodécylsulfate de sodium
Sox2	« SRY-Box 2 »
Sox9	« SRY-Box 9 »
Tg	« Transgene »
Tyr	Tyrosinase

## RÉSUMÉ

Le syndrome CHARGE est une maladie génétique rare qui se caractérise par un ensemble complexe de diverses anomalies qui touchent plusieurs organes du corps humain. Le laboratoire du Pr Pilon a récemment identifié des mutations du gène *Fam172a* comme étant responsable du syndrome CHARGE. Le labo Pilon a notamment généré un modèle de souris avec mutation de ce gène qui récapitule toutes les anomalies de la pathologie humaine. De plus, ces travaux ont permis de déterminer que la protéine FAM172A est principalement localisée au noyau, où elle participe à la régulation de l'épissage alternatif co-transcriptionnel. Mais, ces travaux sont basés sur l'existence d'une seule isoforme de FAM172A alors que nous avons récemment découvert l'existence de 3 isoformes produites par épissage alternatif. La détermination du patron d'expression spatio-temporel des isoformes de FAM172A durant le développement embryonnaire de la souris a révélé que la forme la plus exprimée à ce stade est la forme moyenne avec une faible expression de la forme longue. La forme moyenne avec la forme courte se localisent majoritairement au niveau du noyau. Par contre la forme longue se localise majoritairement au niveau du cytoplasme et se déplace vers le noyau en cas de stress. Une approche BiFC a été utilisée afin de valider certains partenaires d'interaction de FAM172A, tel qu'Argonaute2. FAM172A interagit avec Argonaute2, mais aussi avec elle-même en formant des dimères. C'est avec espoir que ces travaux aideront à raffiner la thérapie à base de rapamycine que nous cherchons à mettre au point, afin de créer une approche thérapeutique efficace.

Mots-clés : Expression et localisation subcellulaire, FAM172A et isoformes, partenaires d'interactions, stress cellulaire, syndrome CHARGE.

## CHAPITRE I

### INTRODUCTION

#### 1.1. Les maladies rares

Une maladie est dite « rare » lorsqu'elle atteint moins d'une personne sur 2000. Les maladies rares sont généralement graves, chroniques et invalidantes. Une thérapie efficace pour ce type de maladie n'est pas toujours existante surtout dans le cas des maladies orphelines. Cela est principalement dû, d'un côté, à la rareté de la maladie et d'un autre côté au fait que le développement de telles thérapies est jugé non rentable par manque de connaissances préalables. En effet, la majorité des maladies orphelines sont des maladies rares et mortelles (Chen et Altman, 2017).

Les maladies rares se manifestent dans les premières années de la vie. Donc, elles touchent surtout la génération la plus jeune : environ 75% sont des enfants et plusieurs enfants en souffrent et en meurent chaque jour à cause de la gravité de ces maladies. Le nombre de maladies rares dépasse 7000 au monde, dont 80% de ces maladies sont d'origine génétique. Pour la plupart des gènes en causes, les mécanismes physiopathologiques associés sont inconnus (Sun *et al.*, 2017). Les symptômes de ces maladies sont très complexes autant que la maladie elle-même. Ils commencent à se manifester très tôt et la gravité continue à évoluer au cours du temps

via l'apparition de nouveaux symptômes, ce qui influence la qualité de vie des personnes atteintes. En effet, certains traitements mis à disposition contre ces maladies sont juste des traitements correctifs des symptômes. Entre autres : des chirurgies, des médicaments pour soulager et d'autres. Dans l'espoir de trouver des solutions, la recherche sur ces maladies continue en impliquant à la fois, recherche fondamentale, recherche clinique, et activités de diagnostic et de soin (Marie-Laure *et al.*, 2013).

## 1.2. Syndrome CHARGE

### 1.2.1. Définition et caractéristiques

Le syndrome CHARGE (OMIM #214800) est regroupé dans les neurocristopathies, dans lesquelles les tissus dérivés des CCN (cellules de la crête neurale) sont défectueux (Chai *et al.*, 2018). Elle est l'une des maladies génétiques rares, elle affecte environ un nouveau-né sur 8 500-15 000. Elle survient au début du développement fœtal et affecte plusieurs systèmes et plusieurs organes. Ce trouble se caractérise par un ensemble complexe de diverses anomalies. Son nom CHARGE provient de la première lettre de certaines caractéristiques les plus courantes observées chez les enfants atteints : (C) = colobome (rétinohoroidien) et anomalies du nerf crânien (80 à 90%), (H) (HHeart defects) = anomalies cardiaques chez 75 à 85%, principalement la tétralogie de Fallot, (A) = atrésie des choanes (voies respiratoires nasales bloquées) (50-60%), (R) = retard de croissance et développement (70-80%), (G) = sous-développement génital dû à un hypogonadisme hypogonadotrope, (E) (Ear defects) = anomalies de l'oreille et perte auditive neurosensorielle (> 90%) (Hittner *et al.*, 1979; Martin *et al.*, 2015; Peter *et al.*, 2014). La plupart des enfants atteints du syndrome CHARGE présentent d'autres

caractéristiques, notamment des caractéristiques faciales : paralysie du nerf facial asymétrique, fente labiale ou palatine, atrésie de l'œsophage ou fistule trachéo-œsophagienne. En effet, le diagnostic du syndrome CHARGE doit être posé par un généticien médical (Peter *et al.*, 2014).

### 1.2.2. Diagnostic

Les symptômes du syndrome CHARGE varient considérablement d'un enfant à l'autre. Environ 30 % des enfants atteints décèdent avant l'âge de 5 ans et, par conséquent, la qualité de vie des patients CHARGE dépend d'un diagnostic précoce, qui permet d'éviter que certaines anomalies demeurent non traitées. Le diagnostic peut prendre plusieurs mois, voire plusieurs années, avant de déterminer de quoi l'enfant est atteint. Cela est dû au fait que les gènes associés à la maladie ne sont pas tous connus et que les anomalies sont nombreuses. Malheureusement, cela rend le diagnostic souvent difficile à établir (Belanger *et al.*, 2018).

Cependant, les anomalies sont divisées en caractéristiques majeures, fréquentes dans ce syndrome et peu fréquentes dans d'autres, et en caractéristiques mineures, fréquentes dans ce syndrome autant que dans d'autres syndromes. La caractérisation clinique de la maladie a par la suite évolué selon les critères de Blake (1998), puis de Verloes (2005). Selon les critères de Blake, comme présenté dans le tableau 1.1, les critères d'inclusion alors posés sont de quatre caractéristiques majeures ou trois majeures et trois mineures (Peter *et al.*, 2014; Natung *et al.*, 2014). Les critères de Verloes proposés par la suite sont plutôt différents selon la classification des critères majeurs et des critères mineurs. Notamment, il a été proposé que les cas typiques de syndrome CHARGE correspondent à 3 critères majeurs ou deux majeurs et deux mineurs, que les cas incomplets correspondent à 2 majeurs et un mineur et que les cas

atypiques correspondent à 2 majeurs ou 1 majeur et 3 mineurs (tableau 1.1) (Natung *et al.*, 2014; Hale *et al.*, 2016).

Tableau 1.1 Évolution des critères pour le diagnostic du syndrome CHARGE.

	Major criteria	Minor criteria	Diagnostic criteria
Pagon (1981) (C-H-A-R-G-E)	1. Choanal atresia 2. Ocular colobomata	1. Congenital heart defects 2. Retarded growth and retarded development and/or CNS anomalies 3. Genital hypoplasia 4. Ear anomalies/deafness	At least four out of six criteria, and at least one major
Blake (1998) (4 Cs)	1. Coloboma-of iris, retina, choroid, disc; microphthalmia  2. Choanal atresia-Unilateral/bilateral, membranous/bony, stenosis/atresia 3. Characteristic ear abnormalities-External ear (lop or cup-shaped), Middle ear (ossicular malformations, chronic serous otitis), mixed deafness, cochlear defects 4. Cranial nerve dysfunction-I: Anosmia, VII: Facial palsy (unilateral or bilateral), VIII: Sensorineural deafness and vestibular problems, IX and/or X: Swallowing problems	1. Genital hypoplasia-males: Micropenis, cryptorchidism; Females: Hypoplastic labia; Both: Delayed, incomplete pubertal development 2. Developmental delay-delayed motor milestones, hypotonia, mental retardation 3. Cardiovascular malformations 2 All types, especially conotruncal defects (e.g., tetralogy of Fallot), AV canal defects, and aortic arch anomalies 4. Growth deficiency-short stature  5. Orofacial cleft-cleft lip and/or palate 6. Tracheoesophageal-fistula-Tracheoesophageal defects of all types 7. Distinctive face-characteristic face: broad forehead, square face, high nasal bridge, full nasal tip, small mouth, facial asymmetry	Four major OR three major + three minor characteristics
Verloes (2005) (3 Cs)	1. Coloboma (iris or choroid, with or without microphthalmia)  2. Atresia of choanae  3. Hypoplastic semi-circular canals	1. Rhombencephalic dysfunction (brainstem dysfunctions, cranial nerve VII to XII palsies and neurosensory deafness) 2. Hypothalamo-hypophyseal dysfunction (including GH and gonadotrophin deficiencies) 3. Abnormal middle or external ear  4. Malformation of mediastinal organs (heart, esophagus) 5. Mental retardation	Typical CHARGE: 3 major signs OR 2/3 major signs + 2/5 minor signs Partial/incomplete CHARGE: 2/3 major + 1/5 minor  Atypical CHARGE: 2/3 major + 0/5 minor OR 1/3 major + 3/5 minors

CNS: Central nervous system AV - atrioventricular

Le tableau résume les critères évolutifs pour le diagnostic du syndrome de CHARGE depuis 1981 jusqu'à 2005. Il montre le développement de la classification de ces critères, en majeur ou en mineur, ainsi que la règle d'inclusion (Natung *et al.*, 2014).

Dans les dernières années, une autre modification a été proposée intégrant l'atrésie des choanes et la fente palatine (les deux étant jugés mutuellement exclusifs), ainsi que la détection d'un variant pathogénique de *CHD7* (Tableau 1.2) (Hale *et al.*,

2016). Le diagnostic clinique actuel repose sur une combinaison des critères de Blake (révisés en 2006) et de Verloes (Antoniou *et al.*, 2019).

Tableau 1.2 Dernière mise à jour des règles d'inclusion de syndrome CHARGE.

Hale <i>and al.</i> (2016)	
Major criteria:	Minor criteria:
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Coloboma</li> <li>• Choanal atresia or cleft palate</li> <li>• Abnormal external, middle or inner ears, including hypoplastic semicircular canals</li> <li>• Pathogenic <i>CHD7</i> variant</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cranial nerve dysfunction including hearing loss</li> <li>• Dysphagia/feeding difficulties</li> <li>• Structural brain anomalies</li> <li>• Developmental delay/ID/Autism</li> <li>• Hypothalamo-hypophyseal dysfunction (gonadotropin or growth hormone deficiency) and genital anomalies</li> <li>• Heart or esophagus malformation</li> <li>• Renal anomalies/Skeletal/limb anomalies</li> </ul>
Inclusion rule:	
CHARGE: 2 major + any number of minor	

Le tableau montre la classification de *Hale* en 2016 des critères pour le diagnostic du syndrome CHARGE avec la règle d'inclusion. Les critères se divisent en critères majeurs et mineurs.

### 1.2.3. Populations affectées et pénétrance

Le syndrome CHARGE est un trouble rare qui touche autant les hommes que les femmes et a été observé dans toutes les ethnies et sur tous les continents. Les patients CHARGE présentent des combinaisons hautement variables de caractéristiques majeures et mineures. La variabilité phénotypique de ce syndrome est très élevée, même entre individus d'une même famille (Peter *et al.*, 2014). Par conséquent, il est suggéré qu'il y a beaucoup plus de cas de CHARGE que ceux déclarés. De nombreux cas sont mal diagnostiqués ou non diagnostiqués, en particulier chez les enfants ayant moins de symptômes. Bien que de nombreuses caractéristiques du syndrome CHARGE sont présentes à la naissance, certaines n'apparaîtront qu'après des



semaines, des mois et même des années. Le risque de récurrence de CHARGE pour les parents d'un enfant affecté est faible, autour de 2 à 3%. Le risque de récurrence pour un adulte atteint de CHARGE d'avoir un enfant affecté peut atteindre 50%. Le parent présente généralement un phénotype faible ou asymptomatique tandis que les enfants présentent un phénotype plus sévère (Zentner., 2010).

#### 1.2.4. Viabilité et prise en charge

Les multiples anomalies du syndrome CHARGE peuvent engendrer des risques variables de mortalité dès les premiers jours suivant la naissance, la première année de vie étant d'ailleurs la plus critique pour la survie des patients. Ainsi, 30% des enfants atteints du syndrome CHARGE décèdent avant l'âge de 5 ans (Zentner., 2010). L'espérance de vie des patients CHARGE varie de cinq jours à environ 46 ans (He *et al.*, 2016). En raison de la diversité des systèmes physiologiques affectés, les soins destinés aux patients présentant un syndrome typique CHARGE et à tous les patients porteurs d'une mutation de *CHD7*, sont généralement complexes. Le suivi devrait donc idéalement être effectué par une équipe multidisciplinaire d'experts dans laquelle plusieurs spécialités sont impliquées : généticien, endocrinologue, pédiatre, immunologiste, oto-rhino-laryngologiste, cardiologue, ophtalmologiste, etc (Martin *et al.*, 2015)

#### 1.2.5. Les causes génétiques

La cause principale du syndrome CHARGE est une mutation du gène *CHD7*, retrouvée chez 60-80% des patients et située sur le chromosome 8q12.2. Plusieurs types de mutations causent l'expression d'une protéine anormale dégradée

prématurément (Hale *et al.*, 2016; Jongmans *et al.*, 2006; Hurd *et al.*, 2007). Ces mutations sont généralement *de novo*, elles apparaissent spontanément au cours de la conception. Dans ce cas, le couple parent d'un enfant avec une mutation dans le gène *CHD7*, ne risque pas d'avoir un second enfant avec le même syndrome. Mais certains cas familiaux sont répertoriés, via une transmission autosomique dominante (Martin *et al.*, 2015). Certains cas de mosaïcisme dans les cellules germinales ou somatiques sont aussi évalués chez les parents de fratries atteintes du syndrome CHARGE (Zentner., 2010). Il existe plus de 500 mutations pathogéniques du gène *CHD7* (Belanger *et al.*, 2018). Les mutations sont également distribuées le long de la région codante de *CHD7*. Le type de mutation le plus courant est une mutation hétérozygote mononucléotidique qui mène à une protéine non fonctionnelle. Les mutations non-sens représentent 44% des mutations de *CHD7* répertoriées dans le syndrome CHARGE, 34% provoquent des modifications du cadre de lecture, 11% affectent les sites d'épissage et 8% sont des mutations faux-sens qui sont majoritairement situés au milieu du gène *CHD7*. Elles sont, en général, associées à un phénotype plus léger. Les délétions complètes d'exons et les microdélétions ne sont retrouvées que dans 5% des cas. Les variants bénins sont principalement regroupés dans les régions 5' et 3' (Figure 1.1) (Blake *et al.*, 2011). *En* effet, à cause de toutes ces variations, il est très difficile d'établir des liens génotype-phénotype pour expliquer les importantes différences phénotypiques observées entre patients CHARGE (Martin *et al.*, 2015; Bergman *et al.*, 2011).

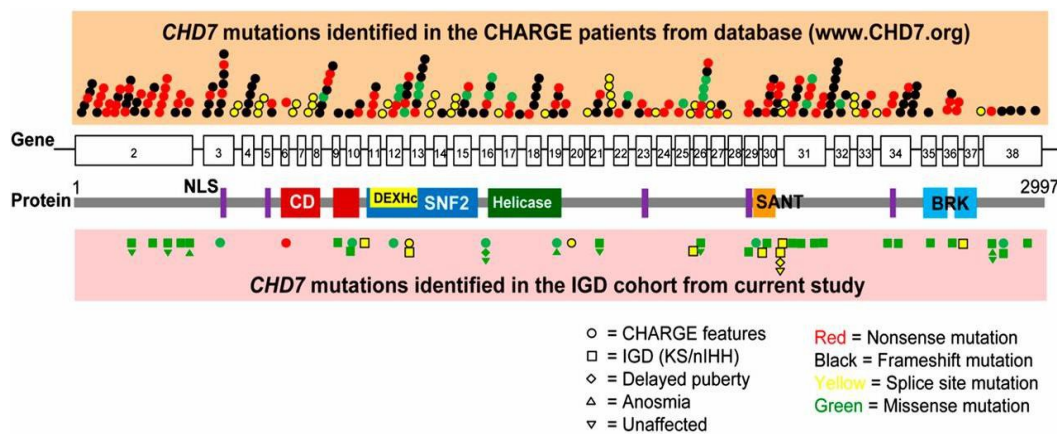


Figure 1.1 Mutations de CHD7 recensées dans le syndrome CHARGE.

La figure montre les domaines et les positions des mutations sur le gène et sur la protéine CHD7 identifiés dans le syndrome CHARGE. Les variantes CHARGE associées à CHD7 sont dispersées à travers 37 exons (Balasubramanian *et al.*, 2014).

Des études récentes identifient de nouveaux gènes dont la mutation entraîne aussi le syndrome CHARGE. Ces gènes codent pour des protéines entrant en interaction avec la chromatine à l'image de CHD7 (*EP300*, *KMT2D* et *KDM6A\**), pour des facteurs de transcription (*RERE*), pour des facteurs d'épissage (*PUF60* et *EFTUD2\**), pour des protéines de l'interface chromatine-splicéosome (*FAM172A*) ou autre (*SEMA3E\**) (\*incertain) (Bérubé-Simard et Pilon, 2019).

#### 1.2.6. Mécanismes moléculaires

La mutation du gène *CHD7* est à l'origine d'un peu plus de la moitié des cas dont le mécanisme pathogénique évoqué était la dérégulation de la transcription due au remodelage de la chromatine (l'état compacté ou relâché de plusieurs régions de la chromatine) (Bajpai *et al.*, 2010; Schulz *et al.*, 2014). Entre autres, l'équipe de notre laboratoire a confirmé qu'une mutation du gène *FAM172A* peut aussi causer le syndrome CHARGE. Les analyses menées sur des patients CHARGE, les interactions

identifiées entre FAM172A, CHD7 et Ago2, ainsi que la caractérisation de modèles de souris ont révélé un mécanisme moléculaire insoupçonné auparavant, qui serait impliqué dans la pathologie, et ce peu importe la mutation en cause (*Chd7*, *Fam172a* ou inconnue). Ce mécanisme, appelé épissage alternatif, permet de contrôler quelle partie des gènes doit être utilisée pour générer les bonnes protéines (Belanger *et al.*, 2018).

Étonnamment, la découverte récente de nouveaux gènes candidats pour le syndrome CHARGE confirme l'idée que la dérégulation de l'épissage alternatif co-transcriptionnel, qui dépend de la structure de la chromatine, joue un rôle essentiel dans la pathogenèse du syndrome CHARGE. Effectivement, des preuves directes et/ou indirectes d'un rôle régulateur dans l'épissage alternatif existent pour les cinq nouveaux gènes candidats (*PUF60*, *EP300*, *RERE*, *KMT2D* et *KDM6A*): *PUF60* code pour un facteur d'épissage; *EP300* code pour l'histone p300 acétyltransférase, qui s'est avérée être directement impliquée dans la régulation de l'épissage; *RERE* code pour un co-répresseur transcriptionnel qui s'associe notamment à HDAC1 / 2, qui sont incluses dans les interactomes FAM172A / spliceosome; *KMT2D* code pour une méthyltransférase H3K4 qui est incluse dans l'interactome spliceosome et la triméthylation de H3K4 est connue pour déclencher le recrutement de facteurs d'épissage; et enfin, *KDM6A* code pour une déméthylase de H3K27me3 (Tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3), une marque d'histone associée à la régulation d'épissage médiée par AGO (Bérubé-Simard et Pilon, 2019).

