

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

SHQ1, UNE PROTÉINE CLÉ DE LA BIOGÈNESE RIBOSOMIQUE : ÉTUDE FONCTIONNELLE CHEZ  
*CAENORHABDITIS ELEGANS* ET *DANIO RERIO*

MEMOIRE

PRÉSENTÉ(E)

COMME EXIGENCE PARTIELLE

MAITRISE EN BIOCHIMIE

PAR

MATHILDE ROCHAS

DECEMBRE 2025

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

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude à mon directeur de recherche, François Dragon, pour sa confiance, son encadrement bienveillant et ses conseils avisés tout au long de cette maîtrise. Son exigence scientifique et sa rigueur m'ont permis de progresser à la fois en autonomie et en réflexion critique.

Je remercie également Frédérique, collègue de maîtrise au sein du même laboratoire, pour sa camaraderie, ses échanges stimulants et son soutien constant pendant ces deux années de recherche.

Je souhaite ensuite remercier chaleureusement l'équipe du laboratoire de Claire Bénard, qui m'a accueillie pour mener les expériences sur *Caenorhabditis elegans*. Un merci tout particulier à Ivan, pour son aide précieuse dans l'écriture de ce mémoire, sa disponibilité et ses conseils toujours pertinents. Je suis également reconnaissante envers tous les membres de ce laboratoire, pour leur soutien quotidien, leur bonne humeur et leur solidarité, qui ont grandement contribué à faire de ces deux années une expérience enrichissante.

Mes remerciements vont également au laboratoire d'Éric Samarut, où j'ai eu l'opportunité de me former à la manipulation du poisson-zèbre. Je remercie sincèrement Alexandra, qui m'a accompagnée avec patience et pédagogie dans l'apprentissage de ce modèle, et qui m'a transmis avec enthousiasme les bases de cette approche expérimentale.

Je tiens aussi à remercier mes parents, pour leur soutien indéfectible tout au long de mes études. Une pensée toute particulière pour Alice, Loïc et Sophie, mon frère et mes sœurs, qui ont contribué à faire de moi la personne que je suis aujourd'hui.

Enfin, je remercie mon fiancé Thomas, qui partage ma vie depuis six ans et m'apporte chaque jour son soutien, sa patience et son amour. Et bien sûr, merci à Kiwi, pour sa présence réconfortante et joyeuse au quotidien.

## TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	ii
TABLE DES MATIÈRES.....	iii
LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	ix
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS.....	xii
RÉSUMÉ.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE.....	2
1.1 Les ribosomes, piliers universels de la synthèse protéique et de la régulation de l'expression génique.....	2
1.1.1 Rôle central des ribosomes dans la synthèse protéique.....	2
1.1.2 Étapes de l'expression génique : transcription et traduction.....	3
1.1.3 Ribosomes et régulation fine de l'expression génique.....	3
1.1.4 Structure conservée des ribosomes et rôle de l'ARNr.....	4
1.1.5 Ribosomopathies : pathologies liées au dysfonctionnement ribosomique.....	5
1.2 Rôle des modifications post-transcriptionnelles de l'ARNr dans la fonction des ribosomes.....	6
1.2.1 Les complexes snoRNP, acteurs principaux des modifications post-transcriptionnelles.....	6
1.2.2 Fonctions additionnelles et implications pathologiques des snoRNP H/ACA.....	9
1.2.3 Complémentarité des snoRNP C/D et H/ACA dans la maturation des ARNr.....	9
1.3 SHQ1, Un acteur clé dans l'assemblage des snoRNP H/ACA et la maturation des ARNr.....	10
1.3.1 Rôle de SHQ1 dans la biogenèse des snoRNP H/ACA et fonction de chaperon temporaire.....	10
1.3.2 Architecture structurale de SHQ1.....	11
1.3.3 Fonction de contrôle qualité dans l'assemblage des snoRNP.....	13
1.4 Perturbation de SHQ1 chez l'humain.....	13
1.4.1 Présentation générale des mutations identifiées.....	13
1.4.2 Cas rapportés de patients hétérozygotes composites, atteintes neurodéveloppementales sévères.....	14
1.4.3 Description clinique d'un variant homozygote chez des familles saoudiennes.....	14
1.4.4 Mutations hétérozygotes composites et diversité phénotypique.....	14
1.4.5 Confirmation du rôle causal des variants SHQ1 dans la dystonie infantile précoce.....	15
1.4.6 Nouveaux variants identifiés dans SHQ1.....	15
1.4.7 Nouveaux variants SHQ1 associés à une dystonie traitable.....	16

1.4.8 Synthèse des conséquences cliniques des mutations <i>SHQ1</i> .....	17
1.5 Étude des mutations hétérozygotes composées du gène <i>SHQ1</i> : aspects cliniques et résultats fonctionnels dans différents modèles.....	20
1.5.1 Phénotypes cliniques liés aux combinaisons D175Y/D277Sfs27* et E292K/D277Sfs27* .....	20
1.5.2 Approches fonctionnelles des mutations <i>SHQ1</i> : des modèles cellulaires aux organismes multicellulaires .....	20
1.6 Modèles biologiques utilisés pour l'étude des mutations <i>SHQ1</i> .....	22
1.6.1 <i>Caenorhabditis elegans</i> : un modèle transparent pour l'étude des fonctions neuronales et motrices.....	22
1.6.2 <i>Danio rerio</i> , un vertébré modèle pour l'étude du développement et des troubles moteurs....	29
1.6.3 Choix des modèles biologiques : complémentarité entre <i>C. elegans</i> et <i>Danio rerio</i> .....	33
1.7 Hypothèses et objectifs .....	35
CHAPITRE 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	37
2.1 Études fonctionnelles chez <i>C. elegans</i> .....	37
2.1.1 Construction et maintenance des souches.....	37
2.1.2 Génotypage des souches par PCR .....	39
2.1.3 Amplification de l'ADN et analyse du génotypage par PCR.....	40
2.1.4 Phénotypage neuronale des souches par microscopie.....	40
2.1.5 Tests de motricité .....	42
2.1.6 Tests pharmacologiques.....	42
2.2 Poisson zèbre.....	43
2.2.1 Maintenance des poissons et lignées utilisées .....	43
2.2.2 Maintien des larves de 0 à 5 jours post fertilisation.....	43
2.2.3 Génération des lignées mutantes.....	44
2.2.4 Design des <i>single guide</i> RNA et ssODN .....	45
2.2.5 Microinjection au stade unicellulaire.....	46
2.2.6 Méthode de génotypage .....	47
2.2.7 Test de motricité .....	49
2.2.8 Observation morphologique.....	50
2.2.9 Immunofluorescence .....	51
2.3 Analyses statistiques .....	52
CHAPITRE 3 RÉSULTATS.....	53
3.1 Chez <i>C. elegans</i> .....	53
3.1.1 Génération des souches mutantes <i>shq-1</i> (E180Y) et <i>shq-1</i> (E277K) .....	53
3.1.2 Vérification des génotypes .....	54
3.1.3 Analyse de la mobilité .....	54
3.1.4 Motoneurones .....	55
3.1.5 Tests pharmacologiques.....	59
3.1.6 Neurones dopaminergiques .....	61
3.2 Poisson zèbre.....	62
3.2.1 Génération et validation des lignées <i>knock-in shq1</i> chez le poisson-zèbre .....	62

3.2.2	Test des concentrations d'ARNg à injecter par HRM.....	63
3.2.3	Étude du comportement moteur et de l'organisation neuronale de la lignée D174Y .....	71
CHAPITRE 4 DISCUSSION.....		77
4.1	Altérations locomotrices et neuroanatomiques chez les mutants <i>shq-1</i> .....	77
4.1.1	Réduction de la motilité associée aux mutations <i>shq-1</i> chez <i>C. elegans</i> .....	78
4.1.2	Intégrité morphologique des motoneurones GABAergiques chez les mutants <i>shq-1</i> .....	78
4.1.3	Altérations des motoneurones cholinergiques chez les mutants <i>shq-1</i> .....	79
4.1.4	Altérations dopaminergiques associées à la mutation E277K de <i>shq-1</i> .....	82
4.1.5	Perspectives et pistes d'investigation futures .....	82
4.2	Analyse comportementale et neuronale des larves D174Y chez le poisson-zèbre .....	83
4.2.1	Échec d'intégration de la mutation "E283K" .....	84
4.2.2	Absence de phénotype morphologique.....	86
4.2.3	Absence de phénotype locomoteur chez les larves D174Y.....	86
4.2.4	Altérations de l'architecture neuronale chez les larves D174Y, marquage à la tubuline acétylée et perspectives d'analyse transcriptionnelle .....	89
4.2.5	Validité du marquage TH et interprétation des résultats .....	91
4.2.6	Perspectives méthodologiques et expérimentales .....	92
4.3	Comparaison croisée des résultats entre <i>C. elegans</i> et le poisson-zèbre.....	93
CONCLUSION.....		96
BIBLIOGRAPHIE.....		97

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Comparaison de la structure et de la composition en ARN ribosomique des ribosomes eucaryotes et procaryotes.....	5
Figure 1.2. Structures des petits ARN nucléolaires (snoRNA) et de leurs complexes ribonucléoprotéiques (snoRNP) .....	8
Figure 1.3. Mécanisme d'isomérisation de l'uridine en pseudouridine catalysée par les snoRNP H/ACA. ..	8
Figure 1.4. Assemblage et fonction des snoRNP H/ACA impliquées dans la pseudouridylation des ARN..	11
Figure 1.5. Domaines et modélisation bio-informatique de la structure tridimensionnelle de la protéine humaine SHQ1.....	12
Figure 1.6. Mutations pathogènes identifiées dans le domaine SSD de la protéine SHQ1.....	17
Figure 1.7. Cycle de vie de <i>C. elegans</i> . .....	23
Figure 1.8. Illustration de différents tissus visualisables par fluorescence chez <i>C. elegans</i> .....	24
Figure 1.9. Visualisation du système nerveux de <i>C. elegans</i> . .....	25
Figure 1.10. Organisation du circuit dopaminergique chez <i>C. elegans</i> .....	27
Figure 1.11. Tests pharmacologiques à l'aldicarbe et au lévamisole pour l'étude de la transmission cholinergique.....	28
Figure 1.12. Étapes de la modification génétique et de l'analyse développementale chez le poisson-zèbre. ....	31
Figure 1.13. Organisation anatomique du système nerveux central chez le poisson-zèbre embryonnaire et adulte. ....	33
Figure 1.14. Alignement des séquences protéiques de SHQ1 chez l'humain, le poisson-zèbre ( <i>Danio rerio</i> ) et le nématode <i>C. elegans</i> . ....	35
Figure 2.1. Représentation schématique des commissures cholinergiques et GABAergiques du côté gauche d'un ver <i>C. elegans</i> de type sauvage.....	42
Figure 2.2. Génération de poissons zèbres mutants par édition CRISPR/Cas9.....	45
Figure 2.3. Représentation schématique des mesures de morphologie chez les larves de poisson-zèbre	51
Figure 3.1. Analyse du nombre de battements par minute chez les mutants <i>shq-1</i> .....	54
Figure 3.2. Aucune altération significative de la transmission ou de l'organisation des motoneurones GABAergiques chez <i>C. elegans</i> porteurs des variants E180Y et E277K.....	56

Figure 3.3. Désorganisation des motoneurones cholinergiques chez <i>C. elegans</i> porteurs des variants E180Y et E277K.....	57
Figure 3.4. Les mutations de perte de fonction de <i>shq-1</i> induisent des anomalies morphologiques des axones cholinergiques de <i>C. elegans</i> .....	59
Figure 3.5. Essais pharmacologiques pour évaluer les fonctions synaptiques chez les mutants <i>shq-1</i> .....	60
Figure 3.6. La mutation E277K affecte le guidage et la morphologie des neurones dopaminergiques chez <i>C. elegans</i> .....	61
Figure 3.7. Analyse HRM classique des œufs injectés avec différentes concentrations d'ARNg pour les mutations <i>shq1</i> D174Y et "E283K" .....	64
Figure 3.8. Détection des cycles d'amplification par HRM spécifique de l'ADN contenant ou non les ssODN injectés .....	65
Figure 3.9. Analyse HRM et validation par séquençage des embryons issus de croisements D174Y F0 x WT .....	66
Figure 3.10. Absence d'intégration de la mutation "E283K" sur embryons issus du croisement F0 "E283K" x WT .....	67
Figure 3.11. Analyse des poissons F1 issus des croisements entre F0 fondateurs et poissons sauvages (WT) par HRM.....	69
Figure 3.12. Validation des génotypes chez les F2 par HRM et séquençage.....	70
Figure 3.13. Analyse du comportement de <i>coiling</i> embryonnaire chez les larves de poisson-zèbre D174Y .....	71
Figure 3.14. Comportement locomoteur des larves F2 dans un test de nage à 5 et 7 dpf .....	73
Figure 3.15. Analyse statistique de la morphologie des larves D174Y .....	74
Figure 3.16. Visualisation par immunofluorescence de l'architecture neuronale des larves D174Y à 5 dpf .....	75
Figure 3.17. Quantification des neurones dopaminergiques chez les larves D174Y de poisson-zèbre à 5 dpf. ....	76

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1. Mutations pathogènes du gène <i>SHQ1</i> associées à des troubles neurodéveloppementaux..	19
Tableau 2.1. Souches de <i>C. elegans</i> utilisées dans cette étude. ....	38
Tableau 2.2. Souches de <i>C. elegans</i> générées dans cette étude.....	38
Tableau 2.3. Séquences des amorces utilisées pour le géotypage des mutations E277K et E180Y chez <i>C. elegans</i> .....	39
Tableau 2.4. : Séquences des ssODN utilisés pour l'introduction des mutations ciblées D174Y et E283K dans le gène <i>shq1</i> . ....	46
Tableau 2.5. Amorces utilisées pour l'analyse HRM des mutations <i>shq1</i> .....	48
Tableau 2.6. Amorces utilisées pour l'amplification PCR et le séquençage des sites ciblés dans le gène <i>shq1</i> . ....	49

## LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ANOVA: *Analysis of Variance*

ARN: Acide ribonucléique

ARNg : ARN guide

ARNm : ARN messenger

ARNr: ARN ribosomique

*C. elegans*: *Caenorhabditis elegans*

C/D (snoRNP C/D): *Small nucleolar ribonucleoprotein* de type C/D

Cas9: *CRISPR-associated protein 9*

CRISPR: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

CS (domaine): *CHORD and SGT1 domain*

Ct: *Cycle threshold* (cycle seuil)

*D. rerio*: *Danio rerio* (poisson-zèbre)

DKC1 : *Dyskeratosis congenita 1*

dNTP : Désoxynucléoside triphosphate

dpf : *days post-fertilization* (jours post-fécondation)

F0, F1, F2 : Générations de reproduction chez le poisson-zèbre

GABA: Acide  $\gamma$ -aminobutyrique

GAR1: *Glycine–Arginine-rich protein 1*

GFP: *Green Fluorescent Protein*

H/ACA (snoRNP H/ACA): *Small nucleolar ribonucleoprotein de type H/ACA*

hpf : *hours post-fertilization* (heures post-fécondation)

HRM: *High-Resolution Melting*

Hyp: Hypothalamus

IgG: Immunoglobuline G

MHB: Frontière mésencéphalo-rhombencéphalique (*Midbrain-Hindbrain Boundary*)

MS222: Tricaïne méthanesulfonate

NGM: *Nematode Growth Medium*

NHP2: *Nucleolar protein family A member 2*

NOP10: *Nucleolar protein family A member 10*

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

qPCR : *quantitative PCR*

SHQ1: *Small nucleolar RNAs of the box H/ACA family quantitative accumulation*

snoRNA: *small nucleolar RNA*

snoRNP: *small nucleolar ribonucleoprotein*

SSD: *SHQ1-Specific Domain*

ssODN: *single-stranded oligodeoxynucleotide* (oligonucléotide simple brin)

TAE: Tris-Acetate-EDTA

TH: Tyrosine Hydroxylase

WT: *Wild Type* (type sauvage)

## LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

% : pourcentage

~ : approximativement

cm : centimètre

kDa : kilodalton

L : litre

mg : milligramme

mL : millilitre

mM : millimolaire

mm : millimètre

nL : nanolitre

ng/ $\mu$ L : nanogramme par microlitre

ns : non significatif

pb : paires de bases

UA : unité arbitraire

V : volt

°C : degré Celsius

$\mu\text{L}$  : microlitre

$\mu\text{M}$  : micromolaire

## RÉSUMÉ

Les mutations bialléliques du gène *SHQ1*, un facteur essentiel de la biogenèse des snoRNP H/ACA, ont été associées à des troubles neurodéveloppementaux précoces chez l'humain. Ce mémoire vise à caractériser les effets fonctionnels de deux mutations identifiées chez des patients, p.(Asp175Tyr) et p.(Glu277Lys), en utilisant deux modèles animaux complémentaires : *Caenorhabditis elegans* et le poisson-zèbre (*Danio rerio*). Chez *C. elegans*, les mutations orthologues D174Y et E277K introduites dans le gène *shq-1* induisent des altérations locomotrices significatives, des modifications de la sensibilité aux agents pharmacologiques, ainsi que des défauts structuraux dans les circuits moteurs cholinergiques et dopaminergiques. Une atteinte préférentielle des motoneurones cholinergiques est observée, suggérant une vulnérabilité liée à leur forte activité biosynthétique. Chez le poisson-zèbre, seule la mutation D174Y a pu être intégrée de manière stable par *knock-in* CRISPR. Les analyses comportementales n'ont révélé aucun déficit locomoteur franc, mais une désorganisation de l'architecture neurale a été détectée par marquage à la tubuline acétylée. Ces résultats confirment l'implication de *SHQ1* dans le développement du système moteur et illustrent la complémentarité des modèles choisis pour l'étude des troubles neurologiques d'origine génétique.

Mots clés: *SHQ1*, snoRNP H/ACA, CRISPR-Cas9, *Caenorhabditis elegans*, *Danio rerio*, motoneurones cholinergiques, neurones dopaminergiques, locomotion, architecture neurale.

## ABSTRACT

Biallelic mutations in the *SHQ1* gene, an essential factor in H/ACA snoRNP biogenesis, have been associated with early-onset neurodevelopmental disorders in humans. This thesis aims to characterize the functional effects of two mutations identified in patients, p.(Asp175Tyr) and p.(Glu277Lys), using two complementary animal models: *Caenorhabditis elegans* and zebrafish (*Danio rerio*). In *C. elegans*, the orthologous mutations D174Y and E277K introduced into the *shq-1* gene induce significant locomotor alterations, changes in sensitivity to pharmacological agents, as well as structural defects in cholinergic and dopaminergic motor circuits. A preferential impairment of cholinergic motor neurons is observed, suggesting a vulnerability linked to their high biosynthetic activity. In zebrafish, only the D174Y mutation could be stably integrated by CRISPR knock-in. Behavioral analyses did not reveal any marked locomotor deficit, but disorganization of neural architecture was detected through acetylated tubulin staining. These results confirm the involvement of *SHQ1* in the development of the motor system and illustrate the complementarity of the chosen models for the study of genetically based neurological disorders.

Keywords : *SHQ1*, H/ACA snoRNP, CRISPR-Cas9, *Caenorhabditis elegans*, *Danio rerio*, cholinergic motoneurons, dopaminergic neurons, locomotion, neural architecture.

## INTRODUCTION

Le fonctionnement du système nerveux repose sur des processus cellulaires essentiels au maintien des fonctions neuronales. Des altérations génétiques peuvent affecter ces processus et se traduire par des perturbations du développement et de la motricité. L'étude fonctionnelle de gènes impliqués dans ces mécanismes permet d'examiner les liens entre modifications génétiques et phénotypes observables à l'échelle de l'organisme.

Parmi les gènes impliqués dans ces processus cellulaires fondamentaux, le gène *SHQ1* constitue le sujet central de ce mémoire. Ce travail s'intéresse à l'étude des conséquences fonctionnelles de mutations génétiques à l'aide de modèles animaux, dans une approche expérimentale visant à relier des altérations génétiques à des phénotypes observables, notamment sur le plan de la motricité et de l'organisation du système nerveux.

Afin d'aborder ces objectifs, deux modèles animaux ont été utilisés comme outils expérimentaux : le nématode *Caenorhabditis elegans* et le poisson-zèbre (*Danio rerio*). Ces modèles offrent des approches complémentaires pour l'étude fonctionnelle de mutations génétiques, permettant d'examiner leurs effets dans des contextes biologiques distincts, allant d'un organisme simple à un vertébré en développement.

Les travaux présentés dans ce mémoire reposent sur l'introduction ciblée de mutations génétiques dans ces modèles, suivie d'analyses comportementales et morphologiques permettant de comparer les organismes porteurs des mutations à des organismes témoins. Ces approches visent à caractériser les effets des mutations étudiées sur la motricité et sur l'organisation neuronale à l'échelle de l'organisme.

Ce mémoire est structuré en quatre chapitres. Le premier chapitre présente le cadre théorique et les connaissances générales nécessaires à la compréhension du contexte scientifique de l'étude. Le deuxième chapitre décrit le matériel biologique utilisé ainsi que les méthodes expérimentales mises en œuvre pour l'analyse fonctionnelle des mutations. Le troisième chapitre expose les résultats obtenus à partir des analyses réalisées chez *Caenorhabditis elegans* et chez le poisson-zèbre. Enfin, le quatrième chapitre propose une discussion intégrative de ces résultats et aborde les perspectives qu'ils ouvrent pour de futures recherches.

# CHAPITRE 1

## REVUE DE LITTÉRATURE

Ce chapitre présente les bases nécessaires à la compréhension du rôle fondamental des ribosomes dans la synthèse protéique et la régulation de l'expression génique, en insistant plus particulièrement sur les modifications post-transcriptionnelles de l'ARN ribosomique catalysées par les complexes snoRNP (*small nucleolar ribonucleoproteins*). La protéine SHQ1, acteur essentiel de l'assemblage des snoRNP H/ACA, est détaillée, ainsi que les conséquences des mutations qui lui sont associées chez l'humain. Enfin, les modèles biologiques *Caenorhabditis elegans* et *Danio rerio* sont présentés comme outils complémentaires pour approfondir l'étude fonctionnelle de certaines mutations.

### 1.1 Les ribosomes, piliers universels de la synthèse protéique et de la régulation de l'expression génique

#### 1.1.1 Rôle central des ribosomes dans la synthèse protéique

Les ribosomes sont des complexes ribonucléoprotéiques universels, présents dans toutes les cellules vivantes, assurant la traduction de l'acide ribonucléique messenger (ARNm) en protéines (Noller, 1984 ; Steitz, 2008). Cette fonction est essentielle à la survie cellulaire, car elle permet la synthèse des protéines indispensables aux processus biologiques majeurs tels que le développement, la prolifération, la différenciation cellulaire, et l'adaptation aux variations environnementales (Mauro et Edelman, 2002). Le bon fonctionnement des ribosomes repose sur une coordination rigoureuse entre leur biogenèse et leur activité de traduction, indispensable au maintien de l'homéostasie cellulaire ; toute perturbation de cette coordination peut compromettre la production protéique et affecter l'équilibre des fonctions cellulaires (Mauro et Edelman, 2002 ; Woolford et Baserga, 2013). Par conséquent, les ribosomes dépassent leur simple fonction catalytique et participent activement aux dynamiques cellulaires nécessaires à la réponse

physiologique (Noller, 1984 ; Rodnina, 2018). Pour mieux comprendre le rôle des ribosomes dans la synthèse des protéines, il est important de rappeler les grandes étapes de l'expression génique.

### 1.1.2 Étapes de l'expression génique : transcription et traduction

L'expression génique repose sur deux processus fondamentaux : la transcription et la traduction. L'acide désoxyribonucléique (ADN) constitue le support de l'information génétique, codant les instructions nécessaires à la synthèse des protéines (Kornberg, 2007). La transcription, catalysée par l'ARN polymérase II, correspond à la synthèse d'un précurseur d'ARN messenger (pré-ARNm) à partir de l'ADN. Ce processus débute par la reconnaissance du promoteur, suivie de l'ouverture locale de la double hélice d'ADN, et de l'élongation du brin d'ARN naissant (Kornberg, 2007). Chez les eucaryotes, le pré-ARNm subit des modifications post-transcriptionnelles essentielles, telles que l'ajout d'une coiffe en 5', l'épissage des introns (séquences non codantes) et la polyadénylation en 3', qui favorisent sa stabilité, son export nucléaire, et son efficacité de traduction (Moore et Proudfoot, 2009). L'ARNm mature est ensuite transporté du noyau vers le cytoplasme, où il sert de matrice à la synthèse protéique assurée par les ribosomes (Kuersten et al., 2001). Chez les eucaryotes, la compartimentation nucléaire entraîne une séparation spatiale et temporelle de la transcription et de la traduction, permettant un contrôle fin de l'expression génique. À l'inverse, chez les procaryotes, ces deux processus sont couplés dans le cytoplasme, la traduction pouvant débiter avant même l'achèvement de la transcription, ce qui autorise une réponse rapide aux stimuli environnementaux, mais limite les possibilités de régulation offertes par la compartimentation nucléaire des eucaryotes (Hershey et al., 2019 ; Hinnebusch et Lorsch, 2012).

### 1.1.3 Ribosomes et régulation fine de l'expression génique

Les ribosomes ne se contentent pas d'exécuter passivement la traduction : ils peuvent aussi influencer activement la sélection des ARNm traduits (Mauro et Edelman, 2002). En réponse à des signaux cellulaires, notamment en situation de stress, certaines classes d'ARNm, en particulier ceux codant des protéines de survie, c'est-à-dire des protéines anti-apoptotiques ou impliquées dans la réponse au stress, voient leur traduction modulée par des éléments régulateurs situés dans leurs régions non traduites (5'UTR ou 3'UTR), favorisant leur sélection préférentielle par les ribosomes (Spriggs et al., 2010). Cette modulation conditionne la reconnaissance des ARNm par les ribosomes et influence ainsi le profil protéique global de la cellule (Moore et Proudfoot, 2009). Par ailleurs, la variabilité de la composition ribosomique, liée à l'incorporation d'isoformes spécifiques de protéines ribosomiques ou à des modifications des ARN ribosomiques (ARNr), suggère l'existence de ribosomes spécialisés capables de contrôler la traduction de

sous-ensembles d'ARNm (Ferretti et Karbstein, 2019). Enfin, l'accessibilité des ARNm à la traduction, c'est-à-dire leur disponibilité pour l'initiation de la traduction, dépend de mécanismes post-transcriptionnels tels que la maturation, le transport, la localisation subcellulaire ou encore leur stockage dans des granules cytoplasmiques (Kuersten et al., 2001). Ces étapes sont elles-mêmes influencées par la structure de la chromatine, modulée par des mécanismes transcriptionnels et épigénétiques, comme la méthylation de l'ADN ou les modifications des histones, assurant un contrôle intégré de l'expression génique (Hinnebusch et Lorsch, 2012 ; Tahmasebi et al., 2018).

#### 1.1.4 Structure conservée des ribosomes et rôle de l'ARNr

Pour mieux comprendre ces fonctions, il est nécessaire de s'intéresser à la structure même des ribosomes et au rôle central joué par l'ARN ribosomique. Les ribosomes présentent une architecture moléculaire remarquablement conservée au cours de l'évolution, ce qui reflète leur rôle central et indispensable dans la synthèse protéique (Steitz, 2008). Chez les procaryotes, ils forment des particules 70S, composées d'une grande sous-unité 50S et d'une petite sous-unité 30S (Noller, 1984). Chez les eucaryotes, ils forment également deux sous-unités, mais plus volumineuses, la grande sous-unité 60S et la petite sous-unité 40S, constituant l'ensemble 80S (Petrov et al., 2014). La Figure 1.1 illustre cette organisation structurale conservée entre ribosomes eucaryotes et procaryotes, en mettant en évidence la composition en ARNr de chaque sous-unité. L'ARNr, qui compose la majeure partie de la masse du ribosome, constitue le cœur catalytique du complexe, c'est-à-dire qu'il assure directement la fonction enzymatique de formation de la liaison peptidique lors de la traduction, au sein du centre peptidyl-transférase (Noller, 1984 ; Steitz, 2008). Contrairement aux protéines ribosomiques, l'ARNr joue donc un rôle actif dans la catalyse de la réaction de polymérisation des acides aminés. Chez les eucaryotes, la petite sous-unité 40S contient l'ARNr 18S, impliqué dans la lecture de l'ARNm, tandis que la grande sous-unité 60S est formée des ARNr 5.8S, 28S et 5S, participant à la catalyse et à la stabilisation structurale du ribosome (Henras et al., 2015) (Figure 1.1). Les ARNr 18S, 5.8S et 28S sont transcrits sous la forme d'un long précurseur 47S dans le nucléole par l'ARN polymérase I, puis maturés par clivages successifs et modifications post-transcriptionnelles (Henras et al., 2015). L'ARNr 5S est quant à lui transcrit séparément dans le nucléoplasme par l'ARN polymérase III (Woolford et Baserga, 2013). La stabilité et le bon fonctionnement des ribosomes reposent en grande partie sur des modifications chimiques de l'ARNr, telles que la pseudouridylation, conversion de l'uridine en pseudouridine, qui renforce les interactions structurales de l'ARNr et participe à la précision du repliement du ribosome (Narla et Ebert, 2010). Ces modifications, accompagnées de méthylations, sont essentielles au bon assemblage des sous-unités ribosomiques et à l'activité catalytique du ribosome. La

conservation extrême des régions fonctionnelles de l'ARNr, en particulier au sein du centre peptidyl-transférase et du sillon de décodage, témoigne de l'importance évolutive de ces éléments structuraux (Steitz, 2008 ; Petrov et al., 2014).

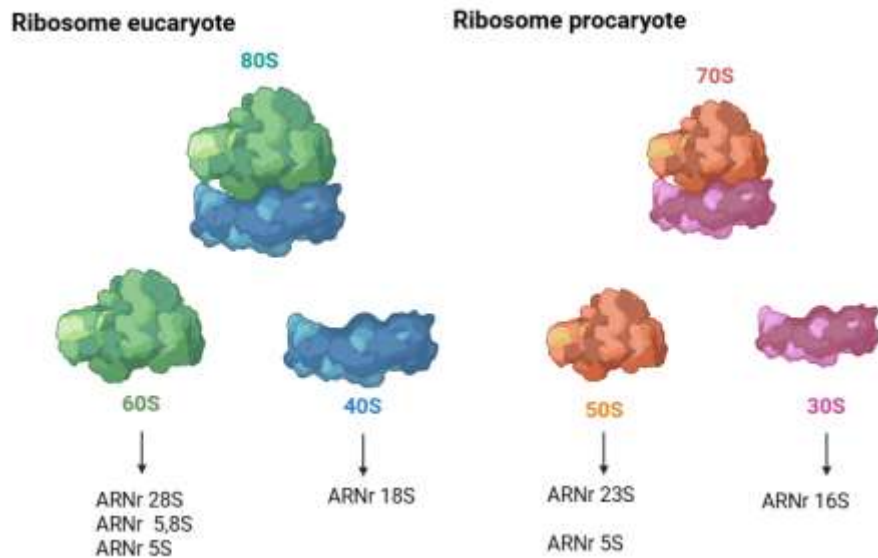


Figure 1.1. Comparaison de la structure et de la composition en ARN ribosomique des ribosomes eucaryotes et procaryotes

Représentation schématique des ribosomes chez les eucaryotes (80S) et les procaryotes (70S), montrant la séparation en deux sous-unités : 60S/40S pour les eucaryotes et 50S/30S pour les procaryotes. Les principaux ARNr constitutifs de chaque sous-unité sont indiqués.

#### 1.1.5 Ribosomopathies : pathologies liées au dysfonctionnement ribosomique.

Lorsque cette machinerie complexe est altérée, les conséquences cellulaires peuvent être majeures. C'est le cas des ribosomopathies, un groupe de maladies génétiques rares causées par des mutations touchant les protéines ribosomiques ou les facteurs de biogenèse des ribosomes (Narla et Ebert, 2010). Ces mutations altèrent la production, la structure ou la fonction des ribosomes, entraînant des défauts de prolifération et une susceptibilité accrue à l'apoptose (Narla et Ebert, 2010). Parmi les principales ribosomopathies figurent le syndrome de Diamond-Blackfan, caractérisé par une anémie macrocytaire due à des mutations touchant majoritairement des protéines de la petite sous-unité ribosomique, mais également certaines de la grande sous-unité; la dyskératose congénitale, impliquant des défauts de maturation des ARNr et de la maintenance des télomères ; la dysplasie de Treacher Collins, causée par des mutations affectant la biogenèse ribosomique dans les cellules des crêtes neurales et l'anémie de Fanconi,

où des altérations indirectes du métabolisme ribosomique contribuent à la pathologie (Bessler et al., 2010 ; Armistead et Triggs-Raine, 2014; Da Costa et al., 2020). Ces maladies affectent surtout les tissus à renouvellement rapide, en particulier les lignées hématopoïétiques, et se manifestent par des atteintes hématologiques, des anomalies du développement, ainsi qu'un risque accru de cancer (Narla et Ebert, 2010). Les mutations impliquées perturbent la biogenèse des ribosomes à différents stades, compromettant ainsi la prolifération cellulaire et la survie (Mills et Green, 2017). Ces données soulignent l'importance d'un contrôle strict de la synthèse protéique pour le maintien de l'homéostasie cellulaire et le développement normal, ouvrant des perspectives thérapeutiques ciblant la biogenèse ribosomique ou les voies de réponse au stress cellulaire (Narla et Ebert, 2010).

## 1.2 Rôle des modifications post-transcriptionnelles de l'ARNr dans la fonction des ribosomes.

Après leur transcription, les ARNr subissent des modifications post-transcriptionnelles indispensables à l'assemblage de ribosomes fonctionnels. Les plus fréquentes sont la méthylation en 2'-OH du ribose et la pseudouridylation, qui ciblent des régions clés de l'ARNr telles que le centre de décodage et le site peptidyl-transférase (Kiss, 2002). Ces modifications stabilisent la structure tridimensionnelle du ribosome, renforcent la fidélité de la traduction et facilitent les interactions avec les protéines ribosomiques (Kiss, 2002). Elles contribuent également à une régulation fine de la traduction en fonction des besoins cellulaires (Decatur et Fournier, 2002). Ces modifications sont catalysées par des complexes ribonucléoprotéiques spécialisés, appelés snoRNP (*small nucleolar ribonucleoproteins*), composés d'un ARN guide (snoRNA) et de protéines associées responsables de la reconnaissance des sites cibles et de l'activité enzymatique (Kiss, 2002).

### 1.2.1 Les complexes snoRNP, acteurs principaux des modifications post-transcriptionnelles

Les modifications post-transcriptionnelles des ARNr sont majoritairement assurées par des complexes appelés snoRNP (Figure 1.2). Ils se divisent en deux grandes classes, selon la nature des modifications enzymatiques qu'ils catalysent et la structure spécifique de leur ARN guide (Kiss, 2002). Les snoRNP de type C/D dirigent la méthylation en 2'-OH du ribose. Ils contiennent un ARN guide portant des boîtes C (motif consensus RUGAUGA, où R représente une purine : A ou G) et D (CUGA). Ces boîtes servent à recruter les protéines du complexe, tandis que la spécificité de la modification est assurée par l'appariement complémentaire entre la région guide de l'ARN sno et la séquence cible de l'ARNr (Watkins et Bohnsack, 2012). L'activité enzymatique est assurée par la fibrillarine (FBL), la méthyltransférase responsable du transfert du groupement méthyle. Ce complexe comprend également NOP56 (*Nucleolar*

*Protein of 56.8 kDa*), qui stabilise le complexe, NOP58 (*Nucleolar Protein of 58 kDa*), impliquée dans l'assemblage et 15.5K, qui reconnaît spécifiquement les boîtes C/D (Watkins et Bohnsack, 2012). Les snoRNP de type H/ACA, quant à elles, dirigent la pseudouridylation, une modification essentielle qui consiste en l'isomérisation de l'uridine en pseudouridine. Ce réarrangement chimique, présenté à la Figure 1.3, modifie le point de liaison entre l'uracile et le ribose (le sucre formant le squelette de l'ARN), ce qui altère la géométrie locale de l'ARN et renforce ses interactions structurales (Kiss, 2002). Les snoRNP H/ACA possèdent un ARN guide en tiges-boucles, contenant des boîtes H (ANANNA) et ACA (Watkins et Bohnsack, 2012). Leur activité enzymatique repose sur la dyskérine (DKC1), une pseudouridine synthase, associée à NOP10 (*Nucleolar Protein of 10 kDa*), qui stabilise le complexe, NHP2, indispensable à l'intégration de la dyskérine, et GAR1 (*Glycine Arginine-rich protein 1*), qui module son activité (Watkins et Bohnsack, 2012). Outre ces rôles de modification enzymatique, certaines snoRNP jouent un rôle essentiel dans la maturation des pré-ARNr, un processus distinct des modifications post-transcriptionnelles. Ces « snoRNP de processing », telles que U3, U14 ou snR30, ne catalysent pas de modification chimique : elles agissent comme guides structuraux permettant les clivages précoces du pré-ARNr, en particulier au cours de la maturation de l'ARNr 18S (Kiss, 2002 ; Henras et al., 2015). Elles assurent ainsi l'architecture correcte du pré-ribosome et la progression efficace du processus de biogenèse. Les snoRNP, par la reconnaissance spécifique des sites de modification sur l'ARNr, orchestrent ces modifications indispensables à sa maturation structurale et fonctionnelle (Watkins et Bohnsack, 2012). Leur organisation moléculaire distincte est illustrée à la Figure 1.2, qui met en évidence les différences architecturales entre les complexes C/D et H/ACA.

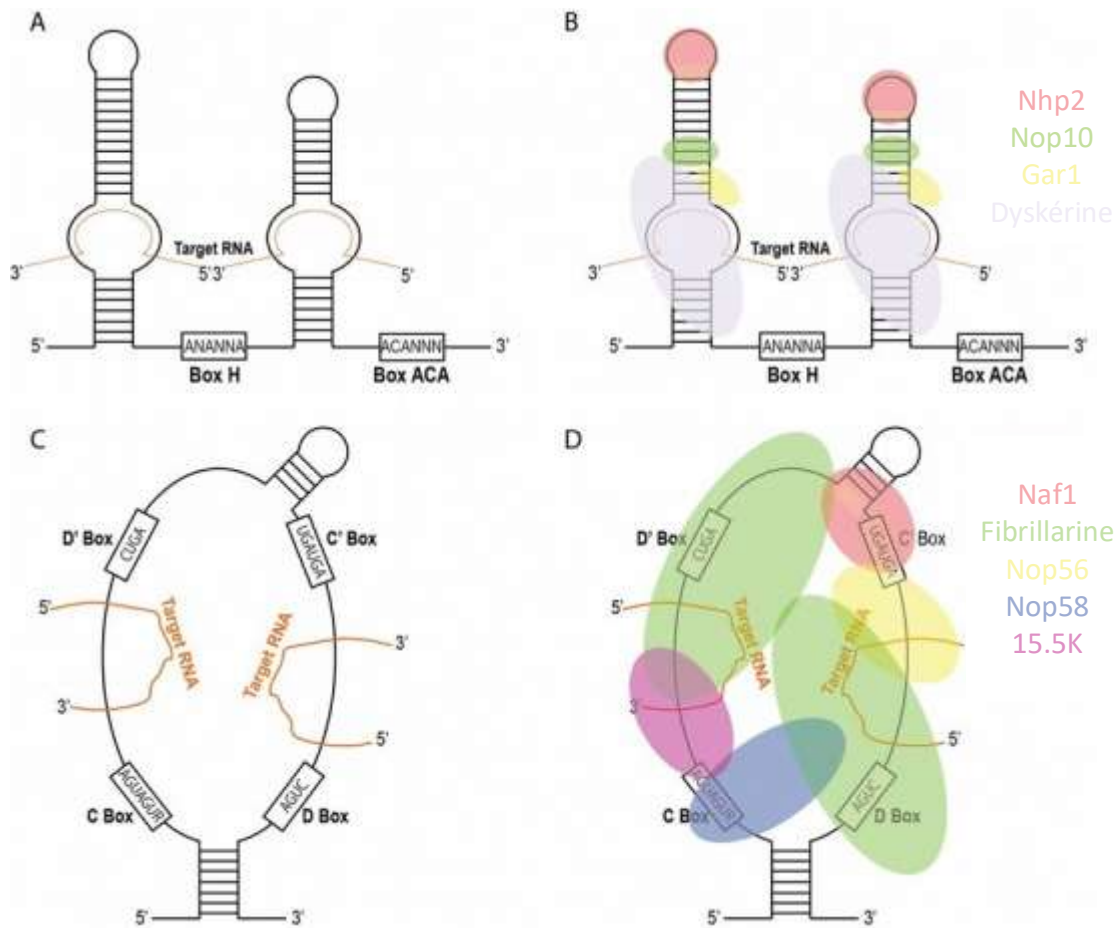


Figure 1.2. Structures des petits ARN nucléolaires (snoRNA) et de leurs complexes ribonucléoprotéiques (snoRNP).

(A) Structure caractéristique des snoRNA de type H/ACA. (B) Complexe snoRNP H/ACA, formé de l'ARN guide et des protéines associées (DKC1, NOP10, NHP2, GAR1). (C) Structure caractéristique des snoRNA de type C/D. (D) Complexe snoRNP C/D, incluant la fibrillarine, NOP56, NOP58 et 15.5K. Adapté de Guglas et al. (2022)

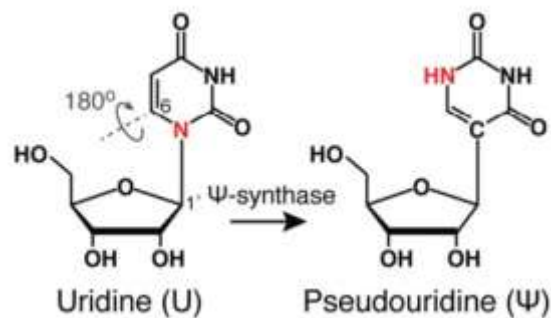


Figure 1.3. Mécanisme d'isomérisation de l'uridine en pseudouridine catalysée par les snoRNP H/ACA.

