
Mémoire

Auteur : Koch, Luca

Promoteur(s) : Peers, Bernard

Faculté : Faculté des Sciences

Diplôme : Master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire, à finalité approfondie

Année académique : 2023-2024

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/21059>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.



Université de Liège

Faculté des Sciences - Département des Sciences de la Vie

Laboratoire de Développement et Modèle de Maladie chez le
Zebrafish (ZDDM)



**Etude du rôle des facteurs nr6a1a et
nr6a1b dans le développement
embryonnaire du poisson zèbre**

Mémoire

KOCH Luca

Master BBMC

Promoteur : Dr. Bernard Peers

Année académique 2023-2024



Remerciements

Tout d'abord, je remercie chaleureusement Marianne Voz et Bernard Peers pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire et pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser un stage et mon mémoire dans leur laboratoire. Je souhaite tout particulièrement remercier Dr. Bernard Peers, mon promoteur, pour ses précieux conseils et son soutien tout au long de ce projet. Sa disponibilité et sa volonté de répondre à mes nombreuses questions ont été d'une aide immense.

Je tiens également à remercier Emma, Colin, et toute l'équipe des doctorants pour leur contribution à cette expérience si agréable. La bonne ambiance au laboratoire a fait de ce mémoire bien plus qu'un simple projet académique. Un remerciement spécial à Romane, avec qui j'ai eu le plaisir de travailler sur une partie de ses projets. Son aide, tant théorique que pratique, m'a énormément aidé.

Je n'oublie pas Philippe Servaty, qui m'a accompagné pendant cinq de mes six années d'études à Liège. Il était toujours là dans les moments difficiles, que ce soit pour m'aider, me changer les idées ou simplement m'embêter. Santé Philippe !

Enfin, je tiens à remercier du fond du cœur ma famille, qui m'a toujours soutenu sans relâche. Leur présence et leurs encouragements, notamment avant et pendant les examens, m'ont donné la force de continuer même lorsque je souhaitais abandonner. Sans eux, ce parcours n'aurait pas été possible.

Merci à tous.

Table des matières

1. Introduction.....	2
1.1. Avant-propos	2
1.2. Les récepteurs nucléaires	4
1.2.1. Structure des récepteurs nucléaires	4
1.3. Nr6a1	5
1.4. Le rein	7
1.4.1. La formation du rein chez le zebrafish	8
1.4.2. Gènes impliqués dans la formation des différents segments du pronéphros chez le zebrafish	10
1.4.3. Similitude entre le rein chez le zebrafish et l'humain	12
1.5. La voie de l'acide rétinoïque	15
1.5.1. Synthèse de l'acide rétinoïque	15
1.5.2. Dégradation de l'acide rétinoïque	16
1.5.3. Les mutants zebrafish <i>no-fin</i> et <i>neckless</i>	17
2. Objectifs	20
3. Matériel et méthodes	22
3.1. Lignées mutantes et transgéniques utilisées	22
3.2. Croisement des poissons et récolte des œufs	25
3.3. Fixation des embryons	25
3.4. Traitement des embryons à l'AR et au DEAB.....	25
3.5. Génotypage	26
3.5.1. Extraction du matériel génétique	26
3.5.2. Amplification du gène	26
3.5.3. Digestion	27
3.5.4. Gel d'électrophorèse	27
3.6. Hybridation in situ	27
3.6.1. Synthèse des sondes ARN antisens	27
3.6.2. Hybridation des sondes	28
3.6.3. Immunodétection des sondes	28
3.6.4. Révélation de la coloration	29
3.6.5. Double hybridation in situ	29
4. Résultats.....	32

4.1.	Analyse du nombre d'arcs pharyngiens	32
4.2.	Etude des profils d'expression de gènes régulateurs impliqués dans la formation du rein ; comparaison des effets de traitements au DEAB et à l'AR et expression dans les mutants <i>nr6a1a/b</i>	33
4.3.	Etude de l'expression de <i>evx1</i> , un gène marqueur du cloaque.	40
4.4.	Etudes des gènes impliqués dans la synthèse et dans la dégradation de l'AR	42
5.	Discussion	50
6.	Bibliographie	52

Liste des abréviations

ADH : Alcool déshydrogénase

AR : Acide Rétinoïque

CS : Corpuscule de Stannius

Cyp26 : Famille 26 du cytochrome P450

DB : Domaine de liaison à l'ADN

DE : Segment distal précoce

DEAB : 4-DiEthylAminoBenzaldehyde

DIG : DIGoxygénine

DL : Segment distal tardif

FLUO : FLUOrescéine

HIS : Hybridation in situ

hpf : Hours Post Fecondation

LBD : Domaine de liaison au ligand

NR : Récepteur Nucléaire

NR6A1 : Nuclear Receptor sous-famille 6, groupe A, gène 1

NTD : Domaine N-terminal

PCR : Polymerase Chain Reaction

PD : Conduit pronephrique

PCT : Tubule contourné proximal

PST : Tubule droit proximal

RALDH : RétinALdéhyde DésHydrogénases

RAR : Retinoic Acid Receptor

RARE : Retinoic Acid Response Elements

RDH : Rétinols déshydrogénases

RXR : Retinoid X Receptor

ULG083 : Nom de l'allèle nr6a1a inactivé par la technique CRISPR/Cas9

ULG085 : Nom de l'allèle nr6a1b inactivé par la technique CRISPR/Cas9

Introduction

1. Introduction

1.1. Avant-propos

Dans l'Union européenne, jusqu'à 36 millions de personnes vivent avec une maladie rare. Il existe plus de 6000 maladies rares distinctes dans l'UE. Ainsi, tandis qu'une maladie rare peut n'affecter qu'une poignée de patients, une autre peut toucher jusqu'à 245 000 personnes. Environ 80 % de ces maladies rares ont une origine génétique et, parmi celles-ci, 70 % commencent dès l'enfance. L'Union européenne a largement soutenu la recherche dans le domaine des maladies rares et lors d'un de ses programmes en 2020, l'UE a mis à disposition plus de 2,4 milliards d'euros pour financer plus de 440 projets de recherche multinationaux dans le domaine. [1]

Avec l'avènement du séquençage de nouvelle génération, l'identification des variants génétiques associés à ces maladies rares est devenue de plus en plus accessible. Les avancées dans les technologies de séquençage du génome ont révolutionné la caractérisation et l'étude des maladies génétiques, notamment des troubles rénaux héréditaires. Ces troubles, affectant au moins 10 % des adultes recevant une thérapie de remplacement rénal et la plupart des enfants dans des situations similaires, posent d'importants défis au diagnostic clinique et à la prise en charge en raison de leurs complications multisystémiques. Les maladies rénales héréditaires englobent un large éventail de troubles, chacun causé par des mutations dans des gènes codant pour diverses protéines telles que des récepteurs, des canaux ou des transporteurs, des enzymes, des facteurs de transcription et des composants structuraux. [2]