### 1.2.7. Chevauchement phénotypique

D'autres pathologies présentent des caractéristiques bien connues du syndrome CHARGE, à cause de la grande variabilité phénotypique de ce syndrome (soit dans la

même famille ou dans des familles différentes). Il existe également un chevauchement clinique important entre le syndrome CHARGE (en particulier les cas moins graves) et de nombreux autres troubles du développement causés par des problèmes crâniens et les CCN cardiaques (Bérubé-Simard et Pilon, 2019).

Kabuki est un trouble multi systémique rare caractérisé par cinq manifestations cardinales : caractéristiques faciales typiques, anomalies du squelette, anomalies dermatoglyphiques, déficience intellectuelle légère à modérée et déficit de croissance postnatale. Les mutations germinales de *KMT2D* sont à la base de 52 à 76% de la pathogenèse moléculaire des patients atteints du syndrome de Kabuki (Bérubé-Simard et Pilon, 2019).

Le syndrome de délétion 22q11.2 (syndrome vélocardiofacial, syndrome de Shprintzen) est beaucoup plus courant que le syndrome de CHARGE. Il existe de nombreuses caractéristiques qui se chevauchent dans ces deux troubles. Le syndrome vélocardiofacial se caractérise par une incompétence vélopharyngée (problèmes de fente palatine et/ou de déglutition), des défauts cardiaques (cœur) et un visage typique (long et étroit) (Bérubé-Simard et Pilon, 2019).

Des mutations dans le gène *CHD7* ont d'ailleurs été identifiées chez des patients atteints de telles conditions, soit les syndromes de Kallman, Omenn-like et de délétion 22q11.2 (Zentner *et al.*, 2010). Dans certaines de ces conditions, soit la dysostose acrofaciale 1 de type Nager, le syndrome Kabuki et la dysostose madibulo-faciale de type Guion-Almeida, des gènes récemment associés au syndrome CHARGE, *EFTUD2*, *KMT2D* et *KDM6A* sont également mutés (Bérubé-Simard et Pilon, 2019).

### 1.2.8. Thérapies standards

Le syndrome CHARGE peut être de sévérité très variable : certains enfants peuvent être très lourdement handicapés, via des problèmes d'alimentation et des déficits de la parole et du langage pouvant nécessiter des années de thérapie et d'autres interventions ; alors que d'autres ont des malformations très modérées et peuvent avoir un développement proche de la normale. Ils peuvent survivre et devenir des citoyens sains et heureux. De nombreuses anomalies structurelles (atrésie choanale, malformations cardiaques, fente labiale, etc.) peuvent être corrigées chirurgicalement. Le traitement sera adapté au cas par cas, en fonction des difficultés et des capacités de l'enfant (Esposito *et al.*, 2014).

## 1.3. CHD7

### 1.3.1. Structure

Le gène *CHD7* est localisé sur le chromosome 8 (8q12.1) (Peter *et al.*, 2014). Ce gène, de 188 kb, contient 38 exons et engendre une protéine de 2997 acides aminés (Visser *et al.*, 2004). Chez les mammifères, la famille des protéines CHD comprend neuf membres (CHD1-CHD9) et elle se divise en 3 sous-familles selon le type de chromodomaine et la présence d'autres domaines fonctionnels. Elles sont toutes des enzymes ATP dépendantes qui régulent l'expression des gènes via le remodelage de la chromatine par la restructuration des nucléosomes. Les protéines CHD possèdent deux chromodomaines en N-terminal ainsi qu'un domaine hélicase/ATPase SNF2-like central. Avec CHD6, CHD8 et CHD9, CHD7 est une protéine CHD de classe III. Ces enzymes se distinguent des autres par la présence de deux domaines Brahma et Kismet BRK, d'un domaine de liaison à l'ADN en C-terminal, d'un domaine SANT

et de domaines CR (Chu *et al.*, 2017). La protéine CHD7 d'origine murine possède en plus quatre domaines de localisation nucléaire (Figure 1.6) Bosman *et al.*, 2005).

### 1.3.2. Fonctions

CHD7 régule l'expression de milliers de gènes en agissant sur le positionnement des histones qui assurent l'enroulement et la condensation de l'ADN (Jongmans *et al.*, 2006). De plus, CHD7 catalyse les mouvements des nucléosomes, qu'ils soient adjacents à des courts ou à de longs segments d'ADN (Manning *et al.*, 2017). Les sites de liaison de CHD7 présentent certaines caractéristiques spécifiques, CHD7 se lie préférentiellement à des résidus lysine de segments décorés avec des niveaux élevés d'histone mono-méthylée H3K4 ou à des complexes d'une manière spécifique au type et au stade de la cellule. D'autres modeleurs de la chromatine sont aussi inclus dans ces complexes avec CHD7, des histones méthyltransférases et des facteurs de transcription. Des sites de liaison de CHD7 présentent des caractéristiques d'éléments activateurs, notamment CHD7 est enrichi près de centaines de régions activatrices et près des sites de départ de la transcription afin de contrôler la transcription génique (Martin *et al.*, 2015; Zentner *et al.*, 2010; Schnetz *et al.*, 2009)

En se liant aux éléments activateurs, CHD7 régule l'établissement d'un programme d'expression génique spécifique aux cellules souches embryonnaires. Par contre, les préférences de liaison de CHD7 changent pendant la transition des cellules souches embryonnaires en progéniteurs neuronaux, indiquant que la fonction de CHD7 varie selon le stade de développement (Chai *et al.*, 2018).

La protéine SOX2 interagit directement avec CHD7 en cas d'un recrutement à la chromatine de ce dernier dans les CCN. CHD7 et SOX2 forment un complexe qui

induit l'expression de plusieurs gènes comme *RGCC* (régulateur du cycle cellulaire) et *PKCθ* (protéine kinase Cθ) (Engelen *et al.*, 2011). CHD7 peut également y interagir avec les protéines du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF pour l'ajustement d'expression de nombreux gènes clés du réseau régulateur des CCN tels que *SOX9* (*SRY-Box 9*), *TWIST1* et *SNAI1* (Belanger *et al.*, 2018). Permettant l'acquisition de la multipotence et du potentiel migratoire au CCN, CHD7 coopère avec les complexes PBAF (Polybromo-associated BAF) pour réguler les facteurs de transcription cruciaux, ainsi que l'expression de *FoxD3* qui est sous le contrôle de *Chd7*, *Oct3/4*, *Sox2* et *Nanog* (Bajpai *et al.*, 2010; Fujita *et al.*, 2016). En utilisant des approches à la fois protéomiques et génomiques, CHD7 s'est également avéré être un cofacteur transcriptionnel du régulateur essentiel des cellules souches neurales, suggérant un rôle pour CHD7 dans la neurogenèse (Machado *et al.*, 2019). Dans ce contexte, CHD7 est important pour l'activation du programme de différenciation neuronale des cellules souches neurales dans l'oreille interne, la placode nasale, le cervelet, la zone subventriculaire et l'hippocampe, les oreilles et le cœur, ainsi que pour le contrôle du développement via l'inhibition ou la modulation de la signalisation BMP (Bone Morphogenetic Protein) (Gage *et al.*, 2015).

La transcription du pré-ARNm influence l'efficacité de l'épissage, correspondant à l'élimination co-transcriptionnelle des introns et est médié par des interactions physiques entre le spliceosome et les facteurs de la chromatine, comme les facteurs de remodelage. CHD7 fait partie des facteurs de la chromatine associés au spliceosome et modulant l'épissage de certains exons (Allemand *et al.*, 2016).

Cependant, l'appauvrissement de la protéine CHD7 affecte l'inclusion de plusieurs exons alternatifs. Ce qui confirme certaines études démontrant que plusieurs événements d'épissage alternatifs sont régulés par des modificateurs de la chromatine (Saltzman *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 2012). La protéine CHD7, comme élément constitutif de la chromatine, peut avoir un impact sur les produits de l'épissage en



affectant l'assemblage des nucléosomes. En effet, les nucléosomes peuvent être éventuellement impliqués dans le choix des exons. L'assemblage des nucléosomes peut notamment être essentiel pour le taux d'élongation et pour la formation des boucles reliant des exons alternatifs à des nucléosomes positionnés par un promoteur (Allemand *et al.*, 2016). La présence du CHD7 sur la chromatine est observée à des sites d'épissages chez les cellules mammifères non dérivées de la crête neurale. Ces découvertes suggèrent l'implication de CHD7 dans l'épissage alternatif de nombreux gènes (Belanger *et al.*, 2018; Allemand *et al.*, 2016).

#### 1.4. Cellules de la crête neurale

Comme mentionné précédemment, la mutation hétérozygote de *CHD7* est la cause génétique majeure connue du syndrome CHARGE. En revanche, jusqu'à ~30% des patients ne sont pas positif pour les mutations *CHD7* selon les critères d'inclusion du syndrome. En se basant sur des niveaux élevés d'expressions du gène *CHD7* dans les dérivés de la crête neurale et les rôles proposés pour CHD7 dans le développement de la crête neurale, ils suggèrent que les patients CHARGE génétiquement indéfinis peuvent avoir des variantes pathogènes qui affectent l'ensemble du transcriptome des cellules de la crête neurale (CCN) (Belanger *et al.*, 2018).

##### 1.4.1. Présentation globale et développement

Les CCN sont une population de cellules souches embryonnaires multipotentes. Elles se distinguent par leur grande capacité migratoire ainsi que par leur différenciation cellulaire tardive.

Durant la gastrulation, elles sont localisées en bordure de la plaque neurale. Pendant la neurulation, le neuroépithélium se referme pour former le tube neural (Williams *et al.*, 2015). À ce stade, les CCN subissent une transition épithélio-mésenchymateuse, se délaminent et amorcent leur migration à partir des plis de l'ectoderme neural (Trainor *et al.*, 2003). Elles s'étendent à de nombreuses régions de l'organisme pour donner naissance à plusieurs types cellulaires (myoblastes, mélanocytes, cellules endocrines, cellules gliales, etc.) et tissulaires (os, cartilage, tissu endocrinien, etc.). Ces processus de migration et de différenciation se produisent pendant et après la formation des organes majeurs (Figure 1.2) (Williams *et al.*, 2015).

Les voies de migration ainsi que les tissus engendrés varient selon la position rostrocaudale des CCN le long du tube neural. On distingue ainsi quatre catégories de CCN en fonction de la crête neurale d'origine, soit les CCN crânielles (ou céphaliques), vagues, troncales et sacrées (Figure 1.2). Chaque catégorie de CCN présente un potentiel développemental différent. Les CCN crânielles donnent naissance aux neurones crâniens, cellules gliales et mésenchyme crâniofacial, qui se différencie par la suite pour générer os, cartilage et tissus conjonctifs (Gilbert, 2000). Les CCN vagues, avec les CCN sacrées, forment le système nerveux entérique (Williams *et al.*, 2015). Les CCN vagues peuvent également se différencier en mélanocytes, neurones, cartilage et tissu conjonctif en plus de contribuer à la formation des grandes artères. Une fraction des CCN troncales donne naissance aux mélanocytes tandis que l'autre fraction forme la médullosurrénale et le réseau de nerfs périphériques (Gilbert, 2000). Les cellules pré-entérique dérivées de la crête neurale colonisent l'intestin durant le développement embryonnaire. Chez la souris, ce processus prend 5 jours embryonnaires (E) commençant autour de E9.5, tandis que chez l'homme, il dure 3 semaines commençant avant la 4<sup>e</sup> semaine de gestation (Lake et Heuckeroth, 2013). Le jour entre E9.5 et E11.5 correspond au pic de migration des CCN (Belanger *et al.*, 2018).

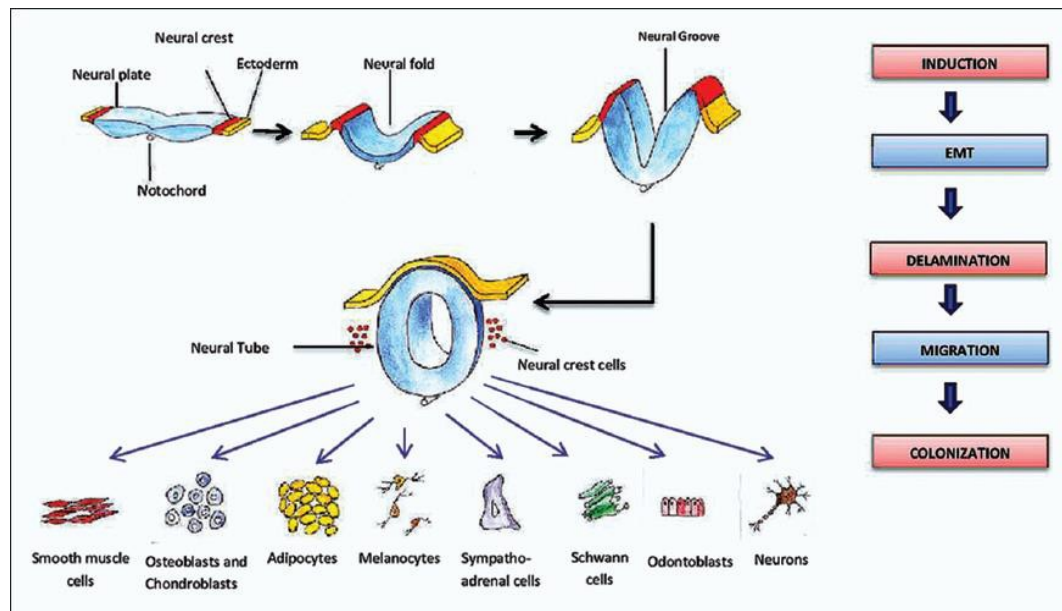


Figure 1.2 Schéma des étapes de développement des CCN.

En suivant les flèches, le schéma montre au début l'origine des cellules de la crête neurale, Jaune (ectoderme), rouge (plaque neurale, CCN), Bleu, (Neuroépithélium, tube neural). Puis, les étapes du développement des CCN. À la fin, quelques exemples des types cellulaires dérivés des CCN (Shyamala *et al.*, 2015).

#### 1.4.2. Neurocristopathies

Lorsque surviennent des défauts de migration, de division, de différenciation et/ou de survie des CCN, cela engendre la dysplasie des tissus et/ou organes dérivés. L'atteinte peut être localisée ou syndromique. La résultante est un ensemble hétérogène de maladies regroupées sous l'appellation de neurocristopathies, pathologies qui reflètent les différentes sous-populations de CCN affectées ainsi que la grande diversité des dérivés potentiels des CCN (Tableau 1.3) (Etchevers *et al.*, 2006). Par exemple, les malformations cranio-faciales sont causées par des problèmes avec les CCN crânielles, tandis que les problèmes avec les CCN cardiaques et vagues peuvent respectivement provoquer des malformations du tractus cardiaque et du système nerveux entérique (Bérubé-Simard et Pilon, 2019).

Tableau 1.3 Exemples de neurocristopathies classées selon le type et le compartiment affecté.

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

Le tableau montre des exemples des neurocristopathies pour lesquelles l'atteinte peut être localisée ou syndromique. Cela engendre la dysplasie des tissus et/ou organes selon l'origine des défauts. Adapté de (Etchevers *et al.*, 2006).

### 1.5. *Toupee* modèle murin pour le syndrome CHARGE

#### 1.5.1. Génération du modèle

Issu d'un criblage génétique visant à identifier des gènes importants au développement des CCN, le modèle *Toupee* a été généré par une insertion aléatoire d'un mini-gène de tyrosinase dans le fond génétique FVB/N. Les souris blanches sont

dépourvues de pigmentation en raison d'une mutation inactivatrice du gène *Tyrosinase* (*Tyr*). L'insertion du minigène *Tyr* permet le sauvetage de la mutation et le rétablissement de la pigmentation. Cependant, son incorporation dans un gène important aux CCN, desquelles sont dérivés les mélanocytes, engendre une pigmentation non uniforme en raison d'un nombre insuffisant de mélanocytes dans l'épiderme. Les souris présentant des anomalies aux CCN ont ainsi été sélectionnées sur la base de défauts de pigmentation (Pilon, 2016).

### 1.5.2. Caractérisation phénotypique

Le modèle *Toupee* doit son nom à la tache blanche que les hétérozygotes ( $FVB\textit{Toupee}^{Tg/+}$ ) présentent au sommet du crâne qui rappelle un toupet. Ces animaux hétérozygotes ne présentent autrement aucun phénotype manifeste. Par contre, les croisements des souris *Toupee* hétérozygotes produisent des animaux homozygotes ( $FVB\textit{Toupee}^{Tg/Tg}$ ) presque entièrement dépigmentés (Figure 1.3). Des ratios mendéliens approximatifs trouvés à la naissance, environ 20% de ces homozygotes meurent avant le 25e jour postnatal (P25). Étonnamment, les animaux  $\textit{Toupee}^{Tg/Tg}$  présentent un phénotype complexe imitant à la fois les caractéristiques majeures et mineures du syndrome CHARGE avec une grande ressemblance chez les patients CHARGE et les souris  $\textit{Toupee}^{Tg / Tg}$ . Ces dernières présentent différentes combinaisons de caractéristiques avec une variation de la gravité. Parmi les principales caractéristiques, les animaux  $\textit{Toupee}^{Tg / Tg}$  présentent un colobome rétinien, une fente palatine et des canaux semi-circulaires hypoplastiques, tel qu'observés chez d'autres modèles murins du syndrome CHARGE (Figure 1.3) (Belanger *et al.*, 2018). Les caractéristiques mineures les plus observées incluent les anomalies génitales, la réversion sexuelle, les anomalies cardiaques et les défauts aux nerfs crâniens (Figure 1.3) (Belanger *et al.*, 2018).

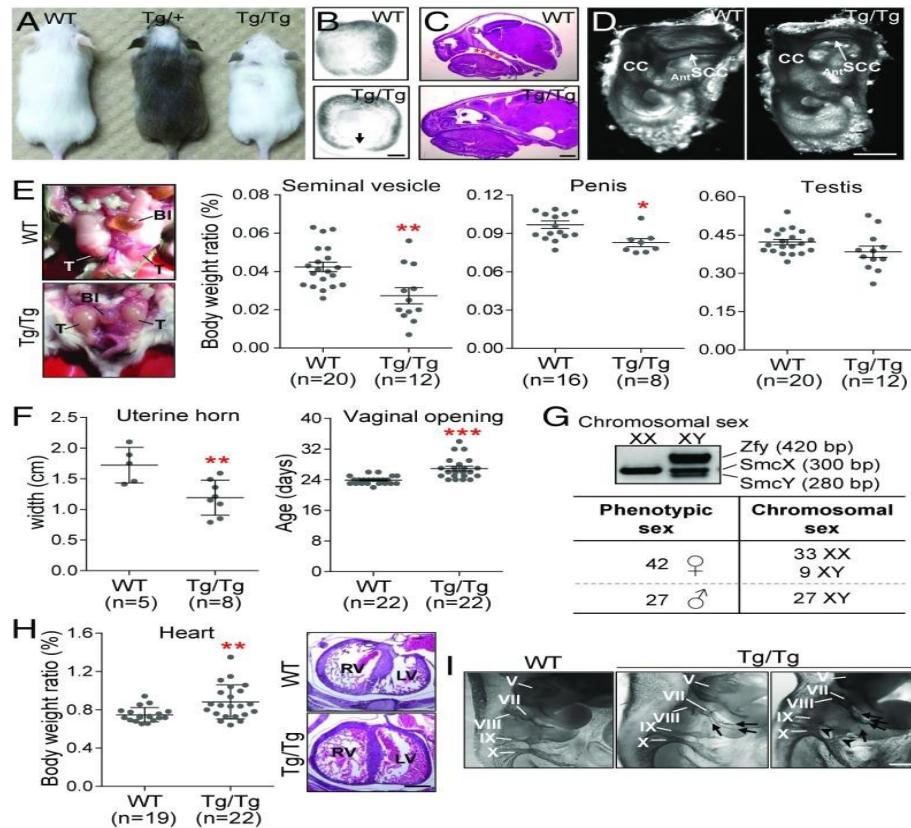


Figure 1.3 Caractéristiques majeures et mineures du syndrome CHARGE présentées par *FVB Toupee<sup>Tg/Tg</sup>*. (A) Défauts de pigmentation et retard de croissance à P25 (B) Colobome oculaire (C) Fente palatine (D) Défauts des canaux semi-circulaires (E-F) Anomalies génitales (G) Réversion sexuelle (H) Anomalies cardiaques (I) Défauts aux nerfs crâniens (Belanger *et al.*, 2018).