La pseudouridylation consiste en un réarrangement du point de liaison entre la base uracile et le ribose : la liaison glycosidique N–C (entre le N1 de l'uracile et le C1' du ribose) est remplacée par une liaison C–C (entre le C5 de la base et le C1' du ribose). Ce changement crée un nouvel atome donneur de liaison hydrogène (le N1 libre), renforçant la capacité de l'ARN à former des interactions stabilisatrices. Tirée de Meier (2016).

### 1.2.2 Fonctions additionnelles et implications pathologiques des snoRNP H/ACA

Au-delà de leur rôle essentiel dans la modification post-transcriptionnelle des ARN ribosomiques, les snoRNP H/ACA remplissent d'autres fonctions cellulaires majeures, en particulier par l'intermédiaire de leur composante catalytique principale, la dyskérine. La dyskérine n'est pas seulement indispensable à la pseudouridylation des ARNr, elle joue également un rôle déterminant dans le fonctionnement de la télomérase, l'enzyme responsable de la maintenance des télomères, ces structures protectrices situées aux extrémités des chromosomes (Mitchell et al., 1999). En stabilisant l'ARN de la télomérase (hTR) et en participant à son activité enzymatique, la dyskérine contribue au maintien de l'intégrité chromosomique, à la prévention du vieillissement cellulaire prématuré et à la préservation du potentiel de renouvellement cellulaire (Yoon et al., 2006 ; Bessler et al., 2010). Des mutations inactivatrices de DKC1 altèrent à la fois la maturation des ARNr et la fonction télomérique, entraînant la dyskératose congénitale, une maladie génétique rare se manifestant par des anomalies cutanées, des défaillances hématopoïétiques, des défauts du renouvellement cellulaire, ainsi qu'un risque accru de cancers (Bessler et al., 2010 ; Glusker et al., 2015). Cette pathologie met en évidence le lien étroit entre la biogenèse des ribosomes, la maintenance des télomères et l'homéostasie cellulaire. Dans le nucléole, les snoRNP H/ACA coopèrent avec divers facteurs protéiques afin de reconnaître avec précision les sites de modification sur les précurseurs d'ARNr et d'assurer leur maturation rigoureuse, un contrôle qualité indispensable à la production de ribosomes fonctionnels (Henras et al., 2015 ; Sloan et al., 2017). Toute altération de ce processus peut compromettre l'intégrité des ribosomes, entraînant des conséquences physiopathologiques graves, notamment l'apparition de ribosomopathies (Narla et Ebert, 2010). Pour comprendre pleinement la contribution des snoRNP à la maturation ribosomique, il est essentiel de considérer leur complémentarité fonctionnelle dans l'ensemble du processus de biogenèse.

### 1.2.3 Complémentarité des snoRNP C/D et H/ACA dans la maturation des ARNr.

Bien qu'ils catalysent des modifications biochimiques distinctes, les snoRNP C/D et H/ACA agissent de manière complémentaire lors de la maturation des ARNr. La méthylation en 2'-OH confère une rigidité locale à l'ARNr, renforçant la stabilité de sa structure secondaire, tandis que la pseudouridylation améliore

la stabilité locale de l'ARNr et optimise ses interactions avec les protéines ribosomiques ainsi qu'avec les facteurs impliqués dans la traduction, renforçant ainsi la fonctionnalité du ribosome (Ganot et al., 1997 ; Henras et al., 2004 ; Kiss, 2002). Cette synergie entre rigidité structurale et optimisation des interactions fonctionnelles est essentielle à la formation de ribosomes efficaces. Ensemble, ces deux classes de snoRNP modifient des centaines de nucléotides des ARNr précurseurs, assurant ainsi la production de ribosomes matures et pleinement fonctionnels (Watkins et Bohnsack, 2012).

### 1.3 SHQ1, Un acteur clé dans l'assemblage des snoRNP H/ACA et la maturation des ARNr.

#### 1.3.1 Rôle de SHQ1 dans la biogenèse des snoRNP H/ACA et fonction de chaperon temporaire

La biogenèse des snoRNP H/ACA, complexes ribonucléoprotéiques responsables de la pseudouridylation de divers ARN nucléaires, incluant principalement les ARNr mais aussi certains snARN, nécessite une machinerie d'assemblage hautement régulée pour garantir la formation de complexes fonctionnels (Figure 1.4) (Watkins et Bohnsack, 2012 ; Henras et al., 2017). Parmi les facteurs clés de ce processus, SHQ1 (*Small nucleolar RNAs of the box H/ACA family quantitative accumulation*) est une protéine hautement conservée, identifiée comme un facteur d'assemblage essentiel des snoRNP H/ACA (Yang et al. 2002). SHQ1 interagit directement avec la dyskérine, composante catalytique des snoRNP H/ACA, en se liant à son site de fixation des ARN (Walbott et al., 2011; Li et al., 2011). Cette interaction, qui précède l'incorporation de l'ARN guide H/ACA, protège la dyskérine et empêche toute association prématurée avec des ARN non spécifiques, grâce à un mécanisme de mimétisme ARN qui bloque temporairement son site de liaison (Walbott et al., 2011 ; Li et al., 2011). Ce contrôle strict garantit un repliement correct de la dyskérine, évitant son agrégation ou la formation de complexes incomplets (Godin et al., 2009). Une fois cette première étape assurée, SHQ1 est remplacée par NAF1 (*Nuclear Assembly Factor 1*), qui initie la formation du complexe précoce des snoRNP H/ACA (McKeegan et al., 2007 ; Watkins et Bohnsack, 2012). Ce complexe comprend la dyskérine, NAF1 ainsi que les protéines partenaires NOP10 et NHP2. GAR1 remplace ensuite NAF1 pour permettre la formation du complexe mature (Watkins et Bohnsack, 2012). Finalement, les snoRNP H/ACA matures sont acheminées vers le nucléole, où elles participent à la pseudouridylation des ARN cibles (Walbott et al., 2011 ; Li et al., 2011). Les expériences de déplétion de SHQ1 ont montré qu'elle est indispensable au maintien des niveaux d'ARN guides H/ACA, à la pseudouridylation des ARNr et à l'intégrité de l'assemblage ribosomique (Godin et al., 2009 ; Watkins et Bohnsack, 2012). Dans la levure, la perte de SHQ1 entraîne également un défaut marqué de maturation précoce des pré-ARNr, en particulier lors des clivages menant à l'ARNr 18S (Godin et al., 2009). Ces observations confirment que

SHQ1 agit comme un chaperon temporaire et un facteur de contrôle qualité central dans la biogenèse des snoRNP H/ACA.

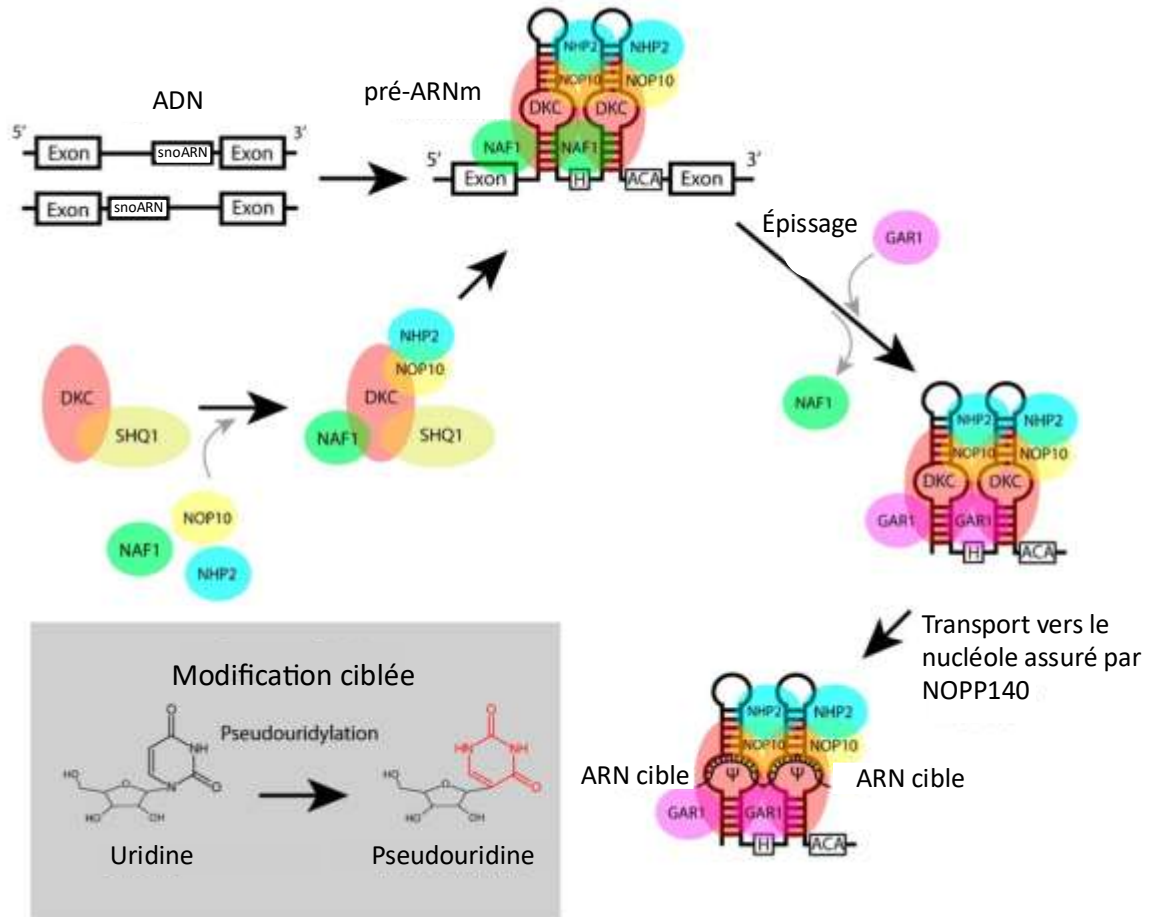


Figure 1.4. Assemblage et fonction des snoRNP H/ACA impliquées dans la pseudouridylation des ARN.

Le schéma illustre le processus d'assemblage des snoRNP H/ACA. Les snoRNP sont formées autour d'un ARN guide de type H/ACA (présent dans les introns des pré-mARN), avec l'incorporation séquentielle des protéines dyskérine (DKC), NOP10, NHP2 et GAR1. SHQ1 agit comme un chaperon temporaire en se liant à la dyskérine, empêchant son interaction prématurée avec l'ARN guide, avant son remplacement par NAF1. Après maturation, le complexe est transporté dans le nucléole où il catalyse la conversion de l'uridine en pseudouridine sur les ARN cibles. Tiré de Verbeek et al., 2022.

### 1.3.2 Architecture structurale de SHQ1.

SHQ1 est une protéine d'environ 60 kDa, composée de deux domaines principaux : un domaine CS, et un domaine SSD. Le domaine CS, riche en feuillets  $\beta$  antiparallèles typiques des chaperons moléculaires, est impliqué dans la reconnaissance initiale de la dyskérine et la stabilisation de son repliement (Walbott et

al., 2011; Li et al., 2011). Le domaine SSD occupe transitoirement le site de liaison de la dyskérine à l'ARN guide H/ACA, se comportant comme un leurre moléculaire qui prévient les interactions prématurées et non spécifiques avec des ARN ou d'autres partenaires (Walbott et al., 2011). Cette occupation temporaire protège également la dyskérine contre l'agrégation ou la dégradation avant son intégration dans le complexe mature des snoRNP H/ACA. Bien que la structure tridimensionnelle complète de SHQ1 n'ait pas encore été résolue expérimentalement, plusieurs structures partielles de ses domaines ont été obtenues (Walbott et al., 2011; Li et al., 2011). Récemment, la prédiction réalisée par AlphaFold (Jumper et al., 2021) a permis de modéliser la structure complète de SHQ1. Cette organisation, combinant des domaines structurés et des régions flexibles, est compatible avec son rôle de chaperon temporaire (Figure 1.5).

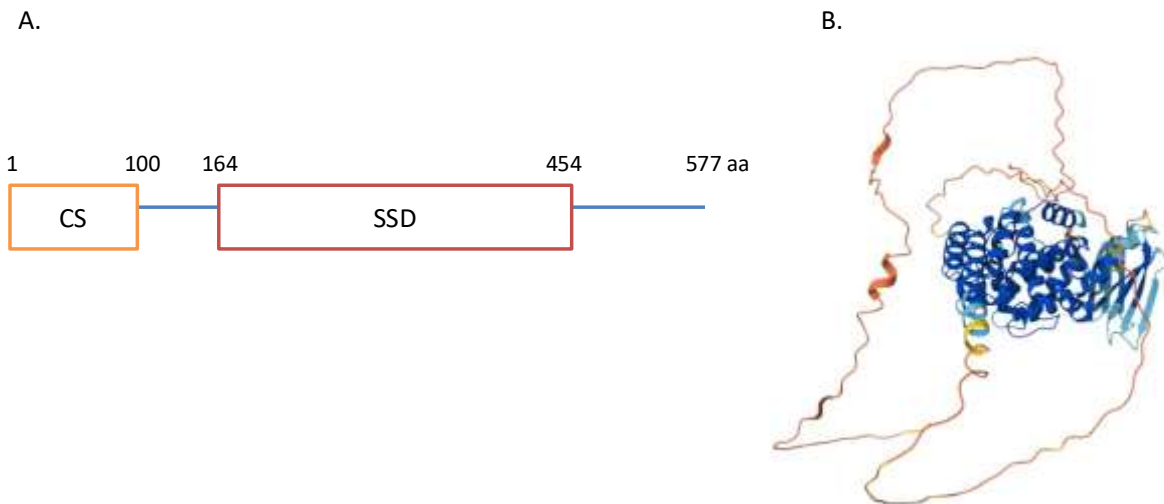


Figure 1.5. Domaines et modélisation bio-informatique de la structure tridimensionnelle de la protéine humaine SHQ1.

(A) Représentation schématique des deux domaines principaux de SHQ1 : le domaine CS (résidus 1-100), impliqué dans l'interaction avec la dyskérine, et le domaine SSD (résidus 164-454), qui joue un rôle de

leurre pour prévenir l'interaction prématurée de la dyskérine avec l'ARN guide H/ACA. (B) Structure tridimensionnelle prédite par AlphaFold (résidus 1–577), indiquant la fiabilité des régions modélisées : bleu foncé pour les segments structurés avec haute confiance, jaune à rouge pour les segments flexibles ou désordonnés. Modélisation obtenue via AlphaFold Protein Structure Database (version 2.0)

### 1.3.3 Fonction de contrôle qualité dans l'assemblage des snoRNP.

Au-delà de son rôle d'assemblage initial, SHQ1 remplit une fonction essentielle de contrôle qualité dans la biogenèse des snoRNP H/ACA. En assurant que seules les formes correctement repliées et assemblées de la dyskérine progressent vers les étapes ultérieures de la formation du complexe, SHQ1 contribue à maintenir l'intégrité du processus d'assemblage ribonucléoprotéique (Watkins & Bohnsack, 2012). Lorsque cette surveillance est compromise, des snoRNP H/ACA immatures ou aberrantes peuvent s'accumuler, entraînant un défaut de maturation de l'ARNr et une perturbation globale de la biogenèse ribosomique (Ojha et al., 2020). Cette défaillance du contrôle qualité peut être particulièrement délétère dans les cellules à forte demande de synthèse protéique, telles que les neurones, où l'accumulation de précurseurs ribosomiques immatures induit un stress ribosomique susceptible de contribuer au développement de pathologies neurodéveloppementales (Hetman & Slomnicki, 2019).

## 1.4 Perturbation de *SHQ1* chez l'humain

### 1.4.1 Présentation générale des mutations identifiées

Les mutations du gène *SHQ1*, bien que rares, sont aujourd'hui reconnues comme responsables de troubles neurodéveloppementaux d'apparition précoce. Ces altérations génétiques concernent des patients issus de divers contextes géographiques et peuvent être retrouvées sous forme homozygote ou hétérozygote composite (Bizarro et Meier, 2017 ; AlHargan et al., 2023). La plupart des mutations identifiées affectent des résidus conservés, localisés principalement dans le domaine SSD de la protéine SHQ1, domaine reconnu pour son rôle clé dans les fonctions cellulaires de SHQ1 (Bizarro et Meier, 2017 ; Sleiman et al., 2022 ; AlHargan et al., 2023 ; Indelicato et al., 2022). Ces quatre études constituent à ce jour les descriptions cliniques les plus détaillées des variants pathogènes de *SHQ1*. Toutefois, d'autres travaux de séquençage génétique à large échelle rapportent ponctuellement des variants supplémentaires, bien que souvent sans analyse fonctionnelle approfondie. Ces observations soulignent le rôle fondamental de SHQ1 dans le développement cellulaire humain et justifient l'intérêt croissant porté à ce facteur dans les études génétiques récentes (Bizarro et Meier, 2017 ; Sleiman et al., 2022).

#### 1.4.2 Cas rapportés de patients hétérozygotes composites, atteintes neurodéveloppementales sévères

Parmi les premiers cas rapportés, l'étude de Bizarro et Meier (2017) a décrit un seul patient composé hétérozygote pour les variants p.Arg335Cys (R335C) et p.Ala426Val (A426V) dans *SHQ1*. Ce patient présentait une hypotonie néonatale sévère, des convulsions précoces, un retard global du développement psychomoteur, une atteinte cérébelleuse, et un retard de croissance. Les auteurs ont montré que ces mutations, localisées dans le domaine SSD de *SHQ1*, altèrent son interaction avec la dyskérine (NAP57), suggérant une perturbation de la fonction des snoRNP H/ACA, bien que l'impact direct sur l'assemblage des RNP ou sur la biogenèse des ribosomes n'ait pas été évalué (Bizarro & Meier, 2017).

#### 1.4.3 Description clinique d'un variant homozygote chez des familles saoudiennes

L'étude d'AlHargan et al. (2023) a rapporté trois enfants, issus de deux familles saoudiennes non apparentées, porteurs d'un variant homozygote du gène *SHQ1* (c.833T>C ; p.Ile278Thr, I278T). Contrairement aux formes plus sévères décrites auparavant avec des mutations composées, ces enfants présentaient un phénotype plus modéré, incluant un retard global du développement et des crises d'épilepsie. L'imagerie cérébrale a révélé une hypomyélinisation diffuse de la substance blanche, sans autre atteinte extra-neurologique manifeste. L'analyse *in silico* et la modélisation structurale ont confirmé que ce variant faux-sens affecte probablement la fonction de *SHQ1*, en altérant la stabilité ou la conformation du domaine SSD. Ces résultats renforcent l'implication directe de *SHQ1* dans les pathologies neurodéveloppementales, même en contexte homozygote (AlHargan et al, 2023).

#### 1.4.4 Mutations hétérozygotes composites et diversité phénotypique

L'étude de Sleiman et al. (2022) a élargi le spectre clinique des pathologies liées à *SHQ1* en rapportant plusieurs patients porteurs de mutations hétérozygotes composées. Parmi les variants identifiés figurent p.Asp175Tyr (D175Y), p.Glu292Lys (E292K) et une délétion entraînant un changement du cadre de lecture (p.Asp277Serfs\*27). Chaque patient présentait une combinaison de deux mutations distinctes, avec des associations variables : certains patients étaient porteurs de la mutation p.Asp175Tyr combinée à la délétion p.Asp277Serfs\*27, tandis que d'autres présentaient la mutation p.Glu292Lys associée à la même délétion (Sleiman et al., 2022). Ces mutations affectent des résidus hautement conservés, situés dans le domaine SSD, essentiel à l'interaction avec la dyskérine. Les patients présentaient une dystonie généralisée à début infantile, un retard du développement moteur, une ataxie, des convulsions, ainsi que des anomalies diffuses de la substance blanche (Sleiman et al., 2022). La sévérité clinique variait d'un patient à l'autre, certains présentant un tableau particulièrement sévère. Les capacités cognitives étaient

également variables selon les individus. Ces observations suggèrent que, même en l'absence de mutation homozygote, des altérations bialléliques de *SHQ1* peuvent entraîner un phénotype neurologique sévère, en fonction de la nature et de la combinaison des mutations affectant des domaines fonctionnels clés (Sleiman et al., 2022).

#### 1.4.5 Confirmation du rôle causal des variants *SHQ1* dans la dystonie infantile précoce

L'étude d'Indelicato et al. (2022) a apporté une confirmation supplémentaire du rôle causal des mutations du gène *SHQ1* dans la dystonie infantile précoce. Les auteurs ont décrit un cas remarquable de dystonie dopa-sensible, c'est-à-dire une dystonie dont les symptômes moteurs s'améliorent significativement sous traitement par lévodopa, un précurseur de la dopamine, ce qui indique l'implication des circuits dopaminergiques et du contrôle moteur central dans cette forme de dystonie (Prudente et al., 2014). Cette patiente était porteuse de variants composés, p.Asp175Tyr (D175Y) et p.Asp277Serfs\*27, déjà identifiés par Sleiman et al. (2022). Le tableau clinique associait des troubles moteurs sévères avec une amélioration notable sous lévodopa, renforçant ainsi le lien entre *SHQ1* et certaines formes de troubles du mouvement (Sleiman et al., 2022). Cette observation ouvre également la voie à des perspectives thérapeutiques ciblées pour les patients porteurs de mutations de *SHQ1*. À ce jour, aucune étude n'a identifié d'interaction moléculaire directe entre *SHQ1* et les protéines clés de la voie dopaminergique. Le rôle de *SHQ1* demeure strictement lié à la biogenèse des snoRNP H/ACA et à la maturation des ARNr, un processus fondamental mais non spécifique à un type neuronal particulier (Sleiman et al., 2022). Les perturbations dopaminergiques observées chez certains patients (Indelicato et al., 2022 ; Chi et al., 2023) sont donc interprétées comme des conséquences secondaires d'un stress cellulaire global plutôt que comme l'indication d'un lien direct avec les voies dopaminergiques.

#### 1.4.6 Nouveaux variants identifiés dans *SHQ1*

L'étude de Chi et al. (2023) a élargi le spectre des mutations pathogènes de *SHQ1* en rapportant huit patients issus de sept familles distinctes, porteurs de quatre nouveaux variants bialléliques : p.Leu333Val (L333V) et p.Val271Glu (V271E), localisés dans le domaine SSD, ainsi que p.Leu49Ser (L49S) et p.Tyr65\* (Y65X), situés dans le domaine N-terminal CS. Les patients présentaient un tableau neurologique précoce incluant une hypotonie sévère, une dystonie paroxystique et, dans certains cas, des signes de dysfonction dopaminergique. Sur le plan fonctionnel, les analyses menées dans des cellules neuronales humaines (SH-SY5Y) ont montré que ces variants ne restaurent pas la migration neuronale altérée en absence de *SHQ1*, indiquant que ces mutations affectent un processus fondamental du développement neuronal (Chi et al.,

2023). Comme la migration neuronale contribue à l'organisation de multiples circuits cérébraux, les conséquences de ces variants dépassent vraisemblablement les seules fonctions motrices et participent à l'ensemble du phénotype neurodéveloppemental observé chez les patients.

#### 1.4.7 Nouveaux variants *SHQ1* associés à une dystonie traitable

Plus récemment, Karnani et al. (2025) ont rapporté le cas d'un adolescent de 15 ans, initialement diagnostiqué avec une paralysie cérébrale athétosique, une affection caractérisée par des mouvements involontaires lents et sinueux, secondaires à une atteinte des noyaux gris centraux, typiquement acquise dans le contexte périnatal (Sanger et al., 2003). L'analyse génétique a révélé chez ce patient deux nouveaux variants hétérozygotes du gène *SHQ1* : une duplication entraînant un décalage du cadre de lecture (c.114dup ; p.Lys39Glnfs\*23) et une mutation faux-sens (c.443A>G ; p.Tyr148Cys) localisée en amont du domaine SSD (Karnani et al., 2025). Ces variants, considérés comme probablement pathogènes, ont été associés à un tableau clinique comprenant un retard du développement moteur, des troubles de la marche, une dystonie, une chorée et une hypertonie diffuse (Karnani et al., 2025). Le patient a bénéficié d'un traitement initial par trihexyphénidyle, un anticholinergique utilisé dans certaines dystonies, suivi d'un traitement par carbidopa-lévodopa, ce qui a entraîné une amélioration significative des symptômes moteurs (Karnani et al., 2025). Cette réponse thérapeutique suggère une forme de dystonie dopa-sensible, c'est-à-dire une dystonie améliorée par le traitement dopaminergique (Prudente et al., 2014). Ce cas illustre l'importance du diagnostic moléculaire dans les troubles moteurs atypiques et montre que certaines mutations de *SHQ1* peuvent être associées à des phénotypes répondant favorablement à un traitement médicamenteux (Karnani et al., 2025). Bien que ce cas n'ait pas encore été publié comme article complet, sa sélection lors d'un congrès reconnu suggère un haut niveau d'intérêt scientifique.

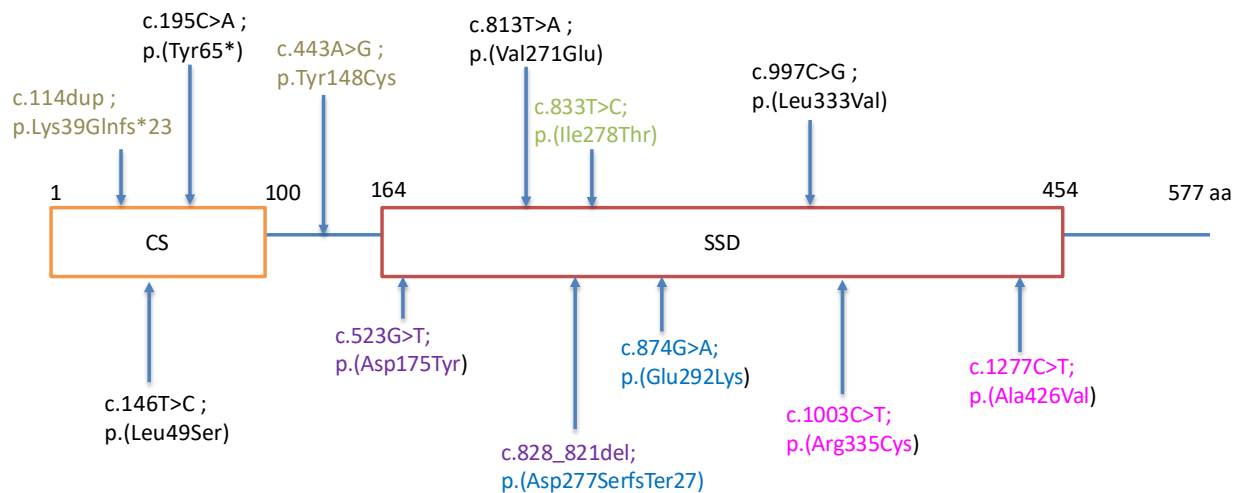


Figure 1.6. Mutations pathogènes identifiées dans le domaine SSD de la protéine SHQ1.

La protéine SHQ1, composée de 577 acides aminés, présente un domaine N-terminal CS (résidus 1–100), une région inter-domaine flexible (résidus ~101–163) et un domaine C-terminal SSD (résidus 164–454), essentiels à sa fonction de chaperon temporaire de la dyskérine. Cette figure regroupe l'ensemble des variants pathogènes rapportés chez l'humain, incluant :

- (i) ceux localisés dans le domaine CS (ex. p.Leu49Ser, p.Tyr65\*),
- (ii) ceux situés dans la région inter-domaine (ex. p.Tyr148Cys),
- (iii) ainsi que les variants du domaine SSD, majoritairement décrits dans la littérature (ex. p.Asp277Serfs\*27, p.Leu333Val, p.Arg335Cys, p.Ala426Val). Les couleurs indiquent les variants retrouvés chez un même patient. Les mutations identifiées dans une même combinaison bialléliques partagent la même couleur. Ainsi, p.Asp175Tyr (violet) et p.Asp277Serfs\*27 (violet) sont retrouvées ensemble chez certains patients, tandis que p.Glu292Lys (bleu) et p.Asp277Serfs\*27 (bleu) coexistent chez d'autres. La mutation p.Asp277Serfs\*27 apparaît donc en deux couleurs puisqu'elle est commune aux deux génotypes décrits dans Sleiman et al. (2022).

#### 1.4.8 Synthèse des conséquences cliniques des mutations *SHQ1*

Les données disponibles issues des études de Bizarro et Meier (2017), Sleiman et al. (2022), AlHargan et al. (2023), Indelicato et al. (2022), Chi et al. (2023) et Karnani et al. (2025) permettent de dresser un tableau cohérent des effets cliniques des mutations du gène *SHQ1*, qu'elles soient homozygotes ou hétérozygotes

composites. Ces mutations touchent principalement des résidus hautement conservés, localisés notamment dans la région C-terminale de la protéine, incluant le domaine SSD (résidus 164 à 454). Certains variants, comme c.443A>G (Karnani et al., 2025), ainsi que p.Leu49Ser et p.Tyr65\* (Chi et al., 2023), sont localisés en dehors du domaine SSD. Sur le plan clinique, les patients présentent de manière récurrente un retard global du développement psychomoteur, souvent dès la période néonatale, associé à une hypotonie axiale marquée (Bizarro et Meier, 2017 ; AlHargan et al., 2023). Des troubles du langage et des atteintes comportementales, telles que l'instabilité émotionnelle, l'irritabilité ou des troubles de l'attention, sont également fréquemment rapportés (AlHargan et al., 2023). L'imagerie cérébrale révèle souvent une hypomyélinisation ainsi que des anomalies diffuses de la substance blanche, témoignant d'un défaut probable dans la maturation et la maintenance des circuits neuronaux (Sleiman et al., 2022 ; AlHargan et al., 2023). Les troubles moteurs, comprenant une dystonie généralisée à début infantile et une ataxie, sont souvent présents, parfois accompagnés de crises épileptiques (Sleiman et al., 2022 ; Indelicato et al., 2022 ; Karnani et al., 2025). Dans l'étude de Chi et al. (2023), les patients porteurs des nouveaux variants présentaient également une hypotonie sévère et des épisodes de dystonie paroxystique, avec des anomalies dopaminergiques documentées. Sur le plan fonctionnel, les analyses cellulaires ont montré que ces variants n'étaient pas capables de restaurer la migration neuronale dans un modèle cellulaire, suggérant un impact direct sur cette fonction de *SHQ1* (Chi et al., 2023). Ces observations soutiennent l'hypothèse d'un rôle essentiel de *SHQ1* dans le développement cérébral, via son implication dans l'assemblage des snoRNP de type H/ACA, indispensables à la modification et à la stabilité des ARN nucléolaires participant à la biogenèse ribosomique (Bizarro et Meier, 2017). La sévérité des phénotypes, même chez des patients porteurs de mutations bialléliques composées, suggère qu'une perte partielle de la fonction de *SHQ1* suffit à perturber de manière importante le développement neurologique, notamment durant les phases critiques du développement postnatal (Sleiman et al., 2022 ; AlHargan et al., 2023 ; Chi et al., 2023). Bien que les données cliniques disponibles confirment le lien entre mutations de *SHQ1* et troubles neurodéveloppementaux, la variabilité interindividuelle des phénotypes, ainsi que le nombre limité de cas rapportés, soulignent la nécessité de poursuivre les études génétiques et fonctionnelles pour mieux comprendre les mécanismes pathogéniques sous-jacents.

Tableau 1.1. Mutations pathogènes du gène *SHQ1* associées à des troubles neurodéveloppementaux

<b>Mutation (protéique)</b>	<b>Type de mutation</b>	<b>Domaine affecté</b>	<b>Contexte génotypique</b>	<b>Référence principale</b>
<b>p.Arg335Cys (R335C)</b>	Faux-sens	Domaine SSD	Hétérozygote composite avec A426V	Bizarro et Meier (2017)
<b>p.Ala426Val (A426V)</b>	Faux-sens	Domaine SSD	Hétérozygote composite avec R335C	Bizarro et Meier (2017)
<b>p.Asp175Tyr (D175Y)</b>	Faux-sens	Domaine SSD	Hétérozygote composite avec Asp277Serfs*27	Sleiman et al. (2022)
<b>p.Glu292Lys (E292K)</b>	Faux-sens	Domaine SSD	Hétérozygote composite avec Asp277Serfs*27	Sleiman et al. (2022)
<b>p.Asp277Serfs*27</b>	Délétion	Domaine SSD	Hétérozygote composite (D175Y ou E292K)	Sleiman et al. (2022)
<b>p.Ile278Thr (I278T)</b>	Faux-sens	Domaine SSD	Homozygote	AlHargan et al. (2023)
<b>p.Leu49Ser (L49S)</b>	Faux-sens	Hors domaine SSD	Hétérozygote composite avec L333V ou Y65X	Chi et al. (2023)
<b>p.Tyr65* (Y65X)</b>	Non-sens (stop prématuré)	Hors domaine SSD	Hétérozygote composite avec L333V	Chi et al. (2023)
<b>p.Val271Glu (V271E)</b>	Faux-sens	Domaine SSD	Hétérozygote composite avec L333V	Chi et al. (2023)

<b>p.Leu333Val (L333V)</b>	Faux-sens	Domaine SSD	Homozygote ou hétérozygote composite (avec Y65X, V271E, L49S)	Chi et al. (2023)
<b>p.Lys39Glnfs23 (K39Qfs23)</b>	Duplication	Hors domaine SSD	Hétérozygote composite avec Y148C	Karnani et al. (2025)
<b>p.Tyr148Cys (Y148C)</b>	Faux-sens	Hors domaine SSD	Hétérozygote composite avec K39Qfs*23	Karnani et al. (2025)

Ce tableau présente un résumé des mutations pathogènes identifiées dans le gène *SHQ1* chez des patients atteints de troubles neurodéveloppementaux. Les mutations sont classées selon leur type (faux-sens, délétion ou duplication), leur localisation par rapport au domaine SSD, leur contexte génotypique (homozygote ou hétérozygote composite) et la publication de référence. Les descriptions cliniques détaillées sont rapportées dans le texte.

#### 1.5 Étude des mutations hétérozygotes composées du gène *SHQ1* : aspects cliniques et résultats fonctionnels dans différents modèles

##### 1.5.1 Phénotypes cliniques liés aux combinaisons D175Y/D277Sfs27\* et E292K/D277Sfs27\*

Les patients porteurs des combinaisons bialléliques D175Y/D277Sfs27\* ou E292K/D277Sfs27\* présentent des phénotypes neurodéveloppementaux sévères, avec des degrés de gravité variables. Selon Sleiman et al. (2022) et Indelicato et al. (2022), la combinaison D175Y/D277Sfs27\* est associée à une dystonie localisée ou segmentaire à début infantile, des troubles moteurs progressifs, et des anomalies modérées de la substance blanche. Les fonctions cognitives semblent relativement préservées, bien qu'un léger retard du développement cognitif puisse être présent selon les patients. Une réponse partielle à la lévodopa a été rapportée chez une patiente (Indelicato et al., 2022). À l'inverse, la combinaison E292K/D277Sfs27\* est liée à une dystonie généralisée précoce, une ataxie sévère, des crises épileptiques fréquentes, et une hypomyélinisation diffuse à l'imagerie cérébrale (Sleiman et al., 2022).

##### 1.5.2 Approches fonctionnelles des mutations *SHQ1* : des modèles cellulaires aux organismes multicellulaires

Les analyses fonctionnelles des mutations pathogènes de *SHQ1* ont été initiées dans des systèmes cellulaires simples afin de comprendre leur impact sur la biogenèse des snoRNP H/ACA et la viabilité cellulaire. Dans l'étude de Sleiman et al. (2022), les mutations humaines D175Y, E292K et D277Sfs27\* ont

été évaluées dans *Saccharomyces cerevisiae* par expression hétérologue. Plutôt que de modifier directement le gène homologue de la levure (*ySHQ1*), les protéines mutées ont été produites via des plasmides d'expression dans lesquels les variants d'origine humaine ont été clonés (Sleiman et al., 2022). Cette approche a montré que la mutation E292K entraîne une perte sévère de croissance, accentuée sous stress thermique, D175Y un défaut intermédiaire, tandis que D277Sfs27\* conduit à une absence totale de viabilité, traduisant une perte complète de fonction (Sleiman et al., 2022). En parallèle, Alidou-D'Anjou et al. (2023) ont montré, dans *S. cerevisiae*, que certains variants pathogènes de *SHQ1*, dont R335C et A426V, compromettent la croissance, l'un ne soutenant pas la viabilité et l'autre présentant un défaut thermosensible, en lien avec une interaction affaiblie avec la dyskérine. En complément, Chang et al. (2024) ont examiné plusieurs variants pathogènes, dont D175Y, E292K, D277Sfs27, L333V, R335C et A426V, dans des cellules humaines HEK293T. L'expression des protéines mutantes a été analysée par western blot, révélant que D175Y, E292K, L333V, R335C et A426V s'expriment à des niveaux comparables à la protéine sauvage. En revanche, les variants introduisant un codon stop prématuré, comme Y65X et D277Sfs27, présentaient une expression quasi absente dans les cellules transfectées, ce qui reflète probablement une instabilité des protéines tronquées. Fait intéressant, ces résultats cellulaires sont globalement cohérents avec les observations cliniques rapportées chez les patients : les variants associés à une perte sévère de croissance dans la levure (comme E292K ou D277Sfs\*27) correspondent aux tableaux cliniques les plus graves, tandis que les mutations montrant un défaut intermédiaire (comme D175Y) sont retrouvées chez des patients présentant des phénotypes moins sévères (Sleiman et al., 2022 ; Indelicato et al., 2022). Ainsi, la sévérité du phénotype cellulaire reflète en partie la sévérité des manifestations neurologiques observées in vivo, même si la présence d'allèles composés dans des individus distincts limite la comparaison directe mutation par mutation. Chez les patients, ces allèles sont vraisemblablement éliminés au stade de l'ARNm par le mécanisme de dégradation médiée par les codons stop prématurés. Des essais de stabilité protéique après traitement au cycloheximide ont confirmé une dégradation plus rapide pour L333V, tandis que les autres variants, y compris D175Y et E292K, montraient une stabilité similaire à la forme sauvage (Chang et al., 2024). Toutefois, ces modèles ne permettent pas d'explorer l'impact de ces mutations sur les fonctions neuronales ou comportementales (Sleiman et al., 2022 ; Chang et al., 2024). Nous avons donc choisi d'étudier les variants de *SHQ1* dans deux modèles animaux complémentaires, *Caenorhabditis elegans* et *Danio rerio* (poisson-zèbre), afin d'évaluer leurs conséquences sur la motricité, le développement neuronal et l'organisation des circuits moteurs.

## 1.6 Modèles biologiques utilisés pour l'étude des mutations *SHQ1*

### 1.6.1 *Caenorhabditis elegans* : un modèle transparent pour l'étude des fonctions neuronales et motrices

Le nématode *Caenorhabditis elegans* est un organisme modèle de choix pour les études en génétique, biologie du développement et neurobiologie. Ce petit ver transparent d'environ 1 mm à l'âge adulte est facilement cultivable en laboratoire sur des boîtes de Pétri contenant des bactéries (*Escherichia coli* OP50), ce qui permet d'en maintenir de grandes populations à faible coût et dans un espace restreint (Byerly et al., 1976). Son cycle de vie est rapide : il passe de l'œuf à l'adulte en environ trois jours à 20 °C et présente une durée de vie totale de deux à trois semaines (Cassada et Russell, 1975). L'une des particularités remarquables de *C. elegans* est sa reproduction hermaphrodite (Brenner, 1974). Chaque hermaphrodite est capable de produire à la fois des spermatozoïdes (durant la phase larvaire) et des ovocytes (à l'âge adulte), ce qui lui permet de s'autoféconder et de générer une descendance génétiquement homogène (Brenner, 1974). Cette stratégie facilite grandement la conservation de lignées mutantes et la réalisation de cribles génétiques. Des mâles sont aussi produits de façon spontanée, bien que rare (~0,1 %), par non-disjonction du chromosome X (Hodgkin et al., 1979), et peuvent être croisés avec les hermaphrodites pour introduire ou combiner des mutations. Un hermaphrodite peut produire environ 300 descendants en l'absence de croisement (Hodgkin, 1992). Le développement de *C. elegans* est très bien caractérisé et comprend quatre stades larvaires (L1 à L4), séparés par des mues successives. En conditions environnementales défavorables, telles que la surpopulation, la famine ou une température élevée, les larves L1 peuvent interrompre leur développement et entrer dans un état alternatif appelé dauer (Cassada et Russell, 1975). Ce stade larvaire spécialisé, non reproducteur, est marqué par une résistance accrue au stress et une longévité étendue pouvant atteindre plusieurs mois (Cassada et Russell, 1975). Une fois les conditions redevenues favorables, les larves dauer reprennent leur développement vers l'âge adulte.

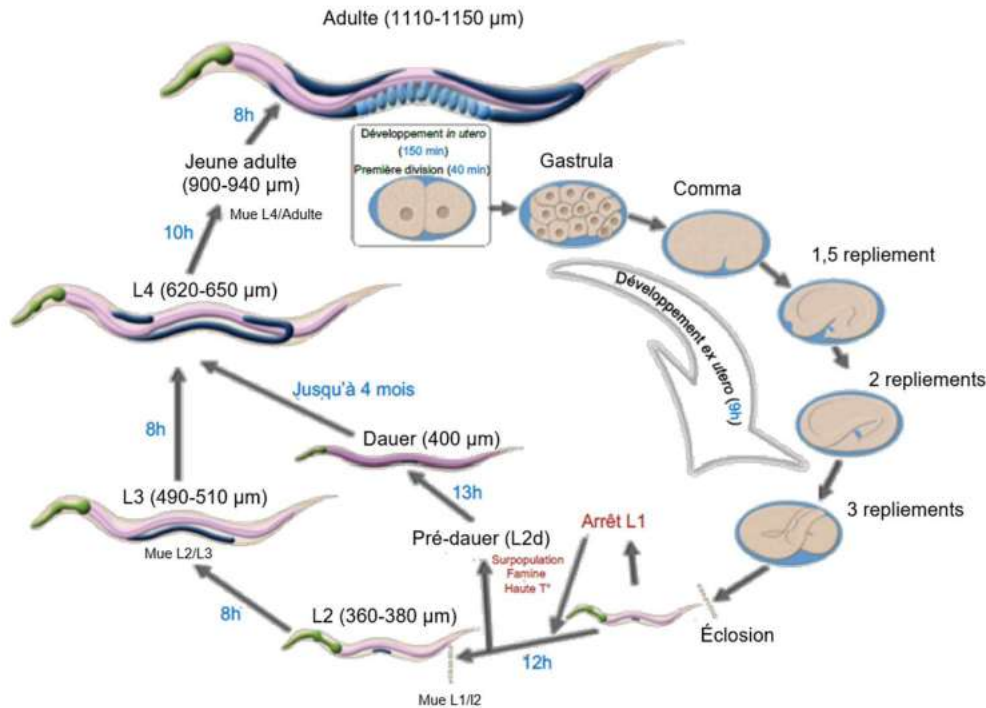


Figure 1.7. Cycle de vie de *C. elegans*.