Les maladies rénales rares présentent un défi majeur en biologie médicale, nécessitant des modèles expérimentaux robustes pour leur étude approfondie. Parmi les différents modèles disponibles, le zebrafish (aussi appelé poisson zèbre ou *Danio rerio*) s'est distingué comme un outil très utile pour l'exploration des mécanismes sous-jacents aux maladies rénales humaines. Grâce à des techniques variées allant des criblages génétiques avancés à l'édition du génome, le zebrafish permet de reproduire certaines pathologies rénales de manière précise et de fournir des informations cruciales sur

l'apparition et la progression de ces maladies. Cela ouvre la voie à des traitements améliorés et à la création de nouvelles thérapies pour les patients atteints de maladies rénales. [3]

Dans le but d'étudier certaines maladies rares héréditaires, le Dr. Adeline Jacquinet, du laboratoire de génétique humaine du CHU de Liège, se penche sur l'étude de familles présentant des malformations utérines et rénales, souvent observées ensemble chez un même individu en raison de leur origine embryonnaire commune. Lorsque des mutations délétères sont identifiées dans des gènes connus pour contrôler le développement du rein et/ou de l'utérus, ceci explique la maladie et un diagnostic peut donc être établi avec un traitement approprié. Cependant, lorsque aucune mutation n'est détectée dans ces gènes connus, une analyse plus approfondie de l'exome est nécessaire. Cette approche a permis d'identifier des mutations dans le gène *nr6a1* chez deux familles, des variants rares et potentiellement délétères. En outre, des cas d'agénésie rénale bilatérale ont été associés à des mutations du gène *nr6a1* selon les données non publiées fournies par le Dr. Jacquinet. [4]

Afin d'explorer le rôle potentiel du gène *nr6a1* dans ces maladies, le Dr. Jacquinet a entamé une collaboration avec le laboratoire de ZDDM (Zebrafish Development & Disease Models). Ce laboratoire utilise le zebrafish comme modèle pour étudier le développement des vertébrés. Ce choix est motivé par la similitude de la plupart des organes du zebrafish avec ceux des vertébrés supérieurs, mais avec une complexité moindre, facilitant ainsi leur étude. De plus, le zebrafish présente l'avantage de se reproduire facilement et en grand nombre. Son développement rapide, externe, ainsi que la transparence des embryons permettent une visualisation aisée des processus cellulaires et des mouvements tissulaires *in vivo*. De plus, il est adapté à l'étude des maladies génétiques : des techniques de mutagenèse ciblée (CRISPR/Cas9) par exemple peuvent être réalisées de manière relativement simple et à moindre coût. Les gènes orthologues de *nr6a1*, codant pour des récepteurs nucléaires, ont été inactivés chez le zebrafish en utilisant la technique CRISPR/Cas9. [4], [5]

1.2. Les récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires (NR) constituent une superfamille de régulateurs transcriptionnels, principalement reconnus comme récepteurs intracellulaires dont le changement de conformation en réponse à la liaison d'un ligand entraîne une action directe sur la transcription. Présents dans tout le règne animal, leur nombre varie de deux dans certaines éponges, à 48 chez l'humain, 49 chez la souris, et jusqu'à 73 chez les téléostéens comme le poisson zèbre. Une analyse phylogénétique a subdivisé cette superfamille en 7 groupes structurellement distincts (NR0 à NR6).[6]

Parmi les ligands bien caractérisés des récepteurs nucléaires, on trouve les hormones thyroïdiennes, les hormones stéroïdes comme l'estrogène, la progestérone et les glucocorticoïdes, ainsi que les dérivés de la vitamine A et de la vitamine D. Un exemple pour un dérivé actif de la vitamine A (rétinol) est l'acide rétinoïque (AR). Ces petites molécules lipophiles diffusent généralement librement à travers les membranes cellulaires. Une fois internalisées, ces molécules agissent comme des ligands à haute affinité pour leurs récepteurs respectifs. [6], [7]

Étant donné la diversité et l'importance des ligands, l'activité des récepteurs nucléaires est cruciale tout au long de la vie animale, notamment pour la croissance embryonnaire précoce et le modelage, les transitions développementales et la métamorphose, la reproduction, le métabolisme et l'homéostasie à l'âge adulte. De plus, des perturbations de la signalisation des récepteurs nucléaires dans divers états pathologiques humains ont entraîné un intérêt significatif pour le ciblage thérapeutique de la fonction de ces récepteurs. Cependant, seulement environ la moitié des récepteurs nucléaires humains ont des ligands caractérisés, les récepteurs sans ligands connus étant désignés comme récepteurs orphelins. [6]

1.2.1. Structure des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires partagent une structure commune composée de plusieurs domaines :

- Domaine N-terminal (NTD) : Ce domaine est peu conservé et variable en longueur et il contient souvent une région de fonction activatrice-1 (AF-1) qui interagit avec des co-régulateurs transcriptionnels.
- Domaine de liaison à l'ADN (DBD) : Hautement conservé parmi les NR, ce domaine en doigt de zinc permet la liaison à des séquences d'ADN spécifiques.
- Domaine de liaison au ligand (LBD) : Ce domaine se lie à des ligands spécifiques et recrute des co-régulateurs transcriptionnels. Néanmoins, ce domaine existe également dans les récepteurs orphelins.
- Région charnière : Aussi appelée « hinge region », connecte le DBD et le LBD, fournissant une flexibilité structurale. [6]

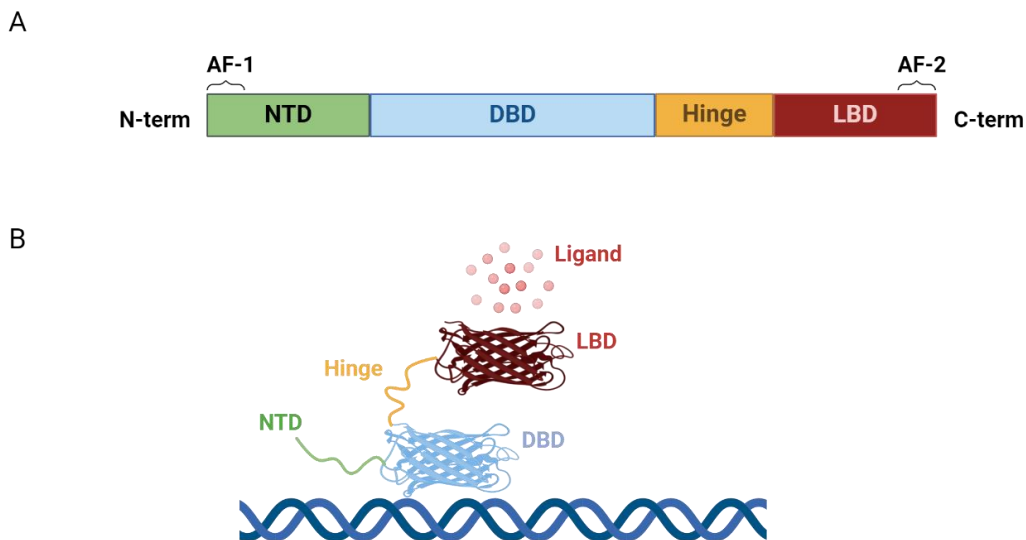


Figure 1: Aperçu structural des récepteurs nucléaires (A) : Les différentes parties qui constituent un récepteur nucléaire typique. Ils possèdent un domaine N-terminal (NTD) moins conservé, qui abrite une région d'activateur de fonction-1 (AF-1), un domaine de liaison à l'ADN (DBD) hautement conservé, un domaine de liaison au ligand (LBD) contenant un activateur de fonction-2 (AF-2), et un domaine charnière reliant le DBD et le LBD. **(B) :** Structure schématique d'un récepteur nucléaire. [6]