### 1.5.3. Le développement des CCN dans les embryons *Toupee<sup>Tg/Tg</sup>*

Puisque les CCN sont une population cellulaire majeure altérée dans le syndrome CHARGE, il était important de déterminer les principaux processus cellulaires de base (c'est-à-dire la prolifération, la survie, la migration et/ou la différenciation) affectés. En effet, la prolifération a diminué, l'apoptose a augmenté. De plus, la

direction et la vitesse de migration des CCN sont significativement affectées. Mais, certains processus affectés peuvent être compensés à des stades ultérieurs (Belanger *et al.*, 2018).

L'impact de la mutation *Toupee* sur le profil transcriptionnel des CCN est frappant, des milliers de gènes sont dérégulés majoritairement à la baisse, touchant à tous les aspects du développement des CCN (Belanger *et al.*, 2018).

Plus de mille événements d'épissage alternatifs dérégulés sont identifiés dans le transcriptome des CCN, qui se manifestent par de l'omission d'exons ou de la rétention d'introns. Les gènes mal épissés sont impliqués dans la signalisation cellulaire, les processus métaboliques, l'expression génique, la motilité et le transport cellulaire, la différenciation cellulaire et la morphogénèse. Les événements d'épissage alternatif dérégulés mènent à chercher le gène muté dans le modèle *Toupee* (Belanger *et al.*, 2018).

#### 1. 5. 4. Allèle hypomorphique dans le modèle *Toupee*

Le séquençage du génome entier a révélé que le site d'insertion du transgène de la lignée *Toupee* était dans le dernier intron de *Fam172a* (famille avec similitude de séquence 172, membre A), un gène très conservé (93% d'identité avec son orthologue humain sur le chromosome 5 (Chr5q15) (Figure 1.4). *Fam172a* est normalement largement exprimé au cours du développement, et hautement exprimé dans les tissus neuronaux. Par conséquent, son expression résiduelle dans les *embryons Toupee*<sup>Tg / Tg</sup> est environ 15%. En effet, la perturbation du gène *Fam172a*, est à l'origine du modèle de souris pour le syndrome CHARGE négatif pour la mutation *CHD7* (Belanger *et al.*, 2018).

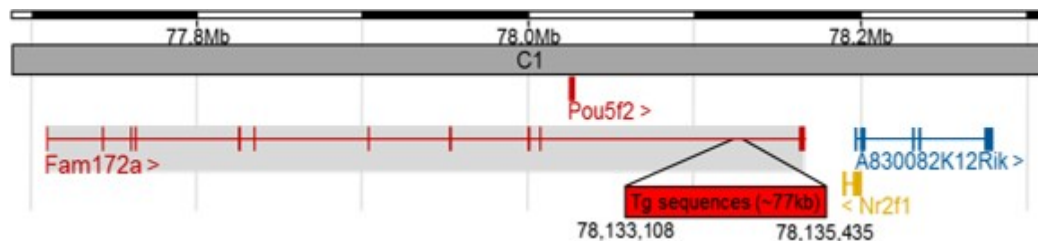


Figure 1.4 Site d'insertion du transgène chez les souris *Toupee*. Schéma du site d'insertion transgénique *Toupee* dans le cytotand C1 du chromosome 13. La boîte rouge est l'endroit où des exemplaires d'un minigène *tyrosinase* sont insérés dans le dernier intron de *Fam172a* (Belanger *et al.*, 2018).

Après son identification à l'aide d'un criblage génétique chez la souris, le nouveau gène responsable *FAM172A* a ensuite été détecté par analyse d'ADN chez des patients CHARGE sans mutation de *CHD7*, validant ainsi la découverte.

## 1.6. FAM172A

### 1.6.1. Structure

Le gène *FAM172A* de 456,69 kb comprend 10 exons, également connu sous le nom de C5orf21 (C5orf21, NM\_032042.5). Le gène est situé sur le chromosome 5 (Chr5q15) chez l'humain et sur le chromosome 13 chez la souris. L'analyse bioinformatique a démontré que *FAM172A* contient un cadre de lecture ouvert composé de 1251 nucléotides chez l'humain menant à une protéine de 416 acides aminés (Feng *et al.*, 2013). Le gène *Fam172a* est fortement conservé (93% d'homologie entre humain et murin). Chez la souris, trois principales isoformes de *FAM172A* ont été identifiées, de 417, 371 et 307 aa. Les domaines identifiés comprennent pour toutes les isoformes, de C-terminal à N-terminal : un signal de rétention au réticulum endoplasmique (RE) qui empêche la sécrétion des protéines,



un domaine Arb2 central, un motif serine hydrolase, un signal bipartite de localisation au noyau, et un domaine de dimérisation. La forme longue comprendrait également un peptide signal (1-18 aa) (Figure 1.5) (Belanger *et al.*, 2018).

Les séquences «peptide signal» du côté N-terminal sont responsables du ciblage et de la translocation des protéines à travers le réticulum endoplasmique ou la membrane cytoplasmique [41].



Figure 1.5 Isoformes murines de FAM172A.

Les trois principaux isoformes de la protéine FAM172A (307 aa, 371 aa et 417 aa). Les boîtes représentent différents domaines identifiés selon des analyses bio-informatiques: peptide signal (orange), domaine protéique 2 (Arb2) (mauve), domaine de dimérisation (pourpre), site de phosphorylation de la caséine kinase 2 (CK2) (rouge), signal de localisation nucléaire bipartite (NLS) (vert), motif de sérine hydrolase (jaune) et signal de rétention du réticulum endoplasmique (ER) (bleu clair) (Bérubé-Simard *et al.*, *À soumettre*).

### 1.6.2. Localisation

Le logiciel en ligne CELLO 2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) a été utilisé pour prévoir l'emplacement subcellulaire de la protéine d'origine humaine. Il indiquait la localisation dans le noyau et/ou le cytoplasme de la protéine FAM172A d'origine humaine (Qian *et al.*, 2016). Chez la souris, une immunofluorescence sur des cellules

embryonnaires a montré que FAM172A est enrichi dans le noyau ainsi que dans le cytoplasme, où il est souvent présent au niveau du RE (Belanger *et al.*, 2018).

### 1.6.3. Fonction

Avant d'associer le gène *FAM172A* avec le syndrome CHARGE, il a été identifié pour la première fois en 2009 dans les cellules endothéliales aortiques d'origine humaine, les macrophages dérivés du THP-1 (une lignée cellulaire des monocytes d'origine humaine) et dans les cellules musculaires lisses aortiques d'origine humaine (Li *et al.*, 2010). Cependant, la fonction biologique de cette protéine dans la physiopathologie de maladies n'est pas encore claire. La découverte qui révèle que la protéine FaAM172A favorisait la prolifération cellulaire, inhibait l'apoptose cellulaire et facilitait l'entrée en phase S a confirmé l'implication de la protéine FAM172A dans la régulation de la croissance cellulaire (Feng *et al.*, 2013). Étant donné que le déséquilibre du cycle cellulaire et l'apoptose sont étroitement liés aux caractéristiques clés des tumeurs malignes, le rôle de FAM172A serait également lié au cancer. Par contre, sa fonction précise (oncogène ou suppresseur de tumeur) dans les cancers reste controversée et la régulation moléculaire correspondante est mal élucidée (Paternoster et Falasca, 2020).

Concernant son identification comme un nouveau gène suppresseur de tumeur, FAM172A joue un rôle important dans le contrôle du cycle cellulaire et la prolifération des cellules tumorales. Il a été constaté que *FAM172A* a été régulé à la baisse chez les patients atteints de carcinome hépatocellulaire. L'expression de FAM172A dans les tissus cancéreux colorectaux était significativement plus faible que celle dans les tissus adjacents. En effet, FAM172A a supprimé le potentiel prolifératif et favorisé les potentiels apoptotiques et invasifs des cellules cancéreuses

du côlon (Xu *et al.*, 2017). Les cellules HepG2 (cellules hépatocytaires de foie) ont démontré un arrêt du cycle cellulaire dans la phase S, et leur prolifération a été inhibée de manière significative lors de la transfection avec des concentrations élevées de protéine recombinante FAM172A. Ces éléments laissent croire que FAM172A aurait un rôle de suppresseur de tumeurs (Bhaumik *et al.*, 2014).

En revanche, dans le carcinome papillaire de la thyroïde (PTC), il a été démontré que l'expression de FAM172A dans les tissus cancéreux était significativement plus élevée que dans les tissus adjacents au carcinome et les tissus thyroïdiens normaux. La présence de FAM172A à des concentrations élevées accélère la prolifération des cellules PTC via l'activation de la voie de signalisation p38 MAPK (Xu *et al.*, 2017).

Au cours des dernières décennies, une épidémie de diabète et d'obésité s'est propagée dans le monde entier, contribuant à une augmentation de l'incidence du cancer du pancréas (Xu *et al.*, 2017). *FAM172A* a été régulé à la hausse par un taux de glucose élevé d'une manière dépendant de la concentration et du temps (Li *et al.*, 2010). ce qui mène à une inhibition de la protéine EMT des cellules de cancer du pancréas via la signalisation ERK-MAPK (Chen *et al.*, 2020). De plus, il a été démontré que FAM172A pouvait être impliquée dans les problèmes de lésions vasculaires induites par le glucose (Zhao *et al.*, 2019). Ces données indiquent que FAM172A pourrait être impliquée dans la pathogenèse des maladies liées au diabète (Chen *et al.*, 2020).

Récemment, il a été démontré que FAM172A permet de stabiliser les interactions protéiques entre les composants de la chromatine et de la machinerie d'épissage. De même son implication a été démontrée dans le mécanisme de l'épissage alternatif co-transcriptionnel (Belanger *et al.*, 2018). Ce rôle dans la régulation de l'épissage alternatif a ensuite été appuyé par les données transcriptomiques et protéomiques des CCN, qui ont révélé une dérégulation importante des niveaux d'expression des gènes et d'épissage alternatif lors d'une diminution de l'expression de *Fam172a*. Parmi les

gènes dérégulés, des dizaines décrits comme étant impliqués dans le réseau de régulation des gènes CCN ont été également identifiés, ce qui couvre notamment tous les aspects du développement des CCN, de l'induction à la différenciation terminale (Bérubé-Simard et Pilon, 2019). Il existe également des preuves convaincantes que l'interaction entre la structure de la chromatine et l'épissage alternatif dans les cellules de mammifères implique des composants de la voie d'interférence ARN comme AGO2 (Belanger *et al.*, 2018).

## 1.7. AGO2

### 1.7.1. Complexe Ago2-RISC dans le cytoplasme

Les protéines d'Argonaute (1-2 chez la mouche, 1-4 chez les mammifères), sont une famille de protéines évolutivement conservées, engagées dans le silençage génique. Une protéine de la sous-famille Argonaute, Ago2 est le composant noyau du complexe RISC (complexe de silençage induit par l'ARN). Via ce complexe, les microARN régulent l'inactivation des gènes dans le cytoplasme par inhibition de la traduction et/ou dégradation des ARNm. L'initiation de la traduction est inhibée de manière compétitive quand le complexe spécifique Ago2-RISC lie eIF4E, ce qui bloque l'interaction de eIF4E avec eIF4G et rend impossible l'étape de reconnaissance de la coiffe-5'. Cela inhibe l'expression des ARNm poly (A)<sup>+</sup> (Figure 1.6) (Iwasaki et Tomari, 2009).

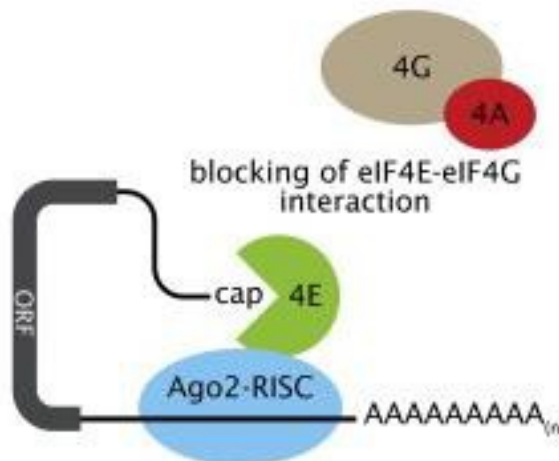


Figure 1.6 Mécanismes d'action du complexe Ago2-RISC pour inhiber la traduction des protéines.

### 1.7.2. Complexe Ago2-RISC et stress cellulaire

Les oligonucléotides (ON) utilisés à des fins thérapeutiques, induisant un stress cellulaire, peuvent utiliser des éléments de voies endogènes de miARN pour optimiser leur fonction. Cela se fait grâce à leur capacité de se lier aux composants du complexe de silençage induit par l'ARN (RISC) tels qu'Argonaute-2 (Ago-2) (Figure 1.7). Étonnamment, il a été prouvé que Ago-2 peut affecter la fonction des ON, ainsi que les produits de dégradation des ARN ciblés par les ON qui ne sont pas générés par un clivage dirigé par Ago-2. En se basant sur ces données, la conclusion était que Ago-2 est utilisé par les ON comme méthode de transport et de localisation des cibles d'ARN (Castanotto *et al.*, 2018).

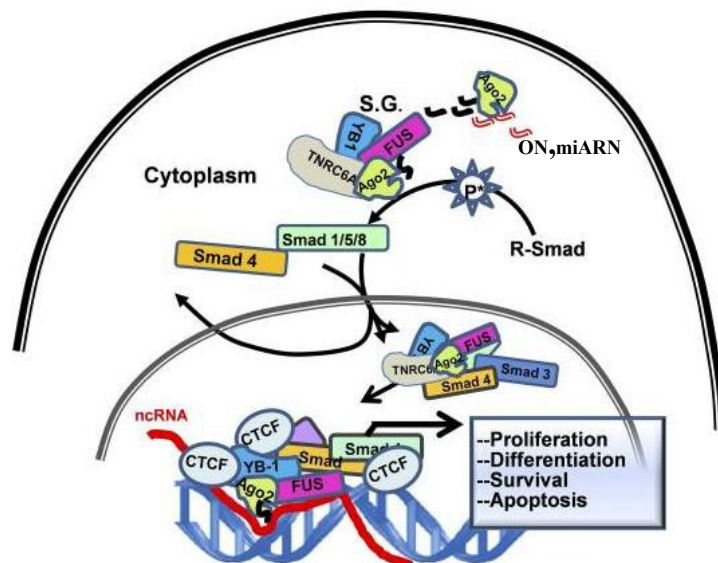


Figure 1.7 Le complexe Ago2-RISC est une navette cytoplasme-noyau. Dans le stress cellulaire provoqué par la *livraison* des oligonucléotides (ON) ou le traitement As III, le complexe Ago2-RISC conduit à la localisation de l'ON, des siARN et des miARN, d'abord aux granules de stress occupant la région périnucléaire (SG) puis aux noyaux cellulaires. À noter aussi que la navette vers le noyau est améliorée en augmentant le degré du stress (Castanotto *et al.*, 2018).

### 1.7.3. Rôle d'Ago2 dans le noyau

#### 1.7.3.1. Remodelage de la chromatine

De plus, Ago2 s'est avéré réguler l'expression des gènes en fonctionnant dans le noyau. À ce sujet, il a été démontré que Ago2 forme un complexe avec des protéines d'échafaudage nucléaire, ainsi que la machinerie de transcription afin de limiter la transcription dans les régions actives ou potentiellement actives qui interagissent ou non directement avec la lamina nucléaire. En formant un complexe, Ago2 aide à contrôler la configuration tridimensionnelle de certaines régions de la chromatine

pour réguler la façon dont les gènes sont activés ou désactivés (Figure 1.8) (Nazer *et al.*, 2018).

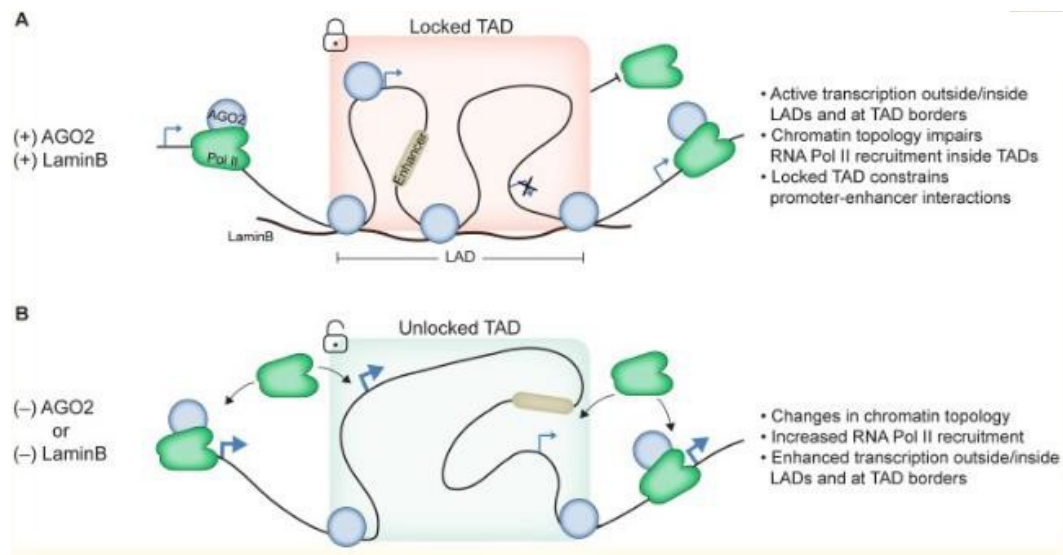


Figure 1.8 Remodelage de la chromatine médié par Ago2.

A) (Présence de Ago2), Ago2 s'associe à des gènes à l'extérieur et à l'intérieur du LAD/TAD (domaines associés à Lamina /domaines associés à la topologie). Le TAD est maintenu dans une structure verrouillée. B) (Absence de Ago2), lors de l'épuisement d'Ago2, la topologie chromatinienne du LAD/TAD passe d'une structure verrouillée à une structure déverrouillée plus accessible (Nazer *et al.*, 2018).

### 1.7.3.2. L'épissage alternatif

Dans les cellules eucaryotes, l'épissage alternatif est un processus cellulaire qui augmente considérablement la biodiversité transcriptome et protéique. Chez l'homme, presque 95% des gènes sont alternativement épissés. L'épissage alternatif se produit dans des tissus, type cellulaire et modèles d'expression génétique spécifique au stade du développement. L'épissage alternatif a d'autres rôles

importants, tels que la détermination du sexe, l'apoptose et l'implication dans des maladies humaines (Xiao *et al.*, 2012).

Afin de compléter le processus de la transcription, l'épissage alternatif est utilisé par les cellules pour favoriser ou réduire l'utilisation d'un site d'épissage particulier pour définir le contenu exonique de l'ARNm. Des séquences spécifiques sur la chromatine sont généralement la cible de nombreux facteurs d'épissage (Allemand *et al.*, 2016). L'épissage est médié par le spliceosome. Ce dernier assemble les régulateurs d'épissage sur le pré-mARN (Figure 1.9). Le rôle de ces régulateurs est essentiel lors de l'inclusion ou de l'exclusion d'exons, effectivement, lors de réactions d'épissage alternatif (Nakka *et al.*, 2018).