Représentation du développement de *C. elegans*, de l'embryon à l'adulte, en passant par les quatre stades larvaires (L1–L4). En conditions de stress, le développement est réorienté vers le stade alternatif de dauer via une larve pré-dauer (L2d), permettant la survie prolongée. La durée des transitions développementales est indiquée. Adapté de sources classiques (Cassada et Russell, 1975 ; Byerly et al., 1976).

La transparence naturelle du nématode *Caenorhabditis elegans* est un avantage majeur pour les études *in vivo*. Elle permet l'observation directe du développement cellulaire et tissulaire à l'échelle unicellulaire tout au long de la vie de l'organisme, sans nécessiter de dissections invasives (Cao et al., 2020; Andor Technology, n.d.). L'utilisation de marqueurs fluorescents tels que la GFP (*Green Fluorescent Protein*), exprimés à l'aide de promoteurs spécifiques, facilite l'étude dynamique des tissus et cellules, y compris les neurones, muscles ou cellules germinales (Chalfie et al., 1994 ; Boulin et al., 2006). Ainsi, de nombreuses structures et fonctions biologiques peuvent être visualisées en temps réel grâce à des techniques de microscopie à fluorescence, permettant l'analyse des altérations morphologiques ou fonctionnelles induites par des mutations (voir Figure 1.8). Le génome de *Caenorhabditis elegans*, séquencé et annoté depuis 1998 (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998), comporte approximativement 20 000 gènes. Environ 60 à 70 % des gènes humains possèdent un orthologue chez ce nématode, et près de 40 % des gènes associés à des maladies humaines ont également des homologues chez *C. elegans* (Culetto et

Sattelle, 2000 ; Kaletta et Hengartner, 2006 ; Shaye et Greenwald, 2011). Parmi ces gènes conservés, *shq-1* (désigné Y48A5A.1 dans la base de données WormBase) présente une forte similarité fonctionnelle avec son homologue humain, notamment au niveau des domaines clés impliqués dans la biogenèse des snoRNP H/ACA (NCBI Resource Coordinators, 2023). Cette conservation génétique souligne la pertinence de *C. elegans* comme modèle pour étudier les fonctions de *SHQ1*, ainsi que les pathologies associées à ses dysfonctionnements. De plus, la facilité d'introduction de mutations ciblées dans ce modèle, grâce aux outils modernes d'édition génomique comme CRISPR-Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - CRISPR associated protein 9*) (Dickinson et Goldstein, 2016), permet une exploration fonctionnelle précise. Grâce à sa génétique bien caractérisée, à sa faible redondance génomique et à la possibilité de réaliser des cribles à grande échelle, *C. elegans* demeure un outil de choix pour l'étude des interactions géniques, du développement cellulaire et de la régulation neuronale.

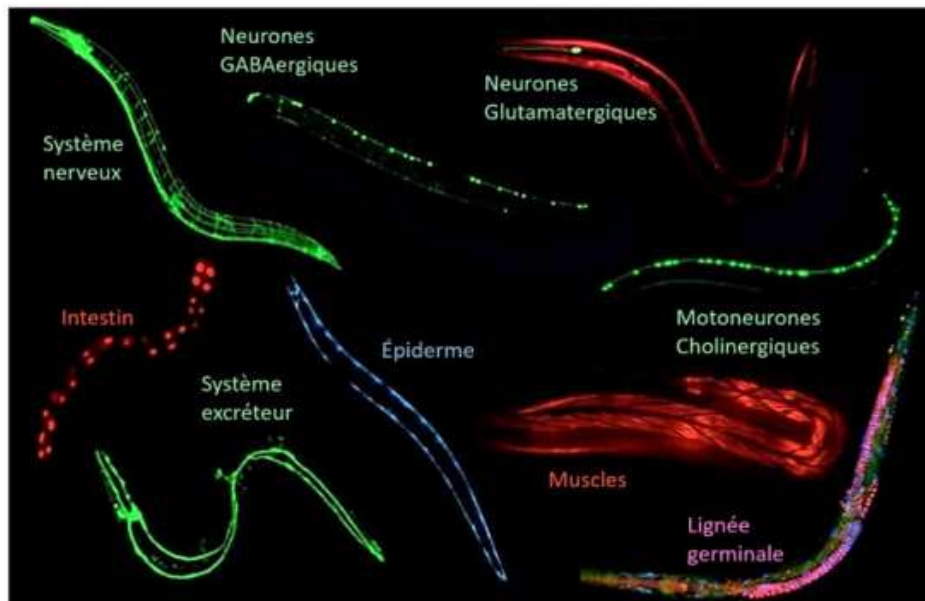


Figure 1.8. Illustration de différents tissus visualisables par fluorescence chez *C. elegans*.

Pour chaque individu montré, un marqueur fluorescent exprimé sous le contrôle d'un promoteur spécifique à un tissu particulier a été inséré dans le génome du ver. Ainsi, les structures ciblées peuvent être observées en conditions vivantes. Image tirée de Katzman (2017).

#### 1.6.1.1 Le système nerveux de *C. elegans*

Le système nerveux adulte de *Caenorhabditis elegans* se compose de 302 neurones précisément identifiés, organisés en 118 types distincts, avec une connectivité et une position parfaitement conservées d'un

individu à l'autre (White et al., 1986 ; Hobert, 2010). Cette invariance structurelle permet une analyse fine des circuits neuronaux impliqués dans le contrôle moteur, la perception sensorielle et la transmission synaptique (White et al., 1986 ; Hobert, 2010). La majorité des neurones se forment durant l'embryogenèse (Sulston et al., 1983), mais une série de motoneurones supplémentaires est ajoutée au stade larvaire L1, principalement dans la chaîne nerveuse ventrale, qui constitue l'axe moteur principal (Sulston et Horvitz, 1977 ; White et al., 1986). Le système nerveux de *C. elegans* s'articule autour de trois structures majeures : l'anneau nerveux, situé dans la tête et considéré comme le centre intégrateur principal (White et al., 1986 ; Emmons, 2015) ; la chaîne nerveuse ventrale, qui parcourt la longueur du corps et contient les circuits moteurs essentiels (White et al., 1986 ; Gally et Bessereau, 2003) ; et la chaîne dorsale, principalement formée de projections axonales (White et al., 1986 ; Gally et Bessereau, 2003). (Figure 1.9).

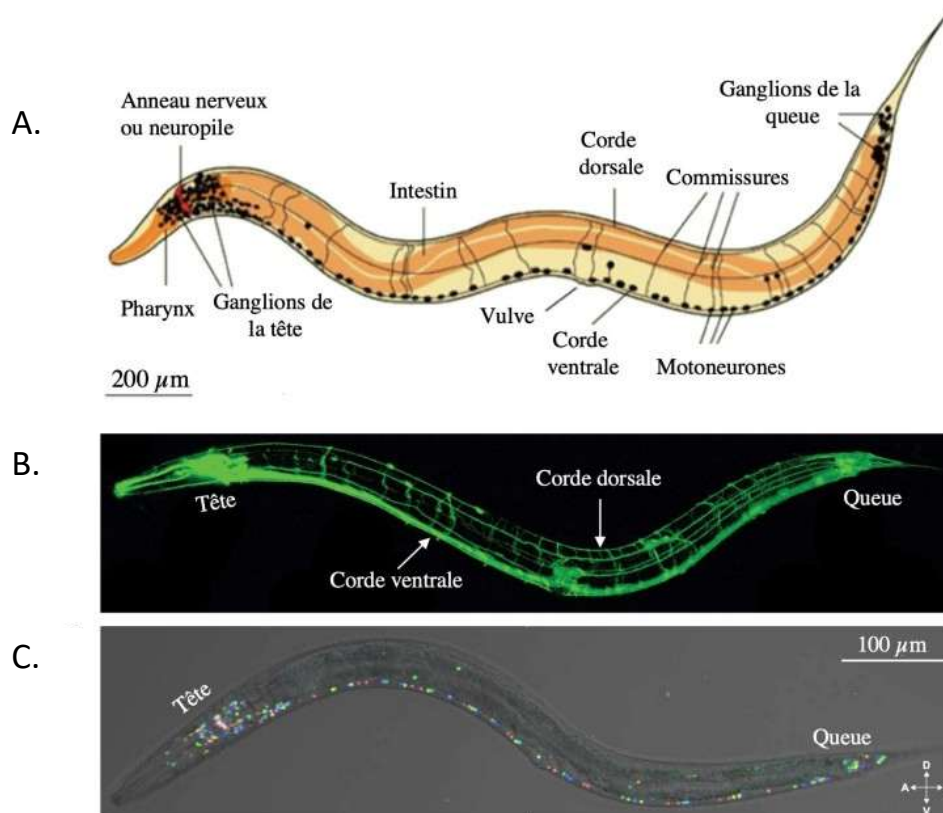


Figure 1.9. Visualisation du système nerveux de *C. elegans*.

Chez le ver hermaphrodite, le système nerveux est réparti sur l'ensemble du corps, avec une concentration importante de neurones localisés dans les ganglions céphaliques. Les ganglions caudaux et la corde nerveuse ventrale complètent cette organisation. (A) Schéma illustrant l'anatomie neuronale

globale chez un adulte hermaphrodite. (B) Image en microscopie à fluorescence d'un ver adulte exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur pan-neuronal *rgef-1*, permettant de visualiser l'ensemble des neurones. (C) Visualisation des 302 neurones grâce au système NeuroPAL, qui attribue à chaque classe neuronale une couleur fluorescente distincte, facilitant leur identification individuelle. Illustrations inspirées des travaux de Emmons (2015), Gally et Bessereau (2003) et Yemini et al. (2021).

La connectivité neuronale de *C. elegans* a été cartographiée intégralement dès les années 1980 par microscopie électronique (White et al., 1986), puis affinée plus récemment grâce à des reconstructions connectomiques à différents stades de développement, incluant des comparaisons interindividuelles (Cook et al., 2019 ; Witvliet et al., 2021). Ces travaux ont révélé une stabilité remarquable des réseaux neuronaux, tout en mettant en évidence certains réarrangements synaptiques développementaux, notamment chez les motoneurones de type DD, un groupe de motoneurones gabaergiques inhibiteurs responsables de la régulation de la contraction musculaire dorsale (White et al., 1986; Cook et al., 2019 ; Witvliet et al., 2021). Ces réarrangements synaptiques reflètent la plasticité fonctionnelle des circuits moteurs au cours du développement. Parmi les types neuronaux majeurs, *C. elegans* possède des neurones cholinergiques, GABAergiques, glutamatergiques, sérotoninergiques et dopaminergiques, témoignant d'une diversité des systèmes de communication neuronale proche de celle des vertébrés (Hobert, 2010). En particulier, les neurones dopaminergiques, bien qu'en faible nombre (huit au total chez l'adulte hermaphrodite), jouent un rôle essentiel dans la modulation sensorimotrice. Il s'agit des neurones CEP (2 dorsaux, 2 ventraux), ADE (2) et PDE (2), localisés principalement dans la tête et la région postérieure (Figure 1.10) (Sulston et al., 1975). Ces neurones participent à la détection mécanique, à la modulation de la locomotion en réponse à la nourriture et à la régulation comportementale en lien avec l'environnement (Hills et al., 2004). Leur expression spécifique de la tyrosine hydroxylase codée par le gène *cat-2*, enzyme limitante de la synthèse de dopamine, ainsi que leur accessibilité et leur nombre restreint, en font des cibles expérimentales privilégiées pour l'étude des circuits dopaminergiques et de leur plasticité (Chase et Koelle, 2007 ; Sanyal et al., 2004).

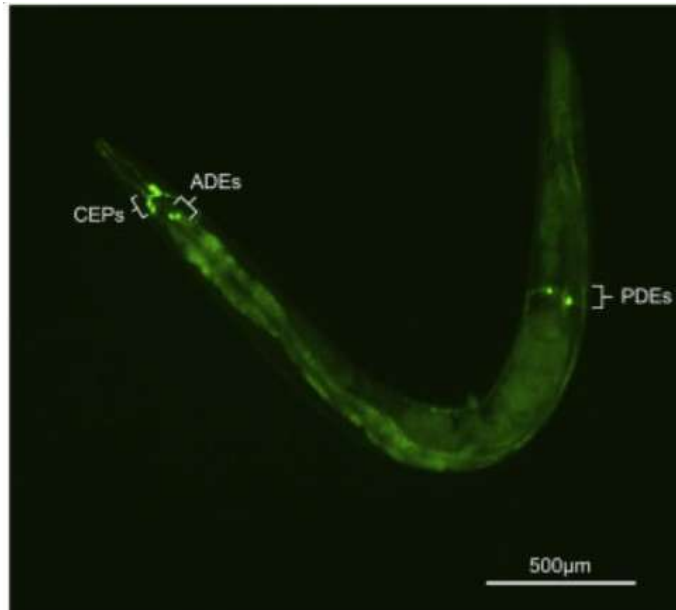


Figure 1.10. Organisation du circuit dopaminergique chez *C. elegans*.

Ce circuit est composé de huit neurones dopaminergiques chez l'hermaphrodite *C. elegans*. Les vers transgéniques, exprimant une GFP cytosolique sous le contrôle du promoteur *dat-1*, présentent deux paires de neurones CEP et une paire de neurones ADE dans la région antérieure, ainsi qu'une paire de neurones PDE localisée dans la partie postérieure du corps. Image adaptée de Palikaras et al. (2022).

#### 1.6.1.2 Motoneurones GABAergiques et cholinergiques chez *Caenorhabditis elegans*

Chez *Caenorhabditis elegans*, les motoneurones forment un réseau restreint mais hautement organisé, essentiel à la coordination de la locomotion et des comportements moteurs. Parmi ces neurones, les GABAergiques sont bien caractérisés et représentent 26 des 302 neurones du système nerveux adulte (White et al., 1986). Ils utilisent l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) comme principal neurotransmetteur inhibiteur. La libération de GABA dépend du transporteur vésiculaire UNC-47, homologue du transporteur vésiculaire du GABA (VGAT) chez les mammifères, dont l'identification a été rapportée plus tardivement (McIntire et al., 1993 ; Gendrel et al., 2016). Cette population inclut les neurones DD (6), VD (13), RME (4), ainsi que les neurones AVL, DVB et RIS, chacun jouant un rôle spécifique dans le contrôle moteur ou la modulation neuronale (Schuske et al., 2004). Les neurones DD et VD, appelés motoneurones de type D, sont essentiels à la locomotion sinusoïdale caractéristique du ver (McIntire et al., 1993). Les DD, présents dès le stade larvaire L1, présentent une plasticité synaptique remarquable : ils sont d'abord connectés aux muscles ventraux, mais remodelent leurs connexions durant le développement pour innerver les muscles dorsaux (Cuentas-Condori et Miller, 2020). Les neurones VD apparaissent plus tardivement et conservent une connectivité ventrale stable. Ensemble, ces motoneurones assurent une inhibition musculaire

coordonnée, indispensable à l'alternance des contractions dorsales et ventrales lors du mouvement (Cuentas-Condori et Miller, 2020). Parallèlement, l'acétylcholine joue un rôle excitateur majeur, notamment dans l'activation des muscles de la paroi corporelle et du pharynx. Les motoneurones cholinergiques, qui représentent environ 30 % des neurones du ver, sont essentiels à la locomotion et à la prise alimentaire (Pereira et al., 2015 ; Treinin et Jin, 2021). Ils se distinguent par l'expression de la choline acétyltransférase (CHA-1), codée par le gène *cha-1*, qui catalyse la synthèse d'acétylcholine à partir de choline et d'acétyl-CoA (Rand et Russell, 1984). L'inactivation de *cha-1* provoque une létalité précoce, illustrant l'importance vitale de ce système (Treinin et Jin, 2021). La dégradation de l'acétylcholine est assurée par quatre acétylcholinestérases distinctes (ACE-1 à ACE-4), garantissant une transmission synaptique rapide et efficace, ce qui constitue une particularité rare chez les invertébrés (Johnson et al., 1983). L'équilibre entre l'excitation cholinergique et l'inhibition GABAergique constitue un mécanisme central dans la génération du mouvement ondulatoire chez *C. elegans* (Jospin et al., 2009). L'activité fonctionnelle des motoneurones cholinergiques peut être évaluée grâce à des tests pharmacologiques bien établis, tels que ceux utilisant l'aldicarbe, qui inhibe la dégradation de l'acétylcholine, ou le lévamisole, un agoniste des récepteurs nicotiniques post-synaptiques (Figure 1.11) (Treinin & Jin, 2021).

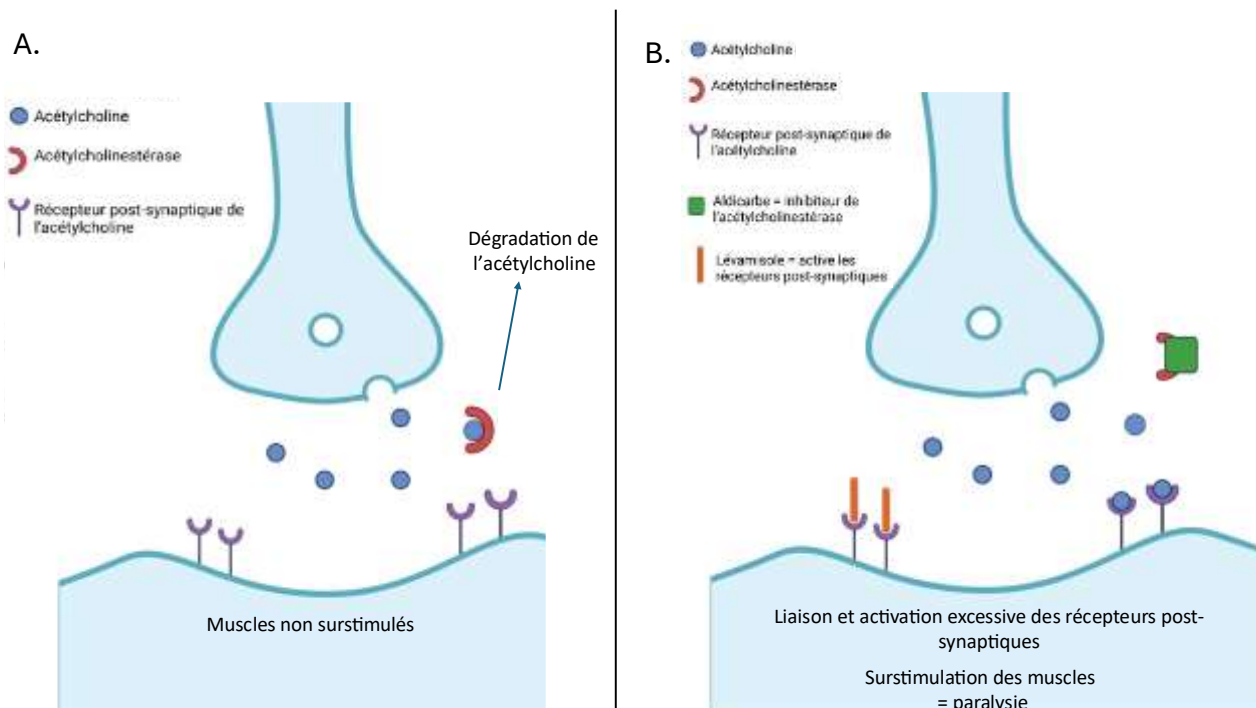


Figure 1.11. Tests pharmacologiques à l'aldicarbe et au lévamisole pour l'étude de la transmission cholinergique.

(A) Transmission synaptique normale. En condition normale, l'acétylcholine est libérée dans la fente synaptique par le neurone présynaptique, puis se lie temporairement à ses récepteurs post-synaptiques pour activer le muscle. L'acétylcholinestérase dégrade ensuite l'ACh, ce qui met fin au signal. Les muscles ne sont donc pas surstimulés. (B) Effets de l'aldicarbe et du lévamisole. L'aldicarbe inhibe l'acétylcholinestérase, empêchant la dégradation de l'ACh. Le lévamisole active directement les récepteurs post-synaptiques. L'un ou l'autre provoque une accumulation d'ACh ou une activation excessive des récepteurs, menant à une surstimulation musculaire qui se traduit par une paralysie.

## 1.6.2 *Danio rerio*, un vertébré modèle pour l'étude du développement et des troubles moteurs

### 1.6.2.1 Caractéristiques générales et développement embryonnaire

Le poisson-zèbre est un modèle vertébré largement utilisé pour l'étude des maladies génétiques, du développement embryonnaire et des fonctions neuronales (Howe et al., 2013). Sa fécondité élevée, entre 100 et 300 œufs par ponte avec une fréquence quasi quotidienne, facilite la constitution de populations synchronisées pour des analyses robustes (Kimmel et al., 1995 ; Howe et al., 2013 ; Lieschke et Currie, 2007). Le développement embryonnaire est rapide et s'accomplit en ~72 heures, de l'œuf fécondé à la larve libre, permettant une observation directe et continue (Kimmel et al., 1995). Les premières divisions cellulaires commencent 30 à 45 minutes après la fécondation, la gastrulation débute vers 5 hpf (heures post-fécondation), les grandes structures de l'organisme sont formées avant 24 hpf, et les larves nagent activement dès 5 jours post-fécondation (dpf) (Kimmel et al., 1995). La transparence des embryons et larves facilite leur observation par microscopie optique (Asakawa et Kawakami, 2008). Une étape clé du développement embryonnaire du poisson-zèbre est la somitogenèse, qui correspond à la formation segmentaire répétitive des somites, précurseurs des structures musculosquelettiques (Schröter et al., 2008). La formation des somites commence dès les premières heures après la fécondation et suit un rythme régulier. Ce rythme est contrôlé par une sorte de "métronome" interne, appelé horloge moléculaire, qui envoie des signaux à intervalles réguliers (Schröter et al., 2008). En même temps, une "vague" de signaux se déplace le long de l'embryon pour indiquer où chaque nouveau segment doit se former, assurant ainsi une organisation précise le long du corps (Schröter et al., 2008). Cette segmentation précise est cruciale pour la morphogenèse et la mise en place correcte de l'architecture corporelle, et elle représente un modèle important pour étudier les mécanismes régulateurs du développement chez les vertébrés (Schröter et al., 2008). Chez le poisson-zèbre, la somitogenèse progresse à un rythme d'environ un somite toutes les 30 minutes à 28 °C, si bien que le stade d'environ 20 somites est atteint autour de 18 heures post-fécondation (hpf), moment auquel apparaissent les premiers comportements moteurs tels que le *coiling* (Schröter et al., 2008 ; Kimmel et al., 1995).

### 1.6.2.2 Conservation génomique et outils génétiques

Le génome du poisson-zèbre a été entièrement séquencé, révélant une forte conservation avec celui de l'humain : environ 70 % des gènes humains ont un orthologue chez le poisson-zèbre, et 80 % des gènes associés aux maladies humaines sont également présents (Howe et al., 2013 ; Lieschke et Currie, 2007). Notamment, le gène *shq1* est présent chez *Danio rerio* (Zebrafish Information Network, 2023), et conserve les domaines fonctionnels essentiels à son rôle dans l'assemblage des complexes H/ACA snoRNP (Howe et al., 2013 ; Henras et al., 2015). Ce modèle est compatible avec de nombreux outils génétiques, notamment l'édition du génome par CRISPR-Cas9, qui permet d'introduire des mutations ciblées de manière efficace (Varshney et al., 2015). Le système CRISPR-Cas9 exploite la capacité de l'endonucléase Cas9, guidée par un ARN spécifique, à induire des cassures double-brin sur des séquences génomiques d'intérêt. Les mécanismes endogènes de réparation des dommages à l'ADN assurent ensuite la génération de mutations, telles que des insertions, des délétions ou des substitutions (Varshney et al., 2015). Grâce à la micro-injection de ce complexe directement dans les œufs fécondés, il est possible d'obtenir des poissons mosaïques, capables de transmettre les modifications génétiques à leur descendance (Varshney et al., 2015). La fécondité élevée du poisson-zèbre et la rapidité de son développement en font ainsi un système privilégié pour la création de lignées mutantes destinées à l'étude fonctionnelle des gènes (Lieschke et Currie, 2007). Ces différentes étapes de l'édition génétique et du suivi développemental du poisson-zèbre sont illustrées à la Figure 1.12, qui résume le principe de l'injection du complexe CRISPR/Cas9 au stade unicellulaire et les analyses possibles aux stades embryonnaire, larvaire et adulte.

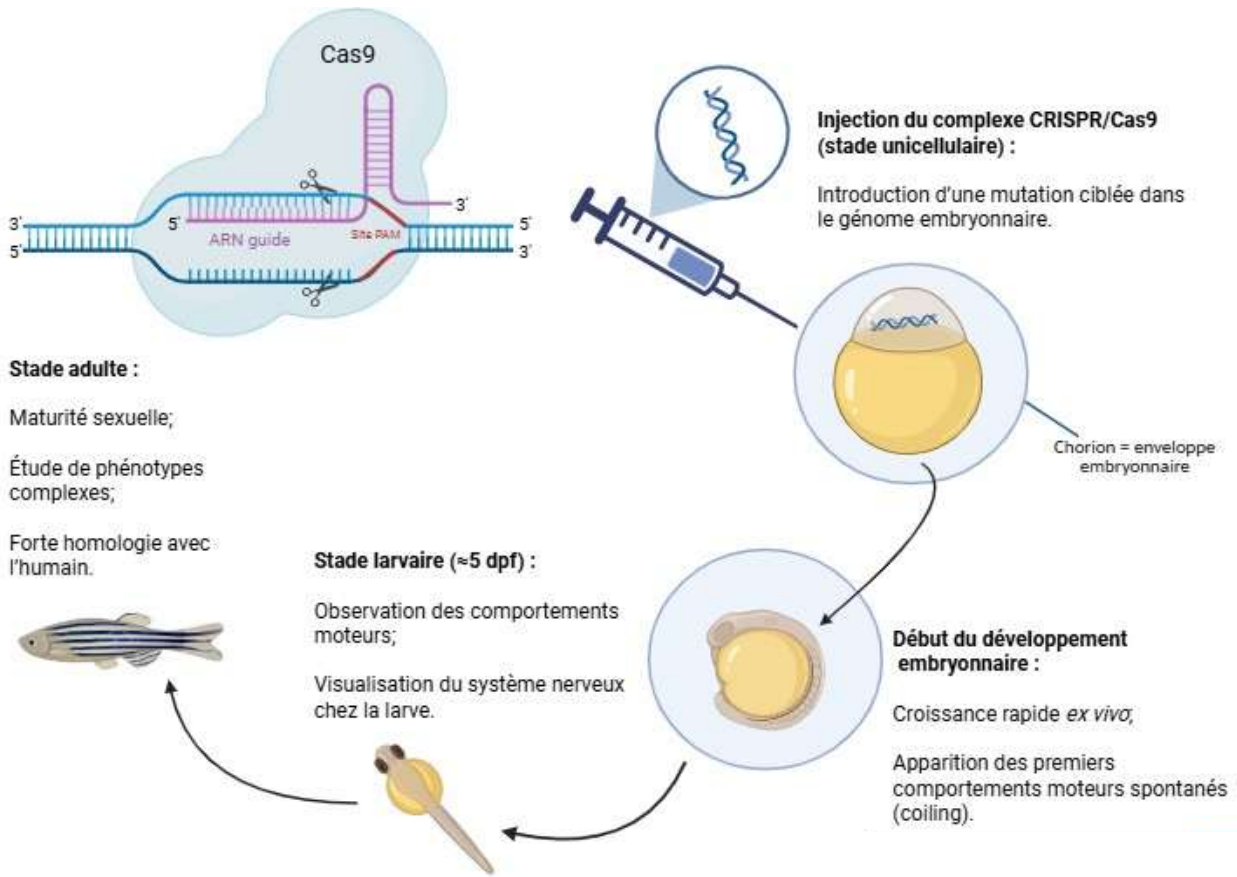


Figure 1.12. Étapes de la modification génétique et de l'analyse développementale chez le poisson-zèbre.

L'injection du complexe CRISPR/Cas9 au stade unicellulaire permet l'introduction de mutations ciblées dans le génome embryonnaire (Varshney et al., 2015). La transparence et le développement rapide des embryons facilitent ensuite l'observation *ex vivo* des effets génétiques, depuis l'apparition des premiers comportements moteurs spontanés (*coiling*) au cours du développement embryonnaire (Kimmel et al., 1995) jusqu'à la phase larvaire (~5 dpf), où le système nerveux fonctionnel peut être étudié *in vivo* (Ahrens et al., 2015). À l'âge adulte, les poissons atteignent la maturité sexuelle et présentent une forte homologie avec l'humain, ce qui en fait un modèle pertinent pour l'étude de phénotypes complexes et translationnels (Lieschke & Currie, 2007).

### 1.6.2.3 Comportements moteurs précoces et analyse fonctionnelle

Chez le poisson-zèbre, les comportements moteurs se manifestent très tôt pendant le développement embryonnaire, fournissant des indicateurs fonctionnels précoces du système moteur. Le premier comportement observable est le *coiling* spontané, un mouvement rythmique involontaire des embryons dans leur chorion, qui apparaît entre 17 et 21 hpf (Kimmel et al., 1995). Ce phénomène reflète l'activité coordonnée des motoneurones et des circuits moteurs primitifs, témoignant de la maturation initiale des

réseaux neuronaux moteurs (Sumbre et al., 2008). Dès 2 dpf, les larves développent la réponse d'échappement, un réflexe moteur rapide déclenché par des stimuli sensoriels aversifs et impliquant des circuits neuronaux plus élaborés (Kimmel et al., 1995 ; Sumbre et al., 2008). Ce comportement constitue un paramètre fonctionnel précieux pour évaluer la motricité et les effets des mutations génétiques ou des traitements pharmacologiques. Ces marqueurs comportementaux sont particulièrement adaptés à des études fonctionnelles rapides, permettant d'analyser l'impact de manipulations génétiques (édition CRISPR, surexpression transitoire) ou de composés pharmacologiques sur le développement du système moteur (Kimmel et al., 1995 ; Sumbre et al., 2008).

#### 1.6.2.4 Organisation et étude du système nerveux

Le système nerveux central du poisson-zèbre présente une organisation anatomique complexe mais bien conservée, avec des structures homologues à celles des autres vertébrés, ce qui rend ce modèle pertinent pour étudier les fonctions neurologiques humaines (Kalueff et al., 2014 ; Stewart et al., 2012). La Figure 1.13 illustre cette organisation, depuis le cerveau embryonnaire (30 heures post-fécondation, hpf) jusqu'au cerveau adulte, en mettant en évidence les principales régions cérébrales et leurs subdivisions (Vaz et al., 2019). Chez la larve (Figure 1.13.A), le cerveau se divise en quatre grandes régions (télencéphale, diencéphale, mésencéphale et rhombencéphale), qui correspondent à des territoires distincts à l'origine de structures cérébrales majeures, telles que le pallium, le bulbe olfactif, l'hypothalamus, le tectum et le cervelet. Chez l'adulte (Figure 1.13.B), ces domaines se sont différenciés en structures fonctionnelles majeures telles que le bulbe olfactif, le pallium, le tectum et le cervelet. La transparence des embryons et larves, ainsi que leur petite taille, permettent d'utiliser des techniques d'imagerie avancées, notamment la microscopie à fluorescence, pour visualiser *in vivo* les populations neuronales et suivre leurs dynamiques (Ahrens et Engert, 2015 ; Vaz et al., 2019). L'immunofluorescence, utilisant des anticorps primaires spécifiques, permet d'identifier différentes populations neuronales en ciblant des marqueurs protéiques précis, tels que la tubuline acétylée ou la tyrosine hydroxylase (McLean et Fetcho, 2004 ; Rink et Wullmann, 2002). Cette organisation anatomique et fonctionnelle conservée fait du poisson-zèbre un modèle particulièrement adapté pour étudier le développement neuronal, la neuroplasticité et les pathologies neurodéveloppementales.

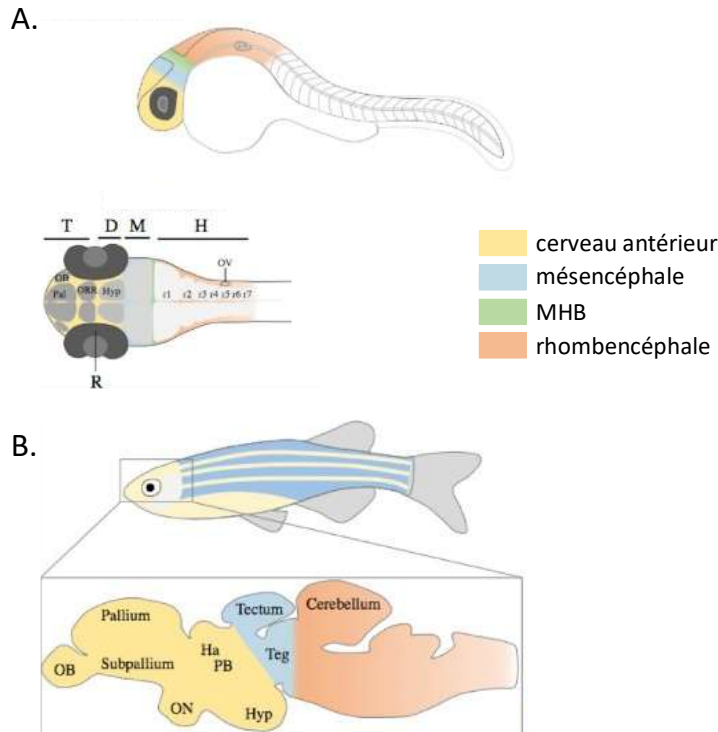


Figure 1.13. Organisation anatomique du système nerveux central chez le poisson-zèbre embryonnaire et adulte.

(A) Schéma du cerveau de larve de poisson-zèbre à 30 hpf : coupe coronale et sagittale illustrant les principales régions cérébrales, incluant le télencéphale (T), le diencéphale (D), le mésencéphale (M), la frontière mésencéphalo-rhombencéphalique (MHB) et le rhombencéphale (H). (B) Poisson-zèbre adulte avec un agrandissement du cerveau montrant les structures cérébrales différenciées : bulbe olfactif (OB), pallium, tectum et cervelet. Cette organisation reflète la conservation des structures cérébrales au cours du développement et leur pertinence en tant que modèle pour l'étude des fonctions neurologiques chez les vertébrés. Image tirée de Vaz et al. (2019).

### 1.6.3 Choix des modèles biologiques : complémentarité entre *C. elegans* et *Danio rerio*

Les modèles animaux *Caenorhabditis elegans* et *Danio rerio* ont été sélectionnés pour leur complémentarité dans l'étude fonctionnelle des mutations *SHQ1*, en raison de leur conservation génétique et de leurs spécificités biologiques. Chez *C. elegans*, le gène orthologue de *SHQ1* est désigné Y48A5A.1 (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998 ; WormBase, 2025), et conserve les domaines fonctionnels nécessaires à l'assemblage des snoRNP H/ACA. Ce modèle permet d'étudier les effets cellulaires et neuronaux des mutations dans un organisme simple et transparent, doté d'un système nerveux invariant et bien cartographié (White et al., 1986 ; Hobert, 2010). L'introduction ciblée de mutations par CRISPR-Cas9 facilite l'analyse rapide de phénotypes fonctionnels (Dickinson et Goldstein,

2016). Le poisson-zèbre, quant à lui, possède également un orthologue fonctionnel de *SHQ1* (*shq1*), dont la séquence et les domaines protéiques sont fortement conservés (Howe et al., 2013 ; Lieschke et Currie, 2007). Ce modèle vertébré présente une organisation du système nerveux proche de celle des mammifères et permet l'évaluation de comportements moteurs précoces (Kimmel et al., 1995 ; Sumbre et al., 2008). L'utilisation de CRISPR-Cas9, couplée à l'imagerie *in vivo* facilitée par la transparence embryonnaire, offre un cadre puissant pour analyser les conséquences des mutations *SHQ1* à l'échelle neurodéveloppementale et comportementale (Varshney et al., 2015; Ahrens et Engert, 2015). L'alignement des séquences de *SHQ1* entre *Homo sapiens*, *Danio rerio* et *Caenorhabditis elegans* (Figure 1.14) met en évidence une conservation marquée du domaine CS, impliqué dans la reconnaissance de la dyskérine, notamment entre l'humain et les deux modèles animaux. En revanche, la conservation du domaine SSD, qui assure un mimétisme ARN pour prévenir l'interaction prématurée de la dyskérine avec l'ARN guide, est plus marquée entre l'humain et le poisson-zèbre, en particulier dans sa région centrale (résidus ~200–350), tandis qu'elle est partiellement conservée chez *C. elegans*. Certains résidus critiques de *SHQ1*, impliqués dans l'interaction avec la dyskérine et identifiés par Walbott et al. (2011), sont conservés dans ces régions, bien que de façon plus fragmentaire chez le nématode. Ces observations suggèrent un maintien évolutif des modules impliqués dans l'assemblage des snoRNP H/ACA. Les données bio-informatiques obtenues renforcent ainsi la pertinence de ces deux modèles pour l'étude des effets fonctionnels des mutations *SHQ1*. La complémentarité entre *C. elegans* et *D. rerio*, alliant la simplicité génétique et neuroanatomique du nématode à la complexité cellulaire d'un modèle vertébré, offre un cadre expérimental pertinent pour explorer les conséquences des mutations de *SHQ1* à différents niveaux d'organisation biologique, du gène au comportement.



perturbent la motricité et la coordination neuronale en affectant les circuits moteurs et la fonction synaptique. Pour explorer cette hypothèse, deux modèles biologiques sont utilisés : *Caenorhabditis elegans* et *Danio rerio*. Leur simplicité, transparence et possibilités d'observation comportementale en temps réel permettent une analyse détaillée des effets des mutations sur le système nerveux.

Les objectifs spécifiques sont :

- (1) Construire des lignées mutantes de *SHQ1* dans les deux modèles pour disposer de systèmes expérimentaux comparables.
- (2) Évaluer les effets des mutations de *SHQ1* sur la motricité et la fonction neuronale dans les deux modèles, en mesurant la motilité et les comportements moteurs.
- (3) Identifier les altérations neuronales grâce à des approches d'imagerie, notamment la microscopie confocale et l'immunofluorescence.
- (4) Mettre en parallèle les observations obtenues chez *C. elegans* et *Danio rerio* afin d'identifier des mécanismes communs ou spécifiques aux deux espèces.

À travers cette approche, l'objectif est de mieux comprendre le rôle de *SHQ1* dans le développement neuronal et moteur, et d'ouvrir la voie à de futures stratégies thérapeutiques ciblant ces mécanismes.

## CHAPITRE 2

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le chapitre 2 décrit le matériel et les méthodes utilisés pour les études fonctionnelles menées chez *C. elegans* et le poisson-zèbre. Il présente la méthodologie de construction et le génotypage des souches, les techniques de microscopie et d'imagerie neuronales, ainsi que les tests de motricité et pharmacologiques appliqués chez *C. elegans*. Pour le poisson-zèbre, le chapitre détaille les conditions de maintenance, les injections CRISPR-Cas9, les méthodes de génotypage, les étapes de reproduction, ainsi que les tests comportementaux, l'observation morphologique et les analyses par microscopie.

#### 2.1 Études fonctionnelles chez *C. elegans*

##### 2.1.1 Construction et maintenance des souches

Toutes les souches de *C. elegans* utilisées dans cette étude sont maintenues à 20 °C sur des boîtes de Petri contenant du milieu NGM (*nematode growth media*)ensemencé avec *E. coli* OP50, selon les protocoles standards (Brenner, 1974). La souche N2 Bristol, considérée comme le type sauvage (WT) de référence, sert de lignée parentale pour les croisements génétiques (Brenner, 1974). Les tableaux ci-dessous présentent les différentes souches utilisées, incluant à la fois les souches témoins portant des rapporteurs fluorescents (Tableau 2.1) et celles construites spécifiquement pour les besoins expérimentaux (Tableau 2.2). Ces dernières sont obtenues par des croisements classiques entre la souche N2 et des individus porteurs d'allèles d'intérêt, permettant de combiner plusieurs mutations ou transgènes dans des génotypes stables. Pour toutes les lignées portant une mutation du gène *shq-1*, l'homozygotie de l'allèle muté a été systématiquement confirmée par génotypage avant utilisation expérimentale.

Tableau 2.1. Souches de *C. elegans* utilisées dans cette étude.

Nom de souche	Génotype	Transgène/Marqueur	Expression	Références
VQ1444	<i>ufls34</i> II	<i>Punc-17::gfp</i>	Neurones cholinergiques	Alfonso et al., 1993
VQ1445	<i>vsls48</i> X	<i>Punc-47::mCherry</i>	Neurones GABAergiques	McIntire et al., 1997
BY200	<i>vtls1</i>	<i>Pdat-1::gfp</i>	Neurones dopaminergiques (ADE, PDE, CEP)	Nass et al., 2002

Les souches listées ci-dessus ont été utilisées pour l'imagerie neuronale ciblée dans différents types de neurones. Chaque lignée transgénique exprime une protéine fluorescente (GFP ou mCherry) sous le contrôle d'un promoteur spécifique à un sous type neuronal: *unc-17p* pour les neurones cholinergiques (VQ1444), *unc-47p* pour les GABAergiques (VQ1445) et *dat-1p* pour les dopaminergiques (BY200).

Tableau 2.2. Souches de *C. elegans* générées dans cette étude.