1.3. Nr6a1

Nr6a1 est un récepteur nucléaire orphelin qui a été découvert en 1994. Nr6a1, qui est unique au sein du groupe 6 de la sous-famille des récepteurs nucléaires, est étroitement lié aux protéines de la branche des hormones stéroïdes. Par rapport à d'autres récepteurs nucléaires, la région LBD de Nr6a1 ne possède pas de domaine AF-2 (activator function-2), mais cette région facilite la dimérisation pour assurer sa fonction biologique et le recrutement de co-répresseurs. [6]

Des études ont montré que la région de liaison à l'ADN de Nr6a1 se lie avec une plus grande affinité en tant qu'homodimère plutôt qu'en monomère, à une répétition directe avec un espacement nul (DR0) de la séquence consensus AGGTCA ou un demi-site étendu TCAGGTCA [8]. *In vitro*, Nr6a1 ne se dimérise pas avec le récepteur X rétinoïde (RXR ou NR2B1/2/3). *In vivo*, Nr6a1 semble former un complexe oligomérique plus grand appelé « transiently retinoid-induced factor » (TRIF) lorsqu'il est lié à l'ADN [6].

Chez la souris, le gène *nr6a1* est exprimé dès le jour embryonnaire 6.5 (E6.5) et au cours de la gastrulation. Il joue un rôle crucial durant le développement précoce car son inactivation provoque la mort des embryons entre E9.5 et E10.5. L'activation du gène *nr6a1* est sous le contrôle de plusieurs voies de signalisation, dont notamment les voies FGF, Wnt et l'acide rétinoïque (AR) [6]. Nr6a1, agissant comme répresseur transcriptionnel, influence l'expression des clusters Hox, un groupe de gènes jouant un rôle crucial dans le remodelage antéro-postérieur de l'embryon et dans la formation de la colonne vertébrale. En effet, l'inactivation du gène *nr6a1* dans le mésoderme altère l'expression des gènes Hox postérieurs et provoque ainsi un changement dans l'identité des vertèbres, le nombre de vertèbres thoraciques étant diminué dans le mutant *nr6a1* [9]. Le mécanisme par lequel Nr6a1 contrôle l'expression des gènes Hox postérieurs n'est pas connu actuellement, son action pouvant être directe (via des sites de liaison au sein des clusters Hox) ou indirecte (via des facteurs ou signaux secondaires). [9]

Deux gènes paralogues, *nr6a1a* et *nr6a1b*, existent chez le zebrafish dû à la duplication du génome lors de l'évolution des téléostéens. Des études antérieures du laboratoire d'accueil montrent que le gène *nr6a1a* a gardé une grande partie du rôle du gène ancestral (mémoire de master de Manon Dohet et résultats non publiés de H. Pendeville et B. Peers). En effet, l'inactivation du gène *nr6a1a* cause des malformations au niveau du squelette axial, du cloaque et du pronéphros alors que l'inactivation de *nr6a1b* ne provoque aucune malformation apparente. Les deux gènes agissent néanmoins de manière redondante étant donné que le double mutant *nr6a1a*^{-/-}; *nr6a1b*^{-/-} est affecté plus sévèrement que le simple mutant *nr6a1a* (absence de nageoire pectorale, létalité précoce et malformation plus sévère du cloaque). Le pronéphros est légèrement affecté dans le simple mutant *nr6a1a* ainsi que dans le double mutant. En effet, la longueur certains segments des néphrons est modifiée. La figure 2 montre que

la longueur du tubule droit proximal (PST) révélé par l'expression du gène *trpm7* est raccourci alors que celui des segments postérieurs, tubule distal tardif (DL) marqué par *clcnk* et du canal pronéphrique (PD) marqué par *gata3*, sont plus longs. [9]