Dans les noyaux des cellules de mammifères, Ago1 et Ago2 s'associent à des modificateurs de la chromatine et, également, à des facteurs d'épissage. Cela donne la possibilité de l'implication d'Ago1 et Ago2 dans le contrôle de l'épissage alternatif ainsi que la transcription des gènes cibles. Ago1 et Ago2 facilitent le recrutement de spliceosome et modulent ainsi le taux d'élongation de l'ARN polymérase II en entraînant une augmentation de la méthylation des histones sur les exons variants. Le ralentissement de l'ARN polymérase II augmente la fiabilité de la machinerie de l'épissage (Ameyar-Zazoua *et al.*, 2012; Alló *et al.*, 2014).

Donc dans la cellule, l'épissage alternatif est affecté par le remodelage de la chromatine et les modifications d'histones en facilitant le recrutement des facteurs d'épissage (Ameyar-Zazoua *et al.*, 2012).

Ces fonctions primordiales des protéines Argonaute confirment leur rôle dans le déroulement de la machinerie de l'épissage alternatif. Ces données démontrent notamment un modèle de régulation de l'épissage alternatif dans lequel les protéines



Argonaute couplent l'élongation de l'ARN polymérase II et la modification de la chromatine (Figure 1.9) (Ameyar-Zazoua *et al.*, 2012).

#### 1.8. Interactions protéiques FAM172A, AGO2 et CHD7

Fait intéressant, selon les données de co-immunoprécipitation (co-IP), il a été démontré que *Chd7* interagit physiquement avec FAM172A et Ago2 et que FAM172A stimule l'interaction Chd7-Ago2. Cela a été confirmé par la présence de FAM172A exogène qui semble favoriser l'interaction Chd7-Ago2. De plus, des tests ChIP et RNA-ChIP ont démontré que FAM172A et Chd7 sont présents sur des exons alternativement épissés régulés par Ago2. Ensuite, il a été confirmé que l'épissage alternatif est également largement dérégulé chez les souris mutantes *Chd7* ainsi que dans les cellules de patients humains porteurs d'une mutation *FAM172A* ou *CHD7* (Belanger *et al.*, 2018; Bérubé-Simard et Pilon, 2019).

En ce qui concerne le syndrome CHARGE, Ago2 d'origine humaine (mais pas Ago1) et CHD7 interagiraient avec les protéines centrales des complexes de remodelage de la chromatine SWI / SNF BRG1 et BAF155. Entre autres, l'analyse des résultats donnés par ChIP, RIP et co-IP suggère fortement que FAM172A pourrait ponter la chromatine avec le mécanisme d'épissage alternatif comme suggéré pour Chd7 et Ago2. De plus, FAM172A et Chd7 sont, comme Ago2, présents sur des régions de chromatine transcrites contenant des sites d'épissage alternatif. D'une manière logique, les autres partenaires d'interaction de FAM172A marquent un enrichissement en protéines de chromatine et en facteurs d'épissage (Belanger *et al.*, 2018; Bérubé-Simard et Pilon, 2019).

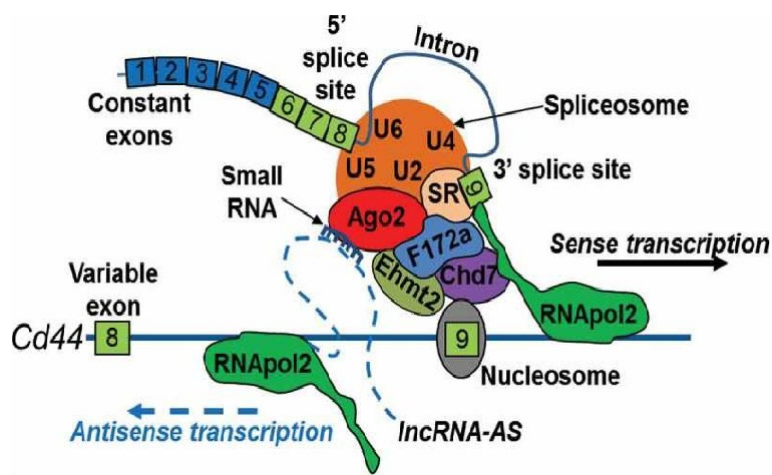


Figure 1.9 L'implication de FAM172A dans l'épissage alternatif médié par Ago2.

Les données les plus récentes suggèrent que la localisation de FAM172A sur l'interface chromatine-spliceosome aide à stabiliser les interactions protéine-protéine entre la petite protéine de liaison à l'ARN Ago2, les remodeleurs de chromatine tels que Chd7 et les modificateurs d'histone tels qu'Ehmt2 (Bérubé-Simard et Pilon, 2019).

### 1.9. Fluorescence par complémentation bimoléculaire (BiFC)

La fluorescence par complémentation bimoléculaire (BiFC) est une méthode fluorescente pour le criblage des interactions protéine-protéine (IPP) à grande échelle dans des conditions vivantes (Bischof *et al.*, 2018).

Les méthodes doivent surmonter les défis techniques posés, comme la nature des interactions protéine-protéine, faible ou forte, la fiabilité de détection de la proximité physique (Varnaité *et al.*, 2016; Bagchi *et al.*, 2015). Parmi les quelques méthodes qui sont compatibles pour l'analyse des interactions protéine-protéine (IPP) dans des conditions vivantes, il y a le transfert d'énergie de résonance de fluorescence (FRET).

Sur une petite distance (moins de 10 nm), l'excitation provoque un transfert d'un photon entre deux chromophores fluorescents. Ce transfert peut donc être utilisé pour valider la proximité étroite entre deux protéines, ou pour capturer un changement de conformation. En particulier, cette méthode demande un niveau élevé d'expression des protéines et des interfaces dédiées pour interpréter les signaux (Bischof *et al.*, 2018).

En revanche, la BiFC est basée sur un signal fluorescent visible ce qui rend la technique plus facile à réaliser. La BiFC est assurée par la reconstitution des protéines fluorescentes à partir de deux sous-fragments à proximité spatiale (distance de proximité similaire à FRET) (Figure 1.10) (Bischof *et al.*, 2018).

De plus, l'analyse des IPP est effectuée par une émission de la fluorescence intrinsèque détectable par un microscope à fluorescence avec des niveaux d'expression protéique normaux. La protéine fluorescente verte (GFP) et divers dérivés de la GFP tels que les protéines YFP, Venus ou Cerulean ont été utilisées pour établir la BiFC (Figure 10) (Bischof *et al.*, 2018). Ainsi d'autres types comme des variantes fluorescentes rouges, exemple Mrfp1 (Fan *et al.*, 2008) ou mCherry (Chen *et al.*, 2015), et plus récemment la protéine fluorescente proche infrarouge iRFP (Chen *et al.*, 2015).

Le plus impressionnant est que la complémentation entre les deux sous-fragments de la protéine fluorescente engendre un complexe protéique formé de façon irréversible. Cependant, la réversibilité dépend du contexte cellulaire, de la stabilité du complexe et du niveau d'expression des fragments fluorescents. Cela permet de détecter de faibles interactions protéiques et même des interactions transitoires. En effet, cela démontre la sensibilité de la méthode de BiFC pour étudier les IPP *in vivo* (Sung *et al.*, 2013).

Confirmant son application à grande échelle, cette méthode a été utilisée dans différents systèmes modèles végétaux et animaux et avec différents types de protéines. La BiFC a été utilisée dans plusieurs approches à haut débit chez la levure, les plantes et les cellules de mammifères, ou pour la découverte de médicaments contre des IPP spécifiques.

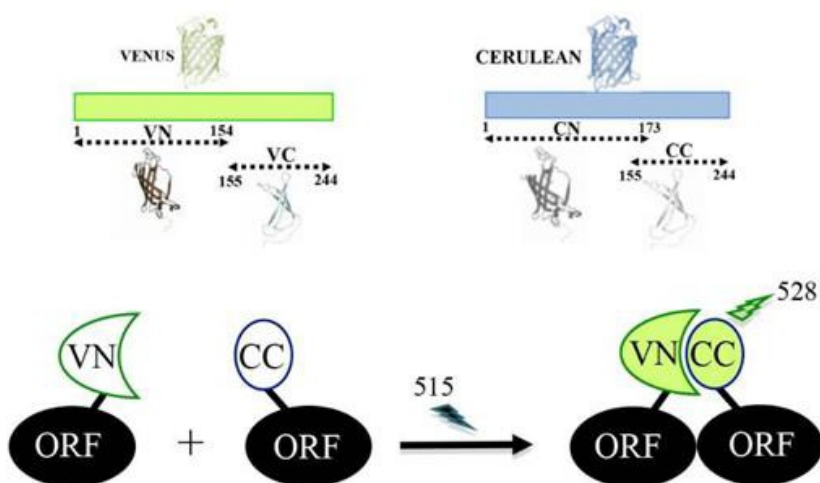


Figure 1.10 Principe du BiFC bicolore en utilisant la propriété de la complémentation.

La complémentation entre le fragment C-terminal de la protéine fluorescente bleue Cerulean (CC) et le fragment N-terminal de Venus (VN). ORF : des facteurs de transcription. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont indiquées (Bischof *et al.*, 2018).

### 1.10. Traitement à la rapamycine

Une récente découverte a permis de tester à des fins thérapeutiques une molécule, appelée rapamycin, qui peut corriger les problèmes d'épissage alternatif et même empêcher partiellement l'apparition des malformations présentes dans le syndrome CHARGE (Belanger *et al.*, 2018).

Connu comme inhibiteur de la cible de la voie Tor, la rapamycine bloque la voie qui stimule la biogenèse des ribosomes en désactivant la transcription des gènes des protéines ribosomiques. Par conséquent, la rapamycine diminue l'expression des gènes codant pour ces protéines. Cela limite le nombre de facteurs d'épissage utilisés dans cette voie et réduit la compétition pour la machinerie d'épissage. Ces événements causent une augmentation de l'efficacité de l'épissage des autres ARN pré-messager (Belanger *et al.*, 2018).

La rapamycine a corrigé, *in vitro* dans les cellules des patients CHARGE, des défauts d'épissage observés dans les gènes dérégulés à la baisse, ainsi que dans les gènes dérégulés à la hausse associés au syndrome CHARGE. Également, le traitement a diminué d'une manière significative la gravité d'un phénotype hautement pénétrant dans syndrome CHARGE chez le modèle *Toupee* (Bérubé-Simard et Pilon, 2019).

Tous ces événements font penser que l'épissage alternatif cotranscriptionnel pourrait bien être le mécanisme pathogène général du syndrome CHARGE (Bérubé-Simard et Pilon, 2019).

### 1.11. Hypothèses et objectifs

Les premiers travaux réalisés par l'équipe de notre laboratoire ont permis de déterminer que la protéine FAM172A est principalement localisée au noyau, où elle participe à la régulation de l'épissage alternatif co-transcriptionnel. Le problème est que ces travaux sont tous basés sur l'existence d'une seule isoforme de FAM172A alors que nous avons récemment découvert l'existence de trois isoformes produites par épissage alternatif.

Afin de répondre à cette problématique nous avons proposé plusieurs hypothèses : La première hypothèse était que FAM172A joue plusieurs fonctions et sa localisation dans la cellule change selon le type d'isoforme. Notre objectif était de caractériser les mécanismes de régulation de la localisation subcellulaire de la protéine FAM172A en fonction de différentes isoformes.

En revanche, la localisation de différentes isoformes peut changer selon l'état des cellules si elles sont stressées ou non. Notre objectif était donc de caractériser la localisation des isoformes de FAM172A en fonction de conditions de stress.

La possibilité de la participation de FAM172A dans le développement des cellules de la crête neurale nous fait penser que l'expression des différentes isoformes de FAM172A peut varier pendant le développement embryonnaire. Donc l'objectif est de déterminer le patron d'expression spatiotemporel des isoformes de FAM172A durant le développement embryonnaire de la souris.

## CHAPITRE II

### MATÉRIELS ET MÉTHODES

#### 2.1. Animaux

Toutes les procédures effectuées sur des animaux ont été approuvées par le Comité Institutionnel de Protection des Animaux de l'Université du Québec à Montréal, accrédité par le Conseil Canadien de Protection des Animaux. Les souris utilisées sont de fond FVB/N. Le jour embryonnaire 0.5 (E0.5) correspond à la journée de détection du bouchon vaginal. Pour récolter les embryons, les femelles gestantes ont été sacrifiées, les cornes utérines prélevées, la déciduale et le sac vitellin disséqués afin d'en extraire l'embryon. Ces derniers coupés en deux, tête et corps. Les animaux sacrifiés ont été anesthésiés à l'isoflurane, puis euthanasiés avec une concentration croissante de CO<sub>2</sub>.

#### 2.2. *Western Blot* : l'expression de la protéine fam172

##### 2.2.1. Extraction protéique sur tissus (embryons)

Les tissus embryonnaires ont été congelés séparément dans l'azote liquide puis ils ont été homogénéisés. Cette étape est suivie par un ajout d'un volume du tampon RIPA :

NaCl (150 mM), Triton (1%), SDS (0,1%), Tris-HCl (pH8.0, 50 mM), Sodium deoxycholate (0,5%) et l'inhibiteur de protéase. Les échantillons ont été incubés pendant une heure sur glace puis ils ont été centrifugés à vitesse de 16300 g. Les surnageants (contenant les protéines) ont été conservés à -80 degrés Celsius. Enfin, les protéines ont été dosées par la méthode de Lowry en utilisant le Kit Bio-Rad (#500-0113, #500-0114).

### 2.2.2. Préparation des gels et montage

Un gel de séparation de polyacrylamide-SDS de 10% et un gel d'entassement ont été préparés.

### 2.2.3. Migration des protéines dénaturées

Des aliquots de 50 µg de protéines ont été mélangés avec le tampon de chargement dans un volume total de 30 µl et chauffés à 95°C pendant 5 min, pour dénaturer les protéines. Les échantillons et le standard de poids (BLUelf Prestained Protein Lader, FroggaBio) ont été chargés sur le gel et la migration a été effectuée dans le tampon d'électrophorèse 1X Tris-Glycine pendant une heure à 100 V pour rassembler les protéines, puis une heure à 120 V pour la migration dans le gel de séparation.

### 2.2.4. Le transfert sur une membrane de PVDF

Sur une cassette, la membrane de PVDF activée (15 sec dans l'eau, puis 15 sec dans le méthanol 100%) a été superposée sur le gel. L'ensemble a été placé entre un papier



Whatman imbibé avec du tampon de transfert. La cassette a été déposée dans une cuve remplie avec le tampon de transfert froid et le transfert a été effectué à 20 volt et à 4°C pendant une nuit.

### 2.2.5. Révélation par anticorps

Le blocage de la membrane a été effectué avec du TBST-Lait 5% (TBS (Tris pH 8, 10 mM, NaCl 0.15 M), tween 0.1%, lait 5%) durant une heure. Cela était suivi par une incubation dans une solution contenant l'anticorps primaire (Lapin anti FAM172A, dilution 1/1000, Abcam, ab121364) (Lapin anti-GAPDH, Santa Cruz, mouse monoclonal) pendant au moins 1 heure à température pièce. Après trois lavages dans du TBST- Lait 5%, la membrane a été incubée dans l'anticorps secondaire (Chèvre anti Lapin HRP, dilution 1/2000, Abcam, ab6721). Le lavage de la membrane avec du TBST-Lait 5% puis du TBS (Tris pH 8 10 mM, NaCl 0.15 M) a été suivi par la révélation protéique en utilisant le kit Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (P90720-Millipore).

## 2.3. Constructions plasmidiques

### 2.3.1. PCR

A partir du plasmide IRES2-EGFP-FAM172A (clontech) et p3XFLAG-myc-CMV-24-Ago2 (addgene), une amplification de la forme moyenne de FAM172A complet de 1251 pb et Ago2 de 2600 pb a été effectuée par PCR. Nous avons utilisé la Platinum Taq DNA polymérase HF (ThermoFisher Scientific) conformément aux instructions du fabricant.

Les amorces utilisées contiennent des sites de restrictions bien définis. Pour FAM172A, en avant EcoRI ((GTT AGA ATT CAT G AAA AAG GAC GAA CCA CCT TTT GAT TTT CC) et en sens inverse XhoI (TTAA CTCGAG CAG CTC CTC GTG CTT GAT CCG). Pour Ago2 en avant, EcoRI (TTA AGC GGC CGC TCA AGC AAA GTA CAT GGT G) et en sens inverse NotI (GTA AGA ATT C CACCCATTCCAGTGGTGTAACGCACTT)

Le programme utilisé consiste en une dénaturation initiale de 1 min à 96°C, puis 40 cycles de 30 s à 96°C, 30 s à 62°C et 3 min à 68°C, avec une élongation finale de 5 min à 72°C.

Les produits de PCR ont été migrés sur un gel d'agarose de 1%, extraits et purifiés en utilisant le kit : EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Minipreps Kit (BIO BASIC).

Les amplicons obtenus ont été coupés par les enzymes de restrictions cités ci-dessus.

### 2.3.2. Clonage

#### 2.3.2.1. Ligation de l'insert FAM172A et Ago2 dans le plasmide pcDNA3

Des vecteurs (pcDNA3-mcs-Venus, pcDNA3-mcs-Ceruleum, pcDNA3-Venus-mcs) (Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon) ont été digérés précédemment par les enzymes de restrictions (EcoRI et XhoI ou EcoRI et NotI). 50 ng de chaque vecteur a été mélangé avec 100 ng de l'insert (FAM172A ou Ago2) digérés aussi avec les mêmes enzymes selon leurs sites de restriction. Cela a été suivi par un ajout de 800 U

d'enzyme T4 ligase et du tampon de ligation dans un volume total de 20  $\mu$ l. Le mélange a été incubé à 16°C pendant une nuit.

#### 2.3.2.2. Transformation E.coli

Les bactéries compétentes DH5 $\alpha$  ont été ajoutées à la solution de la ligation. Le mélange a été mis sur glace pendant 30 minutes, puis un choc thermique à 42°C/90 sec a été appliqué, suivi d'un refroidissement pendant 2 min sur glace. Du milieu LB a été ajouté, suivi d'une incubation d'une heure à 37°C. Le tout a été centrifugé à 3000 g/5 min. Une bonne partie du surnageant a été enlevée et le reste a été utilisé pour resuspendre le culot et l'étaler sur un pétri de LB agar avec de l'ampicilline.

#### 2.3.2.3. Amplification de colonies isolées

Des colonies ont été isolées et déposées dans un volume de 3 ml du milieu LB contenant de l'ampicilline 0.1 mg/ml et incubées à 37°C pendant une nuit avec agitation.

#### 2.3.2.4. Mini Prep

Un Kit EZ-10 Spin Column Plasmide DNA Minipreps Kit, de la compagnie BIO BASIC, a été utilisé pour extraire les plasmides. La vérification du clonage a été faite par PCR et par séquençage chez Génome Québec.

## 2.4. Culture cellulaire et transfection

### 2.4.1. Préparation des lignées cellulaires Neuro2a (N2a) et COS7

Les cellules ont été cultivées, dans des boîtes de Petri de 10 cm, dans un milieu EMEM (N2a) ou DMEM (COS7) contenant 10% de FBS et 1% (pénicilline / streptomycine) dans des conditions standard (37 ° C et 5% CO<sub>2</sub>).