Nom de souche	Génotype complet	Description
VQ2397	<i>shq-1(syb8953)</i> IV 2oc	Mutant E277K
VQ2632	<i>shq-1(syb9022)</i> 10C	Mutant E180Y
VQ2420	<i>shq-1 (syb8953)</i> IV 2OC; <i>ufls34</i> ; <i>vsls48</i>	Mutant E277K avec marquage GABAergique et cholinergique
VQ2636	<i>shq-1(syb9022)</i> 10C; <i>ufls34</i> ; <i>vsls48</i>	Mutant E180Y avec marquage GABAergique et cholinergique
VQ2578	<i>shq-1(syb8953)</i> IV 2OC; <i>vtls1</i>	Mutant E277K avec marquage dopaminergique

Les souches mutantes *shq-1(syb8953)* (E180Y) et *shq-1(syb9022)* (E277K) ont été générées par édition du génome à l'aide du système CRISPR-Cas9, un service réalisé par SunyBiotech (Fuzhou, Chine).

Ces lignées mutantes ont été croisées avec des souches transgéniques exprimant des marqueurs fluorescents spécifiques des neurones cholinergiques (*unc-17p::GFP*), GABAergiques (*unc-47p::mCherry*) ou dopaminergiques (*dat-1p::GFP*), permettant l'analyse morphologique des réseaux neuronaux dans différents fonds génétiques.

### 2.1.2 Géotypage des souches par PCR

Pour le géotypage des souches mutantes, l'ADN génomique a été extrait à partir de vers individuels ou de petits groupes d'animaux à l'aide d'un tampon de lyse dont les concentrations finales avaient été ajustées pour optimiser la digestion. Le tampon final contenait 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl pH 8,2 et 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, auxquels s'ajoutaient 0,45 % d'IGEPAL CA-630, 0,45 % de Tween-20 et 0,01 % de gélatine, conformément aux protocoles de lyse couramment utilisés chez *C. elegans*. Juste avant l'utilisation, de la protéinase K a été ajoutée au tampon pour atteindre une concentration finale d'environ 100 µg/mL, correspondant à une activité approximative de 2,5 à 6 U/mL selon le lot enzymatique. Les vers ont ensuite été placés directement dans ce tampon (25 µL pour des groupes de 16 à 25 individus ou 100 µL lors du lavage de plaques d'élevage), puis incubés dans un thermocycleur. La digestion a été effectuée à 60 °C pendant deux heures, suivie d'une inactivation de la protéinase K à 95 °C pendant vingt minutes. Le lysat obtenu a été conservé à 10 °C jusqu'à son utilisation pour les réactions de PCR. Le géotypage des mutations *shq-1* a été réalisé à l'aide d'amorces spécifiques permettant de distinguer les allèles mutés des allèles de type sauvage, dont les séquences sont présentées dans le Tableau 2.3.

Tableau 2.3. Séquences des amorces utilisées pour le géotypage des mutations E277K et E180Y chez *C. elegans*

Mutation ciblée	Sens de l'amorce	Séquence (5' → 3')	Utilisation	Taille du produit (pb)
E277K	Sens	AGCCGACACCCTGGAGCCTGA	Commune	234
	Anti-sens	CCACTTTCACAGGCCGACTT	Mutant	

	Anti-sens	CCACTTTCACACGCGGACTC	Sauvage	234
E180Y	Sens	GAGTTATTGAGAGACTCCGT	Mutant	83
	Anti-sens	CTTCGTCAAAGTTTTCCCAG	Mutant	
	Sens	GAGTTATTGAGAGGCTCAGA	Sauvage	83
	Anti-sens	CTTCATCAAAGTTTTCCCAA	Sauvage	

Les amorces dites « communes » sont utilisées pour amplifier à la fois l'allèle sauvage et l'allèle mutant, tandis que les amorces spécifiques permettent de discriminer entre ces deux variantes. La taille attendue des fragments PCR est indiquée en paires de bases (pb).

### 2.1.3 Amplification de l'ADN et analyse du génotypage par PCR

Les réactions de PCR ont été préparées dans un volume total de 25  $\mu$ L. La solution finale contenait de la bétaine à 1X, un tampon PCR  $Mg^{2+}$  à 1X, un mélange de dNTPs à 0,2 mM (soit 50  $\mu$ M de chaque base), chaque amorce à 2  $\mu$ M, et de la Taq DNA polymérase (Froggabio) à 0,03 U/ $\mu$ L. Deux microlitres d'ADN génomique extrait ont été ajoutés à chaque réaction. Le protocole de PCR a débuté par une étape de dénaturation initiale à 95 °C pendant 3 minutes, suivie de 35 cycles composés d'une dénaturation à 95 °C pendant 30 secondes, d'une hybridation à 59 °C pendant 30 secondes et d'une extension à 72 °C pendant 1 minute. La réaction s'est terminée par une extension finale à 72 °C pendant 5 minutes. Les produits de PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose. Un gel d'agarose à 1,5 % a été préparé dans du tampon TAE 1X, avec une concentration finale de GelRed (1X, soit 0,1  $\mu$ L/mL de solution stock 10 000X) (réf. SCT123, Milipore Sigma). Pour chaque échantillon, 15  $\mu$ L de produit de PCR ont été mélangés avec 3  $\mu$ L de tampon de chargement 6X (volume final 18  $\mu$ L) avant d'être déposés dans les puits du gel. La migration a été effectuée à 90 V pendant 30 à 45 minutes. Les bandes d'ADN ont été visualisées sous lumière UV à l'aide du système Alpha Innotech Multimager II. Une échelle de poids moléculaire (Low MW DNA Ladder, réf. N3233S, NewBioLabs) a été utilisée pour estimer la taille des fragments.

### 2.1.4 Phénotypage neuronale des souches par microscopie

#### 2.1.4.1 Marqueurs neuronaux utilisés

Afin d'identifier les phénotypes neuronaux dans les fonds mutants, trois souches transgéniques exprimant des marqueurs fluorescents ont été utilisées, chacune ciblant un sous-type neuronal spécifique (voir Tableau 2.1). Ces souches ont exprimé une protéine fluorescente sous le contrôle d'un promoteur neuronal spécifique : *unc-17p::gfp* pour les neurones cholinergiques, *unc-47p::mCherry* pour les neurones GABAergiques, et *dat-1p::gfp* pour les neurones dopaminergiques. Pour chaque transgène, des mâles de type sauvage ont été croisés avec des hermaphrodites porteurs du marqueur fluorescent. Les mâles hétérozygotes exprimant le transgène ont ensuite été croisés avec des hermaphrodites homozygotes pour la mutation. Les individus homozygotes mutants porteurs du transgène ont été sélectionnés après isolement de larves L4 exprimant le marqueur, suivi d'un double génotypage (par PCR et microscopie à fluorescence) à cinq jours d'intervalle pour confirmation sur deux générations. Ces souches recombinantes ont été utilisées pour l'analyse morphologique des réseaux neuronaux.

#### 2.1.4.2 Préparation des échantillons

Après validation des génotypes, les souches confirmées ont été maintenues et nourries pendant trois générations sur des plaques NGM ensemencées avec la souche bactérienne *E. coli* OP50 à 20 °C, afin d'assurer des conditions de croissance homogènes. Les vers ont été analysés au stade L4, période où les structures neuronales sont bien différenciées (Brenner, 1974).

#### 2.1.4.3 Immobilisation et acquisition des images

Les individus ont été placés sur un coussin d'agarose à 5 %, puis immobilisés par un traitement à l'azide de sodium (75 mM) avant d'être recouverts d'une lamelle. Les observations ont été réalisées à l'aide d'un microscope à fluorescence Zeiss AxioScope A1 équipé d'une caméra AxioCam, et les images ont été traitées à l'aide du logiciel ImageJ (win64) (Schindelin et al., 2012).

#### 2.1.4.4 Critères d'analyse neuronale

L'analyse a porté sur des régions spécifiques du système nerveux. Elle s'est focalisée sur le côté gauche de l'animal, utilisé comme référence anatomique standard pour l'observation des commissures GABAergiques (neurones DD et VD) et des neurones cholinergiques (White et al., 1986) (Figure 2.1). Les observations ont également inclus les neurones dopaminergiques de types ADE, PDE et CEP, ainsi que la corde dorsale cholinergique, notamment pour évaluer la continuité des faisceaux axonaux et détecter

d'éventuels défauts de guidage ou de fasciculation. Les critères morphologiques ont compris la présence ou l'absence des commissures, la continuité ou discontinuité des projections axonales, la localisation des corps cellulaires, ainsi que la présence d'anomalies telles que des erreurs de guidage axonal.



Figure 2.1. Représentation schématique des commissures cholinergiques et GABAergiques du côté gauche d'un ver *C. elegans* de type sauvage.

Les commissures des neurones GABAergiques (en rouge, à gauche) et des cholinergiques (en vert, à droite) sont représentés en focalisant sur le côté gauche de l'animal. On retrouve une commissure GABAergique correspondant au neurone DD1, ainsi que sept neurones cholinergiques répartis le long du corps. Cette illustration est adaptée du mémoire de Cerdeira (2022).

#### 2.1.5 Tests de motricité

##### 2.1.5.1 Test de nage

L'analyse de la locomotion a été réalisée selon un protocole adapté de Nawa & Matsuoka (2012), permettant d'évaluer les capacités motrices spontanées des vers dans un environnement liquide. Les animaux ont été sélectionnés au stade L4 et transférés sur des plaques NGM fraîchement ensemencées environ 20 heures avant l'essai, afin d'obtenir des jeunes adultes. Le jour du test, chaque ver a été transféré individuellement dans une goutte de 8  $\mu$ L de solution M9 déposée sur une lame de microscope. Le transfert a été effectué avec un minimum de bactéries pour ne pas interférer avec l'observation. Les mouvements des vers ont été filmés pendant 30 secondes à l'aide d'un microscope stéréoscopique équipé d'un adaptateur pour caméra de téléphone mobile. Le nombre de flexions latérales complètes du corps a été compté manuellement pendant la durée d'enregistrement pour chaque individu. Ce test a été appliqué aux lignées mutantes ainsi qu'aux contrôles, afin de détecter d'éventuelles altérations motrices liées aux mutations.

##### 2.1.6 Tests pharmacologiques

Des tests de sensibilité à l'aldicarbe et au lévamisole ont été utilisés pour évaluer les fonctions de transmission synaptique. Des individus au stade L4 ont été sélectionnés la veille de l'expérience, afin de

disposer de jeunes adultes au moment du test. Des plaques de culture contenant respectivement 1 mM d'aldicarbe ou 100  $\mu$ M de lévamisole ont été préparées. Un groupe de 15 vers par plaque a été exposé simultanément sur les plaques contenant les composés. Les animaux mutants et témoins ont été évalués en parallèle. Pour détecter la paralysie, une stimulation tactile consistant en trois tapotements successifs sur le nez et la queue des vers à l'aide d'une anse de platine a été appliquée. L'absence de réponse motrice après ces stimulations a été considérée comme un critère de paralysie. L'état moteur des vers a été évalué toutes les 15 minutes. Les observations se sont poursuivies jusqu'à paralysie totale de tous les vers.

## 2.2 Poisson zèbre

### 2.2.1 Maintenance des poissons et lignées utilisées

Les poissons-zèbres (*Danio rerio*) ont été élevés dans une eau douce maintenue à 28,5 °C, aux paramètres contrôlés, et ont été soumis à un cycle lumière/obscurité de 12 heures, conformément aux protocoles décrits (Kimmel et al., 1995). La reproduction a été réalisée selon les procédures standards (Westerfield, 1995). Toutes les expériences ont été menées conformément aux directives du Conseil canadien de protection des animaux (CCPA) et réalisées au Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM). Les poissons utilisés dans cette étude n'ont pas été conservés pendant toute leur durée de vie, mais il est important de préciser que, dans des conditions aquacoles optimales, *D. rerio* peut atteindre une longévité de 1,5 à 2 ans en aquarium. L'euthanasie chez un poisson adulte a été réalisée par immersion dans une solution d'eau refroidie à 2,4 °C, sans contact direct avec la glace, pendant au moins 10 minutes après l'arrêt du mouvement operculaire, selon les recommandations institutionnelles en vigueur (McGill University, 2024).

### 2.2.2 Maintien des larves de 0 à 5 jours post fertilisation

Les larves de poisson-zèbre ont été maintenues à 28,0 °C dans un incubateur réglé sur un cycle jour/nuit de 12 h/12 h. Le jour de la ponte (0 dpf), les œufs ont été triés afin de garder seulement les embryons fécondés. Par la suite, les embryons et les larves ont été inspectés quotidiennement afin de retirer les individus morts et/ou présentant des malformations non phénotypiques. L'euthanasie des embryons (avant 3 dpf) et des larves jeunes (3–7 dpf) a été réalisée par immersion dans une solution diluée de sodium hypochlorite (1 part d'hypochlorite à 6 % pour 5 parts d'eau) (McGill University, 2024). Le milieu de culture a été changé tous les jours. Les larves ont été maintenues jusqu'à 5 jours dans du milieu E3, préparé à partir d'une solution mère concentrée à 60X. Cette solution stock contenait les composés aux concentrations suivantes : 300 mM NaCl, 10 mM KCl, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, et 30 mg/L de bleu de

méthylène. Le pH a été ajusté à 7,2 à l'aide de NaOH ou KOH. La solution a ensuite été stérilisée par autoclave et conservée à 4 °C. Lors de l'utilisation, un volume approprié de solution 60X a été dilué dans de l'eau distillée pour obtenir une solution E3 à 1X. Après les 5 premiers jours post-fécondation passés en incubateur, les larves ont été transférées à l'animalerie pour la suite de leur développement.

### 2.2.3 Génération des lignées mutantes

Des embryons F0 ont été injectés avec le complexe CRISPR/Cas9 ciblant le gène *shq1* afin de créer les mutations D174Y ou E283K (Figure 2.2, étape 1). Après une croissance de 4 à 6 mois, chaque poisson de la génération F0 a été criblé sur sa descendance par croisement avec une lignée sauvage. Cinquante œufs provenant de chaque poisson F0 ont été analysés par HRM (*High-Resolution Melting*, une méthode basée sur l'analyse des courbes de fusion d'ADN permettant de détecter rapidement des variations de séquence), puis par séquençage lorsqu'une amplification précoce a été détectée (voir méthode de génotypage). Lorsqu'un poisson a été capable de transmettre la mutation souhaitée à sa descendance, il a été désigné comme poisson F0 fondateur. À taille adulte, chaque poisson de la génération F1 a ensuite été créé par reproduction du poisson fondateur avec un poisson sauvage (Figure 2.2, étape 2). Chaque poisson F1 a été génotypé individuellement à l'aide d'un prélèvement de fragment de queue. Les poissons hétérozygotes (mâles et femelles) ont été sélectionnés et croisés entre eux afin de produire des larves de génération F2, comprenant trois génotypes distincts selon la distribution mendélienne attendue : 25 % WT, 50 % hétérozygotes (WT/D174Y) et 25 % homozygotes mutants (D174Y) (Figure 2.2, étape 3). Les analyses expérimentales ont été réalisées directement sur les larves F2, entre 5 et 7 jours post-fécondation, sans élevage jusqu'à l'âge adulte.

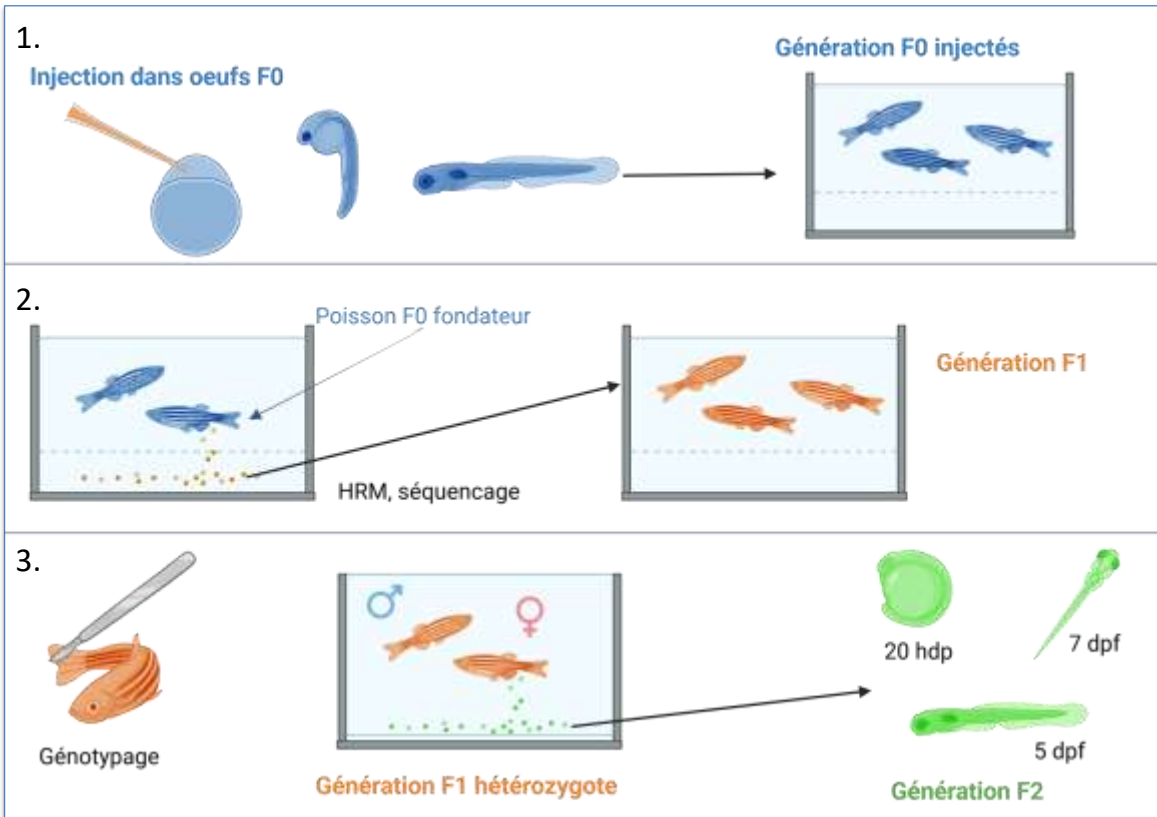


Figure 2.2. Génération de poissons zèbres mutants par édition CRISPR/Cas9.

Schéma illustrant les étapes ayant conduit à l'obtention d'une génération stable permettant l'étude fonctionnelle du gène *shq1*. (1) Des embryons sauvages au stade 1 cellule (F0) ont été injectés avec le complexe CRISPR/Cas9. Les poissons F0 injectés ont été élevés jusqu'à l'âge adulte, (2) puis croisés avec des poissons sauvages pour obtenir la génération F1. Les œufs issus de ces croisements ont été analysés (HRM et séquençage) afin d'identifier un poisson fondateur F0 transmettant la mutation. Les descendants F1 ont été élevés et (3) génotypés par prélèvement de tissu caudal. Les individus hétérozygotes ont été sélectionnés et croisés entre eux pour générer la génération F2.

#### 2.2.4 Design des *single guide* RNA et ssODN

Les séquences d'ARN guide (ARNg) ciblant les mutations D174Y et E283K du gène *shq1* ont été conçues à l'aide de l'outil en ligne CRISPRscan. Pour la mutation D174Y, la séquence ciblée a été : 3' CCAACGCTGAACTCAGAAGACGC 5', avec le site PAM (CCA). Pour la mutation E283K, la séquence ciblée a été : 5' CTATGATGTGCGCACTACAGAGG 3', avec le site PAM (AGG). Afin d'introduire les mutations ponctuelles D174Y (Asp174Tyr) ou E283K (Glu283Lys) dans le gène *shq1*, des oligonucléotides simple brin

(ssODN) ont été utilisés comme matrices de réparation homologue de l'ADN lors de la microinjection (Tableau 2.4).

### 2.2.5 Microinjection au stade unicellulaire

Des œufs sauvages de la souche Tübingen long fin (TL) ont été collectés dès leur ponte. Pour chaque lignée mutante, 1 nL d'un mélange contenant 100 ng/μL d'ARNm Cas9, 30 ng/μL (E283K) ou 100 ng/μL (D174Y) d'ARN guide, et 10 ng/μL du ssODN spécifique a été injecté au stade unicellulaire (0 à 30 minutes post-fécondation) à l'aide d'un Picospritzer IV.

Tableau 2.4. : Séquences des ssODN utilisés pour l'introduction des mutations ciblées D174Y et E283K dans le gène *shq1*.

Mutation ciblée	Codon WT → Mutant	Séquence ssODN (5'→3')
<b>D174Y</b>	GAC → TAC	AGGAGCTGAATGAGGTGATTGACATGAAGGAcCCA <u>TACA</u> AtCaA AtGCcGAgCTtAGAAGACGCAATCGACTAGACACAGAGACTG
<b>E283K</b>	GAG → AAG	TGGACATCATCTTGGCGTACGTCTATGATGTtCGaACcACgGAaGG <u>AAG</u> GcAtAAcGTAAGTGCACCTTTGAATGCCACAGACATCT  Erreur dans la conception du ssODN.

Les séquences des oligonucléotides simple brin (ssODN) sont présentées en orientation 5' → 3'. La mutation d'intérêt est indiquée en rouge (D174Y : GAC → TAC ; E283K : GAG → AAG), soulignée. Les mutations silencieuses, introduites afin d'éviter la recoupe par la Cas9 ou de faciliter la détection génotypique, sont surlignées en jaune et en minuscule. Une erreur dans la conception du ssODN pour E283K a été identifiée. Le codon GAG a été modifié en AGG (Arginine) au lieu d'AAG (Lysine), ce qui ne correspond pas à la mutation souhaitée (voir section Résultats).

## 2.2.6 Méthode de géotypage

### 2.2.6.1 Extraction de l'ADN génomique sur des embryons jusqu'à 5 jours post fertilisation (dpf) ou chez l'adulte

Les poissons adultes ont été anesthésiés à l'aide de tricaine méthanesulfonate (MS222) à une concentration finale de 160 mg/L, puis un petit fragment de la nageoire caudale (1 mm) a été coupé à l'aide d'une lame affûtée. Les poissons ont ensuite été immédiatement remis dans de l'eau claire (Samarut et al., 2016). Le fragment de nageoire a été déposé dans un tube PCR contenant 20 µL de NaOH 50 mM. Les échantillons ont été incubés pendant 10 minutes à 95 °C dans un thermocycleur (Biorad), puis 2,2 µL de Tris-HCl 100 mM pH 8 ont été ajoutés pour tamponner la solution, comme décrit précédemment (Meeker et al., 2007 ; Samarut et al., 2016). Les échantillons d'ADN extraits à partir d'embryons de plus de 1 dpf ont été dilués avant utilisation par l'ajout de 180 µL d'eau stérile.

### 2.2.6.2 *High-Resolution Melting* (HRM)

Les amorces ont été conçues à l'aide de l'outil Universal Probe Library Assay Design Center (Roche) (Tableau 2.5). Les réactions de HRM ont été préparées dans un volume final de 5 µL, de manière à obtenir une concentration finale de 1X en Precision Melt Supermix, ainsi que des amorces sens et antisens chacune à 5 µM. L'ADN génomique a été ajouté de façon à atteindre une concentration finale de 0,2 µg/µL, et le volume restant a été complété avec de l'eau stérile. Les analyses de HRM ont été réalisées sur un LightCycler 96 (Roche) dans des plaques blanches à 96 puits. Le protocole suivait les conditions du programme EvaGreen : une dénaturation initiale à 95 °C pendant 2 minutes, suivie de 45 cycles comprenant une étape de dénaturation à 95 °C pendant 10 secondes et une hybridation/extension à 60 °C pendant 30 secondes. Une analyse de courbe de fusion haute résolution a ensuite été effectuée après une dénaturation à 95 °C pendant 30 secondes, un refroidissement à 60 °C pendant 60 secondes, puis une montée progressive de la température à un rythme de 0,02 °C/s jusqu'à 95 °C, avant un refroidissement final à 40 °C. Les courbes de fusion et la distinction des géotypes ont été analysées à l'aide du logiciel LightCycler 96 (version 1.1.0.1320).

Tableau 2.5. Amorces utilisées pour l'analyse HRM des mutations *shq1*

Mutation	Type d'HRM	Amorces (5' → 3')	Taille amplicon (pb)
<b>D174Y</b>	HRM classique	Sens : TGAATGAGGTGATTGACATGAAGG Antisens : GTAATGGTCAGCACAAAATACTGCA	104
	HRM spécifique	Sens : CCCATACAATACAAATGCCGAGCTT Antisens : GTAATGGTCAGCACAAAATACTGCA	451
<b>E283K</b>	HRM classique	Sens : CGCGCTTTCATGTCTGGTTGG Antisens : CGCAGAGAGATGTCTGTGGC	121
	HRM spécifique	Sens: TTCGAACCACGGAAGGAAGGCATAAC <b>Amorce conçue à partir du mauvais ssODN.</b> Antisens: CGCAGAGAGATGTCTGTGGC	413

L'amorce spécifique HRM pour la mutation E283K a été conçue pour reconnaître le ssODN du tableau 2.3.

### 2.2.6.3 PCR et séquençage

Les amorces pour l'amplification des régions entourant les sites cibles CRISPR du gène *shq1* (mutations D174Y et E283K) ont été conçues à l'aide du logiciel Universal Probe Library (Roche). Le tableau 2.6 présente les séquences de ces amorces ainsi que la taille des amplicons correspondants. Les réactions de PCR ont été réalisées dans un volume final de 25 µL, en utilisant une concentration finale de 200 µM de chaque dNTP, 0,2 µM de chaque amorce, 1X de tampon PCR, et 0,5 U de Taq polymérase, avec de l'ADN génomique ajouté à une concentration finale d'environ 40 ng/µL. Le protocole d'amplification comprenait une dénaturation initiale à 94 °C pendant 5 minutes, suivie de 35 cycles de 94 °C pendant 30 secondes,

60 °C pendant 30 secondes et 72 °C pendant 45 secondes, puis une extension finale à 72 °C pendant 10 minutes. Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose. Les gels ont été préparés à une concentration finale de 1,5 % d'agarose dans du tampon TAE 1X, avec l'intercalant Froggastain ajouté à une concentration finale de 1X. Les échantillons PCR ont été déposés sur gel en présence d'un tampon de chargement 6X, puis ont migré à 90 V pendant 20 minutes. La visualisation a été effectuée sous UV à l'aide d'un système Azure Biosystems c150, en comparaison avec une échelle d'ADN 100 bp chargée à 0,1 µg/µL. Les produits PCR présentant une bande de la taille attendue ont été envoyés pour un séquençage Sanger unidirectionnel au Centre Génome Québec, à l'aide d'un séquenceur capillaire Applied Biosystems 3730xl.

Tableau 2.6. Amorces utilisées pour l'amplification PCR et le séquençage des sites ciblés dans le gène *shq1*.

Mutation ciblée	Amorces (5' → 3')	Taille de l'amplicon (pb)
<b>D174Y</b>	Sens: CCACAAGTACGGCTTTGGAAATC Anti-sens : AAATGTCAAAGCCCATTCCCCTAA	451
<b>E283K</b>	Sens : CGGCTTTGACTGTATCTCCCT Anti-sens: TCCATACAATTACAGCCATGTGC	413

## 2.2.7 Test de motricité

### 2.2.7.1 Analyse des enroulements (*coiling*)

Les embryons F2 âgés d'environ 18 hpf (stade correspondant à ~20 somites) ont été immobilisés dans de l'agarose à faible point de fusion puis recouverts de milieu E3. Leurs mouvements spontanés à l'intérieur du chorion ont été filmés pendant 20 minutes à l'aide d'un microscope stéréoscopique équipé d'un adaptateur pour caméra mobile. L'analyse du nombre de contractions a été réalisée avec le logiciel Danioscope (Noldus).

#### 2.2.7.2 Test de nage

Les larves de 5 et 7 dpf ont été placées individuellement dans les puits d'une plaque 96 puits à fond plat, conformément aux pratiques standards utilisées pour les analyses comportementales et les criblages à haut débit chez le poisson-zèbre (Richendrfer, 2013). Leur activité locomotrice a été enregistrée à l'aide d'une caméra Basler GenICam intégrée à une chambre d'enregistrement DanioVision (Noldus). Le protocole d'enregistrement s'est étalé sur un total de 2 h 30 min : 30 minutes dans l'obscurité pour une phase d'adaptation, suivies de 30 minutes supplémentaires dans le noir durant lesquelles la caméra a été activée. Une phase d'exposition à la lumière de 60 minutes a été appliquée, puis la lumière a été éteinte pour une dernière période de 30 minutes. L'analyse et la quantification de la distance parcourue ont été effectuées à l'aide du logiciel EthoVision XT 12 (Noldus).

#### 2.2.8 Observation morphologique

À 5 dpf, des larves WT et D174Y ont été anesthésiées, puis des images dorsales et latérales du corps entier ont été capturées à l'aide d'un microscope stéréoscopique équipé d'un adaptateur pour caméra de téléphone mobile. Les mesures de la longueur corporelle, de la taille des yeux et de la longueur de la tête ont été réalisées à l'aide du logiciel ImageJ (win64). La longueur corporelle a été mesurée de la pointe antérieure de la tête jusqu'au pédoncule caudal (Figure 2.3.A). La taille des yeux a été déterminée par le diamètre de chaque œil (Figure 2.3.B), et la longueur de la tête a correspondu à la distance entre la pointe antérieure de la tête et la limite postérieure de la tête (Figure 2.3.C).

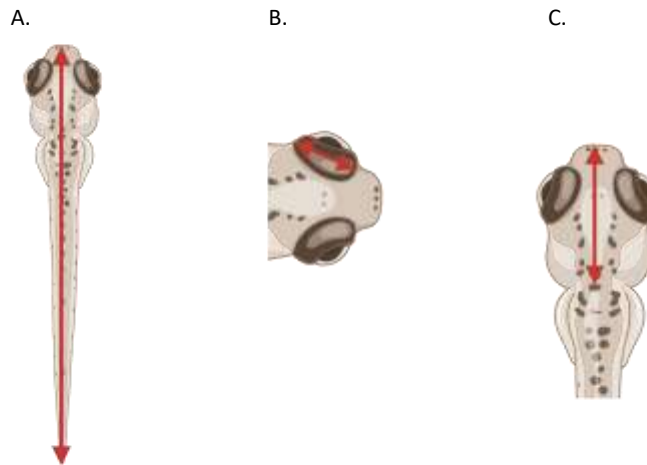


Figure 2.3. Représentation schématique des mesures de morphologie chez les larves de poisson-zèbre

(A) Mesure de la longueur totale du corps, de la tête à l'extrémité de la queue.

(B) Mesure du diamètre de l'œil.

(C) Mesure de la longueur de la tête, de l'extrémité antérieure au début du tronc.

### 2.2.9 Immunofluorescence

Les larves de 5 dpf ont été fixées toute une nuit à 4 °C dans de la paraformaldéhyde à 4 % (ThermoScientific, réf. 28908). Le lendemain, elles ont été lavées à plusieurs reprises pendant une heure avec du PBS 1X-Triton 1 % (Sigma-Aldrich, réf. X100-500ML). Ensuite, les larves ont été incubées pendant 30 minutes dans une solution de blocage composée de 2 % de sérum normal de chèvre (Jackson Laboratory, réf. 005-000-121), 1 % de BSA, 1 % de DMSO et PBS 1X-Triton 1 %, puis rincées plusieurs fois avec du PBS 1X-Triton 1 %. Les larves de poisson-zèbre ont ensuite été incubées toute la nuit à 4 °C avec un anticorps primaire monoclonal anti-acétyl-tubuline (clone 6-11B-1, souris, Sigma-Aldrich, réf. T7451), spécifique des microtubules acétylés (Drummond et Austin-Tse, 2013), ou un anticorps anti-tyrosine hydroxylase (clone aTH, souris, DSHB), spécifique des neurones dopaminergiques chez le poisson-zèbre (Schweitzer et Driever, 2009). Après plusieurs lavages au PBS 1X contenant 0,1 % de Tween (Sigma-Aldrich, réf. P5927), les larves ont été incubées toute la nuit à 4 °C avec un anticorps secondaire Goat anti-Mouse IgG (H+L), conjugué Alexa Fluor 488 (Invitrogen, réf. A-11001, RRID: AB\_2534069), dilué dans la solution de blocage. Pour l'imagerie, les larves ont été positionnées dans de l'agarose à faible point de fusion à 0,5 % (ThermoScientific, réf. 16520-050) et observées au microscope confocal Zeiss ou Olympus avec des

objectifs 20X ou 40X. Le traitement des images a été effectué à l'aide de Volocity (Quorum Technologies). Le nombre de neurones dopaminergiques TH<sup>+</sup> a été compté manuellement, et l'intensité de fluorescence a également été quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ (win64).

### 2.3 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel GraphPad Prism (version 8). La comparaison de deux groupes a été réalisée à l'aide d'un test t de Student non apparié, précédé d'un test de Fisher pour vérifier l'homogénéité des variances. Lorsque les variances étaient homogènes, un test t bilatéral a été appliqué. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne (SEM). Pour les comparaisons entre plus de deux groupes, une analyse de variance (ANOVA) à un facteur a été utilisée, avec vérification de l'homogénéité des variances par les tests de Brown-Forsythe et de Bartlett. Les données de survie ont été analysées par le test de Log-rank (Mantel-Cox). Les pourcentages d'animaux présentant un phénotype ont été comparés par test t de Student non apparié, après vérification des conditions d'application. Un seuil de significativité de  $p < 0,05$  a été retenu pour toutes les analyses statistiques. Les différences non significatives sont indiquées par la mention "ns". Les détails des tests appliqués et des valeurs statistiques obtenues sont précisés dans la présentation des résultats.

## CHAPITRE 3

### RÉSULTATS

Le Chapitre 3 présente les résultats obtenus dans les modèles *C. elegans* et *Danio Rerio*. Chez *C. elegans*, des tests de nage, des observations microscopiques des motoneurones et des neurones dopaminergiques, ainsi que des tests pharmacologiques ont été réalisés pour évaluer les effets des mutations. Du côté du poisson-zèbre, les lignées *knock-in* ont été générées et validées à travers plusieurs étapes de génotypage. Des analyses fonctionnelles ont ensuite permis d'évaluer l'impact de la mutation D174Y sur le comportement embryonnaire, la motricité post-éclosion, la morphologie larvaire et l'organisation du système nerveux.

#### 3.1 Chez *C. elegans*

##### 3.1.1 Génération des souches mutantes *shq-1*(E180Y) et *shq-1*(E277K)

Les souches *C. elegans* portant les mutations ponctuelles *shq-1*(E180Y) et *shq-1*(E277K) ont été générées par SunyBiotech (souches PHX9022 et PHX90XX, allèles *syb9022* et *syb90XX*), à l'aide de l'édition génomique CRISPR-Cas9. Le service comprenait la conception des ARN guides, la préparation du plasmide donneur, la micro-injection, le criblage des animaux F1 et l'établissement de lignées homozygotes vérifiées par séquençage. Pour chaque mutation, SunyBiotech a d'abord conçu un ARN guide ciblant spécifiquement la région codante du gène *shq-1* (Y48A5A.1) contenant le codon à modifier. Des complexes ribonucléoprotéiques Cas9–ARN guide ont été injectés dans le syncytium germinale des hermaphrodites N2, accompagnés d'un oligonucléotide simple brin (ssODN) servant de matrice de réparation par recombinaison homologue. Cette matrice contenait : la mutation désirée (E180Y ou E277K), des mutations silencieuses supplémentaires introduites dans le site PAM ou dans la séquence reconnue par l'ARN guide, afin d'empêcher la recoupe du locus après réparation (comme recommandé par SunyBiotech).

### 3.1.2 Vérification des génotypes

Avant d'entreprendre les analyses fonctionnelles, l'identité génétique des souches mutantes a été confirmée par PCR à l'aide des amorces présentées au Tableau 2.3. Pour chaque mutation (E180Y et E277K), deux réactions distinctes ont été réalisées : l'une spécifique de l'allèle sauvage et l'autre spécifique de l'allèle muté. Les produits amplifiés ont ensuite été séparés sur gel d'agarose à 1,5 % aux côtés d'une échelle moléculaire, d'un contrôle négatif (eau) et d'un ADN de type sauvage (N2). Les vers mutants présentaient une bande unique dans la réaction amplifiant l'allèle muté, tandis qu'aucun signal n'était détecté avec les amorces reconnaissant l'allèle sauvage, confirmant leur homozygotie. Inversement, l'ADN N2 ne montrait qu'une amplification de l'allèle WT. Aucun signal n'a été observé dans les contrôles négatifs, attestant de l'absence de contamination.

### 3.1.3 Analyse de la mobilité

Dans le but d'évaluer si les mutations introduites dans le gène *shq-1* chez le ver *C. elegans* peuvent reproduire certains phénotypes moteurs observés chez les patients porteurs de mutations analogues dans *SHQ1* (Sleiman et al., 2022), une première analyse comportementale a été réalisée, basée sur un test de nage. Chez *C. elegans*, la nage en milieu liquide constitue une approche bien établie pour détecter des altérations de la motricité, car elle permet de mesurer de manière fiable l'activité musculaire et neuronale sous-jacente (Buckingham et Sattelle, 2009). Les capacités locomotrices des mutants E180Y et E277K ont pu être comparées à celles des vers de type sauvage (WT) à l'aide de ce protocole (Figure 3.1).

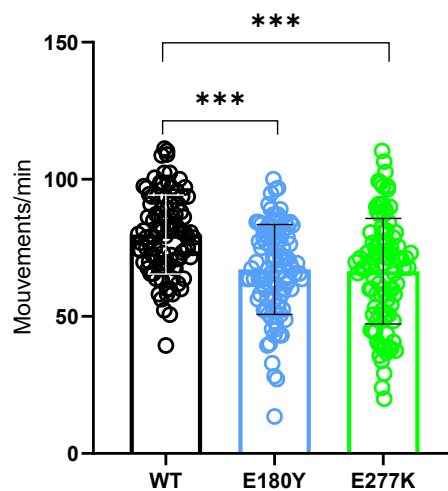


Figure 3.1. Analyse du nombre de battements par minute chez les mutants *shq-1*

Quantification du nombre de mouvements de nage par minute chez les adultes de *C. elegans* de type sauvage (WT, noir, n = 100), porteurs de la mutation E180Y (bleu, n = 100) ou E277K (vert, n = 100). Les barres représentent la moyenne  $\pm$  SEM, les points individuels correspondant aux valeurs pour chaque animal. Les analyses statistiques ont été réalisées par test t non apparié, montrant une diminution significative du nombre de mouvements chez les mutants E180Y ( $p < 0,0001$ ) et E277K ( $p < 0,0001$ ) par rapport au type sauvage.

Les résultats montrent que le type sauvage présente une motilité moyenne de 79,86 mouvements par minute, tandis que les mutants E180Y et E277K affichent des moyennes respectives de 67,13 et 66,47 mouvements par minute. Cette diminution de la motilité observée chez les mutants E180Y et E277K suggère que ces variantes de *shq-1* altèrent des fonctions nécessaires à la locomotion, une hypothèse que nous avons explorée plus en détail en examinant l'état des circuits moteurs GABAergiques et cholinergiques. Chez *C. elegans*, la locomotion repose sur l'activité coordonnée des motoneurones cholinergiques, qui induisent la contraction musculaire, et des motoneurones GABAergiques, responsables de l'inhibition des muscles antagonistes (McIntire et al., 1993 ; Hall et Hedgecock, 1991).

#### 3.1.4 Motoneurones

Dans les figures 3.2, 3.3 et 3.4, seules des images représentatives du mutant E277K sont présentées, car l'illustration porte uniquement sur les défauts spécifiquement examinés chez ce variant. Les mêmes types d'altérations ont été analysés chez E180Y.

##### 3.1.4.1 GABAergiques

La motricité chez *C. elegans* dépend d'une coordination entre les motoneurones excitateurs cholinergiques et inhibiteurs GABAergiques (McIntire et al., 1993 ; Hall et Hedgecock, 1991). Il s'agit ici de déterminer si les troubles locomoteurs observés chez les mutants sont liés à un défaut dans l'un ou l'autre de ces circuits. Dans un premier temps, l'analyse porte sur les motoneurones GABAergiques. Les altérations des neurones GABAergique et cholinergiques sont généralement évalués à l'aide de la stéréotypie de guidage de leur commissure, soit une pour les GABAergiques et sept pour les cholinergiques du côté gauche de l'animal. Ces analyses ont été faites par microscopie à fluorescence à l'aide d'un rapporteur spécifique des neurones GABAergiques, ce qui permet d'observer leur morphologie et leur organisation.

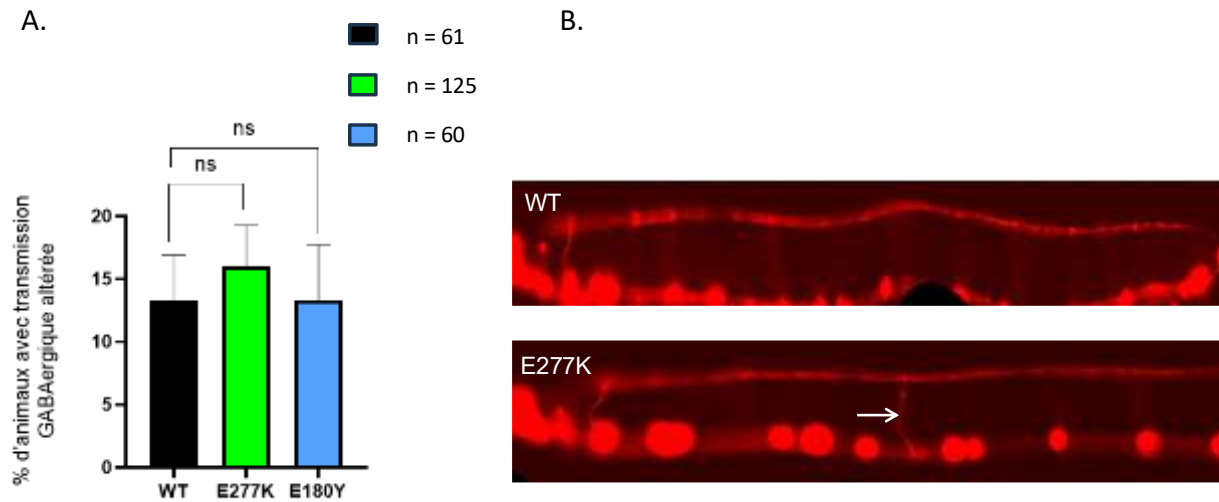


Figure 3.2. Aucune altération significative de l'organisation des motoneurones GABAergiques chez *C. elegans* porteurs des variants E180Y et E277K.