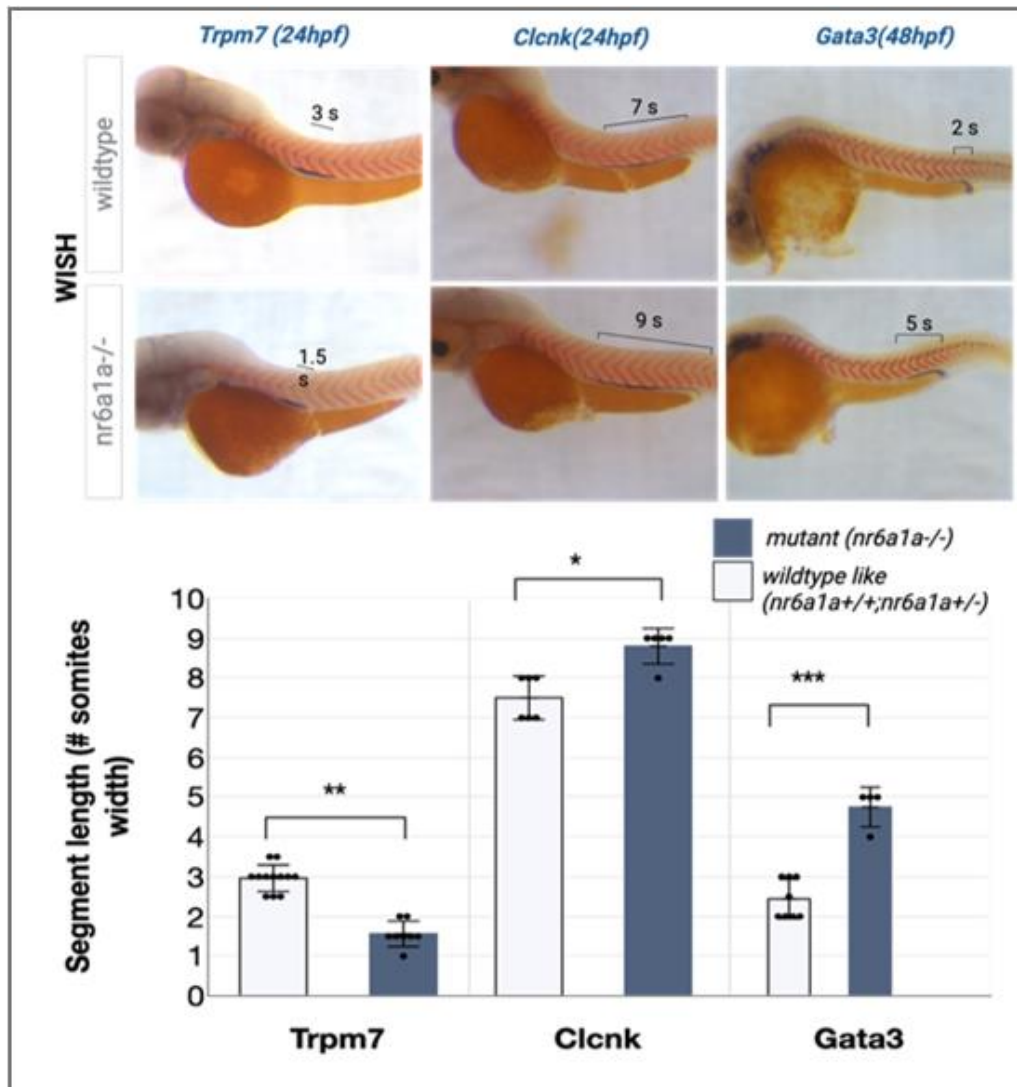


Figure 2 : Le « patterning » antéropostérieur du pronéphros chez le zebrafish mutant *nr6a1a-/-*. Résultats de doubles hybridations *in situ*. En rouge, la sonde *xirp2* marque les somites. En noir, la sonde *trpm7* marque le segment intermédiaire PST, la sonde *clcnk* marque les segments distaux (précoce et tardif) et la sonde *gata3* marque le segment distal tardif. Ces données montrent une perturbation de la structuration antéropotérieure du pronéphros chez le mutant *nr6a1a-/-* : le segment intermédiaire PST est réduit et les segments distaux sont allongés comparé aux poissons sauvages.

1.4. Le rein

Les reins des vertébrés ont des rôles multiples : ils excrètent les déchets, assurent l'osmorégulation, réabsorbent les métabolites, équilibrent les niveaux acido-basiques et sécrètent des hormones. Les reins sont composés de nombreuses cellules spécialisées, notamment des cellules épithéliales et mésenchymateuses, les cellules épithéliales

formant notamment les centaines de néphron présents dans le rein adulte. Les néphrons se composent d'un filtre sanguin, d'un tubule et d'un conduit, chaque région présentant une organisation segmentaire dans laquelle des sous-domaines d'épithéliums phénotypiquement distincts effectuent des tâches physiologiques spécifiques. Le développement du rein est unique par rapport à celui d'autres organes car une ou deux structures rénales intermédiaires sont générées au cours de la vie embryonnaire et/ou larvaire. En effet, le premier rein embryonnaire, appelé pronéphros, se forme à partir du mésoderme intermédiaire. Ensuite, le mésonéphros se développe à partir du pronéphros. Finalement, chez les mammifères, une partie caudale du mésonéphros forme le métanéphros, le mésonéphros dégénère ensuite. Dans ces trois étapes, des néphrons sont formés permettant la filtration du sang. Chez les poissons adultes, le rein consiste au mésonéphros. [5]

1.4.1. La formation du rein chez le zebrafish

Durant les 3 premiers jours de développement, l'embryon de poisson zèbre forme un pronephros à l'architecture simple avec deux néphrons, qui devient finalement un support sur lequel un mésonéphros de plusieurs centaines de néphrons est construit pendant les stades larvaires et juvéniles (à partir du 11^{ième} jour après fécondation). Chez le poisson zèbre adulte, le mésonéphros présente une néphrogénèse continue, générant de nouveaux néphrons à partir d'un pool local de progéniteurs rénaux pendant les périodes de croissance ou à la suite de lésions rénales. [5]