Pour les études de la localisation subcellulaire de FAM172A, les trois isoformes ont été transfectées séparément dans deux lignées cellulaires. Des cellules N2a et COS7 ont étéensemencées dans des plaques contenant des lamelles et transfectées avec 1 µg de vecteur IRES-EGFP-FAM172A 417 aa (contient isoforme longue de FAM172A) ou IRES-EGFP-FAM172A 371 aa (isoforme moyenne) ou IRES-EGFP-FAM172A 307 aa (isoforme courte) 2 h après l'étalement (la transfection a été faite comme indiqué dans le protocole du réactif de transfection GeneJuice - transfection d'ADN, Millipore, 70967-4) et analysés par immunofluorescence après 48 h de culture. Toutes les transfections ont été effectuées en utilisant les réactifs Gene-Juice conformément aux instructions du fabricant.

Pour les études de la localisation subcellulaire des isoformes de FAM172A en cas de stress, le milieu de culture standard a été remplacé par un milieu sans FBS 24h après la transfection. Les cellules ont été analysées par immunofluorescence après 48 h de culture.

Pour valider certains partenaires d'interaction de FAM172A via l'approche BiFC (*bimolecular fluorescence complementation*), des cellules N2a et COS7 ont été

cotransfectées avec 1 µg de pcDNA3-Venus-Ago2 et pcDNA3-FAM172A-Cerulean ou avec de pcDNA3-FAM172A-Venus et pcDNA3-FAM172A-Cerulean. Les cellules ont été analysées par immunofluorescence après 48 h de culture à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>.

#### 2.4.2. Immunofluorescence

Les cellules ont été fixées par PFA 4% (paraformaldéhyde) pendant 15 min sur glace, puis lavées au PBS trois fois pendant 5min. Les cellules ont été incubées dans une solution de blocage (PBS, 0.1% de triton et 10% de FBS) pendant une heure. Dans une chambre humide, les cellules ont été incubées avec l'anticorps primaire Lapin anti FAM172A, dilution 1/250, Abcam, ab121364) pendant une nuit à 4°C. L'anticorps primaire a été remplacé par l'anticorps secondaire (Ane anti Lapin, Alexa 594, dilution 1/500, Jackson ImmunoResearch, 711-585-152) (une heure à température pièce) après trois lavages avec le PBS. Le DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) (Sigma-Aldrich) a été utilisé pour teinter les noyaux (10 min/ température pièce). Les cellules ont été examinées à l'aide d'un microscope inversé Nikon TI et l'acquisition des images a été faite avec une unité confocale Nikon A1 et le logiciel NIS-Element AR4 (Nikon).

## CHAPITRE III

### RÉSULTATS

#### 3.1. Les trois principales isoformes de FAM172A (307 aa, 371 aa et 417 aa)

Sur la base d'une analyse informatique de séquence, disponible dans les bases de données Ensembl (<https://useast.ensembl.org>) et UniProtKB (<https://www.uniprot.org>), il existe trois principales isoformes de la protéine FAM172A d'origine murine : l'isoforme 417 acides aminés (Q3TNH5), l'isoforme 371 aa (E9QMA2) et l'isoforme 307 aa (Q3TNH5-3). Les trois isoformes sont susceptibles de participer à l'épissage alternatif (Figure 1.5).

#### 3.2. Déterminer le patron d'expression spatiotemporel des isoformes de FAM172A durant le développement embryonnaire de la souris

Nous avons choisi les stades embryonnaires entre E9.5 et E12.5 qui correspondent aux stades de développement des CCN. Et à l'aide de la technique du *Western blot*, nous avons quantifié l'expression des trois isoformes.

Le *Western Blot* dirigé contre FAM172A, pour analyser des extraits de protéines corporelles ou de tête à différents stades embryonnaires, a montré que la protéine

prédominante de FAM172A était l'isoforme 371 aa, tandis que l'isoforme 417 aa était faiblement exprimée. En revanche l'isoforme 307 aa était indétectable. Le rapport tête / corps de l'expression de FAM172A 371 aa semblait augmenter entre E11.5-12.5 pour les deux isoformes 371 aa et 417 aa (Figure 3.1 A/C).

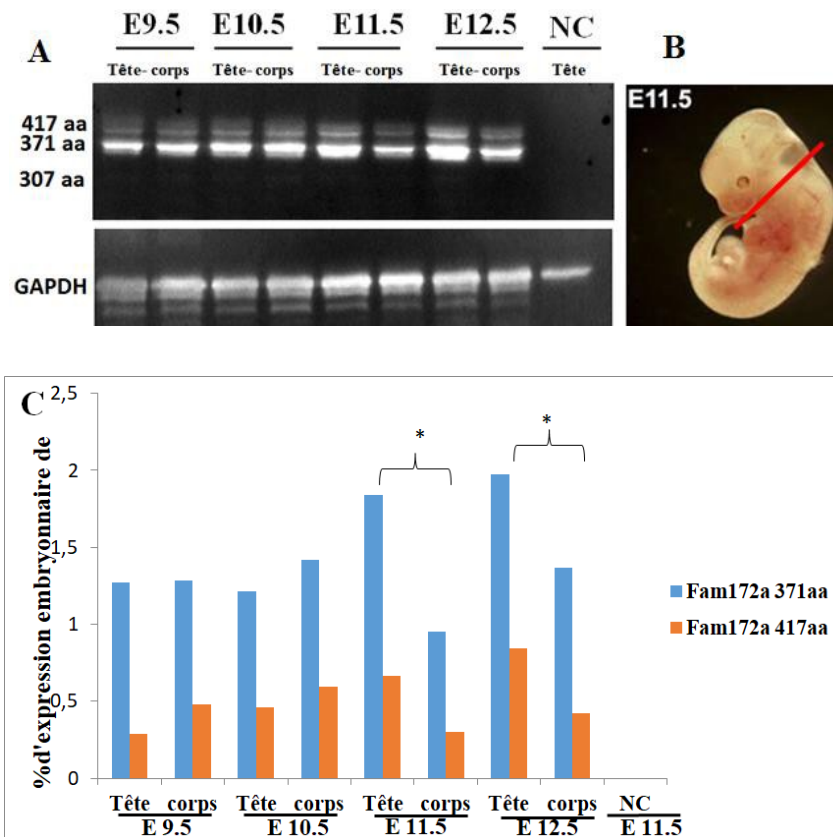


Figure 3.1 Analyse d'abondance d'isoformes de la protéine FAM172A durant le développement embryonnaire.

(A) Un *Western blot* des extraits protéiques de corps ou de tête (50  $\mu$ g) obtenus à partir de différents stades embryonnaires : E9.5, E10.5, E11.5 et E12.5 a été réalisé en utilisant un anticorps anti-FAM172A et analysé pour différentes abondances d'isoformes de FAM172A (307aa, 371aa et 417aa). (C) La quantification de *Western blot* de l'abondance de différentes isoformes de FAM172A. E : embryonnaire. NC: contrôle négatif (Tête Toupee homozygote, E11.5). GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) a été utilisé comme contrôle de chargement. L'expérience a été effectuée en triplicata. (B) Un embryon au stade E11.5. La ligne rouge est l'endroit où nous avons coupé pour séparer la tête et le corps.

### 3.3. Caractériser les mécanismes de régulation de la localisation subcellulaire de FAM172A en fonction des différentes isoformes

L'hypothèse était que les trois isoformes de FAM172A sont susceptibles de participer à l'épissage alternatif. Cela mène à poser les questions suivantes : est-ce qu'elles sont exprimées dans le même endroit ou dans des endroits différents de la cellule ? ; si elles sont exprimées dans des endroits différents est-ce qu'elles jouent le même rôle dans la cellule ou bien ont-elles des rôles différents ? Est-ce que des conditions de stress pourraient influencer la localisation pour qu'elles exercent le même rôle ?

Une immunofluorescence dans des cellules N2a et COS7 surexprimant transitoirement de façon séparée les trois isoformes de FAM172A (417aa, 371aa ou 307aa), dans des conditions optimales (les cellules en culture dans du EMEM/DMEM complémenté de FBS à 10% et incubées à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>), a été effectuée (Figure 3.2). Le calcul du pourcentage de la distribution de la localisation de chaque isoforme (Figure 3.3) a révélé que les deux isoformes, 371 aa ou 307 aa, étaient enrichies dans le noyau, en revanche l'isoforme 417 aa était bien enrichie dans le cytoplasme.



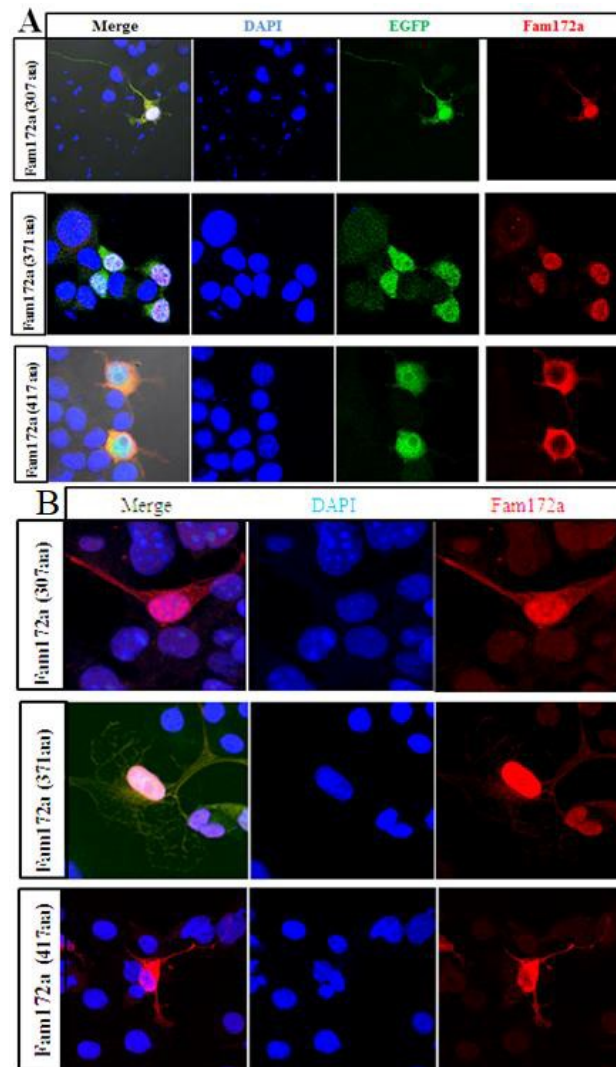


Figure 3.2 Localisation subcellulaire des différentes isoformes de FAM172A dans des conditions optimales :

La localisation cellulaire spécifique de la protéine FAM172A a été obtenue par immunofluorescence, dans des conditions optimales (10% FBS), de FAM172A (rouge, anticorps anti-FAM172A) dans des lignées cellulaires Neuro2a (N2a) (Figure 12-A) et Cos7 (Figure 12-B). Les cellules ont été transfectées avec le vecteur Fam172a-IRES-EGFP (l'insert est soit : l'isoforme FAM172A 307 aa, 371 aa ou 417 aa). N=3 expériences pour chaque lignée. Le DAPI (bleu) a été utilisé pour colorer les noyaux. FAM172A (rouge) protéine d'intérêt. EGFP (vert), *Recombinant Enhanced Green Fluorescent Protein*, contrôle positif de transfection.

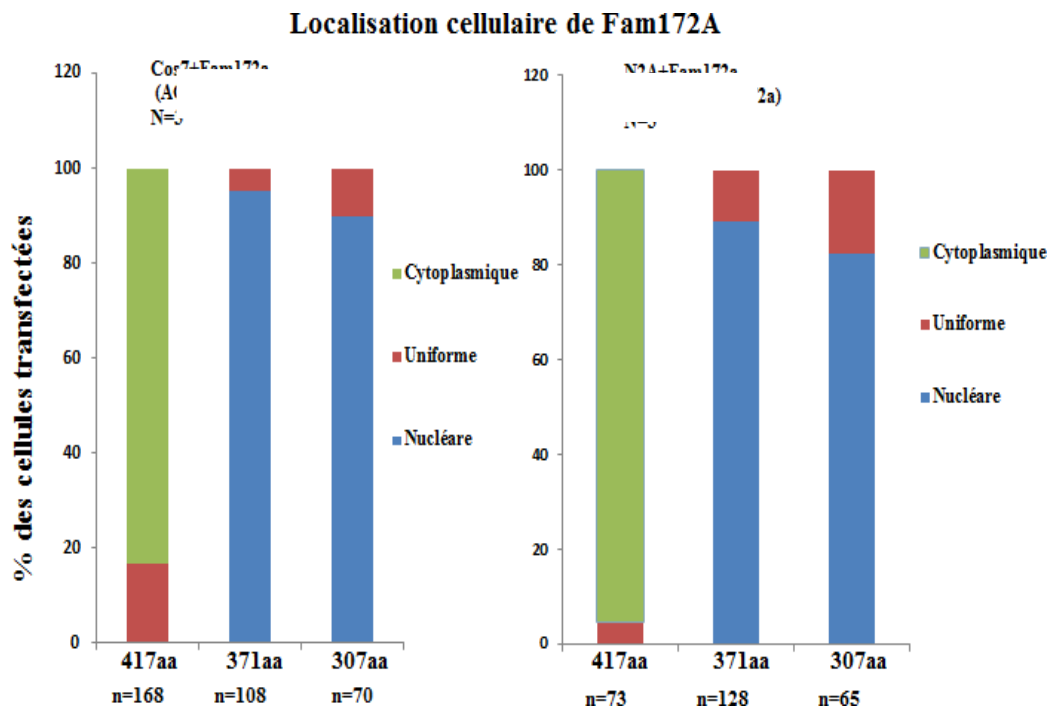


Figure 3.3 La distribution de la localisation subcellulaire des différents isoformes de FAM172A dans des conditions optimales.

Des immunofluorescences ont été effectuées en triplicata (N = 3) pour calculer le pourcentage de la distribution de la localisation subcellulaire des isoformes de la protéine FAM172A (307 aa, 371 aa et 417 aa). n : nombre total des cellules transfectées comptées.

#### 3.4. La localisation subcellulaire des différents isoformes de la protéine FAM172A en fonction des conditions de stress

Après avoir identifié le niveau d'expression et la localisation subcellulaire de chaque isoforme, nous avons décidé de continuer le reste de nos expériences avec les deux isoformes, 417aa et 371aa. En effet, le niveau d'expression de l'isoforme 307aa était indétectable durant le développement embryonnaire et précisément durant la période de développement des CCN. Donc, nous avons jugé qu'elle n'est pas indispensable

pour ce processus. Toutefois, la prochaine expérience a été réalisée pour répondre à la question posée suivante : dans des conditions de stress, les isoformes de FAM172A peuvent-elles changer de localisation dans la cellule afin qu'elles exercent un rôle ou participent dans un mécanisme défini comme l'épissage alternatif?

Donc, nous avons appliqué des conditions de stress, en faisant pousser les cellules transfectées 24 heures dans un milieu sans FBS avant la récolte des cellules.

Concernant l'isoforme 371 aa (Figure 3.4), l'expérience d'immunofluorescence sur la surexpression de l'isoforme n'a montré aucun changement de la localisation de la protéine Fam172a dans les cellules COS7, dans les conditions de stress (appauvrissement du milieu de culture en nutriments) par rapport aux cellules non stressées. La protéine reste dans le noyau.

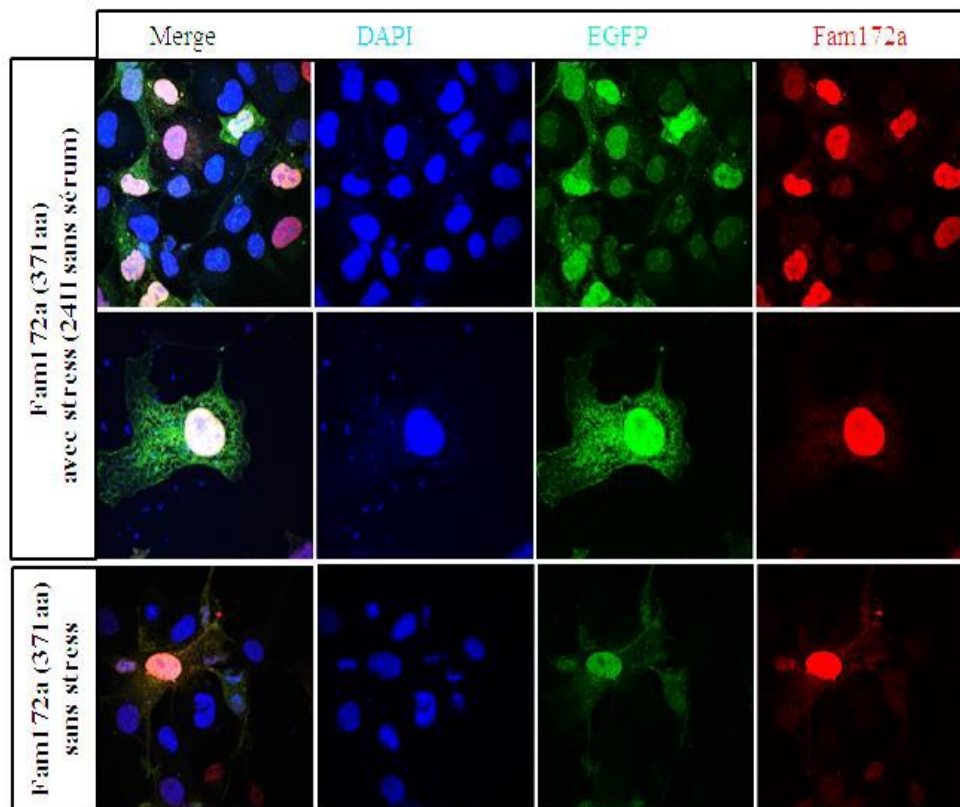


Figure 3.4 Localisation subcellulaire de l'isoforme 371aa de FAM172A dans des conditions de stress.

La localisation cellulaire spécifique de la protéine FAM172A a été obtenue par immunofluorescence de FAM172A dans des conditions optimales (sans stress, milieu 10% FBS) ou dans des conditions de stress (24 heures dans un milieu sans sérum). Dans les deux conditions, n=3 expériences. Les cellules de la lignée cellulaire COS7 ont été transfectées avec le vecteur Fam172a-IRES-EGFP (l'insert 371 aa). L'isoforme 371 aa (rouge, anticorps anti-FAM172A). Le DAPI (bleu) a été utilisé pour colorer les noyaux. EGFP (vert), *Recombinant Enhanced Green Fluorescent Protein*, contrôle positif de la transfection.

La figure 3.5 illustre une immunofluorescence dans des cellules COS7, surexprimant transitoirement de l'isoforme de FAM172A (417 aa), dans les conditions de stress (appauvrissement du milieu de culture en nutriments) Le calcul du pourcentage de la distribution de la localisation (Figure 3.6) a révélé que dans le cas contrôle (sans

stress) l'isoforme 417 aa était enrichie dans le cytoplasme, comme il a été démontré dans l'expérience précédente (Figure 3.3). Par contre en cas de stress, l'isoforme 417 aa se déplace du cytoplasme vers le noyau ce qui crée une distribution uniforme de l'isoforme dans la cellule, et parfois même plus concentré au noyau.