Seule une image représentative du variant E277K est présentée ; les mêmes analyses morphologiques ont été réalisées et observées pour E180Y. (A) Pourcentage d'animaux L4 présentant une altération morphologique des neurones GABAergiques. Les groupes analysés incluent le type sauvage (WT, n = 61), E277K (n = 125) et E180Y (n = 60). Les barres représentent la moyenne  $\pm$  SEM. Les analyses statistiques ont été réalisées par test t non apparié (comparaison deux à deux). (B) Visualisation des motoneurones GABAergiques chez des vers L4.

Les observations morphologiques réalisées sur les commissures des motoneurones GABAergiques n'ont révélé aucun défaut évident chez les mutants E180Y et E277K, indiquant que leur organisation globale est préservée (Figure 3.2). Le pourcentage d'animaux présentant une anomalie morphologique était comparable entre les mutants et le type sauvage. Cette analyse repose uniquement sur la morphologie et ne permet donc pas d'évaluer la transmission GABAergique. Ces résultats ont conduit à orienter l'étude

vers les motoneurones cholinergiques, potentiellement plus sensibles aux mutations. Le décompte présenté en (A) a été réalisé à partir de l'ensemble des images acquises pour chaque groupe, même si une seule image illustrative est montrée en (B).

### 3.1.4.2 Cholinergiques

Les motoneurones cholinergiques jouent un rôle clé dans la transmission excitatrice responsable de la contraction musculaire et de la locomotion chez *C. elegans* (Rand, 2007). Compte tenu de leur importance et du fait que les commissures GABAergiques apparaissent intactes chez les mutants étudiés, l'analyse a été orientée vers les motoneurones cholinergiques. Pour cela, nous utilisons une souche exprimant un marqueur fluorescent spécifique des motoneurones cholinergiques, ce qui permet d'observer l'architecture de leurs projections axonales et de leurs commissures par microscopie à fluorescence. Le pourcentage d'animaux présentant des défauts structuraux a été quantifié.

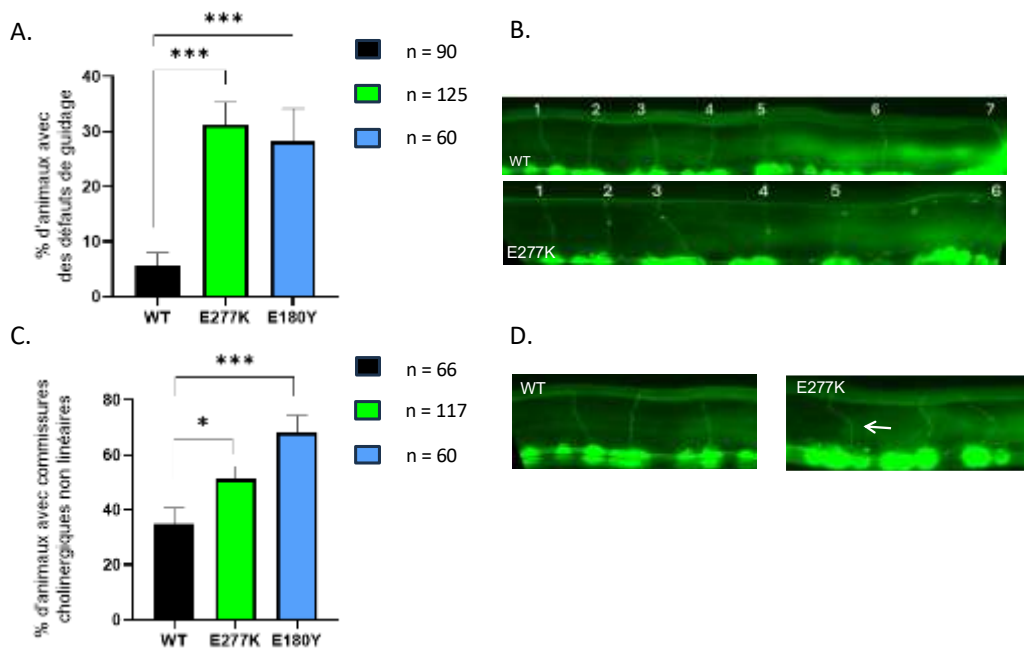


Figure 3.3. Désorganisation des motoneurones cholinergiques chez *C. elegans*

Les images illustrent le variant E277K ; les quantifications incluent les deux variants, E180Y et E277K. (A) Pourcentage de vers au stade L4 présentant des défauts des projections axonales cholinergiques. Moyenne  $\pm$  SEM. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard de la moyenne (SEM). Analyse statistique réalisée par test t non apparié. (B) Exemples de commissures cholinergiques observées en microscopie à fluorescence chez des animaux de type sauvage (image du haut) et chez un mutant E277K (image du bas). Seul E277K est représenté ici, mais les mêmes analyses morphologiques ont été réalisées chez E180Y, avec des défauts de nature comparable. (C) Pourcentage de vers au stade L4 présentant des commissures cholinergiques anormalement courbées ou non linéaires. Moyenne  $\pm$  SEM. Les barres d'erreur = SEM. Analyse statistique par test t non apparié. (D) Images représentatives de commissures linéaires chez un animal WT et de commissures déviées (flèche blanche) chez un mutant E277K.

Les mutants E277K et E180Y présentent une augmentation significative des altérations morphologiques des neurones cholinergiques par rapport aux animaux de type sauvage (WT). Alors qu'environ 9 % des animaux WT présentent des défauts dans les projections axonales cholinergiques, cette proportion s'élève à 32 % chez les mutants E277K et à 28 % chez les E180Y. Ces différences sont hautement significatives entre WT (n = 90) et E277K (n = 125) (\*\*\*)  $p < 0,0001$ , ainsi qu'entre WT et E180Y (n = 60) (\*\*\*)  $p < 0,0001$  (Figure 3.3.A). Ces anomalies se manifestent par une désorganisation ou une absence partielle de certaines projections, souvent localisées sur le côté gauche de l'animal (Figure 3.3.B). L'analyse des commissures cholinergiques met également en évidence une fréquence accrue de malformations : 35 % des animaux WT présentent des commissures légèrement courbées ou irrégulières, contre 56 % chez les E277K et 67 % chez les E180Y. Ces écarts sont statistiquement significatifs entre WT (n = 66) et E277K (n = 117) (\*  $p = 0,0312$ ), ainsi qu'entre WT et E180Y (n = 60) (\*\*\*)  $p = 0,0001$  (Figure 3.3.C). L'ensemble de ces anomalies structurelles est compatible avec un dysfonctionnement du système cholinergique, qui pourrait contribuer aux déficits moteurs observés chez les mutants.

Afin d'approfondir la caractérisation des altérations cholinergiques observées, nous avons examiné plus spécifiquement l'intégrité des axones cholinergiques au niveau de la corde dorsale. Des défauts à ce niveau peuvent se manifester par l'apparition de varicosités, des renflements pathologiques souvent associés à un stress cellulaire, un défaut de transport axonal ou un processus de dégénérescence (Ghosh-Roy et al., 2010). Nous avons utilisé pour cela la même souche exprimant la GFP dans les neurones cholinergiques et analysé la morphologie de la corde dorsale par microscopie à fluorescence.

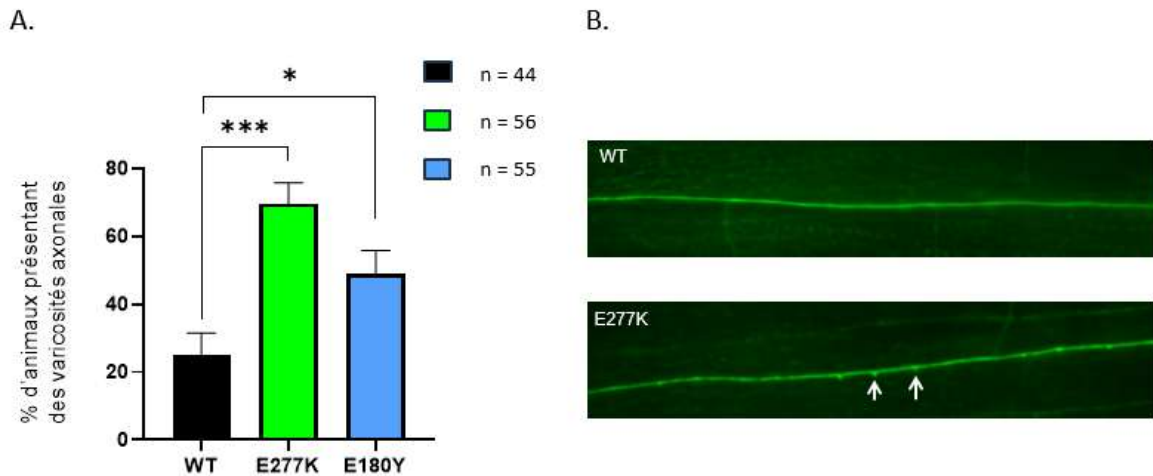


Figure 3.4. Les mutations de perte de fonction de *shq-1* induisent des anomalies morphologiques des axones cholinergiques de *C. elegans*

(A) Pourcentage de vers au stade L4 présentant des varicosités axonales dans la corde dorsale au niveau des motoneurones cholinergiques. Les données représentent la moyenne  $\pm$  SEM. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard de la moyenne (SEM). L'analyse statistique a été réalisée par test t non apparié. (B) Images représentatives obtenues par microscopie à fluorescence montrant la corde dorsale de vers exprimant la GFP dans les motoneurones cholinergiques. Les flèches blanches indiquent des varicosités observées chez E277K.

L'examen morphologique des axones cholinergiques révèle une augmentation significative de la fréquence des varicosités chez les mutants *shq-1* par rapport aux animaux sauvages (WT). Cette altération touche 70 % des animaux E277K, 50 % des E180Y, contre seulement 25 % des WT. Les différences observées sont statistiquement significatives entre WT et E277K (\*\*\*)  $p < 0,0001$ , ainsi qu'entre WT et E180Y (\*  $p = 0,0131$ ) (Figure 3.4.A). Ces anomalies axonales, visualisées en Figure 3.4.B, pourraient refléter une perte d'intégrité structurale des prolongements cholinergiques, possiblement induite par les mutations *shq-1*, et contribuer ainsi aux déficits moteurs documentés chez les mutants.

### 3.1.5 Tests pharmacologiques

Afin d'évaluer les conséquences fonctionnelles des altérations morphologiques observées dans les neurones cholinergiques, nous avons réalisé des tests pharmacologiques mesurant la paralysie induite par deux composés : l'aldicarbe, inhibiteur de l'acétylcholinestérase, qui augmente la concentration d'acétylcholine dans la synapse (Mahoney et al., 2006), et le lévamisole, un agoniste des récepteurs

nicotiniques cholinergiques postsynaptiques (Richmond et Jorgensen, 1999). Des tests de paralysie ont été réalisés sur des animaux porteurs des mutations E180Y ou E277K, comparés aux témoins WT. La paralysie a été suivie dans le temps sur trois expériences indépendantes (N = 3), avec 15 animaux par génotype et par expérience.

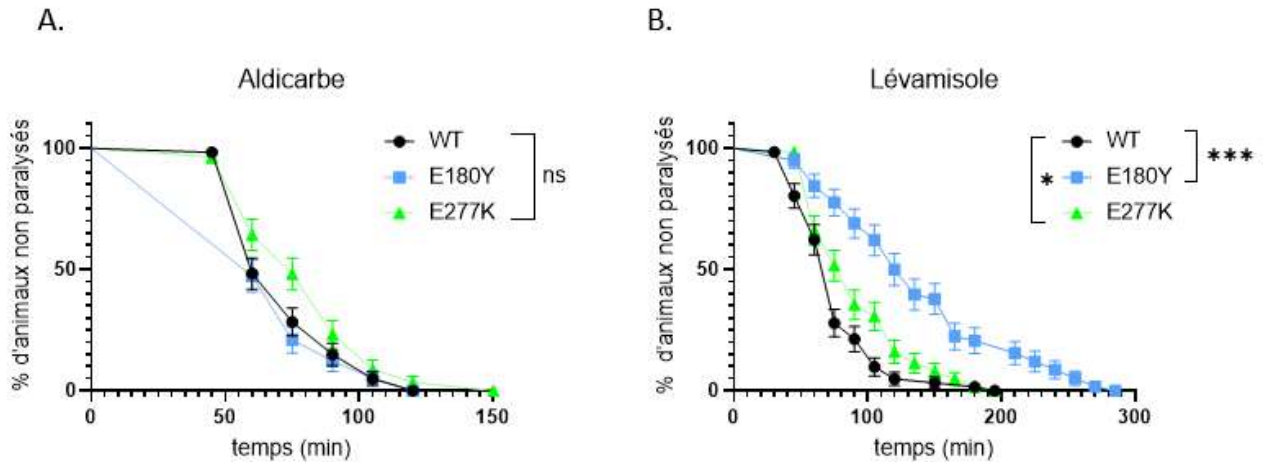


Figure 3.5. Essais pharmacologiques pour évaluer les fonctions synaptiques chez les mutants *shq-1*

(A) Test de sensibilité à l'aldicarbe évalué par analyse de survie (test du Log-rank). (B) Test au lévamisole évalué par test du Log-rank. Les courbes présentent le pourcentage moyen  $\pm$  SEM d'animaux non paralysés au cours du temps.

Les résultats indiquent que la transmission cholinergique présynaptique reste globalement préservée chez les mutants, comme en témoigne l'absence de différence significative de sensibilité à l'aldicarbe entre les animaux WT et les mutants (Figure 3.5.A). En revanche, le test au lévamisole révèle une altération spécifique de la transmission postsynaptique. Les animaux porteurs de la mutation E180Y présentent une résistance marquée au lévamisole, se paralysant significativement plus lentement que les animaux WT (\*\*\*) ( $p < 0,0001$ ). Les mutants E277K montrent eux aussi un allongement du délai avant paralysie, mais l'effet est plus modéré et demeure statistiquement significatif (\*  $p = 0,0186$ ) (Figure 3.5.B). Ces résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle les mutations du gène *shq-1* affectent préférentiellement la transmission cholinergique au niveau postsynaptique, contribuant ainsi aux altérations locomotrices observées chez les mutants.

### 3.1.6 Neurones dopaminergiques

Chez l'humain, les mutations étudiées sont associées à des troubles moteurs sévères accompagnés d'un dysfonctionnement du métabolisme de la dopamine (Sleiman et al., 2022). Étant donné le rôle central des neurones dopaminergiques dans la régulation motrice (Kalia et Lang, 2015), nous avons analysé la morphologie et le guidage de ces neurones chez le mutant E277K de *C. elegans*, à l'aide d'une souche exprimant la GFP dans ces neurones.

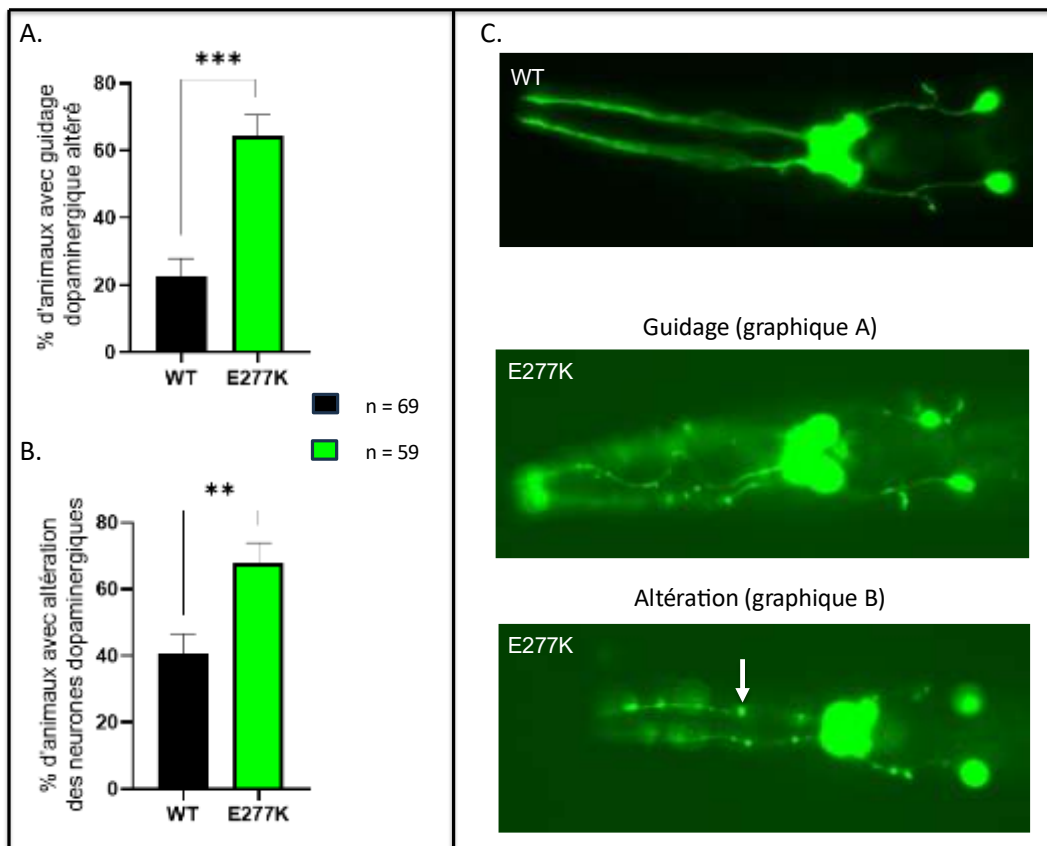


Figure 3.6. La mutation E277K affecte le guidage et la morphologie des neurones dopaminergiques chez *C. elegans*

(A) Pourcentage de vers au stade L4 présentant un défaut de guidage des neurones dopaminergiques chez les animaux de type sauvage (WT, noir, n = 69) et porteurs de la mutation E277K (vert, n = 59). Les données représentent la moyenne  $\pm$  SEM. Les barres d'erreur correspondent à l'erreur standard de la moyenne (SEM). Analyse statistique par test t non apparié : \*\*\* p < 0,0001. (B) Pourcentage d'animaux présentant une altération morphologique des neurones dopaminergiques (WT, noir, n = 69 ; E277K, vert, n = 59). Analyse statistique par test t non apparié : \*\* p = 0,0018. (C) Images représentatives des neurones dopaminergiques exprimant la GFP : en haut, animal WT ; au centre, animal E277K (défaut de

guidage, correspondant au graphique A) ; en bas, animal E277K (altération morphologique, flèche blanche, correspondant au graphique B).

Nos analyses montrent que 64,4 % des animaux E277K présentent des défauts de guidage des neurones dopaminergiques, contre 23,2 % chez les WT (Figure 3.6.A). Ce pourcentage relativement élevé observé chez les animaux de type sauvage reflète la variabilité normale du signal fluorescent *dat-1::GFP*, qui peut présenter de légères irrégularités d'intensité ou de continuité sans correspondre à de véritables défauts neuronaux. Dans la lignée *dat-1::GFP*, les neurones dopaminergiques sont visualisés grâce à une fluorescence cytosolique permettant d'identifier clairement les corps cellulaires (soma) ainsi que leurs prolongements neuritiques, incluant axones et dendrites. Chez les mutants E277K, les dendrites apparaissent désorganisées, parfois discontinues, reflétant un défaut d'orientation des prolongements neuronaux (Figure 3.6.C, milieu). Par ailleurs, 72,9 % des animaux E277K présentent des anomalies morphologiques (53,6 % chez les WT), notamment au niveau des corps cellulaires, principalement situés dans la tête, où se trouvent les neurones dopaminergiques CEP et ADE, ainsi qu'au niveau des axones descendant le long du corps (Figure 3.6.B–C, bas). Ces perturbations s'ajoutent aux défauts observés dans les circuits cholinergiques, suggérant que les mutations du gène *shq-1* affectent plusieurs populations neuronales impliquées dans le contrôle moteur.

## 3.2 Poisson zèbre

### 3.2.1 Génération et validation des lignées *knock-in shq1* chez le poisson-zèbre

Les mutations ciblées sont introduites dans le gène *shq1* du poisson-zèbre par micro-injection, au stade unicellulaire, d'un mélange contenant la protéine Cas9 purifiée, un ARN guide ciblant la séquence d'intérêt, ainsi qu'un oligonucléotide simple brin (ssODN) portant la mutation désirée (D174Y ou E283K), accompagné de mutations silencieuses destinées à empêcher la recoupe par Cas9. Les injections sont réalisées au stade zygote, lorsque l'embryon ne possède qu'une cellule unique, afin de maximiser l'édition génétique dans tout l'organisme. Néanmoins, les individus F0 sont généralement mosaïques, car toutes les cellules ne portent pas nécessairement la même modification, ce qui justifie le criblage des descendants F1 plutôt qu'un génotypage direct des F0 (Bergen et al., 2019). Bien que les mutations silencieuses n'altèrent pas la séquence en acides aminés de la protéine SHQ1, plusieurs études ont montré qu'elles peuvent, dans certains contextes, influencer la régulation post-transcriptionnelle d'un gène. Les substitutions synonymes peuvent, par exemple, modifier la stabilité de l'ARNm en altérant la structure

secondaire locale (Chamary & Hurst, 2005 ; Kudla et al., 2009), ou encore affecter l'efficacité de la traduction en fonction du biais d'usage des codons et de la disponibilité relative des ARNt (Plotkin & Kudla, 2011 ; Quax et al., 2015). Elles sont également susceptibles de perturber certains éléments cis régulateurs situés dans la région codante, comme des sites de liaison pour des protéines ou des microARN (Yu et al., 2015; Hunt et al., 2014), et peuvent influencer la cinétique de traduction, ce qui a des répercussions sur le repliement co-traductionnel de la protéine (Komar, 2009 ; Buhr et al., 2016).

### 3.2.2 Test des concentrations d'ARNg à injecter par HRM

Avant de générer les lignées, il est essentiel de déterminer la concentration optimale d'ARNg qui permet une édition génomique efficace sans toxicité excessive. Pour cela, deux concentrations d'ARNg : 30 ng/ $\mu$ L et 100 ng/ $\mu$ L, sont testées par injection dans des œufs de poisson-zèbre. Des œufs non injectés servent de témoins. L'ADN génomique extrait de ces œufs a été analysé par HRM classique, méthode sensible permettant de détecter des variations de séquence par la comparaison des courbes de fusion d'ADN amplifié (Reed et Wittwer, 2004). Cette analyse évalue indirectement l'efficacité de coupure au site spécifique par l'endonucléase Cas9 en comparant les profils de fusion entre conditions. Pour la mutation D174Y (Figure 3.7.A), les œufs injectés avec 100 ng/ $\mu$ L d'ARNg ont présenté un profil de fusion nettement différent de celui des témoins non injectés, et plus distinct que celui obtenu avec 30 ng/ $\mu$ L, indiquant une efficacité de coupure supérieure à la concentration élevée. La concentration de 100 ng/ $\mu$ L a donc été retenue pour cette mutation. Pour la mutation "E283K" (Figure 3.7.B), les profils de fusion à 30 ng/ $\mu$ L et 100 ng/ $\mu$ L étaient tous deux clairement différents des témoins, et très similaires entre eux, ce qui suggère qu'une concentration plus faible suffisait pour une édition efficace. La concentration de 30 ng/ $\mu$ L a ainsi été choisie pour les injections ciblant cette mutation.

D174Y

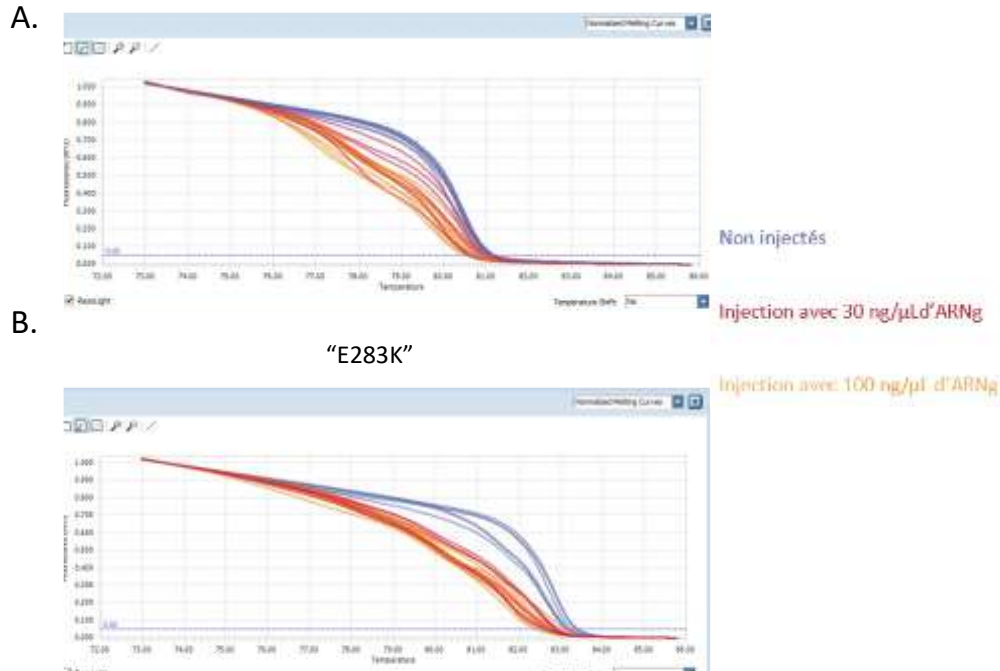


Figure 3.7. Analyse HRM classique des œufs injectés avec différentes concentrations d'ARNg pour les mutations *shq1* D174Y et "E283K"

Les courbes de fusion normalisées ont été obtenues par HRM classique à partir d'ADN extrait d'embryons injectés avec 30 ng/μL (rouge) ou 100 ng/μL (orange) d'ARN guide, et comparées à celles d'œufs non injectés (violet). (A) Présentation des courbes pour la mutation D174Y. (B) Présentation des courbes pour la mutation "E283K".

### 3.2.2.1 Génération de lignées stables de poisson zèbre

### 3.2.2.2 Vérification de l'efficacité d'intégration du ssODN par HRM spécifique

Le lendemain de l'injection des œufs par CRISPR-Cas9, l'objectif était de valider, sur un petit échantillon d'œufs, la présence des mutations spécifiques introduites par les ssODN désignés. L'ADN génomique de huit embryons injectés avec ou sans ssODN, sélectionnés au hasard, a été extrait puis amplifié par PCR en temps réel (qPCR) couplée à une analyse HRM spécifique. Cette méthode combine la sensibilité de la qPCR avec la résolution fine du HRM, permettant de détecter avec précision les mutations ponctuelles introduites par les ssODN (Zischewski et al., 2017). La comparaison des cycles seuil (Ct) obtenus en qPCR reflète la spécificité de l'amplification : un Ct plus faible indique une amplification plus précoce et donc

une meilleure reconnaissance de l'ADN modifié par les amorces spécifiques aux mutations intégrées. Les résultats montrent que, pour la mutation D174Y, les embryons injectés avec ssODN présentent des courbes d'amplification entre 18 et 22 cycles, tandis que ceux sans ssODN amplifient entre 25 et 28 cycles. Ce décalage traduit une amplification plus précoce et spécifique de l'ADN modifié, attestant de la bonne spécificité des amorces. Cela nous indique aussi pour nos futures analyses de cette lignée que seuls les poissons présentant une amplification avant 25 cycles seront considérés comme potentiellement positif. Pour la mutation "E283K", les courbes d'amplification apparaissent aux alentours de 15-23 cycles en présence de ssODN et entre 25-30 cycles sans ssODN, ce qui confirme également la spécificité des amorces. Ces analyses ont permis de valider l'intégration, dans le génome, des mutations souhaitées grâce aux ssODN, ainsi que l'efficacité des amorces spécifiques utilisées pour le futur génotypage.

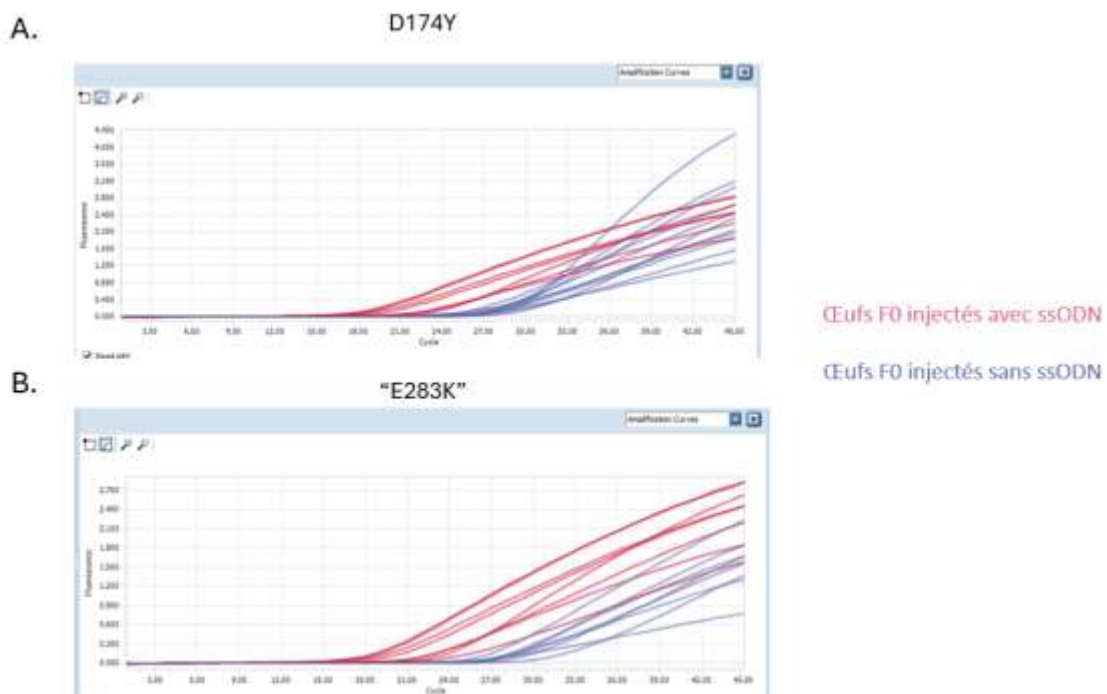


Figure 3.8. Détection des cycles d'amplification par HRM spécifique de l'ADN contenant ou non les ssODN injectés

(A) Mutation D174Y : les courbes d'amplification issues de l'analyse HRM montrent que les ADN extraits des œufs injectés avec le ssODN (courbes rouges) et les ADN des œufs injectés sans ssODN (courbes violettes). (B) Mutation "E283K" : les courbes d'amplification issues de l'analyse HRM montrent que les ADN extraits des œufs injectés avec le ssODN (courbes rouges) et les ADN des œufs injectés sans ssODN (courbes violettes).

Le reste des œufs injectés a été élevé jusqu'à l'âge adulte. Cette génération, appelée F0, a permis de sélectionner les poissons fondateurs capables de transmettre les mutations souhaitées à leur descendance.

### 3.2.2.3 Criblage et sélection des poissons fondateurs F0 par HRM et séquençage

Lorsque les lignées de poissons F0 ont atteint la maturité sexuelle, leur sexe a été déterminé, puis chaque individu a été mis en reproduction avec un poisson de type sauvage (WT). Les œufs issus de ces croisements ont ensuite été analysés par HRM spécifique afin de cribler la transmission des mutations dans la descendance.

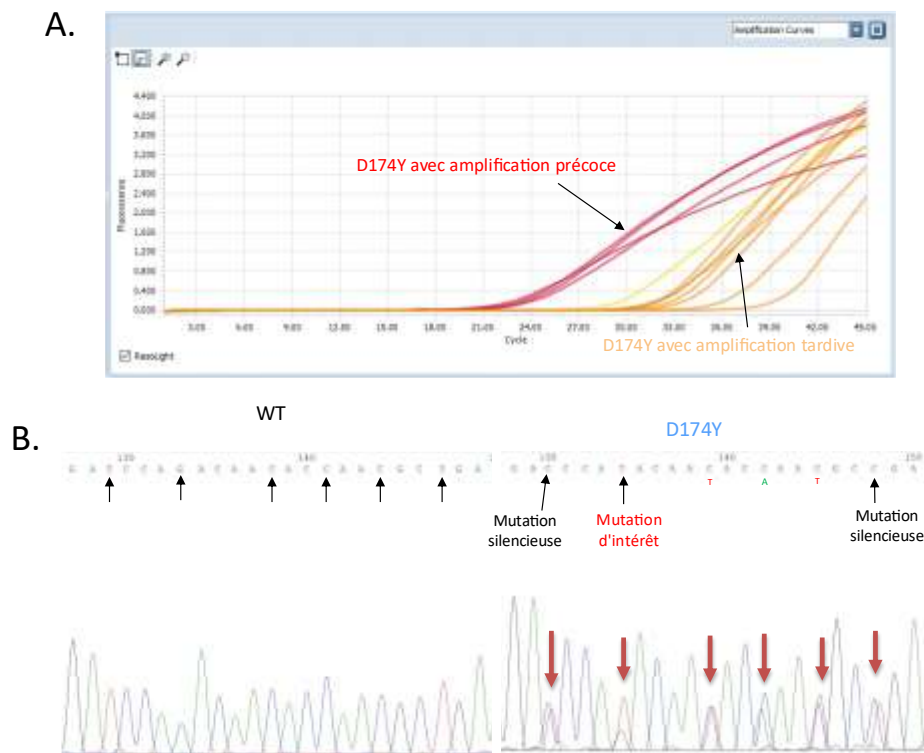


Figure 3.9. Analyse HRM et validation par séquençage des embryons issus de croisements D174Y F0 x WT

(A) Courbes d'amplification obtenues par analyse HRM sur l'ADN d'embryons issus de croisements F0 x WT. Les courbes rouges correspondent à des échantillons présentant une amplification précoce. Les courbes orange correspondent à des échantillons présentant des amplifications tardives. (B) Chromatogramme obtenu par séquençage Sanger des produits PCR issus des échantillons qui montraient une amplification précoce (droite). Un profil WT est présenté à titre comparatif (gauche). Les pics

doubles, indiqués par des flèches rouges dans les chromatogrammes, correspondent aux positions des mutations. Ils reflètent la présence des deux allèles et sont caractéristiques d'un génotype hétérozygote.

Pour chaque poisson F0, 50 œufs de leur descendance ont été analysés en HRM spécifique afin d'obtenir un bon échantillonnage. Un exemple de résultat est montré à la Figure 3.9.A pour la mutation D174Y. Les courbes rouges montrent une amplification précoce entre 21 et 22 cycles, indiquant une spécificité d'amplification due à une bonne complémentarité entre les amorces spécifiques et l'ADN cible. Les courbes orange montrent une amplification après 25 cycles ; ces échantillons ont été considérés comme négatifs sur la base des cycles seuils établis auparavant (Figure 3.9.A). Les échantillons qui présentaient un profil précoce ont été amplifiés par PCR avant d'être envoyés pour séquençage. L'analyse des séquences a confirmé l'intégration de la mutation d'intérêt ainsi que des mutations silencieuses introduites par le ssODN lors de l'injection (Figure 3.9.B). Au total, environ 60 poissons F0 ont été criblés pour la mutation D174Y. Parmi eux, 7 poissons transmettaient la mutation d'intérêt. Un mâle a été sélectionné parmi ces derniers pour fonder la lignée F1, en raison de la proportion élevée d'œufs porteurs de la mutation observée dans sa descendance. Tous les autres poissons, qu'ils aient été criblés ou non, ont été euthanasiés conformément aux protocoles éthiques en vigueur.

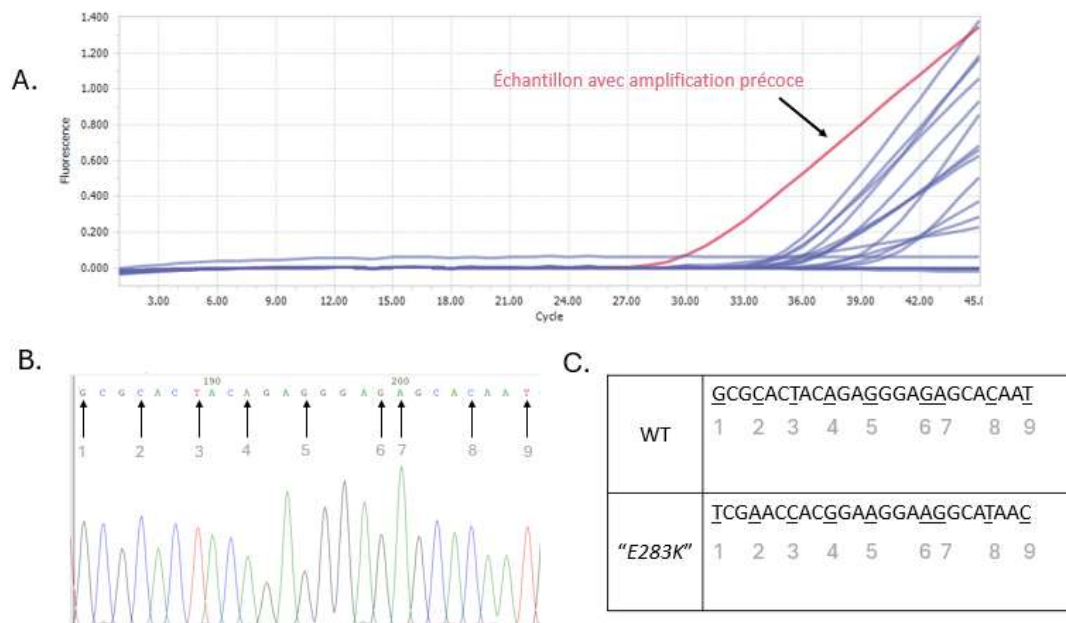


Figure 3.10. Absence d'intégration de la mutation "E283K" sur embryons issus du croisement F0 "E283K" × WT

(A) Analyse HRM sur l'ADN de larves F1 provenant de poissons issus du croisement F0 "E283K" × WT. (B) Chromatogramme obtenu par séquençage Sanger de la larve qui montrait une amplification précoce. (C) Alignement entre la séquence WT du gène *shq1* (haut) et la séquence attendue du ssODN "E283K" (bas).

Lors du criblage des poissons F0 "E283K", sur 75 individus criblés, un seul poisson F0 a permis d'obtenir un œuf présentant une courbe d'amplification relativement précoce (28 cycles) par HRM spécifique (Figure 3.10.A, courbe rouge). Les autres échantillons montraient des amplifications tardives, aux alentours de 33 cycles. Bien que les tests de cycle seuil pour cette mutation aient suggéré de rechercher une amplification avant 24 cycles, cet échantillon a tout de même été amplifié par PCR puis envoyé en séquençage. Le résultat du séquençage Sanger de cet échantillon a révélé l'absence de mutation à la position ciblée (Figure 3.10.B). Ces données indiquent que le ssODN "E283K" n'a pas été intégré dans le génome. Aucun fondateur porteur de la mutation "E283K" n'a pu être isolé. De plus, après analyse, il a été constaté que le ssODN "E283K" avait été mal conçu (voir Tableau 2.4). Seule la lignée D174Y a été conservée en vue des analyses fonctionnelles.

#### 3.2.2.4 Établissement et génotypage de la génération F1 D174Y

À la suite de l'identification d'un poisson fondateur F0 transmettant la mutation D174Y, ce poisson a été mis en reproduction avec un poisson WT pour générer la génération F1, qui a été élevée jusqu'à l'âge adulte. À l'atteinte de la maturité sexuelle, un prélèvement de nageoire (*fin clip*) a été réalisé sur chaque poisson F1 afin d'en extraire l'ADN. Un HRM spécifique a été effectué et l'ADN des poissons qui présentaient un profil d'amplification précoce a été amplifié puis séquencé.

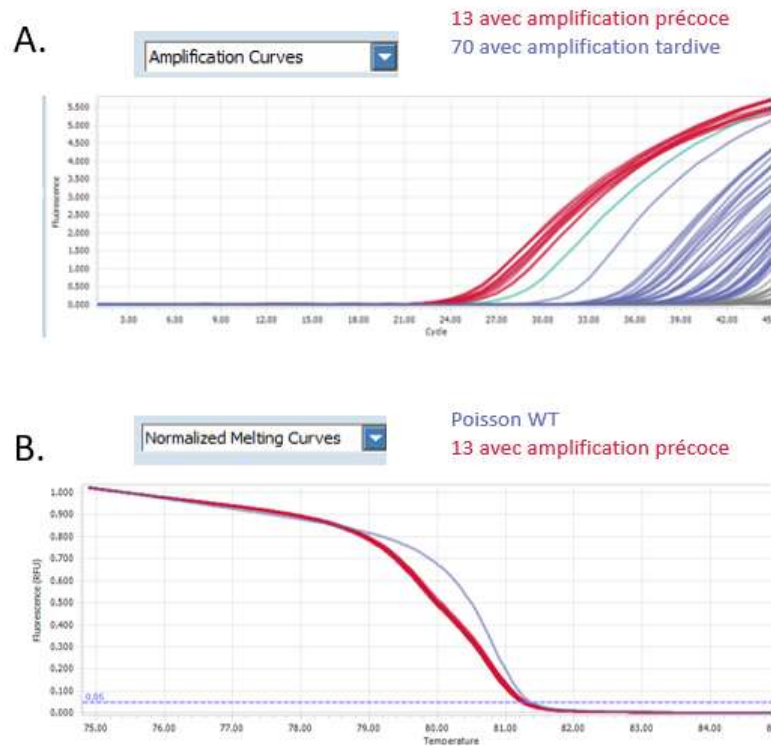


Figure 3.11. Analyse des poissons F1 issus des croisements entre F0 fondateurs et poissons sauvages (WT) par HRM

(A) Courbes d'amplification obtenues par HRM spécifique à partir de l'ADN extrait des nageoires de poissons F1 adultes. (B) Courbes de fusion normalisées obtenues par analyse HRM classique, comparant le profil d'un poisson WT à celui des poissons présentant une amplification précoce (Figure 3.11.A).