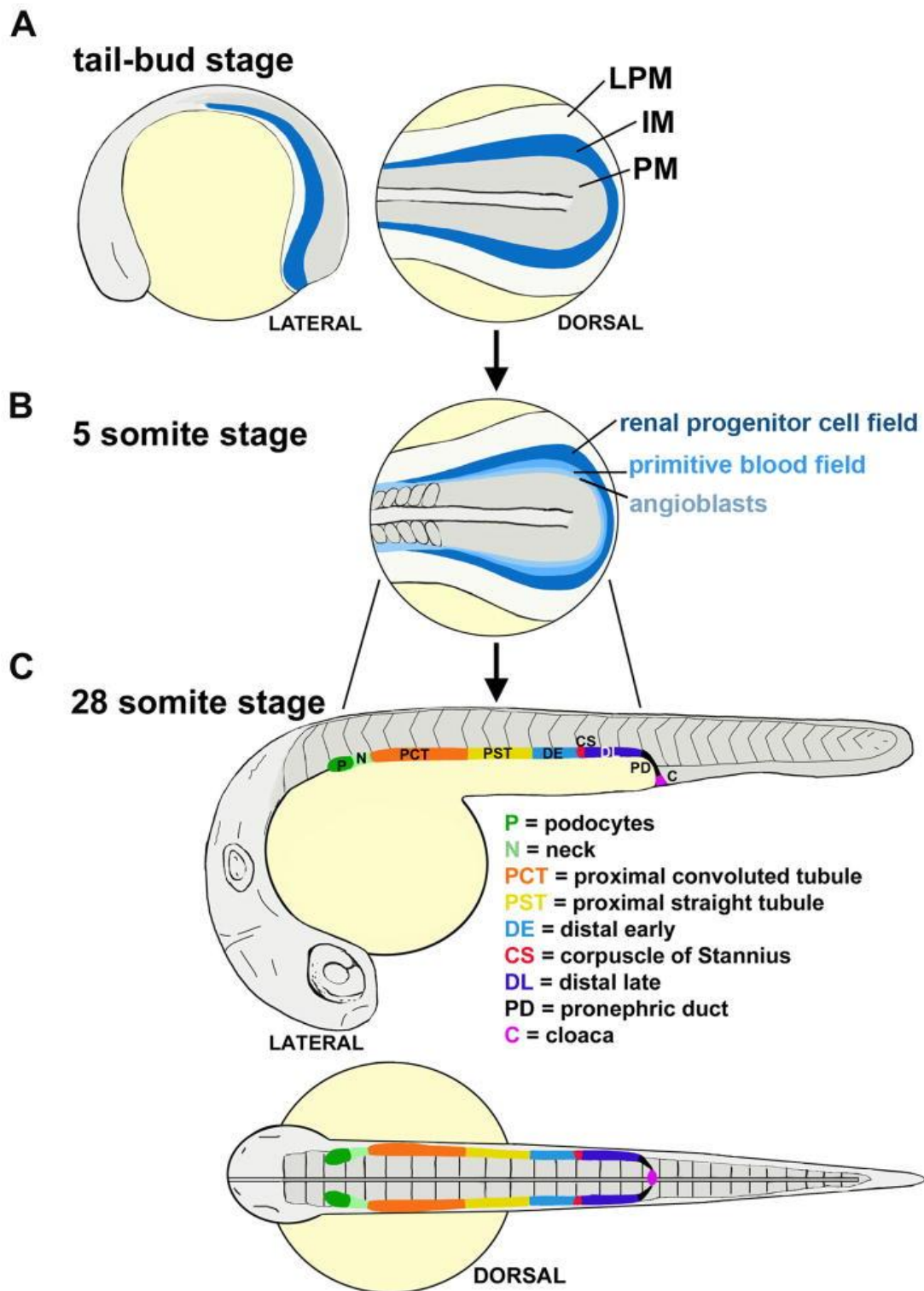


Figure 3: La formation du pronéphros chez le zebrafish. (A) Le mésoderme intermédiaire (IM) (bleu) se trouve entre le mésoderme paraxial (PM) (gris) et le mésoderme de la plaque latérale (LPM) (blanc) chez l'embryon au stade 10 hpf (« tail bud »). (B) Au stade des 5 somites, l'embryon présente différents champs cellulaires similaires au champ des progéniteurs rénaux : des champs de cellules *tal1+* destinées à devenir des angioblastes, un champ co-exprimant *tal1+/gata1a+* destiné aux cellules sanguines primitives, et le champ des progéniteurs rénaux exprimant *pax2a*, *pax8* et *lhx1a*. (C) Au stade des 28 somites, l'embryon possède un pronephros constitué de deux néphrons parallèles avec plusieurs segments : podocytes (P) (vert foncé), cou (N) (vert clair), tubule contourné proximal (PCT) (orange), tubule droit proximal (PST) (jaune), segment distal précoce (DE) (bleu clair), corpuscule de Stannius (CS) (rouge), segment distal tardif (DL) (bleu foncé), et conduit pronephrique (PD) (noir), qui draine le corps par le cloaque (C) (rose). Figure reprise de l'article [5].

Le pronephros du zebrafish se forme à partir de bandes bilatérales de cellules progénitrices rénales émergentes du mésoderme intermédiaire (IM). Pendant l'épibolie et la gastrulation, le mésoderme intermédiaire se répartit en une forme en 'U', distribué en pistes parallèles de chaque côté de la ligne médiane, se rejoignant en arc semi-circulaire dans le bourgeon caudal (Figure 3A). [5]

Après la gastrulation, le territoire en 'U' du mésoderme intermédiaire s'allonge, les pistes parallèles se rapprochent de la ligne médiane et de l'une de l'autre (Figure 3B et C). Ces changements morphologiques résultent de mouvements cellulaires et de la croissance qui rapprochent les 2 futurs néphrons du pronephros situés de part et d'autre de la ligne médiane. [5]

Les études d'expression génique montrent que le champ de cellules progénitrices rénales émergeant du mésoderme intermédiaire aux stades précoces de la somitogenèse est adjacent à un champ de cellules générant un mélange d'angioblastes et de précurseurs sanguins primitifs. Les angioblastes sont situés dans une bande latérale à côté du mésoderme paraxial, les précurseurs sanguins dans des bandes postérieures, et le champ de cellules progénitrices rénales dans la position la plus latérale. [5]

Au-delà du stade 15 somites, les précurseurs mésenchymateux rénaux se différencient et entreprennent des réarrangements morphologiques, formant une paire de néphrons parallèles de chaque côté du tronc. Les précurseurs mésenchymateux adoptent un état épithélial (MET), subissent la tubulogenèse et forment une lumière. La néphrogenèse implique la différenciation régionale des précurseurs néphroniques en segments épithéliaux distincts dans l'axe antéro-postérieur [5] (Figure 3C).

1.4.2. Gènes impliqués dans la formation des différents segments du pronephros chez le zebrafish

Les limites des segments des néphrons sont établies au stade des 28 somites, selon les profils d'expression génique dynamiques de gènes régulateurs. Les précurseurs néphroniques du domaine le plus antérieur deviennent des podocytes formant le glomérule, sous le contrôle des facteurs de transcription paralogues *wt1a* et *wt1b*. Les précurseurs des domaines antérieur, central et caudal forment des segments tubulaires,

suivis d'un conduit. Les cellules antérieures adjacentes aux podocytes développent un segment appelé cou (« neck »). Les segments tubulaires incluent le tubule proximal convoluté (PCT), le tubule proximal droit (PST) exprimant *trpm7*, le segment distal précoce (DE), et le segment distal tardif (DL) exprimant *slc12a3* [5]. *Sim1a* est essentiel pour la formation du tubule droit proximal et du corpuscule de Stannius [10]. Les segments DL se prolongent en conduits pronéphriques (PD), définis par l'expression de *gata3*, et se rejoignent au niveau du cloaque [5].

Les corpuscules de Stannius (CS), clusters bilatéraux de cellules endocrines, apparaissent à la frontière entre DE et DL, situés dorsalement à cette région. L'organisation segmentaire des néphrons du pronephros du zebrafish suit le modèle archétype des domaines proximaux et distaux des vertébrés supérieurs, bien qu'ils manquent un segment intermédiaire ou mince présent chez les mammifères. [5]

Dans le graphique présenté à la figure 4, l'expression de plusieurs gènes clés impliqués dans le développement du pronephros chez le zebrafish peut être observée aux stades 15 et 28 somites. [11]