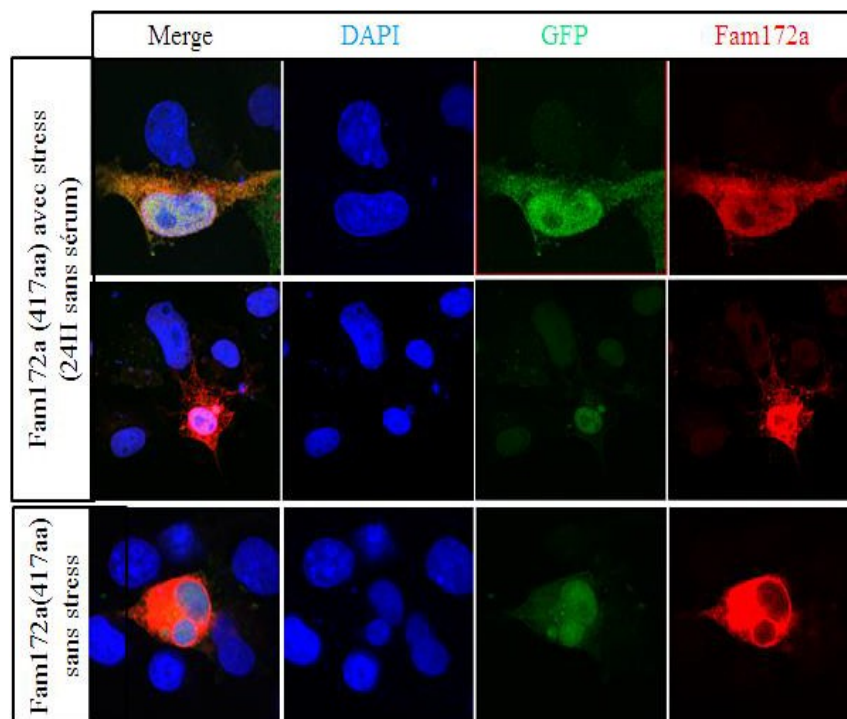


Figure 3.5 Localisation subcellulaire de l'isoforme 417aa de FAM172A dans des conditions de stress.

La localisation cellulaire spécifique de la protéine FAM172A a été obtenue par immunofluorescence de FAM172A dans des conditions optimales (sans stress, milieu 10% FBS) ou dans des conditions de stress (24 H dans un milieu sans sérum). Dans les deux conditions, n=3 expériences. Les cellules de la lignée COS7 ont été transfectées avec le vecteur Fam172a-IRES-EGFP (l'insert 417 aa). L'isoforme FAM172A 417 aa (rouge, anticorps anti-FAM172A). Le DAPI (bleu) a été utilisé pour colorer les noyaux. EGFP (vert), *Recombinant Enhanced Green Fluorescent Protein*, contrôle positif de transfection.

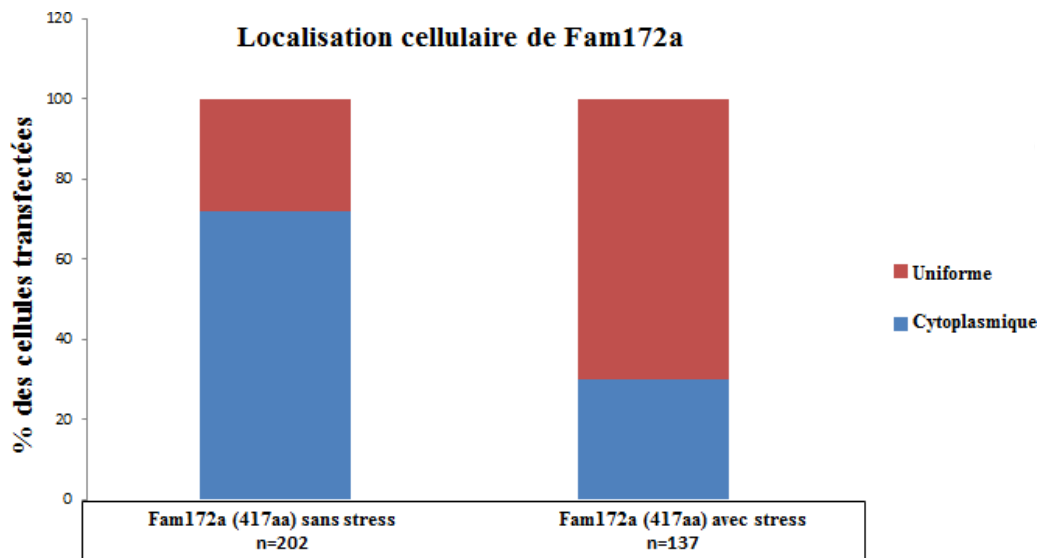


Figure 3.6 La distribution de la localisation subcellulaire de l'isoformes 417aa de FAM172A dans des conditions de stress.

Des immunofluorescences ont été effectuées en triplicata (N = 3) pour calculer le pourcentage de la distribution de la localisation subcellulaire de l'isoforme de FAM172A (417aa). n : nombre total des cellules transfectées comptées.

Pour éliminer toute sorte de stress supplémentaire, qui pourrait être causé par la transfection des cellules, nous avons vérifié directement les changements de la localisation de FAM172A endogène dans des conditions de stress bien choisies (Figure 3.7). Après 24 h de maintenance des cellules COS7 dans un milieu sans FBS, l'immunofluorescence de FAM172A endogène montre que la protéine est exprimée de façon majoritaire au niveau du noyau et qu'elle est faiblement exprimée au niveau du cytoplasme. Toutefois, cela ne diffère pas à ce qui était observé dans les cellules COS7 qui n'ont pas subi de stress.

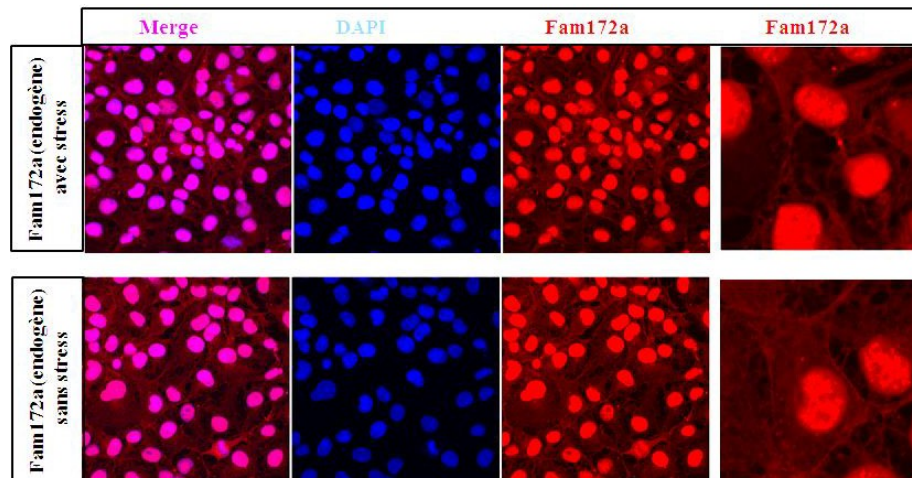


Figure 3.7 Localisation subcellulaire de FAM172A endogène dans des conditions de stress.

Une immunofluorescence de la protéine FAM172A a été effectuée dans des conditions optimales (sans stress, milieu 10% FBS) ou dans des conditions de stress (24 H dans un milieu sans FBS). Dans les deux conditions, n=3 expériences. FAM172A endogène a été révélée en utilisant l'anticorps anti-FAM172A (rouge) dans la lignée cellulaire COS7. Le DAPI (bleu) a été utilisé pour colorer les noyaux.

### 3.5. Valider certains partenaires d'interaction de FAM172A à l'échelle subcellulaire via l'approche BiFC

Il a été précédemment démontré que FAM172A et Ago2 endogènes se colocalisent dans le noyau. Les deux protéines interagissent ensemble et elles sont impliquées dans l'épissage alternatif cotranscriptionnel (Belanger *et al.*, 2018). Cela suggère que l'isoforme FAM172A 371 aa, en raison de son abondance et de sa localisation nucléaire, est la plus susceptible de participer à l'épissage alternatif médié par Ago2. Nous avons choisi de nous concentrer sur cette isoforme pour les prochaines expériences.

### 3.5.1. L'isoforme FAM172A 371 aa interagit avec Ago2

Nos données antérieures de co-immunoprécipitation (co-IP) suggèrent que FAM172A et Ago2 interagissent ensemble dans un grand complexe (Belanger *et al.*, 2018)., ainsi nous voulions caractériser plus en détail cette interaction. Pour ce faire, nous avons utilisé une approche de la fluorescence par complémentation bimoléculaire (BiFC) (Figure 3.8). Donc nous avons couplé les deux protéines avec une moitié de fluorophore : FAM172A avec la partie C-terminale de la protéine bleue Cerulean et Ago2 avec la partie N-terminale de la protéine Venus. L'interaction avec les deux protéines, FAM172A et Ago2, induit l'interaction avec les deux fluorophores, provoquant une émission de lumière verte. Après la co-transfection des deux vecteurs qui contiennent les deux constructions, les gènes qui codent pour les protéines d'intérêt couplés avec les inserts qui codent pour les fluorophores, nous avons observé l'émission de la fluorescence verte. La fluorescence a été localisée au niveau du noyau des cellules qui ont reçu les deux plasmides, en les comparant avec les cellules adjacentes qui ont reçu un ou pas de plasmide. Les cellules fluorescentes ont une étrange apparence due, peut-être, à un stress causé par la transfection. Toutefois, plusieurs expériences ont été effectuées après par d'autres membres de laboratoire qui confirment ces résultats. Nous pouvons considérer les cellules adjacentes comme contrôle négatif interne. Des contrôles négatifs externes ont été aussi faits en parallèle. Des cellules COS7 ont été transfectées séparément avec des vecteurs : PCDNA3 vide, PCDNA3 avec l'insert Fam172a-Cerulean ou avec de PCDNA3 avec l'insert Venus-Ago2. Il n'y avait aucune émission de la fluorescence verte dans les trois cas de transfections.



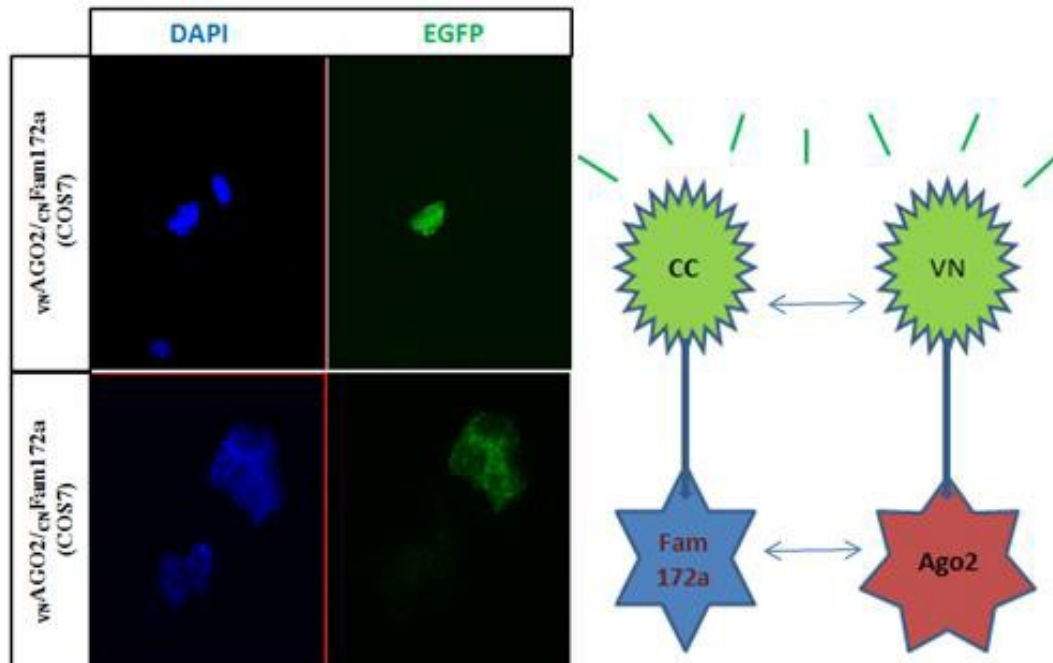


Figure 3.8 FAM172A interagit directement avec Ago2.

Analyse de la fluorescence par complémentation bimoléculaire (BiFC) montrant l'interaction protéine-protéine FAM172A et Ago2 (l'émission de la couleur verte) dans des cellules COS7 fixées. CC (Cerulean), VN (Venus) des moitiés des fluorophores. Les noyaux ont été contre-colorés avec le DAPI (bleu). EGFP (vert). Nombre d'expériences n=1. Les résultats ont été confirmés par d'autres membres du laboratoire en utilisant différentes combinaisons de position de fluorophores.

### 3.5.2. FAM172A possède un domaine de dimérisation fonctionnel

En utilisant le serveur de modélisation d'homologie SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>), nous avons trouvé un modèle de protéine FAM172A contenant un bras dépassant à l'extérieur d'une structure très similaire au sandwich Hda1  $\alpha / \beta$ . Hda1, étudié dans des travaux antérieurs sur *Saccharomyces*, qui est un membre du complexe d'histone désacétylase de classe II (HDAC). Il contient une architecture sandwich  $\alpha / \beta$  englobée dans son domaine Arb2 (Shen *et*

*al.*, 2016). Cette structure est essentielle pour la dimérisation du domaine Arb2, mais aussi pour sa liaison avec H2B et H3.

À la lumière de cette découverte, nous avons étudié la dimérisation de FAM172A afin de confirmer que le domaine ARB2 était fonctionnel. Pour ce faire, nous avons utilisé la technique de BiFC (Figure 3.9). Donc nous avons co-transfecté des cellules COS7 ou des cellules N2a avec deux constructions, le gène qui code pour la protéine d'intérêt couplé avec les inserts qui codent pour les fluorophores. Nous avons couplé FAM172A avec la partie C-terminale de la protéine bleue Cerulean et pour l'autre construction nous avons couplé FAM172A avec la partie N-terminale de la protéine Venus. Les résultats ont montré une émission de la fluorescence verte au niveau du noyau des cellules qui ont reçu les deux plasmides, en les comparant avec les cellules adjacentes qui ont reçu un ou pas de plasmide. Nous pouvons considérer les cellules adjacentes comme contrôle négatif interne. Un contrôle négatif externe a été aussi fait en parallèle. Des cellules COS7 ont été transfectées séparément avec des vecteurs : de PCDNA3 vide, PCDNA3 avec l'insert Fam172a-Cerulean ou avec de PCDNA3 avec l'insert Venus-Fam172a. Il n'y avait aucune émission de la lumière verte dans les trois cas de transfection.

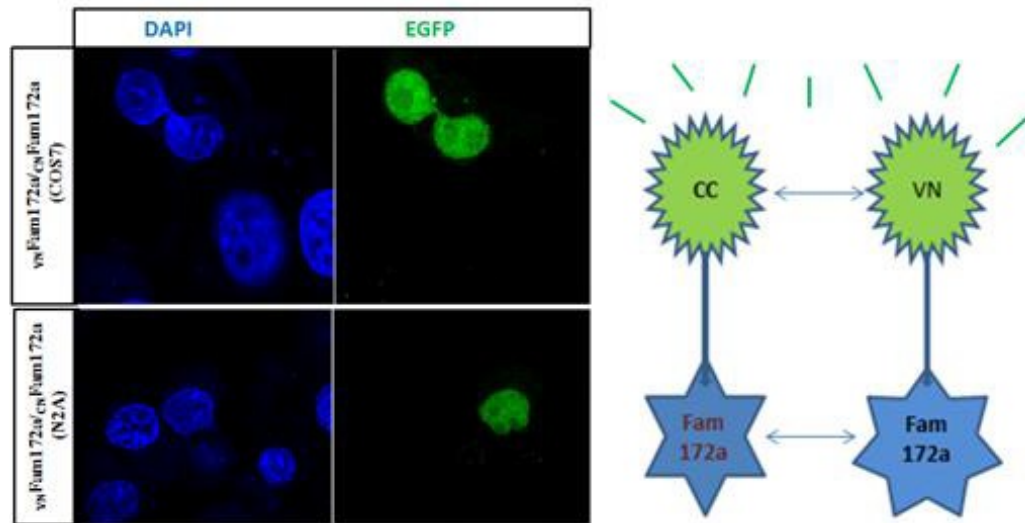


Figure 3.9 La dimérisation de la protéine FAM172A. Analyse de la fluorescence par complémentation bimoléculaire (BiFC) montrant l'homodimérisation de FAM172A (l'émission de la couleur verte) dans des cellules COS7 et N2a. CC (Cerulean), VN (Venus) des moitiés des fluorophores. Les noyaux ont été contre-colorés avec le DAPI (bleu). EGFP (vert). N = 3 expériences par lignée.

## CHAPITRE IV

### DISCUSSION

#### 4.1. Contribution des isoformes de FAM172A au développement des CCN

Étant donné que le gène *FAM172A* est très peu étudié, nous avons décidé de caractériser d'une manière approfondie les différentes isoformes exprimées à partir de ce gène. En effet, trois isoformes sont générées à partir du gène *Fam172a* par l'épissage alternatif : l'isoforme long (417 aa), moyenne (371 aa) et courte (307 aa) (Figure 1.5) (Belanger *et al.*, 2018).

Le but était de savoir si les trois isoformes de la protéine FAM172A participent à l'épissage alternatif des gènes cibles impliqués dans le développement des CCN. Les stades embryonnaires choisis étaient entre E9.5 et E12.5, vu que le pic de migration des CCN est entre E9.5 et E11.5 chez la souris (Belanger *et al.*, 2018). Le *Western blot* dirigé contre FAM172A a montré que, soit dans la tête ou dans le corps, l'isoforme 371 aa était la plus exprimée, tandis que les isoformes 417 aa et 307 aa étaient respectivement faiblement exprimées et indétectables (Figure 3.1 A et C). Ces données suggèrent que l'isoforme 371 aa de la protéine FAM172A est particulièrement importante pour contrôler le développement crânien et cérébral en participant à l'épissage alternatif à ce stade particulier. Concernant l'isoforme 417 aa,

son expression n'est pas négligeable. Nous suggérons qu'elle pourrait jouer un rôle compensatoire en cas de forte demande de la participation de la protéine dans des situations spécifiques ou bien elle pourrait avoir d'autres fonctions dans d'autres endroits de la cellule. Bien que nous ne puissions exclure la possibilité que l'isoforme de la protéine FAM172A 307 aa joue un rôle significatif dans d'autres stades de développement non testés.

Nous avons remarqué aussi un rapport tête / corps de l'expression de FAM172A 371 aa et 417 aa plus élevé entre E11.5-E12.5 (Figure 3.1 C) et finalement autour de E15.5 revenir au niveau observé dans les stades embryonnaires précédents (E9.5-E10.5) (Figure A1). Donc, les résultats suggèrent qu'à ces stades de développement embryonnaire (E11.5-E12.5), la migration et la différenciation des CCN crânielles sont les plus actives et les plus importantes. Mais après ces stades embryonnaires, un équilibre s'établit entre les voies de différenciation des CCN. Notamment, le pic de migration des CCN est entre E9.5 et E11.5 (Belanger *et al.*, 2018) ce qui appuie les résultats et donne la possibilité que ces deux isoformes participent à l'épissage alternatif des gènes cibles impliqués dans le développement de la CCN.

#### 4.2. La localisation subcellulaire de la protéine FAM172A en fonction des différentes isoformes

En cherchant à mieux comprendre et à mieux caractériser la protéine FAM172A, nous avons posé la question suivante, après avoir montré que deux isoformes de la protéine sont exprimées durant la période pic de développement des CCN : est-ce que ces isoformes sont exprimées dans le même endroit ou dans des endroits différents de la cellule ? Étonnamment, nos résultats révèlent une localisation différente après une surexpression séparée de chaque isoforme. Les deux isoformes, 371 aa ou 307 aa,

étaient enrichies dans le noyau. En revanche l'isoforme 417 aa était bien enrichie dans le cytoplasme (Figure 3.3). De plus, le logiciel en ligne CELLO 2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>), utilisé pour prévoir l'emplacement subcellulaire des protéines d'origine humaine, indiquait la localisation dans le noyau et/ou le cytoplasme de la protéine FAM172A humaine endogène (Qian *et al.*, 2016). Ce qui confirme nos observations. Par contre, l'identification de l'emplacement réalisé par le logiciel était effectuée de façon globale sans pouvoir spécifier les isoformes (Qian *et al.*, 2016). Des études antérieures de notre laboratoire ont démontré que FAM172A et Ago2 endogènes colocalisent dans les noyaux des cellules embryonnaires de souris. Elles interagissent ensemble et ont très probablement un rôle commun dans l'épissage alternatif cotranscriptionnel (Belanger *et al.*, 2018). Ces données suggèrent qu'en raison de son abondance et de sa localisation nucléaire, l'isoforme FAM172A 371 aa est la plus sujette à participer à l'épissage alternatif médié par la protéine Ago2.