L'analyse par HRM spécifique (Figure 3.11.A) a permis d'identifier treize poissons présentant une amplification précoce de 22 à 24 cycles (courbes rouges) et soixante-dix poissons présentant une amplification plus tardive, après 25 cycles (courbes violettes). Un HRM classique a également été réalisé sur les treize échantillons d'ADN avec une amplification précoce (Figure 3.11.B) afin de comparer leurs profils de fusion à ceux des poissons WT. Les courbes de fusion normalisées ont révélé deux profils distincts entre un échantillon WT contrôle et les treize échantillons D174Y. L'analyse par le séquençage Sanger a confirmé l'intégration correcte de la mutation ciblée.

### 3.2.2.5 Vérification des génotypes WT, hétérozygote et homozygote de la lignée stable D174Y

Afin d'étudier la mutation D174Y chez le poisson zèbre, il était essentiel d'obtenir des larves homozygotes. Avoir les trois génotypes dans la génération F2 permettait de comparer directement les effets de la mutation entre les différents profils génétiques. Les larves WT issues de la même portée servaient également de contrôles génétiquement proches, ce qui limitait les biais liés à la comparaison entre lignées distinctes. Pour ce faire, les mâles et femelles de la génération F1 portant la mutation désirée ont été reproduits entre eux afin d'obtenir trois génotypes : sauvage (WT), hétérozygote et homozygote. L'analyse HRM des larves F2 issues du croisement d'individus F1 hétérozygotes a révélé trois profils de courbes de fusion distincts (Figure 3.12.A). Le chromatogramme obtenu par le séquençage Sanger a permis d'attribuer le génotype correspondant à chaque profil de courbe de fusion (Figure 3.12.B). La séquence WT présentait des pics simples sans mutation, tandis que le génotype hétérozygote se caractérisait par des pics doubles aux positions des mutations, indiquant la présence d'un allèle WT et d'un allèle muté. Ces pics doubles sont indiqués par des flèches rouges dans les chromatogrammes. Le génotype homozygote mutant se caractérisait par une séquence exclusivement mutée, sans trace de l'allèle sauvage (Figure 3.12.B, panneau de droite).

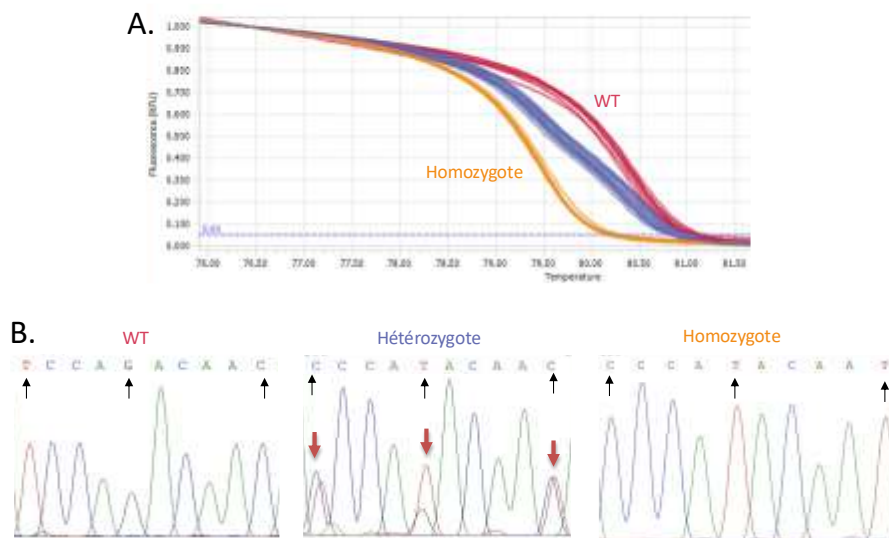


Figure 3.12. Validation des génotypes chez les F2 par HRM et séquençage

(A) Profil HRM des poissons F2 issus du croisement d'individus F1 hétérozygotes. Profil rouge : WT, profil violet : hétérozygote, profil orange : homozygote. (B) Zoom des séquences d'intérêts des génotypes WT, hétérozygote et homozygote D174Y. Flèches rouge : identification des doubles pics.

### 3.2.3 Étude du comportement moteur et de l'organisation neuronale de la lignée D174Y

La mutation D175Y du gène humain *SHQ1*, a été reproduite sous sa forme homologue D174Y dans l'orthologue *shq1* du poisson-zèbre, afin d'en évaluer les effets sur la locomotion et le développement du système nerveux. Des analyses comportementales et neuroanatomiques ont été réalisées sur les larves WT, hétérozygote et homozygote pour la mutation D174Y.

#### 3.2.3.1 *Coiling* spontané embryonnaire

Le *coiling* est une activité motrice spontanée observable dès 17–19 hpf, reposant sur les circuits moteurs primitifs de la moelle épinière. Ce test est couramment utilisé pour détecter des altérations motrices précoces liées à des dysfonctionnements neuronaux ou musculaires (Saint-Amant et Drapeau, 1998). Dans cette optique, la fréquence des contractions a été mesurée entre 17 et 19 hpf chez les larves WT, hétérozygotes et homozygotes D174Y (Figure 3.13).

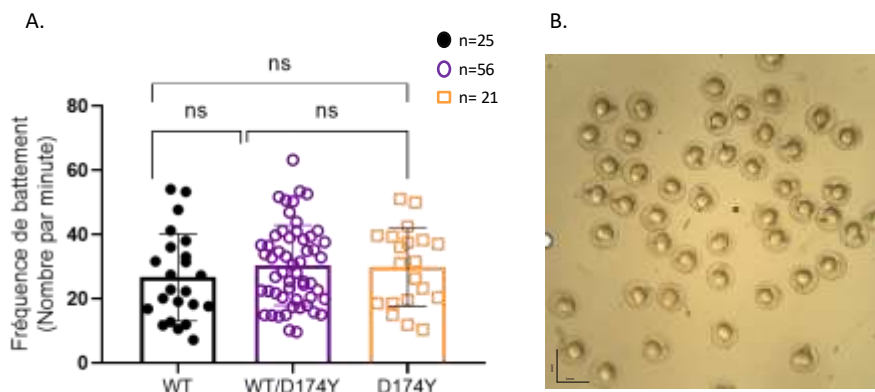


Figure 3.13. Analyse du comportement de *coiling* embryonnaire chez les larves de poisson-zèbre D174Y.

(A) Fréquence moyenne des contractions spontanées par minute mesurée entre 17 et 19 hpf chez les larves WT (n = 25), hétérozygotes WT/D174Y (n = 56) et homozygotes D174Y (n = 21). analyse de variance (ANOVA) à un facteur (ns). Homogénéité des variances confirmée par les tests de Brown-Forsythe et de Bartlett ( $p > 0,05$ ). Les barres d'erreur représentent la moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne (SEM).

(B) Image représentative des embryons de poisson-zèbre à 18 hpf. Barre d'échelle = 1 mm.

La fréquence moyenne des contractions spontanées par minute n'a montré aucune différence significative entre les trois groupes de génotypes : WT (26,62 contractions/min), hétérozygotes (30,40 contractions/min) et homozygotes D174Y (29,89 contractions/min). Ces résultats suggèrent que la mutation D174Y n'a pas d'effet sur le comportement de *coiling* à ce stade embryonnaire.

### 3.2.3.2 Analyse comportementale des larves D174Y

Le comportement locomoteur des larves mutantes D174Y a été évalué à l'aide d'un test de nage réalisé à un stade où les circuits moteurs étaient pleinement fonctionnels. À partir de 4-5 dpf, les circuits locomoteurs du poisson-zèbre étaient matures et permettaient une nage organisée. Le test de nage en bassin individuel était couramment utilisé pour évaluer les altérations de la motricité volontaire chez les larves, notamment en lien avec des atteintes du système nerveux central ou périphérique (Burgess et Granato, 2007). Dans ce contexte, la distance parcourue par les larves a été mesurée à 5 et à 7 dpf chez les larves WT, hétérozygotes et homozygotes D174Y (Figure 3.14).

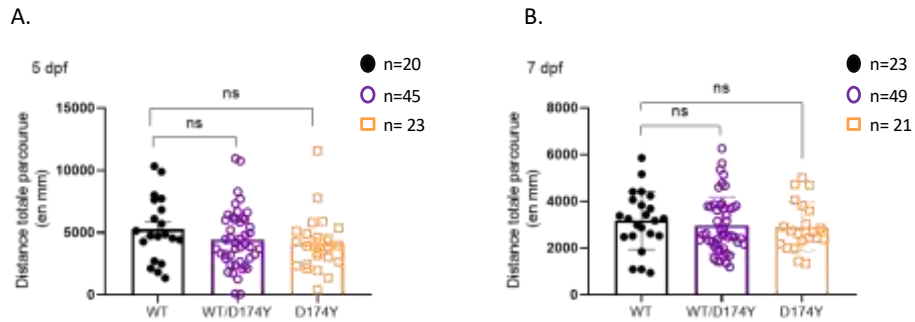


Figure 3.14. Comportement locomoteur des larves F2 dans un test de nage à 5 et 7 dpf

(A) Distance totale parcourue à 5 dpf chez les larves WT (n = 20, noir), hétérozygotes (n = 45, violet) et homozygotes D174Y (n = 23, orange). (B) Distance totale parcourue à 7 dpf chez les larves WT (n = 23), hétérozygotes (n = 49) et homozygotes D174Y (n = 21). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test t non apparié. Les barres d'erreur représentent la moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne (SEM).

Aucun des résultats n'est significatif, suggérant que la mutation D174Y n'altère pas la locomotion spontanée à ces stades.

### 3.2.3.3 Analyse morphologique de la lignée D174Y à 5 dpf

Pour analyser si la mutation D174Y affecte le développement des larves, une évaluation morphologique standard a été réalisée à 5 dpf. La longueur corporelle, le diamètre de l'œil ainsi que la longueur de la tête ont été mesurés, selon les protocoles habituels (Kimmel et al., 1995). Les analyses statistiques sont présentées à la Figure 3.15.

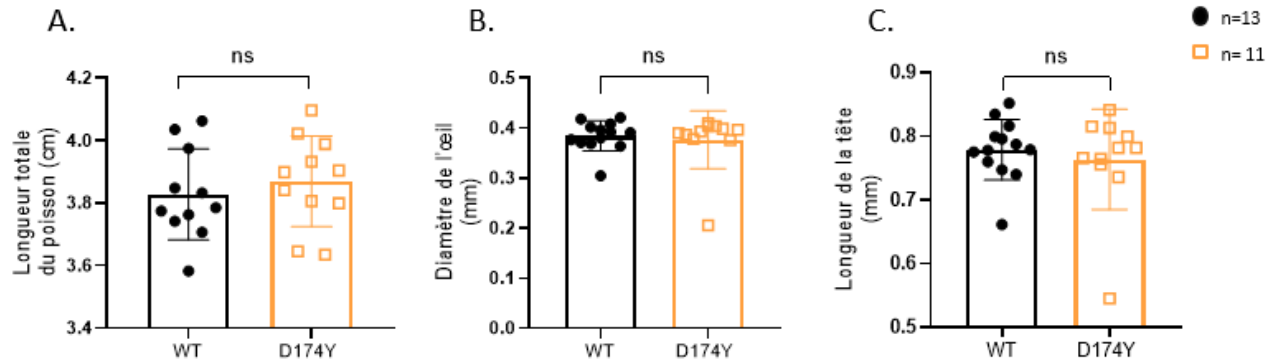


Figure 3.15. Analyse statistique de la morphologie des larves D174Y

(A) Longueur corporelle totale (en cm), (B) diamètre de l'œil (en mm), et (C) longueur de la tête (en mm) mesurés chez des larves WT (n = 13, noir) et homozygotes D174Y (n = 11, orange). Les comparaisons statistiques ont été réalisées par test t de Student pour chaque paramètre, avec vérification de l'homogénéité des variances par le test F. Les barres représentent la moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne (SEM).

La longueur corporelle totale, le diamètre de l'œil et la longueur de la tête ont été comparés entre les larves WT et les larves D174Y. Aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes, ce qui suggère que la mutation D174Y n'altérerait pas significativement la morphologie externe des larves à ce stade.

#### 3.2.3.4 Visualisation du système nerveux par immunofluorescence

Indépendamment des résultats obtenus concernant les comportements moteurs et les paramètres morphologiques, une analyse du système nerveux central a été réalisée pour détecter d'éventuelles altérations neuroanatomiques associées à la mutation D174Y. Pour étudier l'organisation du système nerveux central, un marquage à la tubuline acétylée (microtubules stables, architecture axonale) a été effectué. Le marquage de la tyrosine hydroxylase (TH) a permis d'évaluer les neurones dopaminergiques, un sous-type de neurones impliqué dans le contrôle moteur et sensible aux altérations développementales (Filippi et al., 2010). L'analyse des neurones dopaminergiques a été incluse car, dans notre modèle *C. elegans*, la mutation homologue E277K entraîne des défauts marqués de guidage et de morphologie de ces neurones (Figure 3.6), en cohérence avec l'atteinte dopaminergique rapportée chez les patients porteurs de mutations *SHQ1* (Sleiman et al., 2022). Il était donc pertinent de vérifier si des altérations similaires étaient conservées dans un modèle vertébré.

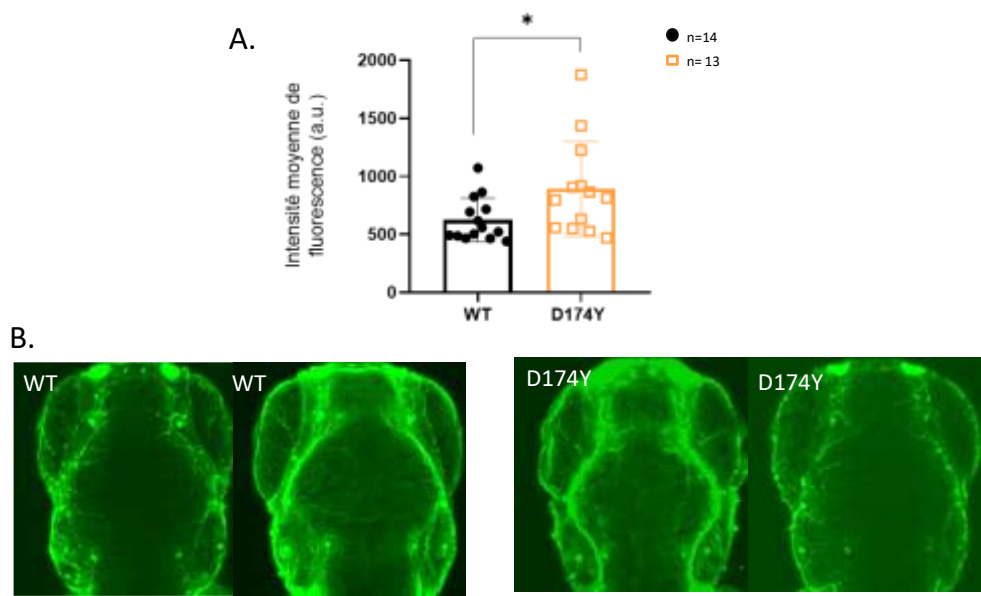


Figure 3.16. Visualisation par immunofluorescence de l'architecture neuronale des larves D174Y à 5 dpf

(A) Quantification de l'intensité moyenne de fluorescence du marquage à la tubuline acétylée dans le cerveau des larves WT (noir) et D174Y (orange). (B) Images représentatives de larves WT (gauche) et D174Y (droite), acquises par microscopie confocale, montrant le marquage de la tubuline acétylée dans la région céphalique. Les données sont présentées en moyenne  $\pm$  SEM. Les comparaisons statistiques ont été réalisées par un test t de Student non apparié, après vérification de l'homogénéité des variances par test de Fisher. \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$ .

L'intensité moyenne de fluorescence a été quantifiée dans la région céphalique des larves D174Y (Figure 3.16). Une augmentation significative de l'intensité du marquage a été observée chez les larves D174Y comparées aux larves WT, avec une moyenne de 623,7 unités arbitraires (a.u.) pour les WT ( $n = 14$ ) et de 890,8 a.u. pour les D174Y ( $n = 13$ ). Ce résultat suggère une accumulation ou une désorganisation des structures neurales marquées, potentiellement liée à la mutation.

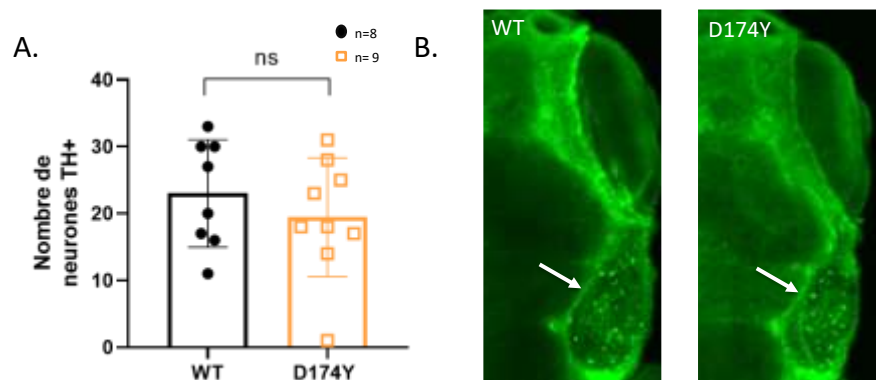


Figure 3.17. Quantification des neurones dopaminergiques chez les larves D174Y de poisson-zèbre à 5 dpf.

(A) Quantification du nombre de neurones TH<sup>+</sup> dans l'encéphale postérieur de larves WT (n = 8, noir) et D174Y (n = 9, orange).

(B) Images représentatives de larves marquées pour la tyrosine hydroxylase. Les flèches blanches indiquent la zone de quantification des neurones dopaminergiques. Les données sont présentées en moyenne ± SEM. Comparaisons statistiques réalisées par un test t de Student non apparié, précédé d'un test de Fisher pour la comparaison des variances.

Le nombre de neurones dopaminergiques a été quantifié dans la région postérieure de l'encéphale à l'aide du marquage TH. Les larves WT présentaient en moyenne 23 neurones TH<sup>+</sup>, tandis que les larves homozygotes D174Y en comptaient 19,4. Bien qu'une légère diminution ait été observée chez les mutants, cette différence n'a pas atteint le seuil de signification statistique. Ces résultats suggéraient que la mutation D174Y n'affectait pas de manière significative le développement des neurones dopaminergiques à ce stade. Toutefois, les signaux TH<sup>+</sup> étaient principalement localisés dans une zone qui ne correspondait pas clairement aux territoires dopaminergiques attendus à ce stade du développement, tels que le diencéphale antérieur, la région préteectale ou la ligne médiane du mésencéphale, où sont habituellement décrits les corps cellulaires dopaminergiques chez le poisson-zèbre larvaire (Filippi et al., 2010 ; Ryu et al., 2007). Ce profil de localisation inhabituel sera discuté plus en détail dans la section suivante.

## CHAPITRE 4

### DISCUSSION

Ce travail visait à explorer les conséquences cellulaires et fonctionnelles de mutations pathogènes identifiées dans le gène humain *SHQ1*, en combinant deux modèles expérimentaux complémentaires, *Caenorhabditis elegans* et le poisson-zèbre. L'approche comparative adoptée a permis de tirer parti des atouts spécifiques de chaque organisme : la simplicité et la connectivité neuronale entièrement décrite de *C. elegans* pour une analyse fine des circuits moteurs, et la complexité d'un système nerveux vertébré chez le poisson-zèbre, plus proche de l'organisation humaine et accessible à l'imagerie *in vivo*. Dans les deux modèles, les mutations introduites ont été sélectionnées pour leur pertinence clinique, en reproduisant des substitutions homologues à celles identifiées chez des patients atteints de troubles moteurs sévères. Les analyses combinant phénotypage comportemental, étude morphologique et approches histologiques ont permis d'identifier des altérations neuroanatomiques et locomotrices marquées chez *C. elegans*, en particulier dans les circuits cholinergiques et dopaminergiques, tandis que les larves de poisson-zèbre mutantes D174Y ne présentaient pas de déficits locomoteurs ou morphologiques évidents aux stades précoces, malgré certaines modifications neuroanatomiques régionales.

#### 4.1 Altérations locomotrices et neuroanatomiques chez les mutants *shq-1*

Afin de mieux comprendre les effets cellulaires et fonctionnels des mutations identifiées dans le gène *SHQ1* chez l'humain, nous avons choisi de reproduire deux mutations homologues (E180Y et E277K) dans le gène orthologue *shq-1* chez *C. elegans*. Les patients porteurs de mutations *SHQ1* présentent des troubles moteurs précoces et sévères (Sleiman et al., 2022), ce qui nous a conduit à nous focaliser sur les aspects locomoteurs et neuromusculaires chez le ver. Plus précisément, notre analyse s'est organisée en plusieurs étapes, débutant par l'évaluation comportementale de la motilité, avant de se prolonger par

l'examen des structures neuronales et par des tests pharmacologiques ciblant les principaux types de motoneurones impliqués dans le mouvement : GABAergiques, cholinergiques et dopaminergiques.

#### 4.1.1 Réduction de la motilité associée aux mutations *shq-1* chez *C. elegans*

Les analyses comportementales ont montré une baisse significative de la motilité chez les vers mutants E180Y et E277K, mesurée à l'aide d'un test de nage en milieu liquide (Figure 3.1). Ce test, souvent utilisé pour évaluer la fonction neuromusculaire globale chez *C. elegans*, permet de repérer des déficits locomoteurs d'origine neuronale ou musculaire (Buckingham et Sattelle, 2009). Chez les deux mutants, le nombre moyen de battements par minute est plus faible que chez les animaux de type sauvage, ce qui laisse penser que les mutations de *shq-1* affectent la motricité. Cela dit, ce type d'évaluation ne permet pas d'identifier précisément l'origine du déficit : une atteinte des motoneurones, de la jonction neuromusculaire ou du muscle lui-même peut produire un effet similaire (Hughes et Vidal-Gadea, 2022). Même avec un effectif expérimental solide (n = 100), des anomalies plus fines peuvent passer inaperçues. D'autres tests, comme la locomotion sur gel solide (grâce à des systèmes de suivi et d'analyse automatisés tels que WormLab) ou l'étude du comportement de ponte, également sous contrôle des circuits cholinergiques, pourraient compléter cette analyse (Rand, 2007 ; Hughes et Vidal-Gadea, 2022). Nous avons donc poursuivi en examinant de plus près les réseaux neuronaux moteurs impliqués dans la locomotion sinusoïdale, qui repose sur une coordination entre motoneurones cholinergiques (pour la contraction) et GABAergiques (pour la relaxation des muscles opposés). Cette alternance est essentielle au déplacement, et dépend d'une organisation synaptique très précise (Zhou & Bessereau, 2019).

#### 4.1.2 Intégrité morphologique des motoneurones GABAergiques chez les mutants *shq-1*

Les résultats obtenus montrent que les mutations E180Y et E277K n'entraînent aucune altération morphologique visible dans les motoneurones GABAergiques de *C. elegans*. Le pourcentage d'animaux présentant des anomalies commissurales dans les motoneurones GABAergiques reste comparable entre les mutants *shq-1* et les témoins (Figure 3.2.A), et nous n'avons observé aucune désorganisation par microscopie à fluorescence (Figure 3.2.B). Toutefois, cela n'exclut pas l'existence de déficits fonctionnels plus subtils (McIntire et al., 1993). Il est en effet bien établi que des altérations majeures de la transmission inhibitrice peuvent se produire sans qu'aucune anomalie morphologique ne soit visible. Par exemple, chez les mutants *unc-25*, incapables de produire du GABA en raison de l'absence de glutamate décarboxylase, un phénotype locomoteur typique dit "shrinker" apparaît en réponse au toucher (McIntire et al., 1993). Ce comportement est également observé lorsque les motoneurones GABAergiques DD et VD sont détruits,

suggérant que la structure des neurones peut être présente, mais non fonctionnelle. De même, les mutations dans *unc-47* (transporteur vésiculaire du GABA) ou *unc-46* (ciblage synaptique) provoquent de forts déficits locomoteurs en lien avec une altération de la transmission inhibitrice, malgré une morphologie neuronale globalement conservée (McIntire et al., 1997 ; Schuske et al., 2007). Ces cas illustrent bien que la simple apparence des neurones ne suffit pas à conclure à leur bon fonctionnement. Pour dépasser cette limite, des approches complémentaires sont disponibles, comme les tests pharmacologiques ou les enregistrements électrophysiologiques (Richmond et Jorgensen, 1999). Par exemple, l'application de GABA exogène ou l'analyse des réponses musculaires peuvent révéler des défauts de transmission non détectables en imagerie. Chez les mutants *unc-49*, qui n'expriment plus les récepteurs GABAergiques UNC-49, aucune réponse musculaire n'est mesurable, bien que l'innervation anatomique soit intacte (Richmond et Jorgensen, 1999). Ce type d'approche pourrait être appliquées aux mutants *shq-1*, pour mieux cerner d'éventuelles atteintes de la neurotransmission inhibitrice que l'analyse morphologique seule ne permet pas de détecter.

#### 4.1.3 Altérations des motoneurones cholinergiques chez les mutants *shq-1*

Contrairement aux neurones GABAergiques, nos données mettent en évidence une atteinte marquée des motoneurones cholinergiques chez les mutants *shq-1*. Les mutations E180Y et E277K entraînent une augmentation significative des défauts de projection axonale, incluant des commissures à trajectoire courbée, irrégulière ou interrompue, ainsi qu'une prévalence élevée de varicosités axonales le long de la corde dorsale (Figure 3.3 et 3.4). Hall et Hedgecock (1991) ont montré que des défauts de transport intracellulaire, notamment vésiculaire, peuvent provoquer l'apparition de varicosités axonales, ces dilatations localisées étant souvent interprétées comme des signes d'accumulation de matériel synaptique ou de dysfonctionnement du transport axonal. Byrne et al. (2019) ont montré que la perturbation de la dynamique mitochondriale, notamment par l'invalidation de gènes comme *fzo-1* ou *drp-1*, peut altérer significativement la motricité et la fonction neuromusculaire chez *C. elegans*, sans nécessairement provoquer de remaniement morphologique majeur des neurones. Le gène *fzo-1* est impliqué dans la fusion des mitochondries, tandis que *drp-1* joue un rôle central dans leur fission, un processus indispensable à la répartition, à la qualité et à la plasticité du réseau mitochondrial. Une altération de ces mécanismes peut entraîner un déséquilibre de la morphologie mitochondriale, affectant la production d'énergie et la transmission synaptique (Byrne et al., 2019). Ces observations, bien qu'issues d'un autre contexte cellulaire, soulignent que l'intégrité des circuits neuromusculaires peut être compromise par des altérations d'organites intracellulaires essentiels (Byrne et al., 2019). Ces neurones cholinergiques sont

hautement actifs : ils assurent une libération continue d'acétylcholine pour induire la contraction musculaire, tout en co-activant les neurones GABAergiques antagonistes qui assurent l'alternance de la contraction musculaire (Jospin et al., 2009). Le gène *acr-2* code pour une sous-unité du récepteur nicotinique à l'acétylcholine, exprimée principalement dans ces motoneurones, où il joue un rôle clé dans la transmission synaptique excitatrice (Jospin et al., 2009). Des mutations gain de fonction comme *acr-2(gf)* entraînent une hyperactivation des circuits moteurs, provoquant des convulsions musculaires spontanées. Ce phénotype met en évidence l'importance d'un renouvellement synaptique soutenu pour maintenir une neurotransmission efficace, même en l'absence de défaut morphologique détectable (Jospin et al., 2009). Les mutations de *shq-1* pourraient ainsi compromettre la maturation des ribosomes via un défaut d'assemblage des snoRNP de type H/ACA, entraînant une pseudouridylation déficiente des ARNr et affectant préférentiellement les cellules à forte demande en traduction (Godin et al., 2009 ; Walbott et al., 2011; Li et al., 2011). Une pseudouridylation altérée pourrait également perturber la formation de ribosomes dits "spécialisés", dont la composition ou les modifications de l'ARNr influencent la traduction sélective de certains ARNm, notamment ceux impliqués dans le développement neuronal, le stress cellulaire ou la plasticité synaptique (Gerst, 2018 ; Genuth & Barna, 2018). Ce concept ouvre la possibilité que des sous-populations ribosomiques anormalement modifiées chez les mutants *shq-1* favorisent une traduction inefficace de gènes particulièrement sensibles à la structure de l'ARNr, contribuant ainsi aux phénotypes moteurs observés. Par ailleurs, plusieurs études ont démontré que des RNP H/ACA ne ciblent pas uniquement les ARNr, mais peuvent également pseudouridyler des ARNm, modulant leur stabilité, leur décodage ou leur capacité à être traduits (Carlile et al., 2014 ; Schwartz et al., 2014). Cette observation soulève la possibilité que certains ARN guides H/ACA "orphelins" puissent cibler des ARNm spécifiques dans les neurones, et que leur perte ou leur dysfonctionnement dans les mutants *shq-1* contribue à une dérégulation traductionnelle additionnelle, indépendante des ARNr. Afin d'explorer les conséquences fonctionnelles des altérations observées dans les motoneurones cholinergiques des mutants *shq-1*, nous avons réalisé des tests pharmacologiques ciblant la jonction neuromusculaire (Figure 3.5). L'aldicarbe, un inhibiteur de l'acétylcholinestérase, induit une accumulation d'acétylcholine dans la fente synaptique, entraînant une paralysie progressive dont la cinétique dépend de l'efficacité de la libération présynaptique (Mahoney et al., 2006 ; Nurrish et al., 1999). Les mutants E180Y et E277K ne présentent pas de différence significative de sensibilité à l'aldicarbe par rapport aux témoins, ce qui suggère que la libération présynaptique d'acétylcholine est globalement préservée. En revanche, une résistance au lévamisole est observée chez les deux mutants. Ce composé, agoniste des récepteurs nicotiniques de type UNC-38/UNC-29 localisés au niveau postsynaptique, provoque une contraction

musculaire dépendante de l'intégrité de ces récepteurs (Lewis et al., 1980 ; Gally et Bessereau, 2003 ; Richmond et Jorgensen, 1999). Dans les souches mutantes pour les sous-unités UNC-38 ou UNC-29, la réponse au lévamisole est abolie (Lewis et al., 1980 ; Gally et Bessereau, 2003), ce qui reflète un rôle indispensable de ces récepteurs dans la contraction musculaire. Dans notre étude, la résistance observée pourrait indiquer une altération fonctionnelle des jonctions neuromusculaires. Il est possible que ce déficit soit secondaire à un stress ribosomique neuronal, un lien suggéré dans des modèles cellulaires mammifères (Hetman et Slomnicki, 2019), bien que ce mécanisme reste à valider chez *C. elegans*. Toutefois, ces résultats doivent être interprétés avec prudence, car la densité et la distribution des récepteurs nicotiques n'ont pas été mesurées directement. Des approches complémentaires, telles que l'immunomarquage des sous-unités UNC-38 et UNC-29, par exemple via anticorps spécifiques ou fusions fluorescentes, permettraient de préciser leur localisation et expression (Lewis et al., 1987 ; Fleming et al., 1997). De même, l'utilisation de rapporteurs fluorescents ciblant les récepteurs cholinergiques, comme cela a été réalisé pour d'autres systèmes de neurotransmission chez *C. elegans* (Gendrel et al., 2016), renforcerait l'interprétation post-synaptique. Les résultats pharmacologiques obtenus chez *C. elegans* trouvent un écho intéressant dans les manifestations cliniques observées chez les patients porteurs de mutations *SHQ1*. En effet, en plus d'une dystonie infantile sévère et de troubles du tonus, plusieurs patients décrits par Sleiman et al. (2022) et Indelicato et al. (2022) présentent une faiblesse musculaire et une fatigabilité marquée, suggérant qu'une atteinte neuromusculaire pourrait contribuer au phénotype. Bien que les études disponibles ne rapportent pas de données électrophysiologiques détaillées permettant de conclure à un déficit postsynaptique spécifique, ces signes cliniques demeurent compatibles avec une vulnérabilité de la transmission cholinergique. L'hypersensibilité au lévamisole observée chez les mutants *shq-1*, qui ciblent directement les récepteurs nicotiques de type UNC-38/UNC-29, offre ainsi un parallèle fonctionnel plausible : dans les deux cas, une altération de la neurotransmission cholinergique pourrait contribuer à la symptomatologie motrice. Cette convergence renforce l'intérêt d'utiliser *C. elegans* pour explorer les mécanismes neuromusculaires potentiellement impliqués dans les déficits moteurs associés aux mutations *SHQ1* chez l'humain. En parallèle, l'analyse de comportements cholinergiques indépendants, tels que la régulation de la ponte, pourrait offrir une approche fonctionnelle complémentaire (Schafer, 2006). Enfin, plusieurs études, notamment Nonet et al. (1993), ont montré que les motoneurones cholinergiques sont particulièrement sensibles aux altérations du transport vésiculaire, ce qui perturbe significativement la mobilité synaptique. Nos résultats s'intègrent dans cette perspective, en suggérant que les mutations *shq-1* affectent préférentiellement les neurones à haute exigence biosynthétique, comme les motoneurones cholinergiques. À l'inverse, les motoneurones GABAergiques

ne présentent pas d'altérations morphologiques détectables, malgré leur rôle essentiel dans l'alternance musculaire, ce qui renforce l'idée d'une vulnérabilité différentielle entre les deux types neuronaux.

#### 4.1.4 Altérations dopaminergiques associées à la mutation E277K de *shq-1*

Outre les altérations observées dans le système cholinergique, la mutation E277K entraîne également des défauts marqués dans le développement des neurones dopaminergiques. L'analyse de ce système se justifie par les phénotypes cliniques observés chez les patients porteurs de mutations dans *SHQ1*, notamment une dystonie infantile sévère, parfois accompagnée de mouvements involontaires complexes et d'une rigidité importante (Sleiman et al., 2022). Une amélioration partielle sous lévodopa a été rapportée dans un cas, suggérant une possible implication du système dopaminergique dans les troubles moteurs observés (Sleiman et al., 2022). Ainsi, nos analyses du système dopaminergique montrent que 64,4 % des animaux mutants présentent des erreurs de guidage axonal, accompagnées d'anomalies morphologiques affectant les prolongements dendritiques et les corps cellulaires (Figure 3.6). Ce phénotype indique que la mutation E277K pourrait affecter plusieurs sous-types neuronaux impliqués dans la motricité. Chez *C. elegans*, les huit neurones dopaminergiques adultes (CEP, ADE, PDE) forment un système bien défini, largement utilisé comme indicateur du développement neuronal (Sulston et al., 1975). Ils interviennent dans la modulation de la locomotion, notamment en réponse à des stimuli sensoriels et aux conditions nutritionnelles (Omura et al., 2012). À ce stade, seule la mutation E277K a été analysée. L'évaluation du mutant E180Y permettrait de déterminer si ce phénotype dopaminergique est spécifique ou commun aux mutations *shq-1*.

#### 4.1.5 Perspectives et pistes d'investigation futures

Les résultats obtenus révèlent des altérations marquées des circuits moteurs cholinergiques et dopaminergiques chez les mutants *shq-1*, mais plusieurs mécanismes cellulaires restent à élucider. Une première piste consisterait à examiner plus précisément l'organisation des jonctions neuromusculaires. Bien que des défauts axonaux aient été observés chez les motoneurones cholinergiques, l'intégrité des synapses elles-mêmes n'a pas été évaluée. L'utilisation de marqueurs fluorescents tels que SNB-1::GFP, qui cible la synaptobrevine, a permis de visualiser *in vivo* la distribution des vésicules présynaptiques dans le système neuromusculaire de *C. elegans* (Gally et Bessereau, 2003). Dans cette même étude, la colocalisation de SNB-1::GFP avec UNC-49::YFP, un récepteur GABAergique postsynaptique, a permis de caractériser l'alignement pré- et post-synaptique (Gally et Bessereau, 2003). En parallèle, des approches d'immunomarquage ont montré que LEV-10 est indispensable à l'agrégation synaptique des récepteurs

cholinergiques comme UNC-29, condition nécessaire à la formation fonctionnelle des jonctions neuromusculaires (Gally et al., 2004). Par ailleurs, l'examen du compartiment musculaire pourrait s'avérer crucial pour compléter l'analyse des circuits neuromusculaires. En effet, bien que les altérations observées concernent principalement les motoneurones, les cellules musculaires peuvent également être affectées par les mutations de *shq-1*, soit de manière autonome, soit secondaire aux défauts neuronaux (Rogalski et al., 2000 ; Meissner et al., 2009). Chez *C. elegans*, des constructions fluorescentes telles que *myo-3::GFP*, qui marque les myofilaments des cellules musculaires, permettent une visualisation précise de l'organisation sarcomérique (Rogalski et al., 2000). D'autres outils comme UNC-112::GFP ciblent les structures d'ancrage des cellules musculaires au niveau des jonctions adhérentes, et fournissent des informations supplémentaires sur l'intégrité du cytosquelette musculaire (Meissner et al., 2009). Ces approches permettront de mieux caractériser les effets cellulaires des mutations *shq-1* et de distinguer les contributions respectives des compartiments neuronal et musculaire. Enfin, une compréhension plus intégrée des mécanismes moléculaires affectés par les mutations de *shq-1* nécessiterait d'explorer les altérations transcriptionnelles et celles affectant la traduction au sein des tissus moteurs. En tant que facteur essentiel à la biogenèse des snoRNP de type H/ACA, *shq-1* est impliqué dans la maturation des ARN ribosomiques via la pseudouridylation, un processus central à l'assemblage et à la fonction des ribosomes (Walbott et al., 2011 ; Yang et al., 2002 ; Li et al., 2011). Un dysfonctionnement de cette machinerie peut entraîner un stress ribosomique, affectant préférentiellement les cellules à forte activité biosynthétique, telles que les motoneurones ou les cellules musculaires (Hetman et Slomnicki, 2019 ; Danilova et Gazda, 2015). À notre connaissance, aucune étude transcriptomique ou protéomique globale n'a encore été menée chez des mutants *shq-1* chez *C. elegans*. Des approches exploitant le tri cellulaire par FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*) de cellules marquées à la GFP (neurones ou cellules musculaires), suivies d'analyses transcriptomiques (*microarray* ou RNA-seq), ont été appliquées avec succès chez *C. elegans* (Fox et al., 2005 ; Spencer et al., 2014 ; Kaletsky et al., 2018), suggérant que ces méthodes pourraient être étendues aux mutants *shq-1* pour identifier les voies de signalisation perturbées. L'application de telles stratégies permettrait potentiellement de relier de manière précise les altérations morpho-fonctionnelles observées à la fonction moléculaire de *SHQ1*.

#### 4.2 Analyse comportementale et neuronale des larves D174Y chez le poisson-zèbre

Afin d'évaluer les effets de la mutation D175Y identifiée dans le gène humain *SHQ1* chez des patients (Sleiman et al., 2022 ; Indelicato et al., 2022) dans un modèle vertébré, la substitution homologue D174Y a été introduite dans le gène orthologue *shq1* du poisson-zèbre (*Danio rerio*). Ce modèle est largement

utilisé pour l'étude du développement neuronal et locomoteur, en raison de la transparence de ses larves et des outils génétiques disponibles (Kalueff et al., 2014 ; Ingebretson et Masino, 2013). Étant donné les troubles moteurs précoces associés aux mutations *SHQ1* chez l'humain, nous avons axé notre analyse sur la morphologie générale, les comportements locomoteurs et l'architecture neuronale des larves mutantes. Les résultats sont présentés selon une progression logique, depuis les aspects génétiques jusqu'aux analyses morphologiques, comportementales, et histologiques, en terminant par les perspectives méthodologiques.