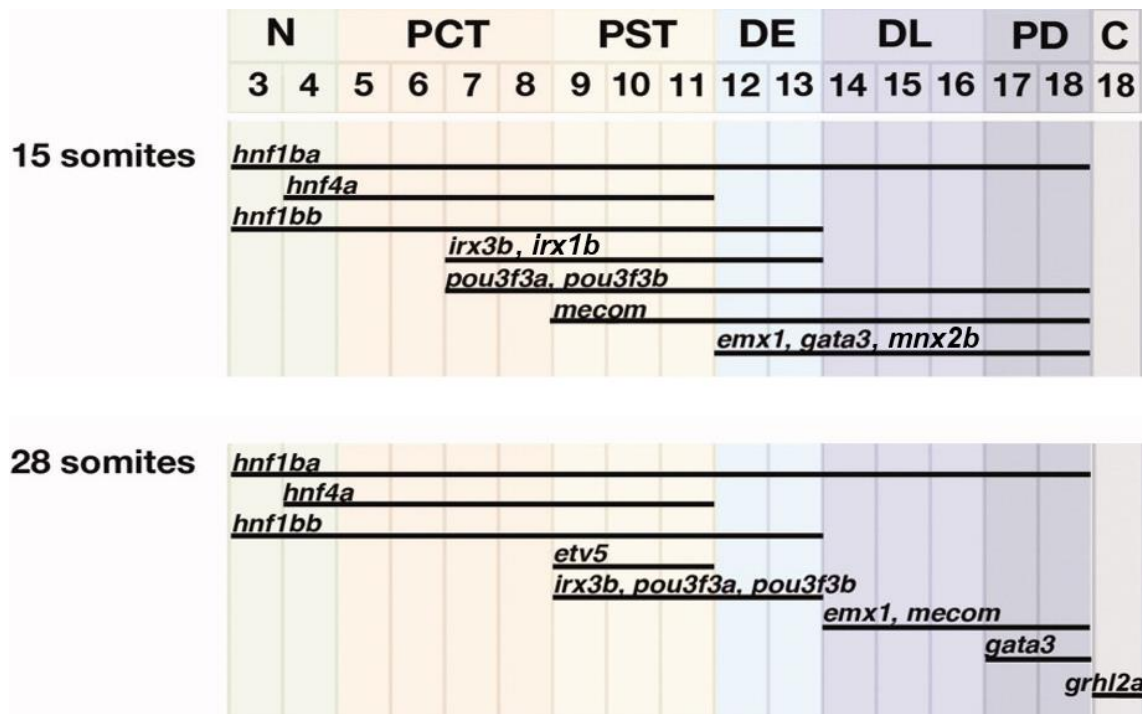


Figure 4: Localisation de l'expression de différents facteurs de transcription dans le pronephros du zebrafish à deux stades du développement (15 et 28 somites). Les segments et les codes de couleur sont les suivants : N (cou), vert ; PCT (tubule contourné proximal), orange ; PST (tubule droit proximal), jaune ; DE (distal précoce), bleu clair ; DL (distal tardif), bleu foncé ; PD (canal pronéphrique), gris foncé ; et C (cloaque), gris clair. Les chiffres notés de 3 à 18 indiquent la position de chaque somite. Figure modifiée de l'article [11].

La segmentation du pronephros chez le poisson zèbre est orchestrée par l'expression spatio-temporelle précise de facteurs de transcription spécifiques et de molécules de signalisation au cours de la somitogenèse. Certains facteurs de transcription tels que *hnf1ba* et *pax2* sont exprimés sur toute la longueur du pronephros. D'autres facteurs, comme *irx3b* et *irx1b*, sont détectés seulement dans la partie centrale du néphron. Finalement d'autres facteurs, tels que *mecom* (également appelé *evi1*), *mnx2b* et *gata3*, sont restreints dans la partie distale (ou postérieure) des néphrons. La figure 4 montre que les limites d'expression de ces facteurs ne sont pas fixes durant le développement. En effet, l'expression de plusieurs facteurs a tendance à être relocalisée plus postérieurement au cours de la somitogenèse (indiqué par la différence de position sur la figure 4 entre les deux stades 15 et 28 somites). C'est le profil d'expression chevauchant de ces facteurs de transcription qui détermine la position de chaque segment des néphrons. [11]

L'acide rétinoïque (AR) a une grande influence sur le profil d'expression des facteurs de transcription décrits ci-dessus. Ainsi, les embryons affectés dans la synthèse de l'AR sont dépourvus des parties proximales (antérieures) et ont des segments distaux (postérieur) beaucoup plus long. [11]

Les événements morphogénétiques entre 24 et 48 heures post-fécondation (hpf) aboutissent à un pronephros fonctionnel, incluant la formation du glomérule et la croissance régionale des segments tubulaires. Bien que simple architecturalement, le pronephros embryonnaire du zebrafish est fonctionnel et soutient la croissance pendant plusieurs semaines de vie larvaire, jusqu'à la formation du mésonéphros. [5]

1.4.3. Similitude entre le rein chez le zebrafish et l'humain

Les néphrons du métanéphros humain et du pronephros du poisson-zèbre présentent une forte similarité dans leurs schémas de segmentation ; chaque segment exprimant des transporteurs et/ou facteurs de transcription spécifiques. Les similitudes clés entre le néphron humain et le pronephros du poisson-zèbre, qui peuvent être observés dans la figure 5, incluent:

- Podocytes (P) : Les deux organismes possèdent des podocytes, cellules spécialisées impliquées dans le processus de filtration et présents au niveau des glomérules.
- Tubule convoluté proximal (PCT) et tubule proximal droit (PST) : Ces structures tubulaires sont présentes à la fois dans le néphron humain et le pronéphros du poisson-zèbre.
- Segments distaux : Bien que la terminologie diffère légèrement, les deux organismes possèdent des segments distaux, tels que le tubule contourné distal (DCT) chez l'homme et les segments distal précoce (DE) et distal tardif (DL) chez le poisson-zèbre.
- Système collecteur : Le néphron humain et le pronéphros du poisson-zèbre possèdent tous deux un tube collecteur (CD) ou un conduit pronéphrique (PD) qui transporte le fluide filtré.
- La forte similarité dans les schémas de segmentation entre le néphron humain et le pronéphros du poisson-zèbre met en évidence la conservation évolutive de ces structures rénales essentielles, cruciales pour le maintien de l'homéostasie des fluides et l'excrétion des déchets chez les deux organismes. [3]