Basé sur une analyse bioinformatique, l'isoforme FAM172A ayant 417 aa (48 kDa) contient un peptide signal représenté par les dix-huit premiers acides aminés en N-terminale (Feng *et al.*, 2013). Il est connu que les protéines sécrétées sont traduites avec des séquences de peptide signal en N-terminale courtes et amovibles, qui dirigent leur ciblage et leur translocation à travers le réticulum endoplasmique et la membrane cytoplasmique. Les séquences signaux ou les peptides signaux contiennent des informations qui spécifient le choix de la voie de ciblage, l'efficacité de la translocation, le moment du clivage et même les fonctions de post-clivage. En conséquence, les séquences signaux peuvent jouer un rôle important dans la modulation de la biogenèse des protéines (Hegde et Bernstein, 2006).

Ainsi, en combinant nos résultats et l'information bio-informatique concernant la détection de la protéine FAM172A au niveau du cytoplasme et au noyau, et l'hypothèse qui propose que l'isoforme 371 aa est exprimée au niveau du noyau, nous

confirmons nos résultats qui démontrent la localisation de l'isoforme 417 aa au niveau du cytoplasme (Figure 3.3). De plus, cela est appuyé par la présence du peptide signal en N-terminal de l'isoforme qui induit la translocation de la protéine à travers le réticulum endoplasmique. Cette isoforme pourrait jouer un rôle différent de l'isoforme Fam172a 371 aa, mais cela n'exclut pas la possibilité d'un rôle compensatoire en appuyant la fonction principale de la protéine FAM172A, via la participation à l'épissage alternatif.

L'isoforme 307 aa se localisait au niveau du noyau (Figure 3.3) après une surexpression cellulaire, mais en raison de son expression indétectable durant les stades de développement des CCN, nous avons jugé qu'elle n'est pas indispensable pour ce processus. Par conséquent, nous avons continué nos expériences en travaillant avec les deux isoformes 417 aa et 371 aa.

### 4.3. Le stress cellulaire

#### 4.3.1. L'impact du stress sur la localisation subcellulaire des différentes isoformes de la protéine FAM172A

Les CCN sont déjà connues pour être particulièrement sensibles à une grande diversité de stress cellulaires comme l'hyperthermie, l'alcool, les virus, un taux de glucose élevé, le stress oxydatif et le stress nucléolaire. La plupart des stress conduisent à une apoptose dirigée par p53 (Bérubé-Simard et Pilon, 2019). Dans cette expérience nous cherchions à savoir si le rapport du pourcentage de la localisation cellulaire des isoformes de la protéine FAM172A noyau/cytoplasme, change dans une situation de stress.

L'induction d'un stress via l'utilisation d'un milieu sans sérum pendant 24 h, induit un changement de distribution des isoformes surexprimées dans la cellule. Mais ce changement ne touche pas tous les isoformes de la protéine FAM172A.

Concernant l'isoforme 371 aa (Figure 3.4), les résultats de la transfection n'ont montré aucun changement de localisation de la protéine par rapport aux cellules non stressées dans les conditions de stress. Toutefois, l'isoforme 371 aa est restée localisée dans le noyau.

Cependant, un stress entraîne une expression plus élevée des protéines épissées. D'un autre côté, le traitement qui induit le stress augmente la fonction nucléaire ce qui provoque un déplacement de certaines protéines, comme Ago2, du cytoplasme vers le noyau. Cela est expliqué par une activité très importante dans le noyau stimulée par le stress (Nazer et al., 2018).

Par conséquent, l'isoforme 371 aa reste dans le noyau et nous pensons qu'elle est plus active à cause du stress dans l'endroit où elle est exprimée de façon naturelle. Ces données confirment l'hypothèse qui suggère que l'isoforme 371 aa est la première candidate susceptible à participer à l'épissage alternatif. En revanche, après avoir exposé des cellules transfectées avec l'isoforme 417 aa au stress, nous avons remarqué que la protéine se déplaçait du cytoplasme vers le noyau ce qui créait une distribution uniforme dans la cellule et parfois même la protéine était plus concentrée au niveau des noyaux (figure 3.5, 3.6).

Il a été démontré qu'un stress exercé sur les cellules peut provoquer des dommages oxydatifs (Nazer et al., 2018), ce qui peut entraîner une stimulation de l'activité nucléaire ou dans les pires des cas le déclenchement de l'apoptose (Bérubé-Simard et Pilon, 2019). D'un autre côté, nous avons expliqué précédemment que le stress induit



un déplacement de certaines protéines vers le noyau et une augmentation de l'activité de l'épissage. Ces événements peuvent attirer tous les éléments de machineries nécessaires vers le noyau pour corriger les dommages.

Ces données nous laissent croire que l'isoforme 417 aa passe du cytoplasme vers le réticulum endoplasmique (RE) après le clivage de son peptide signal. Mais en cas de stress, elle se dirige vers l'endroit où il doit agir, comme sur l'ADN nucléaire, pour participer à l'épissage alternatif (Belanger *et al.*, 2018; Hegde et Bernstein, 2006).

Dans certains états de stress, la cellule induit la formation d'un complexe qui conduit à la localisation des siARN et des miARN d'abord aux granules de stress occupant la région périnucléaire puis aux noyaux cellulaires. De plus, cette navette vers le noyau est améliorée en augmentant le degré du stress (Nazer et al., 2018). En revanche, il est connu que Ago2 fait partie du complexe RISC qui est le cœur de cette navette. En particulier, il a été montré que Ago2 est une navette vers le noyau dans des conditions de stress (Nazer et al., 2018). Sachant que FAM172A interagit avec Ago2 (Belanger *et al.*, 2018).

Cependant, nous suggérons que cette navette soit également utilisée afin de transporter la protéine FAM172A du cytoplasme vers le noyau, et plus précisément, l'isoforme 417 aa.

Notre hypothèse est que cette protéine, l'isoforme 417 aa, en cas de stress, quitte le réticulum endoplasmique pour se retrouver dans les granules de stress, avant d'être transportée au noyau à l'aide du complexe RISC. Une fois que la protéine est localisée dans le noyau, elle exerce un rôle compensatoire de l'isoforme 371aa, soit pour participer à l'épissage alternatif, ou pour exercer une autre fonction qui n'est pas encore connue.

#### 4.3.2. L'effet du stress sur la localisation subcellulaire de la protéine FAM172A endogène

Après avoir déterminé la localisation des différentes isoformes surexprimées de la protéine FAM172A sans stress, dans les cellules N2a et COS7, et avec stress, dans les cellules COS7, nous voulions étudier directement le comportement de la protéine dans la cellule, en homéostasie ou soumise à un stress. Pour éliminer toute sorte de stress supplémentaire qui pourrait être causé par la transfection des cellules, nous avons vérifié directement les changements de la localisation de FAM172A endogène dans des conditions de stress mentionnées avant (Figure 3.7). L'immunofluorescence de FAM172A endogène, dans les cellules COS7 qui n'ont pas subi de stress, montre que la protéine est exprimée majoritairement au niveau du noyau et elle est faiblement exprimée au niveau du cytoplasme. Toutefois, cela ne diffère pas à ce qu'était observé dans les cellules COS7 qui ont subi de stress (Figure 3.7).

En se basant sur ce qui a été démontré, on peut expliquer les résultats obtenus de la façon suivante.

Le niveau protéique élevé dans le noyau correspond à l'isoforme 371 aa, qui joue le rôle principal dans l'épissage alternatif cotranscriptionnel. Cela n'exclut pas sa présence dans le cytoplasme à des faibles quantités. Par contre, la protéine exprimée au niveau du cytoplasme correspond à l'isoforme 417 aa qui vient au secours de l'isoforme 371 aa en cas de stress, comme il a été suggéré. Évidemment, son expression est faible puisqu'il n'agit pas de façon permanente. Cependant, l'isoforme 417 aa peut jouer d'autre rôle que l'épissage et qui reste à découvrir.

En cas de stress (Figure 3.7), nous n'avons pas remarqué beaucoup de changements au niveau du cytoplasme, ni au niveau du noyau. Ceci pourrait être expliqué par la faible quantité de l'isoforme 417aa qui rend tout changement de localisation, en cas

de stress, non visible et non quantifiable. Mais aussi, la possibilité de la présence de l'isoforme 371 aa dans le cytoplasme.

#### 4.4. Valider certains partenaires d'interaction de FAM172A à l'échelle subcellulaire via l'approche BiFC

Les protéines se localisent dans différents compartiments de la cellule afin d'exercer des fonctions bien définies. Malgré un environnement « surpeuplé », l'emplacement des protéines est très dynamique selon plusieurs facteurs : comme l'état de la cellule et les contacts moléculaires établis par ces protéines, en répondant à certains signaux intra ou extracellulaires. Par conséquent, plusieurs complexes se forment et plusieurs se décomposent via des interactions protéiques réversibles. En revanche, ces interactions ne sont pas toujours fortes et visibles ce qui rend leur détermination un vrai défi (Varnaité *et al.*, 2016).

##### 4.4.1. L'isoforme de protéine FAM172A 371 aa interagit avec Ago2

Il est connu que FAM172A soit dépourvue de tout domaine de liaison à l'ADN malgré cela elle est capable de cibler des régions transcrites spécifiques. Ces informations indiquent que sa fonction pourrait être médiée par certaines protéines associées à la chromatine, qui composent la majorité de l'interactome FAM172A, comme Ago2 (Bérubé-Simard et Pilon, 2019).

Dans un travail effectué par l'équipe de notre laboratoire, ils suggèrent que, dans des conditions optimales, FAM172A endogène est principalement exprimée dans les noyaux des cellules de la souris où elle se co-localise avec la protéine Ago2. À cet

endroit, les deux protéines interagissent dans un grand complexe afin d'effectuer leur rôle dans l'épissage alternatif cotranscriptionnel (Belanger *et al.*, 2018). Comme mentionné précédemment, Ago2 est le composant noyau du complexe RISC qui régule l'inactivation des gènes dans le cytoplasme par inhibition de la traduction. Cependant, Ago2 n'est pas localisée dans le noyau en général.

Cela suggère que l'isoforme FAM172A 371 aa, à cause de son abondance et de sa localisation nucléaire, est la plus susceptible de participer à l'épissage alternatif médié par Ago2, dans les conditions cellulaires optimales. C'est pourquoi nous avons choisi de nous concentrer sur cette isoforme pour les prochaines expériences.

L'interaction de FAM172A et Ago2 a été démontrée en utilisant la méthode de co-immunoprécipitation (co-IP) (Belanger *et al.*, 2018). Mais comme nous avons mentionné avant, la co-IP est peu sensible et elle ne représente pas une preuve convaincante d'une interaction directe entre les deux protéines. La biotinylation (BioID) est également une approche qui a été utilisée dans le laboratoire. Bien qu'elle donne la possibilité de détecter de faibles interactions, elle pourrait donner de faux positifs. À cause de cela, nous avons décidé d'appliquer une nouvelle méthode pour la première fois au laboratoire : la complémentation de fluorescence bimoléculaire (BiFC), afin de caractériser plus en profondeur l'interaction entre FAM172A et Ago2.

La BiFC est assurée par la reconstitution des protéines fluorescentes, à partir de deux sous-fragments au moment de la proximité spatiale entre les deux protéines en question (Varnaité *et al.*, 2016). En particulier, il a été montré que le fragment C-terminal de la protéine céruléenne fluorescente bleue (CC) était complémentaire avec le fragment N-terminal de Vénus (VN), générant une fluorescence verte (Hu *et al.*, 2002).

Concernant notre expérience, nous avons couplé chacune des deux protéines FAM172A et Ago2 avec une moitié de fluorophore, FAM172A-CC et Ago2-VN. Après la co-transfection dans deux types cellulaires, N2a et COS7, nous avons observé l'émission de la fluorescence verte (Figure 3.8). Par contre, le nombre des cellules fluorescentes n'était pas très élevé. Nous avons suggéré que probablement les cellules ont reçu les deux vecteurs, mais l'efficacité du couplage était faible à cause de la position du Tag en C-terminale pour FAM172A ou du Tag en N-terminale de Ago2. Donc, d'autres combinaisons de position de Tag ont été testées par des membres de notre laboratoire qui ont donné une efficacité de transfection et un pourcentage plus élevé de cellules fluorescentes.

La présence des deux protéines, FAM172A et Ago2, dans le même endroit de la cellule, a induit un rapprochement spatial des deux fluorophores et a facilité leur fusion. Ainsi, cela a généré l'émission d'une lumière verte que nous avons détectée par microscopie à fluorescence. Cela confirme les données antérieures de co-immunoprécipitation (co-IP) concernant l'interaction de la protéine FAM172A et Ago2 (Belanger *et al.*, 2018).

D'une autre côté, les signaux lumineux se localisaient au niveau nucléaire, ce qui suggère que soit les IPP entre FAM172A et Ago2 se produisent une fois que les deux protéines sont localisées dans le noyau de la cellule, ou bien cette interaction a commencé autre part puis le complexe s'est déplacé vers le noyau, pour interagir avec d'autres protéines afin de participer à l'épissage alternatif.

L'interaction observée au niveau des noyaux des cellules COS7 nous a permis de suggérer la présence d'une interaction entre Ago2 et l'isoforme 317 aa, mais elle n'exclut pas l'interaction avec l'isoforme 417 aa car, comme nous avons démontré précédemment, le clivage du peptide signal avant sa relocalisation au noyau en cas de

stress engendre une forme similaire à l'isoforme 317 aa, qui est apte à faire les mêmes liens que ce dernier. Mais, cette hypothèse reste à confirmer avec autres expériences de BiFC en utilisant l'isoforme FAM172A 417aa.

#### 4.4.2. FAM172A possède un domaine de dimérisation fonctionnel

Afin de mieux comprendre le mécanisme moléculaire de FAM172A et son rôle dans les événements de l'épissage alternatif cotranscriptionnel, ainsi que son implication dans le syndrome CHARGE et comment elle interagit avec son environnement et également avec Ago2, nous avons décidé d'étudier sa structure en détail.

En utilisant le serveur de modélisation d'homologie SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>), une structure très similaire au sandwich Hda1  $\alpha/\beta$  de FAM172A a été trouvée. Hda1 est un membre du complexe d'histone Desacétylase de classe II. Il contient une architecture sandwich  $\alpha / \beta$  englobée dans son domaine Arb2 (Shen *et al.*, 2016). Cette structure est essentielle pour la dimérisation du domaine Arb2, mais aussi pour sa liaison avec les histones H2B et H3.

Étant donné que la perturbation de l'interface du dimère Hda1 déstabilise sa liaison aux histones (Shen *et al.*, 2016), nous supposons que le domaine de dimérisation de Arb2 est important pour la dimérisation de FAM172A autant que pour sa liaison avec Ago2.

Cette découverte était très importante pour notre recherche sur CHARGE. Une telle fonction peut jouer un rôle important dans l'activité de la protéine FAM172A et son interaction avec son environnement. Ainsi, nous avons décidé d'étudier la dimérisation de FAM172A afin de confirmer que le sous-domaine de dimérisation de

Arb2 est fonctionnel. Pour ce faire, nous avons utilisé la technique de BiFC. Les résultats de la co-transfection ont montré la présence d'une émission de fluorescence verte au niveau des noyaux cellulaires (Figure 3.9). Cela démontre que les deux monomères de FAM172A étaient suffisamment proches qu'ils ont induit le couplage des deux moitiés de fluorophores. Des expériences de chromatographie sont en cours afin de confirmer que le signal produit dû à la formation d'un dimère de la protéine FAM172A et non à trois ou plus. De plus, des constructions de la protéine qui contiennent des mutations ponctuelles dans le domaine de dimérisation sont dans l'essai.

Ces données confirment notre hypothèse de dimérisation de la protéine FAM172A. De plus, la figure 3.9 a montré une interaction FAM172A-FAM172A qui s'est produite au niveau du noyau. Et nous avons démontré avant que FAM172A forme un hétérodimère avec Ago2. Ces données appuient l'existence d'un échange dynamique de partenaire d'interaction selon les besoins de la cellule. En particulier, FAM172A utilise le domaine Arb2 pour choisir son partenaire : induisant soit l'homodimérisation ou l'interaction avec Ago2 afin de répondre à certains signaux comme le stress. Ces détails suggèrent que d'autres protéines pourraient stabiliser la liaison entre FAM172A et son interacteur direct.

En conclusion, ces données ont établi le domaine Arb2 de FAM172A comme élément central pour l'interaction protéine-protéine. En particulier, son homodimérisation ainsi que son interaction avec Ago2, suggèrent un interactome complexe et dynamique de la protéine FAM172A médiée par Arb2.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le syndrome CHARGE est une neurocristopathie avec un phénotype très complexe qui affecte environ 1/10 000 nouveau-né dans le monde. Il touche principalement les cellules dérivées des CCN crâniennes et cardiaques. Il est important de noter que la cause principale de ce syndrome semble impliquer des problèmes de régulation de l'épissage alternatif cotranscriptionnel. En effet, de nouveaux gènes candidats au syndrome CHARGE montrent également une dérégulation de l'épissage alternatif, et cela dépendant de la structure de la chromatine.

Nous avons récemment généré un modèle murin *Toupee* pour le syndrome CHARGE, qui est négatif pour la mutation *CHD7*. Le modèle a été généré par une insertion aléatoire du transgène tyrosinase causant une mutation d'un gène mal caractérisé : *Fam172a*. Il est important de noter que cette mutation affecte négativement presque tous les aspects de l'ontologie des CCN (migration, prolifération, survie et différenciation). De plus, l'implication de la protéine FAM172A a été démontrée dans l'épissage alternatif.

La protéine FAM172A est importante pour le développement des CCN. En plus, nous avons récemment découvert l'existence de 3 isoformes produites par épissage alternatif qui diffèrent par la présence ou l'absence de certains domaines. Cette différence a été démontrée dans une expérience révélant une expression importante de l'isoforme 371 aa durant la période clef du développement des CCN et une faible



expression de l'isoforme 417 aa. Ces données nous ont permis de suggérer que l'isoforme 371 aa est la protéine la plus importante parmi les trois dans cette étape de développement.

Il est nécessaire de noter que les autres isoformes peuvent avoir des rôles importants pour le développement de la souris, pour cela il est suggéré de faire d'autres expériences en ciblant d'autres stades embryonnaires afin de regarder leur niveau d'expression.

La présence de certains domaines n'influence pas juste l'expression des trois isoformes, mais aussi la localisation de chacune de ces isoformes dans la cellule elle-même. C'est ce que les expériences immunofluorescences ont révélé. Le domaine peptide signal permet de conduire l'isoforme 417 aa dans le réticulum endoplasmique. Cependant, l'isoforme 371 aa qui ne contient pas ce domaine, se déplace vers le noyau après la traduction, ce qui suggère qui est le candidat principal pour l'épissage alternatif. Mais cette localisation semblait changer pour l'isoforme 417 aa en cas du stress. Celle-ci est transportée vers le noyau à l'aide d'un complexe qui pourrait inclure Ago2 afin d'exercer sa fonction qui pourrait ressembler à celle de l'isoforme 371 aa.