#### 4.2.1 Échec d'intégration de la mutation "E283K"

L'absence d'intégration de la mutation "E283K" dans le génome du poisson-zèbre s'explique principalement par une erreur de conception du brin donneur (ssODN). Alors que la mutation ciblée était GAG → AAG (Glu → Lys), le ssODN injecté contenait une substitution incorrecte, GAG → AGG (Glu → Arg), introduisant ainsi une mutation erronée. Cette substitution entraîne une modification de charge similaire à celle de la mutation souhaitée (de négative à positive), mais l'arginine qui en résulte possède une chaîne latérale plus encombrante et fortement polarisée, capable de former davantage de liaisons hydrogène et de ponts salins que la lysine (Betts et Russell, 2003 ; Livingstone et Barton, 1993). Les amorces HRM, conçues pour reconnaître le ssODN injecté, ont produit des profils d'amplification précoce, mais aucun embryon n'a montré de mutation confirmée par séquençage, suggérant soit une intégration transitoire, soit un mosaïcisme élevé (Thomas et al., 2014 ; Zischewski et al., 2017). Ces faux positifs pourraient aussi refléter un design sous-optimal des amorces, affecté par le pourcentage en GC, la température de fusion ou une région avec une séquence peu spécifique au locus (Thomas et al., 2014; New England Biolabs., 2021). Aucun des embryons analysés n'a présenté de mutation confirmée par séquençage, ce qui suggère que toute intégration éventuelle du ssODN, même incorrect, a été limitée ou transitoire, probablement confinée à un faible pourcentage de cellules, sans transmission au génome germlinal (Boel et al., 2018 ; Zu et al., 2013). Ce phénomène de mosaïcisme élevé dans la génération F0 est bien documenté dans les études CRISPR/HDR chez le poisson-zèbre (Boel et al., 2018 ; Zu et al., 2013). La réparation par homologie (*homology-directed repair*, HDR) est un mécanisme de correction de l'ADN qui utilise un brin donneur comme matrice pour insérer ou remplacer une séquence au site de coupure induit par Cas9 (Liao et al., 2024). Le faible taux d'intégration observé ici pourrait s'expliquer par une homologie imparfaite du ssODN ou par une efficacité limitée de la voie HDR (Boel et al., 2018) ; par une élimination possible des cellules porteuses si la substitution erronée en arginine induisait une cytotoxicité (hypothèse encore non documentée chez le poisson-zèbre) ; ou encore par un niveau élevé de mosaïcisme F0, rendant la mutation

difficile à détecter dans la descendance germinale (Hruscha et al., 2013 ; Zu et al., 2013). Ces difficultés sont souvent rapportées dans la littérature sur les stratégies de *knock-in* chez le poisson-zèbre : les taux d'intégration via HDR demeurent faibles (typiquement entre 1 % et 10 % chez les F0) et varient considérablement selon la qualité du design du ssODN, incluant notamment la longueur et l'orientation des bras d'homologie, la protection du site PAM par des mutations silencieuses, l'efficacité du clivage Cas9 ou encore le moment de l'injection (Boel et al., 2018 ; Hoshijima et al., 2016). L'absence de protection du site PAM ou une orientation sous-optimale des bras d'homologie figurent également parmi les facteurs limitant l'efficacité d'intégration (Prykhozij et al., 2018 ; Hoshijima et al., 2016). Face à ces contraintes, des alternatives comme le *Prime Editing* ont récemment émergé (Anzalone et al., 2019). Cette méthode associe une Cas9-nickase à une transcriptase inverse, guidée par un *prime editing guide RNA (pegRNA)*, pour introduire directement des substitutions ponctuelles sans cassure double brin ni apport d'un ssODN exogène (Anzalone et al., 2019). Elle permet ainsi d'améliorer la précision et, parfois, l'efficacité de l'édition, tout en minimisant la toxicité et les erreurs de réparation associées aux cassures double brin (Anzalone et al., 2019). À noter que, dans des conditions expérimentales similaires, l'intégration de la mutation D174Y dans le gène *shq1* a pu être obtenue avec succès, comme en témoignent les profils HRM spécifiques et les séquences validées chez plusieurs individus F0. L'absence d'intégration de la mutation "E283K" dans le génome du poisson-zèbre pourrait être liée à la nature du brin donneur utilisé. Le ssODN injecté comportait deux substitutions nucléotidiques adjacentes (GAG → AGG), alors que la mutation visée ne nécessitait qu'un seul changement de base (GAG → AAG). Plusieurs études ont montré que, dans les approches de *knock-in* par réparation homologue, l'efficacité est maximale lorsque le brin donneur présente un nombre minimal de modifications localisées à proximité immédiate du site de coupure induit par Cas9 (Boel et al., 2018 ; Hoshijima et al., 2016). À l'inverse, elle diminue lorsque plusieurs bases sont modifiées simultanément ou lorsque les substitutions sont éloignées du point de clivage (Paix et al., 2017). Il a également été observé que l'appariement entre le brin donneur et le génome cible peut être compromis si les mutations à introduire affectent la complémentarité locale avec l'ADN génomique, réduisant ainsi l'efficacité de l'incorporation du brin donneur pendant la réparation (Boel et al., 2018 ; Prykhozij et al., 2018). Ces données suggèrent que le design du ssODN "E283K", avec ses deux substitutions voisines, a pu compromettre l'efficacité de l'intégration par HDR. Dans les deux approches de *knock-in* (D174Y et "E283K"), les ssODN comportaient également plusieurs mutations silencieuses destinées à protéger le site PAM et à empêcher une recoupe par Cas9. Bien qu'elles ne modifient pas la séquence protéique, de telles substitutions peuvent théoriquement influencer la stabilité de l'ARNm ou la structure secondaire locale, voire modifier marginalement l'efficacité de traduction (Chamary et Hurst,

2005). Dans notre cas, les changements sont peu nombreux, situés dans une courte région dépourvue de motifs régulateurs connus, et leur impact fonctionnel potentiel est donc considéré comme très faible comparé à celui attendu de la mutation D174Y elle-même.

#### 4.2.2 Absence de phénotype morphologique

L'analyse morphologique des larves D174Y à 5 dpf n'a révélé aucune différence significative par rapport aux témoins de type sauvage. La longueur corporelle, le diamètre de l'œil ainsi que la longueur de la tête ont été mesurés à 5 dpf, en s'appuyant sur les repères morphologiques décrits par Kimmel et al. (1995), ce qui suggère que la mutation D174Y n'affecte pas visiblement le développement externe global à ce stade. Cette observation est en accord avec les résultats locomoteurs précédents, qui ne montraient pas non plus de déficit moteur manifeste chez les mutants. Toutefois, il est important de souligner que l'absence d'anomalies morphologiques ne garantit pas nécessairement une intégrité fonctionnelle. Par exemple, le réflexe optocinétique (OKR), qui consiste en des mouvements oculaires rythmiques déclenchés par la perception d'un motif visuel en mouvement, constitue un outil de choix pour tester l'intégrité fonctionnelle du système visuel des larves de poisson-zèbre (Emran et al., 2008). Ce réflexe repose sur une alternance de poursuites lentes (suivant le défilement de l'image) et de saccades rapides (remettant l'œil en position), permettant ainsi de stabiliser l'image sur la rétine. L'OKR émerge dès 5 dpf et dépend du bon développement de la rétine, des voies visuelles centrales et des circuits oculomoteurs (Emran et al., 2008). Il est donc fréquemment utilisé comme indicateur non invasif du bon fonctionnement neurovisuel, y compris chez des larves présentant une morphologie externe normale (Emran et al., 2008). Ainsi, l'absence d'anomalies morphologiques visibles chez les larves D174Y à 5 dpf suggère un développement externe globalement préservé. Toutefois, ce constat ne permet pas à lui seul de conclure à une intégrité fonctionnelle complète, en particulier au niveau des circuits neuronaux moteurs. Afin de déterminer si la mutation D174Y pouvait malgré tout entraîner des altérations comportementales plus subtiles, nous avons réalisé une série d'analyses locomotrices automatisées à différents stades du développement larvaire.

#### 4.2.3 Absence de phénotype locomoteur chez les larves D174Y

Les analyses comportementales réalisées à l'aide du système automatisé DanioVision n'ont révélé aucune différence significative entre les larves homozygotes D174Y, hétérozygotes et de type sauvage, que ce soit au niveau du *coiling* embryonnaire (17–19 hpf) ou de la distance de nage spontanée à 5 et 7 dpf. Ces deux tests sont couramment utilisés pour évaluer l'intégrité fonctionnelle des circuits moteurs en

développement chez le poisson-zèbre, la nage étant un indicateur neurocomportemental reconnu (Kalueff et al., 2014), et le *coiling* représentant le tout premier comportement moteur contrôlé par les circuits spinaux (Saint-Amant et Drapeau, 1998). Le *coiling* embryonnaire, observé dès 17 hpf, est le premier comportement moteur du poisson-zèbre ; il consiste en des contractions rythmiques du tronc, générées de manière autonome par les circuits spinaux avant l'apparition de la nage coordonnée, et reflète ainsi l'intégrité fonctionnelle des réseaux moteurs segmentaires (Saint-Amant et Drapeau, 1998). En raison de son caractère reproductible et précoce, le *coiling* est parfois utilisé pour détecter des altérations neuromusculaires majeures dans certains modèles mutants, même si son usage reste moins fréquent que celui de la nage spontanée dans les études comportementales de routine (Saint-Amant et Drapeau, 1998). À partir de 5 dpf, la nage spontanée devient un comportement moteur coordonné impliquant des circuits moteurs centraux et périphériques désormais fonctionnels (MacPhail et al., 2009). Ce comportement émerge lorsque le système neuromusculaire atteint une maturité suffisante pour permettre des réponses locomotrices autonomes, sans stimulation externe (Ingebretson et Masino, 2013). Il est largement utilisé dans les études comportementales chez le poisson-zèbre pour évaluer l'intégrité motrice globale et détecter des perturbations d'origine génétique, pharmacologique ou environnementale (MacPhail et al., 2009). L'enregistrement de la distance de nage ou des profils d'activité dans des plaques multi-puits est devenu une méthode standardisée dans les protocoles de criblage à haut débit (Ingebretson et Masino, 2013). Cependant, certains phénotypes locomoteurs discrets ou à expression retardée peuvent ne pas être détectés par ces tests, en particulier si la taille des groupes est restreinte ou si la variabilité interindividuelle est élevée (MacPhail et al., 2009). Dans cette étude, les comportements moteurs ont été enregistrés et quantifiés via un système automatisé de suivi vidéo des larves (usage classique dans les protocoles de plaques multi-puits (MacPhail et al., 2009; Ingebretson et Masino, 2013). DanioVision est un système intégré de suivi automatisé des larves de poisson-zèbre en plaques multi-puits, qui inclut l'observation au moyen d'une caméra IR haut débit et l'analyse vidéo via EthoVision XT (*DanioVision™ Observation Chamber*. Noldus Information Technology). Cette combinaison offre un environnement expérimental contrôlé avec un suivi cohérent et standardisé de la locomotion, largement adoptée dans le domaine des modèles larvaires (*DanioVision™ Observation Chamber*. Noldus Information Technology). Bien que ces outils offrent une sensibilité robuste pour détecter des altérations locomotrices globales, ici aucun résultat significatif n'a été détecté. Dans la mesure où nos analyses n'ont pas mis en évidence de déficit locomoteur global, il pourrait être pertinent d'explorer d'autres paradigmes comportementaux plus sensibles à des altérations sensorimotrices subtiles. Des tests réflexes déclenchés, tels que la réponse acoustique de type C-start, reposent sur un circuit neuronal bien défini impliquant les cellules de Mauthner

(Burgess et Granato, 2007 ; Medan et Preuss, 2014). Ces neurones géants du tronc cérébral reçoivent des entrées sensorielles multimodales (acoustiques, mécano-sensorielles, visuelles) et, lorsqu'un seul de ces neurones est activé, il déclenche un potentiel d'action unique qui commande une flexion latérale rapide du corps en forme de "C", suivie d'un mouvement de fuite (phase propulsive) , un mécanisme d'évasion ultra-rapide (latence de 3 à 10 ms), typique du poisson-zèbre (Burgess et Granato, 2007 ; Medan et Preuss, 2014). Ce modèle est largement documenté comme un marqueur robuste de l'intégrité fonctionnelle des voies sensorimotrices, permettant de détecter des altérations réflexes même lorsque la locomotion spontanée semble normale (Medan et Preuss, 2014). De même, la réponse motrice visuelle induite par un changement soudain de luminosité (*Visual Motor Response*, VMR) permet d'évaluer la réactivité locomotrice à des stimuli visuels brefs, et peut révéler des déficits moteurs ou sensoriels qui échapperaient à la détection dans les tests de nage libre (Emran et al., 2008). Bien qu'ils ne soient pas systématiquement employés pour toutes les mutations, ces paradigmes complémentaires pourraient enrichir l'évaluation fonctionnelle dans des modèles où les tests locomoteurs spontanés ne révèlent pas de phénotype apparent. L'absence de différence détectée suggère que la mutation D174Y ne perturbe pas, de manière manifeste, la mise en œuvre des comportements moteurs de base aux stades précoces chez le poisson zèbre. Cette observation contraste avec les résultats obtenus chez *C. elegans*, où des mutations homologues dans *shq-1* (E180Y et E277K) entraînent une diminution significative de l'activité locomotrice mesurée en nombre de battements par minute lors du test de nage en milieu liquide, indiquant un déficit moteur précoce. Cette divergence inter-espèce peut s'expliquer par plusieurs facteurs. Tout d'abord, le système nerveux de *C. elegans* est extrêmement simple, composé de 302 neurones somatiques identifiables, dont environ 75 motoneurones, sans réelle redondance génétique (White et al., 1986). À l'inverse, le poisson-zèbre possède un système moteur plus complexe et régulé par des mécanismes de plasticité homéostatique, capable de restaurer des comportements moteurs après des perturbations initiales (Mongeon et al., 2008). Par exemple, chez le mutant (GlyT1-/-), une paralysie motrice initiale induite par une accumulation de glycine est suivie d'une récupération progressive de la nage au cours des 48 à 72 hpf (Mongeon et al., 2008). Ce modèle illustre la capacité du poisson-zèbre à activer précocement des mécanismes compensatoires, notamment par des ajustements synaptiques au niveau spinal, permettant une restauration partielle de la motricité malgré une perturbation initiale importante (Mongeon et al., 2008). Bien que les larves ne retrouvent pas toutes les caractéristiques du type sauvage, ce modèle illustre clairement la capacité du poisson-zèbre à activer des processus adaptatifs pour restaurer la fonction motrice malgré une mutation initialement sévère. Cette robustesse est en partie attribuable à la duplication génomique survenue chez les téléostéens, qui a généré de nombreux gènes

paralogues pouvant partiellement compenser la perte ou la réduction de fonction d'un gène donné (Postlethwait et al., 1998 ; Howe et al., 2013). Cette absence de phénotype locomoteur pourrait également s'expliquer par des mécanismes de compensation transcriptionnelle (*transcriptional adaptation*) activés en réponse à la dégradation d'ARNm mutés, comme cela a été observé dans plusieurs modèles CRISPR/Cas9 chez le poisson-zèbre (El-Brolosy et Stainier, 2019). Un autre facteur à considérer est la sensibilité des tests comportementaux et la taille des échantillons. Dans notre étude, les larves analysées (environ 20 à 25 par groupe) se situent légèrement en dessous des standards recommandés pour les analyses comportementales à haute sensibilité, où des effectifs de 40 à 50 individus sont souvent préconisés pour détecter des effets modérés (Winter et al., 2008). Cependant, l'absence totale de tendance ou de différence, même légère, entre les groupes mutants et témoins dans nos premières analyses exploratoires, ainsi que le coût expérimental associé, n'a pas motivé l'augmentation des effectifs. Cette approche reste prudente mais pourrait limiter la détection de phénotypes subtils. Enfin, l'hypothèse d'une expression retardée du phénotype locomoteur mérite une attention particulière. Des études chez le poisson-zèbre ont montré que certains modèles de maladies neurodégénératives, tels que la maladie neurodégénérative héréditaire spinocérébelleuse de type 1 (SCA1), ne présentent des déficits moteurs qu'à un stade post-larvaire avancé, bien après l'apparition des premières anomalies neuroanatomiques (Elsaey et al., 2021). Dans le modèle SCA1 basé sur l'expression du gène mutant *ATXN1*, les altérations locomotrices ne sont observables qu'au stade juvénile ou adulte, malgré une atteinte cérébelleuse précoce (Elsaey et al., 2021). Ces observations renforcent l'idée que certains phénotypes pourraient échapper aux tests précoces de locomotion spontanée (Elsaey et al., 2021). En résumé, l'absence de différences locomotrices observées entre les mutants D174Y et les poissons sauvages pourrait résulter d'un effet modéré, masqué par des mécanismes compensatoires, ou d'une expression phénotypique différée. Pour aller au-delà de ces résultats négatifs, nous avons entrepris une analyse du système nerveux central par immunofluorescence, dans le but d'identifier des anomalies neuroanatomiques associées à la mutation D174Y.

#### 4.2.4 Altérations de l'architecture neuronale chez les larves D174Y, marquage à la tubuline acétylée et perspectives d'analyse transcriptionnelle

Au-delà des évaluations locomotrices et morphologiques, nous avons examiné l'architecture neuronale des larves D174Y à 5 dpf par immunomarquage de la tubuline acétylée, un marqueur des microtubules stables présent dans les axones et les structures neuronales matures (Weber et al., 2013). Les images représentatives acquises par microscopie confocale montrent une intensité de fluorescence globalement

plus élevée chez les larves D174Y que chez les témoins de type sauvage (Figure 3.16.B). Cette observation est confirmée par une quantification objective dans la région céphalique, où une augmentation significative de l'intensité moyenne est observée chez les mutants D174Y comparés aux larves WT (Figure 3.16.A). Ce résultat est compatible avec une modification de l'organisation microtubulaire, pouvant refléter soit une densité axonale accrue, soit une stabilisation excessive ou une désorganisation locale. Des études antérieures ont associé des variations de l'acétylation de la tubuline à des changements de stabilité axonale et de guidage (Fukushima et al., 2009 ; Weber et al., 2013 ; Lasser et al., 2018). Toutefois, des analyses complémentaires seraient nécessaires pour caractériser précisément la nature de cette augmentation. L'acétylation de la tubuline  $\alpha$ , notamment sur la lysine K40, constitue un marqueur post-traductionnel bien établi des microtubules stables (Janke et Montagnac, 2017 ; Fukushima et al., 2009). Cette modification est particulièrement enrichie dans les axones matures, où elle est associée à la stabilité structurale et à la longévité des faisceaux microtubulaires (Fukushima et al., 2009). Une augmentation de l'intensité du marquage à la tubuline acétylée peut effectivement refléter soit une densité accrue de faisceaux axonaux, soit une désorganisation locale des trajets neuraux, notamment en cas de défauts de guidage ou de croissance excessive des axones. Chez *C. elegans* et dans certains modèles de poissons zèbre, la protéine MEC-17/ $\alpha$ TAT1 contrôle cette acétylation et son absence perturbe la croissance axonale (Akella et al., 2010), tandis que chez la souris, l'inactivation d' $\alpha$ TAT1 provoque un déficit marqué en acétylation K40, associé à des anomalies structurales cérébrales et à une réduction de la coordination motrice (Kim et al., 2013). Ces données issues d'invertébrés et de vertébrés *in vivo* soulignent l'importance de cette modification dans le développement neuronal, mais ne permettent pas de conclure directement à un mécanisme identique chez le poisson-zèbre. Bien que notre modèle ne présente pas de déficit moteur manifeste, ces données soulignent l'intérêt de poursuivre les analyses neuroanatomiques plus fines, notamment pour évaluer d'éventuelles désorganisations régionales non détectées par les tests comportementaux de base. Il convient toutefois de souligner que l'interprétation des données obtenues par immunofluorescence à 5 dpf peut être influencée par la variabilité des protocoles expérimentaux et des paramètres d'acquisition entre les études, notamment en ce qui concerne la zone d'analyse et la taille des échantillons (Sakai et al., 2018). Dans notre cas, l'analyse a été réalisée sur un nombre modeste de larves ( $n = 13-14$  par groupe), ce qui limite la portée des conclusions. Une extension de l'échantillon renforcerait les résultats, comme recommandé par Montero Llopis et al. (2021), qui soulignent la nécessité de définir la taille d'échantillon en fonction d'une analyse de puissance ou d'expériences antérieures, afin d'assurer la validité statistique et la reproductibilité. Une piste complémentaire pour approfondir ces observations neuroanatomiques serait d'utiliser l'hybridation *in situ* (ISH) afin de visualiser l'expression

spatiale de *shq1* dans les larves D174Y (Chitramuthu et Bennett, 2013). Cette approche permettrait de déterminer si la mutation modifie la distribution régionale de l'ARNm, notamment dans les zones cérébrales présentant une intensité de marquage accrue en immunofluorescence. À ce jour, aucune étude ne rapporte une expression régionale de *shq1* chez le poisson-zèbre ou d'autres vertébrés ; le gène est généralement décrit comme ubiquitaire en raison de son rôle indispensable dans la biogenèse ribosomique. Ainsi, cette hypothèse ne repose pas sur des données publiées mais découle exclusivement des altérations neuroanatomiques observées dans notre lignée D174Y, ce qui justifie de l'explorer par hybridation in situ. L'ISH, et en particulier sa variante en coloration globale (WISH), est une méthode de référence pour cartographier l'expression spatio-temporelle des gènes dans les embryons et larves de poisson-zèbre, et pour relier ces profils aux phénotypes observés (Thisse et Thisse, 2008). Bien que *shq1* soit considéré comme un gène ubiquitaire impliqué dans la biogenèse ribosomique (Walbott et al., 2011 ; Li et al., 2011), sa cartographie précise dans le cerveau du poisson-zèbre reste mal caractérisée. En combinant immunofluorescence et ISH, il serait possible d'établir un lien direct entre l'expression génique et les altérations morphologiques identifiées. Grâce à l'utilisation de sondes antisens marquées, comme celles à la digoxigénine, la technique permet de visualiser simultanément la localisation et l'intensité de l'expression d'un transcrite d'intérêt (Chitramuthu et Bennett, 2013 ; Vauti et al., 2020). L'intégration de cette approche compléterait ainsi les données morphologiques et comportementales obtenues, en permettant de confirmer ou d'infirmer une régulation locale du gène *shq1* dans les zones cérébrales présentant des altérations chez les mutants D174Y.

#### 4.2.5 Validité du marquage TH et interprétation des résultats

Bien que le nombre moyen de neurones positifs à la tyrosine hydroxylase (TH<sup>+</sup>) ne diffère pas significativement entre les larves D174Y et les témoins, l'interprétation de ces résultats nécessite certaines précautions. Les signaux TH<sup>+</sup> apparaissent regroupés dans une région anatomique qui ne correspond pas clairement aux territoires dopaminergiques attendus à 5 dpf, notamment le diencephale antérieur, la région prétegmentaire et la ligne médiane du mésencéphale (Filippi et al., 2010 ; Ryu et al., 2007). L'anticorps primaire utilisé dans cette étude, un anticorps monoclonal dirigé contre la tyrosine hydroxylase, est pourtant reconnu pour sa spécificité dans la détection des neurones dopaminergiques chez le poisson-zèbre, et a été validé dans plusieurs travaux de cartographie neuronale (Filippi et al., 2010 ; Yamamoto et al., 2011). Toutefois, même un anticorps bien validé peut entraîner un marquage inattendu ou un bruit de fond si les étapes de fixation, de perméabilisation ou de blocage ne sont pas parfaitement maîtrisées. Ce type de problème est bien décrit dans la littérature : une fixation trop longue, un blocage insuffisant ou

une dilution inappropriée des anticorps peuvent induire un marquage de fond non spécifique (Magaki et al., 2019 ; Ramos-Vara et Miller, 2014). Par ailleurs, des liaisons non spécifiques de l'anticorps secondaire aux tissus, ou un lavage incomplet, peuvent accentuer ces signaux indésirables et compliquer l'interprétation des résultats (Magaki et al., 2019 ; Thermo Fisher Scientific, n.d.). Afin de lever les incertitudes liées à la localisation des signaux TH<sup>+</sup>, des approches complémentaires pourraient être mises en œuvre. L'utilisation de lignées transgéniques telles que Tg(th:GFP), dans laquelle l'expression de la GFP est contrôlée par le promoteur du gène th, permet de visualiser de manière fiable et spécifique les populations dopaminergiques dans le cerveau larvaire du poisson-zèbre (Meng et al., 2008). Cette lignée transgénique constitue un outil fiable et largement utilisé pour visualiser la distribution attendue des neurones dopaminergiques, et elle pourrait servir de comparaison directe pour valider le marquage observé chez les mutants D174Y.

#### 4.2.6 Perspectives méthodologiques et expérimentales

L'ensemble des analyses réalisées sur les larves D174Y n'a révélé aucun phénotype locomoteur ou morphologique évident aux stades précoces, malgré une augmentation du signal de tubuline acétylée suggérant des modifications neuroanatomiques régionales. Ces résultats laissent envisager des altérations fonctionnelles discrètes, non détectables par les tests de nage spontanée ou de *coiling*. Sur le plan fonctionnel, l'utilisation de tests réflexes déclenchés permettrait de détecter plus finement d'éventuelles perturbations sensorimotrices précoces. La réponse acoustique de type C-start, dépendante des cellules de Mauthner, constitue un marqueur sensible de l'intégrité des voies de fuite rapides (Burgess et Granato, 2007 ; Medan et Preuss, 2014). De même, la réponse motrice visuelle (VMR), induite par un changement brutal de luminosité, a montré sa capacité à révéler des déficits locomoteurs dans des modèles larvaires apparemment normaux (Emran et al., 2008). Sur le plan cellulaire, l'utilisation de marqueurs neuronaux pan-cellulaires, tels que la protéine HuC/D ou des lignées transgéniques exprimant un rapporteur fluorescent sous le contrôle du promoteur *elav3* (par exemple une lignée *elav3:GFP*), permettrait de visualiser l'ensemble des neurones, y compris les motoneurones (Muto et al., 2013), et d'affiner l'analyse morphologique dans les régions cérébrales où une altération du signal axonal a été observée (Nikolaou et al., 2012). Enfin, des analyses transcriptomiques globales (RNA-seq) ou unicellulaire (scRNA-seq) sur cerveaux ou moelles larvaires permettraient d'identifier les voies de signalisation perturbées, notamment celles liées à la biogenèse ribosomique ou à la stabilité du cytosquelette (Kelly et al., 2023 ; Shainer et al., 2023). Ces données pourraient être complétées par une analyse protéomique ciblée des tissus neuronaux (Singh et al., 2010), ainsi que par des hybridations in situ (WISH ou ISH) pour localiser précisément *shq1*

dans les structures cérébrales affectées (Chitramuthu et Bennett, 2013). L'intégration de ces approches multi-échelles permettrait d'établir un lien fonctionnel solide entre l'altération moléculaire de *SHQ1* et les dysfonctions motrices observées. Enfin, en lien avec les résultats de marquage TH, l'exploration plus spécifique du système dopaminergique pourrait être approfondie à l'aide de lignées transgéniques ou de co-marquages ciblés (Meng et al., 2008). Une telle approche permettrait de valider de manière indépendante l'intégrité des circuits dopaminergiques.

#### 4.3 Comparaison croisée des résultats entre *C. elegans* et le poisson-zèbre

L'analyse parallèle des mutants *shq-1* chez *C. elegans* (E277K et E180Y) et *shq1* chez le poisson-zèbre (D174Y) met en évidence la complémentarité expérimentale des deux modèles, mais aussi des divergences marquées dans la manifestation des phénotypes. Chez le nématode, les deux mutations conduisent à des altérations locomotrices significatives, accompagnées de défauts morphologiques dans les circuits moteurs, en particulier au niveau des motoneurones cholinergiques, mis en évidence par des approches comportementales, morphologiques et pharmacologiques fines. À l'inverse, chez le poisson-zèbre, la mutation D174Y n'a pas été associée à un phénotype locomoteur ou morphologique grossier détectable aux stades précoces, malgré la validation génétique de la mutation et la mise en évidence de modifications neuroanatomiques régionales par le marquage de la tubuline acétylée. Ce contraste peut donner l'impression que la complémentarité entre *C. elegans* et *Danio rerio* reste partiellement démontrée, en particulier parce que l'absence de déficit locomoteur chez le poisson-zèbre semble difficile à concilier avec les effets drastiques observés chez les patients porteurs de mutations *SHQ1* (troubles moteurs sévères, anomalies de la substance blanche) (Sleiman et al., 2022 ; Indelicato et al., 2022), ainsi qu'avec les altérations locomotrices nettes décrites chez *C. elegans*. La simple différence de complexité entre les systèmes nerveux des deux espèces ne suffit manifestement pas à expliquer cette divergence : si la complexité accrue d'un système vertébré impliquait systématiquement une plus grande vulnérabilité, on pourrait s'attendre à détecter au moins des altérations locomotrices modérées chez *Danio* aux stades analysés. Plusieurs hypothèses, non exclusives, peuvent être avancées pour interpréter cette situation. D'une part, le poisson-zèbre présente une robustesse développementale et une plasticité compensatoire importantes au cours des premiers jours de développement. Des études chez des mutants affectant la neurotransmission, comme les modèles glycinergiques, illustrent la capacité du système moteur larvaire à restaurer un patron locomoteur relativement fonctionnel après une perturbation initiale, via des mécanismes de plasticité synaptique et circuitaire au niveau spinal (par exemple Mongeon et al., 2008). Dans ce contexte, des effets initiaux de la mutation D174Y sur les circuits moteurs pourraient être

partiellement compensés, conduisant à une locomotion spontanée globalement préservée aux stades 5–7 dpf. Cette robustesse est susceptible d’être renforcée par la duplication spécifique du génome des téléostéens, qui a conduit à la rétention d’un pourcentage non négligeable de gènes dupliqués chez le poisson-zèbre (environ 20–30 % des gènes possèdent un paralogue), offrant un substrat moléculaire potentiel à la compensation fonctionnelle entre paralogues (Postlethwait et al., 2000 ; Howe et al., 2013 ; Glasauer et Neuhaus, 2014). De plus, la littérature récente sur la compensation génétique et la transcriptionnelle adaptation dans les modèles CRISPR chez le poisson-zèbre suggère que la dégradation d’ARNm mutés peut déclencher une surexpression de gènes apparentés, atténuant le phénotype attendu dans des lignées stables (El-Brolosy et Stainier., 2019 ; Kontarakis & Stainier, 2020). Ces mécanismes pourraient contribuer à masquer des effets modérés de la mutation D174Y sur le système moteur, en particulier si *shq1* possède des partenaires fonctionnels partiellement redondants dans certains tissus. D’autre part, la sensibilité des paradigmes comportementaux utilisés doit être prise en compte. Les tests de coiling embryonnaire et de nage spontanée sont bien établis pour évaluer l’intégrité globale des circuits moteurs en développement (Saint-Amant et Drapeau, 1998 ; MacPhail et al., 2009 ; Kalueff et al., 2014), mais ils restent principalement adaptés à la détection de perturbations locomotrices franches. Des déficits plus subtils : par exemple une altération de la coordination, de la fatigabilité, ou des réponses sensorimotrices rapides, pourraient échapper à ces approches et nécessiter des paradigmes réflexes déclenchés (C-start, VMR) ou des analyses à des stades juvéniles/adultes, comme cela a été montré dans d’autres modèles de maladies neurodégénératives où les déficits moteurs émergent tardivement malgré des atteintes neuroanatomiques précoces (Elsaey et al., 2021). Une autre dimension importante tient aux différences de contexte développemental et anatomique entre la larve de poisson-zèbre et le cerveau humain. Les manifestations cliniques associées aux mutations *SHQ1* chez l’humain (dystonie sévère, troubles moteurs complexes, anomalies de la substance blanche) impliquent des processus largement dépendants de la myélinisation et de l’organisation de voies axonales longues (Sleiman et al., 2022 ; Indelicato et al., 2022). Or, chez le poisson-zèbre, la myélinisation du système nerveux central émerge progressivement au cours des premiers jours et semaines, et les stades larvaires précoces représentent une phase encore très immature de l’organisation des voies myélinisées (Buckley et al., 2008 ; Czopka et al., 2013 ; Auer et al., 2018 ; Early et al., 2018). Des travaux récents ont montré que les oligodendrocytes et la myéline larvaire chez le poisson-zèbre constituent un modèle puissant pour étudier la dynamique de la myélinisation, mais que les patrons de myéline et leur maturité diffèrent de manière importante de ceux observés chez l’adulte et, a fortiori, chez l’humain (Auer et al., 2018). Dans ce cadre, il est plausible que certaines conséquences des mutations *SHQ1* sur les circuits moteurs myélinisés et la substance blanche

ne puissent pas être pleinement capturées à 5-7 dpf. De manière volontairement provocatrice, on pourrait donc considérer que, pour certaines dimensions spécifiques des maladies neurodéveloppementales ou neuromusculaires liées à *SHQ1* (notamment celles impliquant la substance blanche et la myéline), la larve de *Danio rerio* représente un modèle partiellement inadapté ou incomplet. Dans cette optique, l'absence de phénotype locomoteur manifeste ne traduirait pas une absence d'effet biologique, mais plutôt une discordance entre les caractéristiques cliniques humaines et ce que le modèle larvaire est capable de révéler aux stades étudiés. Plutôt que de remettre en cause la pertinence globale du poisson-zèbre, ces divergences invitent à délimiter plus précisément le champ d'application de chaque modèle. *C. elegans* apparaît comme un système très sensible pour détecter des perturbations neuromusculaires précoces et disséquer, à un niveau cellulaire et synaptique, les conséquences de mutations affectant la biogenèse ribosomique, dans un connectome entièrement cartographié et dépourvu de fortes redondances génétiques (White et al., 1986). Le poisson-zèbre, de son côté, est particulièrement adapté pour explorer (i) la mise en place de circuits neuronaux plus complexes dans un vertébré, (ii) les mécanismes de compensation et de plasticité au cours du développement (Mongeon et al., 2008), et (iii) l'émergence éventuelle de phénotypes à stades juvéniles ou adultes plus proches des manifestations humaines, plutôt que des déficits locomoteurs bruts aux stades larvaires précoces. Ainsi, loin d'invalider la complémentarité des deux modèles, l'absence de phénotype locomoteur majeur chez les larves D174Y met en lumière le fait que la comparaison croisée ne peut pas se limiter à un simple contraste « présence vs absence de déficit moteur ». Elle révèle la diversité des trajectoires phénotypiques possibles pour une même mutation *SHQ1* selon le contexte cellulaire, développemental et évolutif, et elle souligne que les divergences entre *C. elegans* et *Danio rerio* constituent en elles-mêmes une information biologique précieuse. Dans cette perspective, la combinaison des deux modèles reste pertinente, à condition de reconnaître clairement leurs limites respectives et d'ajuster les stratégies expérimentales (choix des stades, des tests fonctionnels, des approches moléculaires) pour capturer à la fois les phénotypes précoces détectés chez *C. elegans* et les altérations plus discrètes ou retardées potentiellement présentes chez le poisson-zèbre.

## CONCLUSION

Les travaux présentés dans ce mémoire ont exploré les conséquences fonctionnelles et cellulaires de mutations dans le gène *SHQ1*, impliqué dans la biogenèse des snoRNP de type H/ACA, en s'appuyant sur deux modèles complémentaires : *Caenorhabditis elegans* et *Danio rerio*. Par l'introduction de substitutions homologues dans les gènes orthologues *shq-1* et *shq1*, nous avons pu évaluer l'impact de ces altérations sur les circuits moteurs, avec une attention particulière portée aux réseaux cholinergiques et dopaminergiques. Chez *C. elegans*, les mutants *shq-1* présentent des altérations locomotrices marquées, une résistance pharmacologique au lévamisole et des défauts neuroanatomiques affectant les motoneurones cholinergiques, témoignant d'une forte vulnérabilité de ces cellules à une perturbation de la biogenèse ribosomique. Chez le poisson-zèbre, seule la mutation D174Y a pu être intégrée, et aucun phénotype locomoteur ou morphologique précoce n'a été détecté. Cette absence de déficit manifeste ne doit cependant pas être interprétée comme une absence d'effet biologique : les stades larvaires précoces sont caractérisés par un fort potentiel de compensation développementale, et la sensibilité des paradigmes comportementaux standards reste limitée. Les altérations neuroanatomiques régionales observées en immunofluorescence suggèrent que des effets plus subtils ou plus tardifs pourraient émerger, possiblement en lien avec des processus encore immatures tels que la myélinisation.

En croisant les résultats obtenus chez l'invertébré et chez le vertébré, ce travail démontre l'intérêt d'approches multi-modèles pour étudier les conséquences de mutations *SHQ1*. Il montre également que la complémentarité entre *C. elegans* et *Danio rerio* repose non pas sur l'expression d'un même phénotype locomoteur, mais sur la capacité de chaque système à révéler des aspects distincts des mécanismes cellulaires et développementaux affectés. Cette perspective justifie la mise en place d'analyses plus fines, transcriptomiques, synaptiques, ou comportementales déclenchées, afin d'identifier des phénotypes discrets ou émergents.

Enfin, ce projet ouvre des perspectives concrètes pour la modélisation fonctionnelle de pathologies humaines liées aux complexes H/ACA, et contribue à une meilleure compréhension des mécanismes du stress ribosomique dans les circuits moteurs au sein de systèmes modèles complémentaires.

## BIBLIOGRAPHIE

- Ahrens, M. B., & Engert, F. (2015). Large-scale imaging in small brains. *Current opinion in neurobiology*, 32, 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.01.007>
- Akella, J. S., Wloga, D., Kim, J., Starostina, N. G., Lyons-Abbott, S., Morrissette, N. S., Dougan, S. T., Kipreos, E. T., & Gaertig, J. (2010). MEC-17 is an  $\alpha$ -tubulin acetyltransferase. *Nature*, 467(7312), 218–222. <https://doi.org/10.1038/nature09324>
- Alfonso, A., Grundahl, K., Duerr, J. S., Han, H. P., & Rand, J. B. (1993). The *Caenorhabditis elegans* unc-17 gene: a putative vesicular acetylcholine transporter. *Science*, 261(5121), 617–619. <https://doi.org/10.1126/science.8342028>
- AlHargan, A., AlMuhaizea, M. A., Almass, R., Alwadei, A. H., Daghestani, M., Arold, S. T., & Kaya, N. (2023). SHQ1-associated neurodevelopmental disorder: Report of the first homozygous variant in unrelated patients and review of the literature. *Human genome variation*, 10(1), 7. <https://doi.org/10.1038/s41439-023-00234-z>
- Alidou-D'Anjou, I., Patel, A., Sleiman, S., & Dragon, F. (2023). Human *SHQ1* variants R335C and A426V lead to severe ribosome biogenesis defects when expressed in yeast. *Frontiers in genetics*, 14, 1240416. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1240416>
- Andor Technology. (n.d.). *Advantages of using Caenorhabditis elegans as a model organism*. Oxford Instruments. <https://andor.oxinst.com/learning/view/article/advantages-of-using-caenorhabditis-elegans-as-a-model-organism>
- Anzalone, AV, Randolph, PB, Davis, JR *et al.* (2019). Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* 576, 149–157. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4>
- Armistead, J., & Triggs-Raine, B. (2014). Diverse diseases from a ubiquitous process: the ribosomopathy paradox. *FEBS letters*, 588(9), 1491–1500. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.03.024>
- Asakawa, K., & Kawakami, K. (2008). Targeted gene expression by the Gal4-UAS system in zebrafish. *Development, Growth & Differentiation*, 50(6), 391–399. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2008.01044.x>
- Auer, F., Vagionitis, S., & Czopka, T. (2018). Evidence for Myelin Sheath Remodeling in the CNS Revealed by In Vivo Imaging. *Current biology : CB*, 28(4), 549–559.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.017>
- Bergen, D. J. M., Kague, E., & Hammond, C. L. (2019). Zebrafish as an Emerging Model for Osteoporosis: A Primary Testing Platform for Screening New Osteo-Active Compounds. *Frontiers in endocrinology*, 10, 6. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00006>
- Bessler, M., Wilson, D. B., & Mason, P. J. (2010). Dyskeratosis congenita. *FEBS letters*, 584(17), 3831–3838. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.05.019>

- Betts, M. J., & Russell, R. B. (2003). Amino acid properties and consequences of substitutions. In I. C. Gray (Ed.), *Bioinformatics for Geneticists* (pp. 289–316). Wiley.  
<https://doi.org/10.1002/0470867302.ch14>
- Bizarro, J., & Meier, U. T. (2017). Inherited SHQ1 mutations impair interaction with NAP57/dyskerin, a major target in dyskeratosis congenita. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 5(6), 805–808.  
<https://doi.org/10.1002/mgg3.314>
- Boel, A., Steyaert, W., De Rocker, N., Menten, B., Callewaert, B., De Paepe, A., Coucke, P., & De Baere, E. (2018). BATCH-GE: Batch analysis of Next-Generation Sequencing data for genome editing assessment. *Scientific Reports*, 8, 422. <https://doi.org/10.1242/dmm.035352>
- Boulin, T., Etchberger, J. F., & Hobert, O. (2006). Reporter gene fusions. In *WormBook: The online review of C. elegans biology* (pp. 1–23). <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.106.1>
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77(1), 71–94.  
<https://doi.org/10.1093/genetics/77.1.71>
- Buckingham, S. D., & Sattelle, D. B. (2009). Fast, automated measurement of nematode swimming (thrashing) without morphometry. *BMC Neuroscience*, 10, 84. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-10-84>
- Buckley, C. E., Goldsmith, P., & Franklin, R. J. (2008). Zebrafish myelination: a transparent model for remyelination?. *Disease models & mechanisms*, 1(4-5), 221–228.  
<https://doi.org/10.1242/dmm.001248>
- Buhr, F., Jha, S., Thommen, M., Mittelstaet, J., Kutz, F., Schwalbe, H., Rodnina, M. V., & Komar, A. A. (2016). Synonymous Codons Direct Cotranslational Folding toward Different Protein Conformations. *Molecular cell*, 61(3), 341–351. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.01.008>
- Burgess, H. A., & Granato, M. (2007). Modulation of locomotor activity in larval zebrafish during light adaptation. *The Journal of experimental biology*, 210(Pt 14), 2526–2539.  
<https://doi.org/10.1242/jeb.003939>
- Byerly, L., Cassada, R. C., & Russell, R. L. (1976). The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. I. Wild-type growth and reproduction. *Developmental biology*, 51(1), 23–33.  
[https://doi.org/10.1016/0012-1606\(76\)90119-6](https://doi.org/10.1016/0012-1606(76)90119-6)
- Byrne, JJ, Soh, MS, Chandhok, G. et al. (2019). Disruption of mitochondrial dynamics affects behaviour and lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Cell. Mol. Life Sci.* 76, 1967–1985.  
<https://doi.org/10.1007/s00018-019-03024-5>
- C. elegans Sequencing Consortium (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5396), 2012–2018.  
<https://doi.org/10.1126/science.282.5396.2012>
- Cao, J., Guan, G., Ho, V. W. S., Chan, C. J., He, S., Wang, Y., ... & Huang, X. (2020). Establishment of a morphological atlas of the *Caenorhabditis elegans* embryo using deep-learning-based 4D segmentation. *Nat Commun* 11, 6254 <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19863-x>

- Carlile, T. M., Rojas-Duran, M. F., Zinshteyn, B., Shin, H., Bartoli, K. M., & Gilbert, W. V. (2014). Pseudouridine profiling reveals regulated mRNA pseudouridylation in yeast and human cells. *Nature*, *515*(7525), 143–146. <https://doi.org/10.1038/nature13802>
- Cassada, R. C., & Russell, R. L. (1975). The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental biology*, *46*(2), 326–342. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(75\)90109-8](https://doi.org/10.1016/0012-1606(75)90109-8)
- Cerdeira, V. (2022). Novel genes implicated in the development of the nervous system in *C. elegans* [Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Montréal]. Archipel. <https://archipel.ugam.ca/id/eprint/15584>
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., & Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, *263*(5148), 802–805. <https://doi.org/10.1126/science.8303295>
- Chamary, J. V., & Hurst, L. D. (2005). Evidence for selection on synonymous mutations affecting stability of mRNA secondary structure in mammals. *Genome biology*, *6*(9), R75. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-9-r75>
- Chang, C. H., Wong, L. C., Huang, C. W., Li, Y. R., Yang, C. W., Tsai, J. W., & Lee, W. T. (2024). Pathogenic SHQ1 variants result in disruptions to neuronal development and the dopaminergic pathway. *Experimental neurology*, *382*, 114968. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2024.114968>
- Chase, D. L., & Koelle, M. R. (2007). Biogenic amine neurotransmitters in *C. elegans*. In *WormBook* (pp. 1–15). <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.132.1>
- Chi, C. S., Tsai, C. R., & Lee, H. F. (2023). Biallelic SHQ1 variants in early infantile hypotonia and paroxysmal dystonia as the leading manifestation. *Human genetics*, *142*(8), 1029–1041. <https://doi.org/10.1007/s00439-023-02533-5>
- Chitramuthu, B. P., & Bennett, H. P. J. (2013). High resolution whole mount in situ hybridization within zebrafish embryos to study gene expression and function. *Journal of Visualized Experiments*, (80), e50644. <https://doi.org/10.3791/50644>
- Cook, S. J., Jarrell, T. A., Brittin, C. A., Wang, Y., Bloniarz, A. E., Yakovlev, M. A., ... & Emmons, S. W. (2019). Whole-animal connectomes of both *Caenorhabditis elegans* sexes. *Nature*, *571*(7763), 63–71. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1352-7>
- Cuentas-Condori, A., & Miller Rd, D. M. (2020). Synaptic remodeling, lessons from *C. elegans*. *Journal of neurogenetics*, *34*(3-4), 307–322. <https://doi.org/10.1080/01677063.2020.1802725>
- Culetto, E., & Sattelle, D. B. (2000). A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes. *Human molecular genetics*, *9*(6), 869–877. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.6.869>
- Czopka, T., Ffrench-Constant, C., & Lyons, D. A. (2013). Individual oligodendrocytes have only a few hours in which to generate new myelin sheaths in vivo. *Developmental cell*, *25*(6), 599–609. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.05.013>