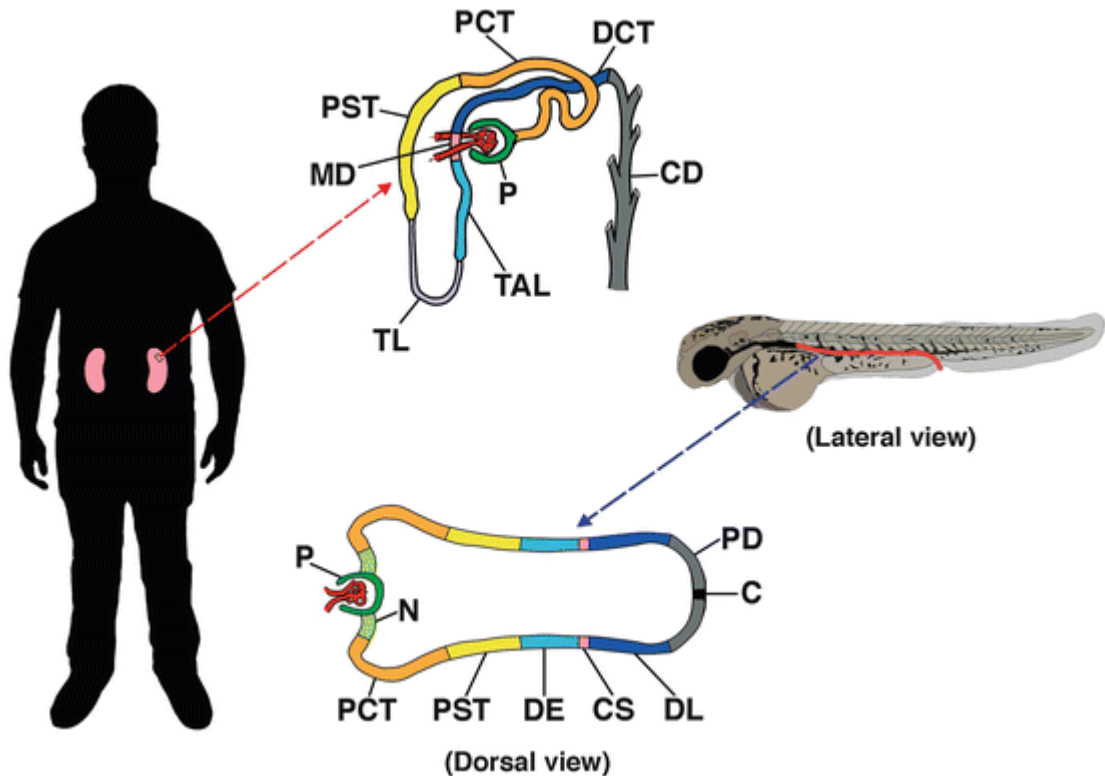


Figure 5: Comparaison du néphron humain au néphron du zebrafish. Abréviations dans le néphron humain: P: Podocytes, PCT: Tubule contourné proximal, PST: Tubule proximal droit, TL: Segment mince, TAL: Segment épais de la branche ascendante, MD: Macula densa, DCT: Tubule contourné distal, CD: Tube collecteur. Abréviations dans le pronephros du poisson-zèbre : P: Podocytes, N: Cou, PCT: Tubule contourné proximal, PST: Tubule proximal droit, DE: Segment distal précoce, CS: Corpuscule de Stannius, DL: Segment distal tardif, PD: Conduit pronephrique, C: Cloaque. Figure reprise de l'article [3]

Chez les mammifères, la formation du rein est sous le contrôle des mêmes facteurs transcriptionnels impliqués dans la formation du pronephros du zebrafish décrits plus haut (*Wt1*, *Hnf1b*, *Mecom*, *Gata3*, ...). Cependant, le rôle des gènes Hox a également été démontré chez la souris. Parmi les 39 gènes Hox, 28 sont exprimés dans le rein en développement. Une grande redondance fonctionnelle existant entre les gènes Hox, l'inactivation de plusieurs gènes Hox sont requis pour détecter des effets dans le développement du rein. Chez la souris, l'inactivation des gènes *hoxa11* et *hoxd11* provoque une hypoplasie rénale [12]. De même, la délétion des gènes *hox9* et *hox10* entraîne des anomalies sévères du rein (hypoplasie, dysplasie et agénésie) [13]. De plus, les néphrons analysés dans le métanéphros des souris mutantes présentent des tubules ayant des identités segmentaires maldéfinies. Toutes ces données indiquent que les gènes Hox « postérieurs » (paralogues *hox9* à *hox11*) sont impliqués dans le développement du rein et notamment dans l'identité des segments proximo-distaux. [9]

1.5. La voie de l'acide rétinoïque

L'acide rétinoïque agit comme un morphogène, une molécule de signalisation qui dicte le destin développemental des cellules en fonction de son gradient de concentration. Dans l'embryogenèse des vertébrés, l'acide rétinoïque joue un rôle essentiel dans la structuration de l'embryon, notamment en influençant l'expression des gènes *Hox*, qui sont des régulateurs clés de la formation de l'axe corporel et de l'organogenèse. La liaison de l'AR à ses récepteurs nucléaires, les récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR), module l'expression des gènes en modifiant l'activité transcriptionnelle des gènes cibles contenant des éléments de réponse à l'acide rétinoïque (RARE). Cette interaction est cruciale pour des processus tels que la différenciation cellulaire, la prolifération et l'apoptose.[7]

Chez le poisson zèbre, il y a quatre récepteurs à l'AR (RARaa, RARab, RARga et RARgb) alors que les mammifères en ont 3 (RAR α , RAR β et RAR γ), ceci en raison d'un événement de duplication du génome qui a entraîné l'apparition de gènes RAR supplémentaires par rapport aux mammifères. Malgré cette différence, les mécanismes fondamentaux de la synthèse, de la dégradation et de la signalisation de l'AR sont conservés, ce qui garantit la régulation précise des niveaux d'AR nécessaires au développement normal. L'équilibre entre la synthèse et la dégradation de l'acide rétinoïque est donc un aspect vital de la biologie des vertébrés, influençant un large éventail de processus physiologiques et de voies de développement. [7]

1.5.1. Synthèse de l'acide rétinoïque

Chez les vertébrés, comme représenté dans la figure 6, la synthèse de l'acide rétinoïque (AR) implique deux étapes enzymatiques clés. Le processus commence par la conversion de la vitamine A, également connue sous le nom de rétinol, en rétinaldéhyde. Cette étape est catalysée par deux grandes classes d'enzymes : les alcools déshydrogénases (ADH) et les rétinols déshydrogénases (RDH). Ces enzymes effectuent une réaction d'oxydation, convertissant le groupe alcool du rétinol en groupe aldéhyde du rétinaldéhyde. Cette conversion est cruciale car le rétinaldéhyde est le précurseur immédiat de l'acide rétinoïque, la forme bioactive de la vitamine A impliquée dans la régulation des gènes. La deuxième étape de la synthèse de l'AR, qui en limite la vitesse,

est l'oxydation du rétinaldéhyde en acide rétinoïque. Cette réaction est catalysée par des enzymes de la famille des aldéhydes déshydrogénases 1, en particulier ALDH1A1, ALDH1A2 et ALDH1A3 chez l'homme. Ces enzymes, également connues sous le nom de rétinaldéhyde déshydrogénases (RALDH1, RALDH2 et RALDH3), sont responsables de la conversion du rétinaldéhyde en acide rétinoïque. Cette conversion est essentielle car elle détermine la disponibilité de l'acide rétinoïque dans les tissus, qui à son tour influence de nombreux processus physiologiques et de développement par l'activation des récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR).[7]