L'étape suivante proposée, pour bien confirmer l'effet du stress cellulaire sur la localisation des trois isoformes de FAM172A, est d'éliminer la forme endogène. C'est pourquoi, une lignée cellulaire N2a Knock-out *Fam172a* a été générée par CRISPR. Après la surexpression de chaque isoforme seule dans ces cellules, nous pouvons déterminer le déplacement de localisation des isoformes sans perturbation de la part de la protéine endogène. Notamment la vérification du déplacement d'Ago2 dans la cellule est à faire aussi dans cette situation.

La forme endogène de FAM172A, se localise majoritairement dans le noyau et faiblement dans le cytoplasme avec un changement indétectable en cas de stress. Afin de confirmer que la partie cytoplasmique représente l'isoforme 417aa contenant le domaine peptide signal, nous avons généré une lignée cellulaire N2a Knock-out de l'isoforme 417 aa de FAM172A par CRISPR. Ainsi, si une révélation de la localisation des isoformes non éliminés montre une localisation nucléaire, cela confirmera que la forme cytoplasmique représente l'isoforme 417aa. En plus, tout déplacement en cas de stress sera facilement détecté.

En analysant la structure de FAM172A, qui présente un domaine Arb2 (Argonaute binding protein-2), nous avons démontré l'existence d'une interaction physique entre FAM172A et Ago2 suggérant que ces deux protéines font partie du même processus moléculaire, comme l'épissage alternatif.

Les résultats obtenus ont été confirmés en essayant plusieurs combinaisons pour optimiser l'interaction entre les deux moitiés de fluorophores. Le positionnement des structures tridimensionnelles de FAM172A et Ago2 est important afin d'augmenter les signaux de fluorescence. En revanche, il est souhaitable de vérifier ainsi l'interaction directe d'Ago2 avec l'isoforme 417 aa par la même méthode de BiFC et de vérifier également le déplacement d'Ago2 dans un état de stress cellulaire.

Finalement, nous avons constaté que la protéine FAM172A n'utilise le domaine Arb2 uniquement pour interagir de façon directe avec Ago2, mais aussi pour former un homodimère FAM172A-FAM172A. En revanche, ces interactions peuvent être changées selon l'état de la cellule, stressée ou non.

ANNEXE

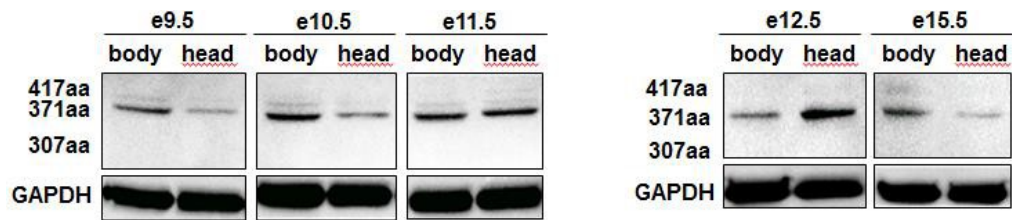


Figure A1 Analyse de l'abondance des isoformes de FAM172A durant le développement embryonnaire.

## BIBLIOGRAPHIE

- Allemand, E., Myers, M. P., Garcia-Bernardo, J., Harel-Bellan, A., Krainer, A. R., & Muchardt, C. (2016). A broad Set of chromatin factors influences splicing. *PLoS Genetics*, *12*(9) : p. e1006318.
- Alló, M., Agirre, E., Bessonov, S., Bertucci, P., Gómez Acuña, L., Buggiano, V., Bellora, N., Singh, B., Petrillo, E et al. (2014). Argonaute-1 binds transcriptional enhancers and controls constitutive and alternative splicing in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111* (44): p. 15622–15629.
- Ameyar-Zazoua, M., Rachez, C., Souidi, M., Robin, P., Fritsch, L., Young, R., Morozova, N., Fenouil, R., Descostes, N., Jean-Christophe Andrau, JC et al. (2012). Argonaute proteins couple chromatin silencing to alternative splicing. *Nature Structural Molecular Biology*. *19*(10): p. 998.
- Antoniou, M. C., Bouthors, T., Xu, C., Phan-Hug, F., Elowe-Gruau, E., Stoppa-Vaucher, S., Sloot, A. V., Acierno, J., Cassatella, D., Richard, C et al (2019). A novel CHD7 mutation in an adolescent presenting with growth and pubertal delay. *Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism*, *24*(1):p. 49–54.
- Bagchi, S., Fredriksson, R., & Wallén-Mackenzie, Å. (2015). In situ proximity ligation assay (PLA). *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1318*: p. 149–159.
- Bajpai, R., Chen, D. A., Rada-Iglesias, A., Zhang, J., Xiong, Y., Helms, J., Chang, C. P., Zhao, Y., Swigut, T., & Wysocka, J. (2010). CHD7 cooperates with PBAF to control multipotent neural crest formation. *Nature*, *463*(7283) : p. 958–962.
- Balasubramanian, R., Choi, J. H., Francescatto, L., Willer, J., Horton, E. R., Asimacopoulos, E. P., Stankovic, K. M., Plummer, L., Buck, C. L., Quinton, R et al. (2014). Functionally compromised CHD7 alleles in patients with isolated

GnRH deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(50): p. 17953–17958.

Bélangier, C., Bérubé-Simard, F. A., Leduc, E., Bernas, G., Campeau, P. M., Lalani, S. R., Martin, D. M., Bielas, S., Moccia, A., Srivastava, A et al (2018). Dysregulation of cotranscriptional alternative splicing underlies CHARGE syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(4): p. E620–E629.

Bergman, J. E., Janssen, N., Hoefsloot, L. H., Jongmans, M. C., Hofstra, R. M., & van Ravenswaaij-Arts, C. M. (2011). CHD7 mutations and CHARGE syndrome: the clinical implications of an expanding phenotype. *Journal of Medical Genetics*, 48(5): p. 334–342.

Bérubé-Simard, F.-A., Azouz, F et al., Fam172a contributes to Ago2 nuclear localization in order to regulate alternative splicing and neural crest cell development. *À soumettre à EMBO J.*

Bérubé-Simard, F.-A., & Pilon, N. (2019). Molecular dissection of CHARGE syndrome highlights the vulnerability of neural crest cells to problems with alternative splicing and other transcription-related processes. *Transcription*, 10(1): p. 21-28.

Bhaumik P, Gopalakrishnan C, Kamaraj B, Purohit R. (2014). Single nucleotide polymorphisms in microRNA binding sites: implications in colorectal cancer. *ScientificWorldJournal*: p. 547154.

Bischof, J., Duffraisse, M., Furger, E., Ajuria, L., Giraud, G., Vanderperre, S., Paul, R., Björklund, M., Ahr, D., Ahmed, A. W et al. (2018). Generation of a versatile BiFC ORFeome library for analyzing protein-protein interactions in live *Drosophila*. *ELife*, 7, p. e38853.

Blake, K., van Ravenswaaij-Arts, C., Hoefsloot, L., Verloes, A. (2011). Clinical utility gene card for: CHARGE syndrome. *European Journal of Human Genetics*, 19(9): p. 1017.

Bosman, E. A., Penn, A. C., Ambrose, J. C., Kettleborough, R., Stemple, D. L., & Steel, K. P. (2005). Multiple mutations in mouse Chd7 provide models for CHARGE syndrome. *Human Molecular Genetics*, 14(22): p. 3463–3476.

Castanotto, D., Zhang, X., Alluin, J., Zhang, X., Rüger, J., Armstrong, B., Rossi, J., Riggs, A., & Stein, CA (2018). A stress-induced response complex (SIRC)

- transports miRNAs, siRNAs and oligonucleotides to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115 (25) : p. E5756 – E5765.
- Chai, M., Sanosaka, T., Okuno, H., Zhou, Z., Koya, I., Banno, S., Andoh-Noda, T., Tabata, Y., Shimamura, R., Hayashi, T et al (2018). Chromatin remodeler CHD7 regulates the stem cell identity of human neural progenitors. *Genes & Development*, 32(2): p. 165–180.
- Chen, B., & Altman, R. B. (2017). Opportunities for developing therapies for rare genetic diseases: focus on gain-of-function and allostery. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 12(1): p. 61.
- Chen, M., Li, W., Zhang, Z., Liu, S., Zhang, X., Zhang, X. E., & Cui, Z. (2015). Novel near-infrared BiFC systems from a bacterial phytochrome for imaging protein interactions and drug evaluation under physiological conditions. *Biomaterials*, 48: p. 97–107.
- Chen, Y., Liu, P., Shen, D., Liu, H., Xu, L., Wang, J., Shen, D., Sun, H., & Wu, H. (2020). FAM172A inhibits EMT in pancreatic cancer via ERK-MAPK signaling. *Biology open*, 9(2), bio048462.
- Chu, X., Guo, X., Jiang, Y., Yu, H., Liu, L., Shan, W., & Yang, Z. Q. (2017). Genotranscriptomic meta-analysis of the CHD family chromatin remodelers in human cancers - initial evidence of an oncogenic role for CHD7. *Molecular Oncology*, 11(10) : p. 1348–1360.
- Esposito, A., Tufano, M., Di Donato, I., Rezzuto, M., Improda, N., Melis, D., & Salerno, M. (2014). Effect of long-term GH treatment in a patient with CHARGE association. *Italian Journal of Pediatrics*, 40, 51.
- Engelen, E., Akinci, U., Bryne, J. C., Hou, J., Gontan, C., Moen, M., Szumska, D., Kockx, C., van Ijcken, W., Dekkers, D. H., Demmers, J et al. (2011). Sox2 cooperates with Chd7 to regulate genes that are mutated in human syndromes. *Nature Genetics*, 43(6) : p. 607–611.
- Etchevers, H. C., Amiel, J., & Lyonnet, S. (2006). Molecular bases of human neurocristopathies. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 589 : p. 213–234.
- Fan, J. Y., Cui, Z. Q., Wei, H. P., Zhang, Z. P., Zhou, Y. F., Wang, Y. P., & Zhang, X. E. (2008). Split mCherry as a new red bimolecular fluorescence

complementation system for visualizing protein-protein interactions in living cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 367(1): p. 47–53.

Feng, Z., Li, H., Liu, S., Cheng, J., Xiang, G., & Zhang, J. (2013). FAM172A induces S phase arrest of HepG2 cells via Notch 3. *Oncology Reports*, 29(3) : p. 1154–1160.

Fujita, K., R. Ogawa, and K. Ito. (2016). CHD7, Oct3/4, Sox2, and Nanog control FoxD3 expression during mouse neural crest-derived stem cell formation. *The FEBS Journal*. 283(20): p. 3791-3806.

Gage, P.J., E.A. Hurd, and D.M. Martin. (2015). Mouse models for the dissection of CHD7 functions in eye development and the molecular basis for ocular defects in CHARGE syndrome. *Investigative Ophthalmology Visual Science*. 56(13): p. 7923-7930.

Gilbert, S.F. (2000). Developmental biology. Sunderland, Massachusetts. *Sinauer Associates, Inc.*

Hale, C. L., Niederriter, A. N., Green, G. E., & Martin, D. M. (2016). Atypical phenotypes associated with pathogenic CHD7 variants and a proposal for broadening CHARGE syndrome clinical diagnostic criteria. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 170(2): p. 344-354.

He, D., Marie, C., Zhao, C., Kim, B., Wang, J., Deng, Y., Clavairoly, A., Frah, M., Wang, H., He, X et al. (2016). Chd7 cooperates with Sox10 and regulates the onset of CNS myelination and remyelination. *Nature Neuroscience*, 19(5): p. 678–689.

Hegde, R. S., & Bernstein, H. D. (2006). The surprising complexity of signal sequences. *Trends in Biochemical Sciences*, 31(10) :p. 563–571.

Hittner, H. M., Hirsch, N. J., Kreh, G. M., Rudolph, A. J. (1979). Colobomatous microphthalmia, heart disease, hearing loss, and mental retardation-a syndrome. *Journal of Pediatric Ophthalmology Strabismus*, 16(2): p. 122-128.

Hu, C. D., Chinenov, Y., et Kerppola, T. K. (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Molecular Cell*, 9(4): p.789–7

- Hurd, E. A., Capers, P. L., Blauwkamp, M. N., Adams, M. E., Raphael, Y., Poucher, H. K., & Martin, D. M. (2007). Loss of Chd7 function in gene-trapped reporter mice is embryonic lethal and associated with severe defects in multiple developing tissues. *Mammalian genome: official journal of the International Mammalian Genome Society*, 18(2):p. 94–104.
- Iwasaki, S. and Y. Tomari. (2009). Argonaute-mediated translational repression (and activation). *Fly*. 3(3): p. 205-208.
- Jongmans, M. C., Admiraal, R. J., van der Donk, K. P., Vissers, L. E., Baas, A. F., Kapusta, L., van Hagen, J. M., Donnai, D., de Ravel, T. J., Veltman, J. A et al. (2006). CHARGE syndrome: the phenotypic spectrum of mutations in the CHD7 gene. *Journal of Medical Genetics*, 43(4) : p. 306–314.
- Lake, J. I., & Heuckeroth, R. O. (2013). Enteric nervous system development: migration, differentiation, and disease. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 305(1): p. G1–G24.
- Li, L., Dong, X., Leong, M. C., Zhou, W., Yang, Z., Chen, F., Bao, Y., Jia, W., & Hu, R. (2010). Identification of the novel protein FAM172A, and its up-regulation by high glucose in human aortic smooth muscle cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 26(4): p. 483–490.
- Machado, R., Schneider, H., DeOcesano-Pereira, C., Lichtenstein, F., Andrade, F., Fujita, A., Trombetta-Lima, M., Weller, M., Bowman-Colin, C., & Sogayar, M. C. (2019). CHD7 promotes glioblastoma cell motility and invasiveness through transcriptional modulation of an invasion signature. *Scientific Reports*, 9(1): p. 3952.
- Manning, B.J. and T. Yusufzai. (2017). The ATP-dependent chromatin remodeling enzymes CHD6, CHD7, and CHD8 exhibit distinct nucleosome binding and remodeling activities. *Journal of Biological Chemistry*. 292(28): p. 11927-11936.
- Marie, L. B. L., Muriel, D. L. D. M., Steve, T., & Ariane, B. (2013). Rare diseases and reference centers. *Rev Orthop Dento Faciale*, 47(4): p. 345 – 353.
- Martin, D.M (2015), Epigenetic developmental disorders: CHARGE syndrome, a case tudy. *Current Genetic Medicine Reports*, 3(1): p. 1-7.
- Nakka, K., Ghigna, C., Gabellini, D., & Dilworth, F. J. (2018). Diversification of the muscle proteome through alternative splicing. *Skeletal Muscle*, 8(1) : p.8.



- Natung, T., Goyal, A., Handique, A., & Kapoor, M. (2014). Symmetrical chorioretinal colobomata with craniovertebral junction anomalies in CHARGE syndrome - A case report with review of literature. *Journal of Clinical Imaging Science*, 4, 5.
- Nazer, E., Dale, R. K., Chinen, M., Radmanesh, B., & Lei, E. P. (2018). Argonaute2 and LaminB modulate gene expression by controlling chromatin topology. *PLoS Genetics*, 14(3) :p. e1007276.
- Paternoster, S., & Falasca, M. (2020). The intricate relationship between diabetes, obesity and pancreatic cancer. *Biochimica et Biophysica Acta. Reviews on Cancer*, 1873(1) : p. 188326.
- Peter, H., Alan, M., Meredith, W., George, W., John, C., Craig, F. M., Sam, M. (2014). CHARGE syndrome: a review. *Journal of Paediatrics Child Health*, 50(7): p. 504-511.
- Pilon, N. (2016). Pigmentation-based insertional mutagenesis is a simple and potent screening approach for identifying neurocristopathy-associated genes in mice. *Rare Diseases*. 4(1) : p. 4483-96.
- Qian, K., Zhang, J., Lu, J., Liu, W., Yao, X., Chen, Q., Lu, S., Xiang, G., & Liu, H. (2016). FAM172A modulates apoptosis and proliferation of colon cancer cells via STAT1 binding to its promoter. *Oncology Reports*, 35(3) : p. 1273–1280.
- Saltzman, A. L., Pan, Q., & Blencowe, B. J. (2011). Regulation of alternative splicing by the core spliceosomal machinery. *Genes & Development*, 25(4) : p.373–384.
- Schnetz, M. P., Bartels, C. F., Shastri, K., Balasubramanian, D., Zentner, G. E., Balaji, R., Zhang, X., Song, L., Wang, Z., Laframboise, T., Crawford, G. E et al. (2009). Genomic distribution of CHD7 on chromatin tracks H3K4 methylation patterns. *Genome Research*, 19(4) : p. 590–601.
- Schulz, Y., Wehner, P., Opitz, L., Salinas-Riester, G., Bongers, E. M., van Ravenswaaij-Arts, C. M., Wincent, J., Schoumans, J., Kohlhase, J., Borchers, A et al. (2014). CHD7, the gene mutated in CHARGE syndrome, regulates genes involved in neural crest cell guidance. *Human Genetics*, 133(8): p. 997–1009.
- Shen H, Zhu Y, Wang C, Yan H, Teng M, Li X (2016) Structural and histone binding ability characterization of the ARB2 domain of a histone deacetylase Hda1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci Rep*. 6: 33905.

- Shyamala, K., Yanduri, S., HC, Girish, Murgod, S. (2015). Neural crest: The fourth germ layer. *Journal of Oral Maxillofacial Pathology*. 19(2): p. 221.
- Sun, W., Zheng, W., & Simeonov, A. (2017). Drug discovery and development for rare genetic disorders. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 173(9): p. 2307–2322.
- Sung, M. K., Lim, G., Yi, D. G., Chang, Y. J., Yang, E. B., Lee, K., & Huh, W. K. (2013). Genome-wide bimolecular fluorescence complementation analysis of SUMO interactome in yeast. *Genome Research*, 23(4): p. 36–746.
- Trainor, P.A., K.R. Melton, and M. Manzanares. (2003). Origins and plasticity of neural crest cells and their roles in jaw and craniofacial evolution. *International Journal of Developmental Biology*. 47(7-8): p. 541-553.
- Varnaitè, R., & MacNeill, S. A. (2016). Meet the neighbors: Mapping local protein interactomes by proximity-dependent labeling with BioID. *Proteomics*, 16(19): p. 2503–2518.
- Vissers, L. E., van Ravenswaaij, C. M., Admiraal, R., Hurst, J. A., de Vries, B. B., Janssen, I. M., van der Vliet, W. A., Huys, E. H., de Jong, P. J., Hamel, B. C., Schoenmakers, E. F et al. (2004). Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. *Nature Genetics*, 36(9) : p. 955–957.
- Xiao, R., Tang, P., Yang, B., Huang, J., Zhou, Y., Shao, C., Li, H., Sun, H., Zhang, Y., & Fu, X. D. (2012). Nuclear matrix factor hnRNP U/SAF-A exerts a global control of alternative splicing by regulating U2 snRNP maturation. *Molecular Cell*, 45(5): p.656–668.
- Xu, C., Zhang, C., Wang, H., Yang, H., Li, G., Fei, Z., & Li, W. (2017). FAM172A expression in circulating tumor cells for prediction of high-risk subgroups of colorectal cancer. *OncoTargets and Therapy*, 10:p. 1933–1939.
- Williams, A.L. and B.L. Bohnsack. (2015). Neural crest derivatives in ocular development: discerning the eye of the storm. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*. 105(2): p. 87-95.
- Zentner, G. E., Layman, W. S., Martin, D. M., & Scacheri, P. C. (2010). Molecular and phenotypic aspects of CHD7 mutation in CHARGE syndrome. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, 152A(3):p. 674–686.

Zhao, H., Wang, Y., Liu, Y., Hao, X., Wei, H., & Xie, W. (2019). The effect of protein FAM172A on proliferation in HepG2 cells and investigation of the possible molecular mechanism. *Analytical Cellular Pathology (Amsterdam)*, 2019, 5901083.