- Da Costa, L., Leblanc, T., & Mohandas, N. (2020). Diamond-Blackfan anemia. *Blood*, 136(11), 1262–1273. <https://doi.org/10.1182/blood.2019000947>
- Danilova, N., & Gazda, H. T. (2015). Ribosomopathies: how a common root can cause a tree of pathologies. *Disease Models & Mechanisms*, 8(9), 1013–1026. <https://doi.org/10.1242/dmm.020529>
- Decatur, W. A., & Fournier, M. J. (2002). rRNA modifications and ribosome function. *Trends in biochemical sciences*, 27(7), 344–351. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(02\)02109-6](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(02)02109-6)
- Dickinson, D. J., & Goldstein, B. (2016). CRISPR-based methods for *Caenorhabditis elegans* genome engineering. *Genetics*, 202(3), 885–901. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.182162>
- Drummond, I., & Austin-Tse, C. (2013). Zebrafish cilia. *Methods in enzymology*, 525, 219–244. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397944-5.00011-0>
- Early, J. J., Cole, K. L. H., Williamson, J. M., Swire, M., Kamadurai, H., Muskavitch, M., & Lyons, D. A. (2018). An automated high-resolution in vivo screen in zebrafish to identify regulators of myelination. *eLife*, 7, e35136. doi:10.7554/eLife.35136
- El-Brolosy, M. A., & Stainier, D. Y. R. (2017). Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS Genetics*, 13(7), e1006780. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006780>
- El-Brolosy, M. A., Kontarakis, Z., Rossi, A., Kuenne, C., Günther, S., Fukuda, N., Kikhi, K., Boezio, G. L. M., Takacs, C. M., Lai, S. L., Fukuda, R., Gerri, C., Giraldez, A. J., & Stainier, D. Y. R. (2019). Genetic compensation triggered by mutant mRNA degradation. *Nature*, 568(7751), 193–197. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1064-z>
- Elsaey, M. A., Namikawa, K., & Köster, R. W. (2021). Genetic modeling of the neurodegenerative disease Spinocerebellar Ataxia Type 1 in zebrafish. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 7351. <https://doi.org/10.3390/ijms22147351>
- Emmons, S. W. (2015). The beginning of connectomics: a commentary on White et al. (1986) 'The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*'. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 370(1666), 20140309. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0309>
- Emran, F., Rihel, J., & Dowling, J. E. (2008). A behavioral assay to measure responsiveness of zebrafish to changes in light intensities. *Journal of Visualized Experiments*, 20, e923. <https://doi.org/10.3791/923>
- Ferretti, M. B., & Karbstein, K. (2019). Does functional specialization of ribosomes really exist? *RNA*, 25(5), 521–538. <https://doi.org/10.1261/rna.069823.118>
- Filippi, A., Mahler, J., Schweitzer, J., & Driever, W. (2010). Expression of the paralogous tyrosine hydroxylase encoding genes th1 and th2 reveals the full complement of dopaminergic and noradrenergic neurons in zebrafish larval and juvenile brain. *The Journal of comparative neurology*, 518(4), 423–438. <https://doi.org/10.1002/cne.22213>

- Fleming, J. T., Squire, M. D., Barnes, T. M., Tornoe, C., Matsuda, K., Ahnn, J., Fire, A., Sulston, J. E., Barnard, E. A., & Sattelle, D. B. (1997). *Caenorhabditis elegans* levamisole resistance genes *lev-1*, *unc-29*, and *unc-38* encode functional nicotinic acetylcholine receptor subunits. *The Journal of Neuroscience*, 17(15), 5843–5857. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-15-05843.1997>
- Fox, R. M., et al. (2005). A gene expression fingerprint of *C. elegans* embryonic motor neurons. *BMC Genomics*, 6, 42. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-6-42>
- Fukushima, N., Furuta, D., Hidaka, Y., Moriyama, R., & Tsujiuchi, T. (2009). Post-translational modifications of tubulin in the nervous system. *Journal of Neurochemistry*, 109(3), 683–693. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06013.x>
- Gally, C., & Bessereau, J.-L. (2003). *C. elegans*: Of neurons and genes. *M/S : médecine sciences*, 19(6–7), 725–734. <https://doi.org/10.1051/medsci/20031967725>
- Gally, C., & Bessereau, J.-L. (2003). GABA is dispensable for the formation of junctional GABA receptor clusters in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neuroscience*, 23(7), 2591–2599. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-07-02591.2003>
- Gally, C., Eimer, S., Richmond, J. E., & Bessereau, J. L. (2004). A transmembrane protein required for acetylcholine receptor clustering in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 431(7008), 578–582. <https://doi.org/10.1038/nature02893>
- Ganot, P., Caizergues-Ferrer, M., & Kiss, T. (1997). The family of box ACA small nucleolar RNAs is defined by an evolutionarily conserved secondary structure and ubiquitous sequence elements essential for RNA accumulation. *Genes & Development*, 11(7), 941–956. <https://doi.org/10.1101/gad.11.7.941>
- Gendrel, M., Atlas, E. G., & Hobert, O. (2016). A cellular and regulatory map of the GABAergic nervous system of *C. elegans*. *eLife*, 5, e17686. <https://doi.org/10.7554/eLife.17686>
- Genuth, N. R., & Barna, M. (2018). The Discovery of Ribosome Heterogeneity and Its Implications for Gene Regulation and Organismal Life. *Molecular cell*, 71(3), 364–374. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.07.018>
- Gerst J. E. (2018). Pimp My Ribosome: Ribosomal Protein Paralogs Specify Translational Control. *Trends in genetics : TIG*, 34(11), 832–845. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.08.004>
- Ghosh-Roy, A., Wu, Z., Goncharov, A., Jin, Y., & Chisholm, A. D. (2010). Calcium and cyclic AMP promote axonal regeneration in *Caenorhabditis elegans* and require DLK-1 kinase. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(9), 3175–3183. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5464-09.2010>
- Glasauer, S. M., & Neuhauss, S. C. (2014). Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. *Molecular genetics and genomics : MGG*, 289(6), 1045–1060. <https://doi.org/10.1007/s00438-014-0889-2>

- Glousker, G., Touzot, F., Revy, P., Tzfati, Y., & Savage, S. A. (2015). Unraveling the pathogenesis of Hoyeraal-Hreidarsson syndrome. *British journal of haematology*, 170(4), 457–471. <https://doi.org/10.1111/bjh.13442>
- Godin, K. S., Walbott, H., Leulliot, N., van Tilbeurgh, H., & Varani, G. (2009). The box H/ACA snoRNP assembly factor Shq1p is a chaperone protein homologous to Hsp90 cochaperones that binds to the Cbf5p enzyme. *Journal of molecular biology*, 390(2), 231–244. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.04.076>
- Guglas, K., Kozłowska-Masłoń, J., Kolenda, T., Paszkowska, A., Teresiak, A., Bliźniak, R., & Lamperska, K. (2022). Midsize noncoding RNAs in cancers. *Reports of practical oncology and radiotherapy*, 27(6), 1077–1093. <https://doi.org/10.5603/RPOR.a2022.0123>
- Hall, D. H., & Hedgecock, E. M. (1991). Kinesin-related gene unc-104 is required for axonal transport of synaptic vesicles in *C. elegans*. *Cell*, 65(5), 837–847. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90391-B](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90391-B)
- Henras, A. K., Plisson-Chastang, C., O'Donohue, M. F., Chakraborty, A., & Gleizes, P. E. (2015). An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 6(2), 225–242. <https://doi.org/10.1002/wrna.1269>
- Henras, A., Henry, Y., Bousquet-Antonelli, C., Noaillac-Depeyre, J., Gélugne, J. P., & Caizergues-Ferrer, M. (2004). Nhp2p and Nop10p are essential for the function of H/ACA snoRNPs. *EMBO Journal*, 23(3), 823–833. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.23.7078>
- Hershey, J. W. B., Sonenberg, N., & Mathews, M. B. (2019). Principles of Translational Control. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 11(9), a032607. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032607>
- Hetman, M., & Slomnicki, L. P. (2019). Ribosomal biogenesis as an emerging target of neurodevelopmental pathologies. *Journal of neurochemistry*, 148(3), 325–347. <https://doi.org/10.1111/jnc.14576>
- Hills, T., Brockie, P. J., & Maricq, A. V. (2004). Dopamine and glutamate control area-restricted search behavior in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Neuroscience*, 24(5), 1217–1225. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1569-03.2004>
- Hinnebusch, A. G., & Lorsch, J. R. (2012). The mechanism of eukaryotic translation initiation: new insights and challenges. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(10), a011544. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011544>
- Hobert, O. (2010). Neurogenesis in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *WormBook*, 1–24. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.12.2>
- Hodgkin J. (1992). Genetic sex determination mechanisms and evolution. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 14(4), 253–261. <https://doi.org/10.1002/bies.950140409>

- Hodgkin, J., Horvitz, H. R., & Brenner, S. (1979). Nondisjunction mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 91(1), 67–94. <https://doi.org/10.1093/genetics/91.1.67>
- Hoshijima, K., Jurynek, M. J., & Grunwald, D. J. (2016). Efficient CRISPR/Cas9-based methods for generating deletion mutations and F<sub>0</sub> embryos that lack gene function in zebrafish. *Developmental Cell*, 36(6), 654–667. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.02.015>
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J. C., Koch, R., Rauch, G. J., White, S., Chow, W., ... Stemple, D. L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498–503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>
- Hruscha, A., Krawitz, P., Rechenberg, A., Heinrich, V., Hecht, J., Haass, C., & Schmid, B. (2013). Efficient CRISPR/Cas9 genome editing with low off-target effects in zebrafish. *Development*, 140(24), 4982–4987. <https://doi.org/10.1242/dev.099085>
- Hughes, K. J., & Vidal-Gadea, A. G. (2022). Methods for Modulating and Measuring Neuromuscular Exertion in *C. elegans*. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2468, 339–356. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2181-3\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2181-3_19)
- Hunt, R. C., Simhadri, V. L., Iandoli, M., Sauna, Z. E., & Kimchi-Sarfaty, C. (2014). Exposing synonymous mutations. *Trends in genetics : TIG*, 30(7), 308–321. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.04.006>
- Indelicato, E., Boesch, S., Baumgartner, M., Plecko, B., Winkelmann, J., & Zech, M. (2022). Confirmation du rôle causal des variants de SHQ1. *Movement Disorders*. <https://doi.org/10.1002/mds.29281>
- Ingebretson, J. J. & Masino, M. A. (2013). *Quantification of locomotor activity in larval zebrafish: Considerations for the design of high-throughput behavioral studies*. *Frontiers in Neural Circuits*, 7, Article 109. <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00109>
- Invitrogen (Thermo Fisher Scientific). (n.d.). Goat anti-Mouse IgG (H+L), Alexa Fluor 488. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A11001>
- Janke, C., & Montagnac, G. (2017). Causes and Consequences of Microtubule Acetylation. *Current biology : CB*, 27(23), R1287–R1292. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.10.044>
- Johnson, C. D., & Russell, R. L. (1983). Multiple molecular forms of acetylcholinesterase in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of neurochemistry*, 41(1), 30–46. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1983.tb11811.x>
- Jospin, M., Qi, Y. B., Stawicki, T. M., Boulin, T., Schuske, K. R., Horvitz, H. R., Bessereau, J.-L., Jorgensen, E. M., & Jin, Y. (2009). A neuronal acetylcholine receptor. *PLoS Biology*, 7(12), e1000265. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000265>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A. et al. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>

- Kaletta, T., & Hengartner, M. O. (2006). Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(5), 387–398. <https://doi.org/10.1038/nrd2031>
- Kaletsky, R., et al. (2018). Transcriptome analysis of adult *C. elegans* cells reveals tissue-specific gene and isoform expression. *PLoS Genetics*, 14(8), e1007559. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007559>
- Kalia, L. V., & Lang, A. E. (2015). Parkinson's disease. *The Lancet*, 386(9996), 896–912. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61393-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61393-3)
- Kalueff, A. V., Stewart, A. M., & Gerlai, R. (2014). Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*, 35(2), 63–75. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2013.12.002>
- Karnani, S., Feldman, M., Peabody, T., Armengol, V., & Margolesky, J. (2025). Dopa-sensitive dystonia associated with novel SHQ1 variants. *Neurology*, 104(7\_Suppl\_1). <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000210561> (Résumé de congrès présélectionné, non publié sous forme d'article complet)
- Katzman, B. (2017). Volumetric 3D Reconstruction of Tissues in *C. elegans*: Part 1. <https://medium.com/@bradenkatzman/volumetric-3d-reconstruction-of-tissues-in-celegans-part-1-443fe3113e15>
- Kelly, J. J., Wen, H., & Brehm, P. (2023). Single-cell RNA-seq analysis of spinal locomotor circuitry in larval zebrafish reveals transcriptional diversity of motor and interneuron subtypes. *eLife*, 12, e89338. <https://doi.org/10.7554/eLife.89338.3>
- Kim, G. W., Li, L., Ghorbani, M., You, L., & Yang, X. J. (2013). Mice lacking  $\alpha$ -tubulin acetyltransferase 1 are viable but display  $\alpha$ -tubulin acetylation deficiency and dentate gyrus distortion. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(28), 20334–20350. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.464792>
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203(3), 253–310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>
- Kiss T. (2002). Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell*, 109(2), 145–148. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00718-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00718-3)
- Komar A. A. (2009). A pause for thought along the co-translational folding pathway. *Trends in biochemical sciences*, 34(1), 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2008.10.002>
- Kontarakis, Z., & Stainier, D. Y. R. (2020). Genetics in Light of Transcriptional Adaptation. *Trends in genetics : TIG*, 36(12), 926–935. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2020.08.008>
- Kornberg, R. D. (2007). The molecular basis of eukaryotic transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(32), 12955–12961. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704138104>

- Kudla, G., Murray, A. W., Tollervey, D., & Plotkin, J. B. (2009). Coding-sequence determinants of gene expression in *Escherichia coli*. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5924), 255–258. <https://doi.org/10.1126/science.1170160>
- Kuersten, S., Ohno, M., & Mattaj, I. W. (2001). Nucleocytoplasmic transport: Ran, beta and beyond. *Trends in Cell Biology*, 11(12), 497–503. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(01\)02144-4](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(01)02144-4)
- Lasser, M., Tiber, J., & Lowery, L. A. (2018). The role of the microtubule cytoskeleton in neurodevelopmental disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 165. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00165>
- Lewis, J. A., Elmer, J. S., Skimming, J., McLafferty, S., Fleming, J., & McGee, T. (1987). Cholinergic receptor mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 7(10), 3059–3071. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.07-10-03059.1987>
- Lewis, J. A., Wu, C. H., Levine, J. H., & Berg, H. (1980). The genetics of levamisole resistance in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 95(4), 905–928. <https://doi.org/10.1093/genetics/95.4.905>
- Li, S., Duan, J., Li, D., Ma, S., & Ye, K. (2011). Structure of the Shq1–Cbf5–Nop10–Gar1 complex and implications for H/ACA RNP biogenesis and dyskeratosis congenita. *The EMBO Journal*, 30(24), 5010–5020. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.427>
- Liao, H., Wu, J., VanDusen, N. J., Li, Y., & Zheng, Y. (2024). CRISPR-Cas9-mediated homology-directed repair for precise gene editing. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 35(4), 102344. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2024.102344>
- Lieschke, G. J., & Currie, P. D. (2007). Animal models of human disease: Zebrafish swim into view. *Nature Reviews Genetics*, 8(5), 353–367. <https://doi.org/10.1038/nrg2091>
- Livingstone, C. D., & Barton, G. J. (1993). Protein sequence alignments: A strategy for the hierarchical analysis of residue conservation. *Computer Applications in the Biosciences*, 9(6), 745–756. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/9.6.745>
- MacPhail, R. C., et al. (2009). *Locomotion in larval zebrafish: Influence of time of day, lighting and ethanol*. *Neurotoxicology*, 30(1), 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2008.09.011>
- Magaki, S., Hojat, S. A., Wei, B., So, A., & Yong, W. H. (2019). An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1897, 289–298. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5\\_25](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_25)
- Mahoney, T. R., Luo, S., & Nonet, M. L. (2006). Analysis of synaptic transmission in *Caenorhabditis elegans* using an aldicarb-sensitivity assay. *Nature Protocols*, 1(4), 1772–1777. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.281>
- Mauro, V. P., & Edelman, G. M. (2002). The ribosome filter hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(19), 12031–12036. <https://doi.org/10.1073/pnas.192442499>

- McGill University, Veterinary Committee & Animal Policy and Welfare Oversight Committee. (2024, 17 juin). *Fish and aquatic amphibian euthanasia protocol (SOP 303.04)* [Manuel institutionnel]. Montréal, QC : McGill University.
- McIntire, S. L., Jorgensen, E., Kaplan, J., & Horvitz, H. R. (1993). The GABAergic nervous system of *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 364(6435), 337–341. <https://doi.org/10.1038/364337a0>
- McIntire, S. L., Reimer, R. J., Schuske, K., Edwards, R. H., & Jorgensen, E. M. (1997). Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature*, 389(6653), 870–876. <https://doi.org/10.1038/39908>
- McKeegan, K. S., Debieux, C. M., Boulon, S., Bertrand, E., & Watkins, N. J. (2007). A dynamic scaffold of pre-snoRNP factors facilitates human box C/D snoRNP assembly. *Molecular and Cellular Biology*, 27(19), 6782–6793. <https://doi.org/10.1128/MCB.01097-07>
- McLean, D. L., & Fetcho, J. R. (2004). Relationship of tyrosine hydroxylase and serotonin immunoreactivity to sensorimotor circuitry in larval zebrafish. *The Journal of comparative neurology*, 480(1), 57–71. <https://doi.org/10.1002/cne.20281>
- Medan, V., & Preuss, T. (2014). The Mauthner-cell circuit of fish as a model system for startle plasticity. *Journal of physiology, Paris*, 108(2-3), 129–140. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2014.07.006>
- Meeker, N. D., Hutchinson, S. A., Ho, L., & Trede, N. S. (2007). Method for isolation of PCR-ready genomic DNA from zebrafish tissues. *BioTechniques*, 43(5), 610–614. <https://doi.org/10.2144/000112619>
- Meier, U. T. (2016). RNA modification in Cajal bodies. *RNA Biology*, 14(6), 693–700. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1249091>
- Meissner, B., Warner, A., Wong, K., Dube, N., Lorch, A., McKay, S. J., Khattra, J., Rogalski, T., Somasiri, A., Chaudhry, I., Fox, R. M., Miller, D. M., 3rd, Baillie, D. L., Holt, R. A., Jones, S. J., Marra, M. A., & Moerman, D. G. (2009). An integrated strategy to study muscle development and myofibrillar structure in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS genetics*, 5(6), e1000537. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000537>
- Meng, S., Ryu, S., Zhao, B., Zhang, D. Q., Driever, W., & McMahon, D. G. (2008). Targeting retinal dopaminergic neurons in tyrosine hydroxylase-driven green fluorescent protein transgenic zebrafish. *Molecular vision*, 14, 2475–2483.
- Mills, E. W., & Green, R. (2017). Ribosomopathies: There's strength in numbers. *Science (New York, N.Y.)*, 358(6363), eaan2755. <https://doi.org/10.1126/science.aan2755>
- Mitchell, J. R., Wood, E., & Collins, K. (1999). A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature*, 402(6761), 551–555. <https://doi.org/10.1038/990141>
- Mongeon, R., Gleason, M. R., Masino, M. A., Fetcho, J. R., Mandel, G., Brehm, P., & Dallman, J. E. (2008). Synaptic homeostasis in a zebrafish glial glycine transporter mutant. *Journal of neurophysiology*, 100(4), 1716–1723. <https://doi.org/10.1152/jn.90596.2008>

- Montero Llopis, P., Senft, R. A., Ross-Elliott, T. J., Stephansky, R., Keeley, D. P., Koshar, P., Marqués, G., Gao, Y. S., Carlson, B. R., Pengo, T., Sanders, M. A., Cameron, L. A., & Itano, M. S. (2021). Best practices and tools for reporting reproducible fluorescence microscopy methods. *Nature methods*, 18(12), 1463–1476. <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01156-w>
- Moore, M. J., & Proudfoot, N. J. (2009). Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell*, 136(4), 688–700. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.001>
- Muto, A., Ohkura, M., Kotani, T., Higashijima, S., Nakai, J., & Kawakami, K. (2011). Genetic visualization with an improved GCaMP calcium indicator reveals spatiotemporal activation of the spinal motor neurons in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(13), 5425–5430. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000887108>
- Narla, A., & Ebert, B. L. (2010). Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood*, 115(16), 3196–3205. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-10-178129>
- Nass, R., Hall, D. H., Miller, D. M., 3rd, & Blakely, R. D. (2002). Neurotoxin-induced degeneration of dopamine neurons in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(5), 3264–3269. <https://doi.org/10.1073/pnas.042497999>
- Nawa, M., & Matsuoka, M. (2012). The Method of the Body Bending Assay Using *Caenorhabditis elegans*. *Bio-Protocol*, 2(17), e253. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.253>
- NCBI Resource Coordinators. (2023). Gene: SHQ1 homolog (*C. elegans*). NCBI Gene. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/176997>
- NEB. (2021). *General guidelines for designing primers*. New England Biolabs. <https://www.neb.com/tools-and-resources/selection-charts/general-guidelines-for-designing-primers>
- Nikolaou, N., Lowe, A. S., Walker, A. S., Abbas, F., Hunter, P. R., Thompson, I. D., & Meyer, M. P. (2012). Parametric functional maps of visual inputs to the tectum. *Neuron*, 76(2), 317–324. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.040>
- Noldus Information Technology. (s.d.). *DanioVision™ Observation Chamber* [système d'observation comportementale]. Noldus. <https://www.noldus.com/daniovision>
- Noller, H. F. (1984). Structure of ribosomal RNA. *Annual Review of Biochemistry*, 53, 119–162. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.53.070184.001003>
- Nonet, M. L., Grundahl, K., Meyer, B. J., & Rand, J. B. (1993). Synaptic function is impaired but not eliminated in *C. elegans* mutants lacking synaptotagmin. *Cell*, 73(7), 1291–1305. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90357-v](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90357-v)
- Nurrish, S., Ségalat, L., & Kaplan, J. M. (1999). Serotonin inhibition of synaptic transmission: Galpha(0) decreases the abundance of UNC-13 at release sites. *Neuron*, 24(1), 231–242. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80835-1](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80835-1)

- Ojha, S., Malla, S., & Lyons, S. M. (2020). snoRNPs: Functions in Ribosome Biogenesis. *Biomolecules*, 10(5), 783. <https://doi.org/10.3390/biom10050783>
- Omura, D. T., Clark, D. A., Samuel, A. D. T., & Horvitz, H. R. (2012). Dopamine signaling is essential for precise rates of locomotion by *C. elegans*. *PLoS ONE*, 7(6), e38649. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038649>
- Paix, A., Folkmann, A., Goldman, D. H., Kulaga, H., Grzelak, M. J., Rasoloson, D., Mariage payé, S., Vert, R., Roseau, R.R. & Seydoux, G. (2017). Precision genome editing using synthesis-dependent repair of Cas9-induced DNA breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(50), E10745–E10754. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711979114>
- Paix, A., Wang, Y., Smith, H. E., Lee, C. Y., Calidas, D., Lu, T., Smith, J., Schmidt, H., Krause, M. W., & Seydoux, G. (2014). Scalable and versatile genome editing using linear DNAs with microhomology to Cas9 Sites in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 198(4), 1347–1356. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.170423>
- Palikaras, K., SenGupta, T., Nilsen, H., & Tavernarakis, N. (2022). Assessment of dopaminergic neuron degeneration in a *C. elegans* model of Parkinson's disease. *STAR protocols*, 3(2), 101264. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101264>
- Pereira, L., Kratsios, P., Serrano-Saiz, E., Sheftel, H., Mayo, A. E., Hall, D. H., White, J. G., LeBoeuf, B., Garcia, L. R., Alon, U., & Hobert, O. (2015). A cellular and regulatory map of the cholinergic nervous system of *C. elegans*. *eLife*, 4, e12432. <https://doi.org/10.7554/eLife.12432>
- Petrov, A. S., Bernier, C. R., Hsiao, C., et al. (2014). Evolution of the ribosome at atomic resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(29), 10636–10641. <https://doi.org/10.1073/pnas.1407205111>
- Plotkin, J. B., & Kudla, G. (2011). Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias. *Nature reviews. Genetics*, 12(1), 32–42. <https://doi.org/10.1038/nrg2899>
- Postlethwait, J. H., Yan, Y. L., Gates, M. A., Horne, S., Amores, A., Brownlie, A., Donovan, A., Egan, E. S., Force, A., Gong, Z., Goutel, C., Fritz, A., Kelsh, R., Knapik, E., Liao, E., Paw, B., Ransom, D., Singer, A., Thomson, M., Abduljabbar, T. S., ... Talbot, W. S. (1998). Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. *Nature genetics*, 18(4), 345–349. <https://doi.org/10.1038/ng0498-345>
- Prudente, C. N., Hess, E. J., & Jinnah, H. A. (2014). Dystonia as a network disorder: what is the role of the cerebellum?. *Neuroscience*, 260, 23–35. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.11.062>
- Prykhozhij, S. V., Fuller, C., Steele, S. L., Veinotte, C. J., Razaghi, B., Robitaille, J. M., McMaster, C. R., Shlien, A., Malkin, D., & Berman, J. N. (2018). Optimized knock-in of point mutations in zebrafish using CRISPR/Cas9. *Nucleic acids research*, 46(17), e102. <https://doi.org/10.1093/nar/gky512>
- Quax, T. E., Claassens, N. J., Söll, D., & van der Oost, J. (2015). Codon Bias as a Means to Fine-Tune Gene Expression. *Molecular cell*, 59(2), 149–161. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.035>
- Ramos-Vara, J. A. (2005). Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary Pathology*, 42(4), 405–426. <https://doi.org/10.1354/vp.42-4-405>

- Rand, J. B. (2007). Acetylcholine. In WormBook. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19736/>
- Rand, J. B., & Russell, R. L. (1984). Choline acetyltransferase-deficient mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 106(2), 227–248. <https://doi.org/10.1093/genetics/106.2.227>
- Reed, G. H., & Wittwer, C. T. (2004). Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. *Clinical Chemistry*, 50(10), 1748–1754. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2003.029751>
- Richendrfer, H., & Créton, R. (2013). Automated high-throughput behavioral analyses in zebrafish larvae. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (77), e50622. <https://doi.org/10.3791/50622>
- Richmond, J. E., & Jorgensen, E. M. (1999). One GABA and two acetylcholine receptors function at the neuromuscular junction of *Caenorhabditis elegans*. *Nature Neuroscience*, 2(9), 791–797. <https://doi.org/10.1038/12160>
- Rink, E., & Wullmann, M. F. (2002). Development of the catecholaminergic system in the early zebrafish brain: an immunohistochemical study. *Brain research. Developmental brain research*, 137(1), 89–100. [https://doi.org/10.1016/s0165-3806\(02\)00354-1](https://doi.org/10.1016/s0165-3806(02)00354-1)
- Rodnina, M. V. (2018). Translation in Prokaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(9), a032664. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032664>
- Rogalski, T. M., Mullen, G. P., Gilbert, M. M., Williams, B. D., & Moerman, D. G. (2000). The UNC-112 gene in *Caenorhabditis elegans* encodes a novel component of cell-matrix adhesion structures required for integrin localization in the muscle cell membrane. *The Journal of Cell Biology*, 150(1), 253–264. <https://doi.org/10.1083/jcb.150.1.253>
- Ryu, S., Mahler, J., Acampora, D., Holzschuh, J., Erhardt, S., Omodei, D., Simeone, A., & Driever, W. (2007). Orthopedia homeodomain protein is essential for diencephalic dopaminergic neuron development. *Current biology : CB*, 17(10), 873–880. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.04.003>
- Saint-Amant, L., & Drapeau, P. (1998). Time course of the development of motor behaviors in the zebrafish embryo. *Journal of neurobiology*, 37(4), 622–632. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4695\(199812\)37:4<622::aid-neu10>3.0.co;2-s](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4695(199812)37:4<622::aid-neu10>3.0.co;2-s)
- Sakai, C., Ijaz, S., & Hoffman, E. J. (2018). Zebrafish Models of Neurodevelopmental Disorders: Past, Present, and Future. *Frontiers in molecular neuroscience*, 11, 294. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.0029>
- Samarut, É., Lissouba, A., & Drapeau, P. (2016). A simplified method for identifying early CRISPR-induced indels in zebrafish embryos using High Resolution Melting analysis. *BMC genomics*, 17, 547. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2881-1>
- Sanyal, S., Wintle, R. F., Kindt, K. S., Nuttley, W. M., Arvan, R., Fitzmaurice, P., Bigras, E., Merz, D. C., Hébert, T. E., van der Kooy, D., Schafer, W. R., Culotti, J. G., & Van Tol, H. H. (2004). Dopamine modulates the plasticity of mechanosensory responses in *Caenorhabditis elegans*. *The EMBO Journal*, 23(2), 473–482. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600057>

- Sanger, T. D., Delgado, M. R., Gaebler-Spira, D., Hallett, M., Mink, J. W., & Task Force on Childhood Motor Disorders. (2003). Classification and definition of disorders causing hypertonia in childhood. *Pediatrics*, 111(1), e89–e97. <https://doi.org/10.1542/peds.111.1.e89>
- Schafer, W. R. (2006). Genetics of egg-laying in *WormBook*. *The C. elegans Research Community*. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.38.1>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schröter, C., Herrgen, L., Cardona, A., Brouhard, G. J., Feldman, B., & Oates, A. C. (2008). Dynamics of zebrafish somitogenesis. *Developmental Dynamics*, 237(3), 545–553. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21458>
- Schuske, K., Beg, A. A., & Jorgensen, E. M. (2004). The GABA nervous system in *C. elegans*. *Trends in Neurosciences*, 27(7), 407–414. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.05.005>
- Schwartz, S., Bernstein, D. A., Mumbach, M. R., Jovanovic, M., Herbst, R. H., León-Ricardo, B. X., Engreitz, J. M., Guttman, M., Satija, R., Lander, E. S., Fink, G., & Regev, A. (2014). Transcriptome-wide mapping reveals widespread dynamic-regulated pseudouridylation of ncRNA and mRNA. *Cell*, 159(1), 148–162. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.08.028>
- Schweitzer, J., & Driever, W. (2009). Development of the dopamine systems in zebrafish. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 651, 1–14. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0322-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0322-8_1)
- Shainer, I., Kuehn, E., Laurell, E., Al Kassar, M., Mokayes, N., Sherman, S., ... & Baier, H. (2023). A single-cell resolution gene expression atlas of the larval zebrafish brain. *Science Advances*, 9(8), eade9909. <https://doi.org/10.1126/sciadv.ade9909>
- Shaye, D. D., & Greenwald, I. (2011). OrthoList: A compendium of *C. elegans* genes with human orthologs. *PLoS ONE*, 6(5), e20085. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020085>
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D. G., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., & Higgins, D. G. (2011). *Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega*. *Molecular Systems Biology*, 7, Article 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
- Sigma–Aldrich. (2025). Anti Tyrosine Hydroxylase Antibody, clone LNC1 (mouse monoclonal, Cat# MAB318). Merck KGaA.
- Singh, S. K., Sundaram, C. S., Shanbhag, S., & Idris, M. M. (2010). Proteomic profile of zebrafish brain based on two-dimensional gel electrophoresis matrix-assisted laser desorption/ionization MS/MS analysis. *Zebrafish*, 7(2), 169–177. <https://doi.org/10.1089/zeb.2010.0657>
- Sleiman, S., Marshall, A. E., Dong, X., Mhanni, A., Alidou-D’Anjou, I., Frosk, P., Marin, S. E., Stark, Z., Del Bigio, M. R., McBride, A., Sadedin, S., Gallacher, L., Care4Rare Canada Consortium, Christodoulou, J., Boycott, K. M., Dragon, F., & Kernohan, K. D. (2022). Compound heterozygous

- variants in SHQ1 are associated with a spectrum of neurological features including early-onset dystonia. *Human Molecular Genetics*, 31(4), 614–624. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddab247>
- Sloan, K. E., Warda, A. S., Sharma, S., Entian, K. D., Lafontaine, D. L. J., & Bohnsack, M. T. (2017). Tuning the ribosome: The influence of rRNA modification on eukaryotic ribosome biogenesis and function. *RNA biology*, 14(9), 1138–1152. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1259781>
- Spencer, W. C., McWhirter, R., Miller, T., Strasbourger, P., Thompson, O., Hillier, L. W., ... & Miller III, D. M. (2014). Isolation of specific neurons from *C. elegans* larvae for gene expression profiling. *PLOS ONE*, 9(11), e112102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112102>
- Spriggs, K. A., Bushell, M., & Willis, A. E. (2010). Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. *Molecular cell*, 40(2), 228–237. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.028>
- Stewart, A., Gaikwad, S., Kyzar, E., Green, J., Roth, A., & Kalueff, A. V. (2012). Modeling anxiety using adult zebrafish: a conceptual review. *Neuropharmacology*, 62(1), 135–143. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.07.037>
- Steitz, T. A. (2008). *A structural understanding of the dynamic ribosome machine*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(3), 242–253. <https://doi.org/10.1038/nrm2352>
- Sulston, J. E., Dew, M., & Brenner, S. (1975). Dopaminergic neurons in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Comparative Neurology*, 163(2), 215–226. <https://doi.org/10.1002/cne.901630207>
- Sulston, J. E., & Horvitz, H. R. (1977). *Post-embryonic cell lineages of the nematode, Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 56(1), 110–156. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(77\)90158-0](https://doi.org/10.1016/0012-1606(77)90158-0)
- Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G., & Thomson, J. N. (1983). *The embryonic cell lineage of the nematode Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 100(1), 64–119. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(83\)90201-4](https://doi.org/10.1016/0012-1606(83)90201-4)
- Sumbre, G., Muto, A., Baier, H., & Poo, M. (2008). Entrained rhythmic activities of neuronal ensembles as perceptual memory of time interval. *Nature*, 456(7218), 102–106. <https://doi.org/10.1038/nature07351>
- Tahmasebi, S., Amiri, M., & Sonenberg, N. (2019). Translational Control in Stem Cells. *Frontiers in genetics*, 9, 709. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00709>
- Thermo Fisher Scientific. (n.d.). *IHC Troubleshooting Guide*. Retrieved from <https://www.thermofisher.com/ca/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/ihc-troubleshooting-guide.html>
- Thisse, C., & Thisse, B. (2008). High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos. *Nature Protocols*, 3(1), 59–69. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.514>

- Thomas, H. R., Percival, S. M., Yoder, B. K., & Parant, J. M. (2014). High-throughput genome editing and phenotyping facilitated by high resolution melting curve analysis. *PLOS ONE*, 9(12), e114632. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114632>
- Treinin, M., & Jin, Y. (2021). Cholinergic transmission in *C. elegans*: Functions, diversity, and maturation of ACh-activated ion channels. *Journal of neurochemistry*, 158(6), 1274–1291. <https://doi.org/10.1111/jnc.15164>
- Varshney, G. K., Pei, W., LaFave, M. C., Idol, J., Xu, L., Gallardo, V., Carrington, B., Bishop, K., Jones, M. P., Li, M., Harper, U., Huang, S. C., Prakash, A., Chen, W., Sood, R., Ledin, J., & Burgess, S. M. (2015). High throughput gene targeting and phenotyping in zebrafish using CRISPR/Cas9. *Genome Research*, 25(7), 1030–1042. <https://doi.org/10.1101/gr.186379.114>
- Vauti, F., & Arnold, H.-H. (2020). Whole-mount in situ hybridization of zebrafish embryos and larvae using digoxigenin-labeled RNA probes. *PLOS ONE*, 15(8), e0237167. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237167>
- Vaz, R., Hofmeister, W., & Lindstrand, A. (2019). *Zebrafish Models of Neurodevelopmental Disorders: Limitations and Benefits of Current Tools and Techniques*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), 1296. <https://doi.org/10.3390/ijms20061296>
- Verbeek, M. W. C., Erkeland, S. J., & van der Velden, V. H. J. (2022). *Dysregulation of Small Nucleolar RNAs in B-Cell Malignancies*. *Biomedicines*, 10(6), 1229. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10061229>
- Walbott, H., Machado-Pinilla, R., Liger, D., Blaud, M., Réty, S., Grozdanov, P. N., Godin, K., van Tilbeurgh, H., Varani, G., Meier, U. T., & Leulliot, N. (2011). The H/ACA RNP assembly factor SHQ1 functions as an RNA mimic. *Genes & development*, 25(22), 2398–2408. <https://doi.org/10.1101/gad.176834.111>
- Watkins, N. J., & Bohnsack, M. T. (2012). The box C/D and H/ACA snoRNPs: Key players in the modification, processing and the dynamic folding of ribosomal RNA. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 3(3), 397–414. <https://doi.org/10.1002/wrna.117>
- Weber, T., & Köster, R. (2013). Genetic tools for multicolor imaging in zebrafish larvae. *Methods (San Diego, Calif.)*, 62(3), 279–291. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.07.02>
- Westerfield, M. (1995). *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)* (3rd ed.). Eugene, OR: University of Oregon Press. 385 pp.ZFIN ID: ZDB-PUB-970327-24
- White, J. G., Southgate, E., Thomson, J. N., & Brenner, S. (1986). The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 314(1165), 1–340. <https://doi.org/10.1098/rstb.1986.0056>
- Winter, M. J., Redfern, W. S., Hayfield, A. J., Owen, S. F., Valentin, J. P., & Hutchinson, T. H. (2008). Validation of a larval zebrafish locomotor assay for assessing the seizure liability of early-stage development drugs. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 57(3), 176–187. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2008.01.004>

- Witvliet, D., Mulcahy, B., Mitchell, J. K., Meirovitch, Y., Berger, D. R., Wu, Y., Liu, Y., Koh, W. X., Parvathala, R., Holmyard, D., Schalek, R. L., Shavit, N., Chisholm, A. D., Lichtman, J. W., Samuel, A. D. T., & Zhen, M. (2021). Connectomes across development reveal principles of brain maturation. *Nature*, 596(7871), 257–261. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03778-8>
- Woolford, J. L., & Baserga, S. J. (2013). *Ribosome biogenesis in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 195(3), 643–681. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.153197>
- WormBase. (2025). Y48A5A.1 gene overview. WormBase. [https://wormbase.org/species/c\\_elegans/gene/Y48A5A.1](https://wormbase.org/species/c_elegans/gene/Y48A5A.1)
- Yamamoto, K., Ruuskanen, J. O., Wullimann, M. F., & Vernier, P. (2010). Two tyrosine hydroxylase genes in vertebrates New dopaminergic territories revealed in the zebrafish brain. *Molecular and cellular neurosciences*, 43(4), 394–402. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2010.01.006>
- Yang, P. K., Rotondo, G., Porras, T., Legrain, P., & Chanfreau, G. (2002). The Shq1p.Naf1p complex is required for box H/ACA small nucleolar ribonucleoprotein particle biogenesis. *The Journal of biological chemistry*, 277(47), 45235–45242. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207669200>
- Yemini, E., Lin, A., Nejatbakhsh, A., Varol, E., Sun, R., Mena, G. E., Samuel, A. D. T., Paninski, L., Venkatachalam, V. et Hobert, O. (2021). NeuroPAL: A Multicolor Atlas for Whole-Brain Neuronal Identification in *C. elegans*. *Cell*, 184(1), 272–288.e211. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.12.012>
- Yoon, A., Peng, G., Brandenburger, Y., Zollo, O., Xu, W., Rego, E., & Ruggero, D. (2006). *Impaired control of IRES-mediated translation in X-linked dyskeratosis congenita*. *Science*, 312(5775), 902–906. <https://doi.org/10.1126/science.1123835>
- Yu, C. H., Dang, Y., Zhou, Z., Wu, C., Zhao, F., Sachs, M. S., & Liu, Y. (2015). Codon Usage Influences the Local Rate of Translation Elongation to Regulate Co-translational Protein Folding. *Molecular cell*, 59(5), 744–754. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.07.018>
- Zebrafish Information Network. (2023). *shq1 (ZDB-GENE-070112-1412): SHQ1, H/ACA ribonucleoprotein assembly factor*. ZFIN. <https://zfin.org/ZDB-GENE-070112-1412>
- Zhou, X., & Bessereau, J.-L. (2019). *Molecular architecture of genetically-tractable GABA synapses in C. elegans*. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12, 304. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00304>
- Zischewski, J., Fischer, R., & Bortesi, L. (2017). *Detection of on-target and off-target mutations generated by CRISPR/Cas9 and other sequence-specific nucleases*. *Biotechnology Advances*, 35(1), 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.12.003>
- Zu, Y., Tong, X., Wang, Z., Liu, D., Pan, R., Li, Z., Hu, Y., Luo, Z., Huang, P., Wu, Q., Zhu, Z., Zhang, B., & Lin, S. (2013). TALEN-mediated precise genome modification by homologous recombination in zebrafish. *Nature methods*, 10(4), 329–331. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2374>