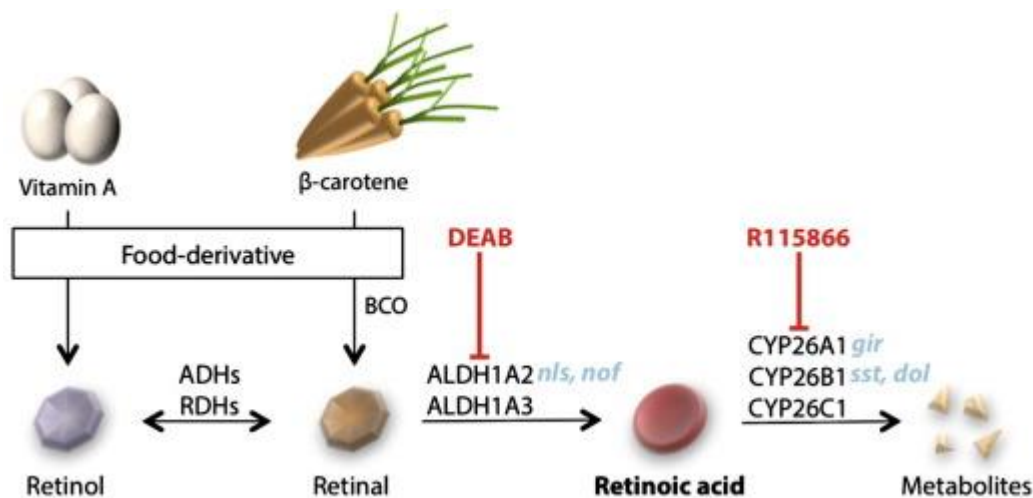


Figure 6: Schéma de la conversion de la vitamine A en acide rétinoïque : La source principale de rétinol provient de la vitamine A alimentaire, qui est convertie en rétinol par l'action des enzymes rétinol ou alcool déshydrogénases, respectivement RDH et ADH. L'acide rétinoïque est synthétisé par l'oxydation du rétinol grâce aux enzymes ALDH1A, dont deux sont présentes chez le poisson-zèbre. L'activité de ces enzymes peut être bloquée chimiquement par le traitement avec le diéthylaminobenzaldéhyde (DEAB). Deux lignées mutantes spécifiques, no-fin (nof) et neckless (nls), ont été identifiées pour le gène *aldh1a2* chez le poisson-zèbre. L'acide rétinoïque est ensuite dégradé en métabolites par les enzymes CYP26 de la sous-famille 26 du cytochrome P450, dont trois variantes existent chez le poisson-zèbre. [7]

1.5.2. Dégradation de l'acide rétinoïque

De nouveau représenté dans la figure 6, la dégradation de l'acide rétinoïque est tout aussi cruciale que sa synthèse, ce qui garantit que ses niveaux sont étroitement régulés dans l'organisme. Cette régulation est particulièrement importante au cours de l'embryogenèse, où des cellules spécifiques ont besoin de concentrations précises d'AR pour se développer normalement. La dégradation de l'AR est principalement assurée par les enzymes de la famille 26 du cytochrome P450, qui comprennent CYP26A1, CYP26B1 et CYP26C1. Ces enzymes hydroxylent l'acide rétinoïque pour former l'acide 4-hydroxy-rétinoïque, qui est ensuite oxydé en acide 4-oxo-rétinoïque. Ces métabolites sont ensuite

conjugués pour former des composés inactifs qui peuvent être facilement éliminés de l'organisme.[7]

L'action des enzymes CYP26 sert à prévenir l'activation excessive des RAR dans les cellules, qui pourrait sinon conduire à une expression génétique anormale et à des anomalies de développement. Les schémas d'expression spatiale et temporelle des enzymes synthétisant l'AR (famille ALDH1A) et des enzymes dégradant l'AR (famille CYP26) sont finement ajustés pour maintenir des gradients d'AR appropriés dans les tissus en développement. Cette expression complémentaire garantit que l'AR est disponible là où elle est nécessaire, tout en étant rapidement dégradée dans les régions où sa présence pourrait être préjudiciable.[7]

1.5.3. Les mutants zebrafish *no-fin* et *neckless*

Chez le poisson-zèbre, les mutants *no-fin* (*nof*) et *neckless* (*nls*) ont été identifiés et ils sont tous deux associés à des mutations du gène *raldh2*, qui est responsable de la production d'acide rétinoïque. Ces mutations entraînent des défauts développementaux significatifs au niveau de plusieurs organes [14], [15]. Des anomalies similaires sont observées dans les souris mutantes dans le gène orthologue *raldh2*. Les mutants *nls/nof* ne possèdent pas de nageoires pectorales (membres antérieurs) et ont une réduction des arcs branchiaux postérieurs. Comme mentionné plus haut, ces mutants possèdent des segments distaux du pronéphros plus importants contrairement aux segments proximaux réduits. Le remodelage du cerveau postérieur, sous le contrôle des gènes *hox*, est fortement affecté dans ces mutants. De même, ils ne forment pas de pancréas et le développement du cœur est affecté. Les anomalies de ces mutants *nof* et *nls* peuvent être corrigées par l'application d'AR ou par l'introduction d'ARNm fonctionnel de *raldh2*, confirmant ainsi le rôle crucial de la signalisation de l'AR dans le développement de ces structures. [15]

Lors du mémoire de Manon Dohet en 2023, il a été démontré que les gènes *nr6a1a* et *nr6a1b* sont régulés par l'acide rétinoïque. L'expression de *nr6a1b* dépend entièrement de l'AR, en revanche, *nr6a1a* est régulé par l'AR mais son expression n'est pas complètement abolie lorsque la synthèse de l'AR est bloquée, indiquant que d'autres facteurs non encore identifiés activent son expression. Ses observations suggèrent que

nr6a1a n'agit pas uniquement comme un médiateur direct de l'AR, mais qu'il pourrait être également impliqué dans un réseau de régulation plus large, où l'AR joue un rôle clé mais n'est pas le seul facteur influençant (voir figure 7). *Nr6a1a* pourrait donc fonctionner comme un médiateur secondaire, modulant les effets de l'AR dans certains processus biologiques. [4]

Ces résultats conduisent donc à définir des objectifs de recherche précis pour la suite de l'étude. En particulier, il est crucial de déterminer si tous les gènes affectés dans les mutants *nr6a1a* et *nr6a1b* sont également régulés par l'acide rétinoïque. Cette approche permettra de comprendre si les anomalies observées dans ces mutants sont directement liées à la régulation par l'AR ou si d'autres facteurs interviennent. De plus, il est essentiel d'explorer si les gènes dont l'expression est modifiée par l'AR présentent également des altérations dans les mutants *nr6a1a* et *nr6a1b*. En établissant ces relations, nous pourrions mieux cerner les interactions complexes entre *nr6a1* et l'acide rétinoïque, et préciser les mécanismes moléculaires sous-jacents aux effets phénotypiques observés.

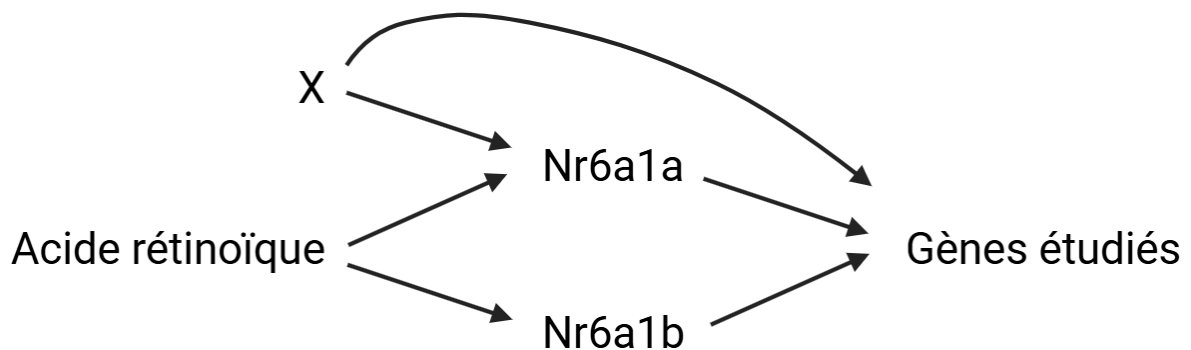


Figure 7: Schéma de l'implication des gènes *nr6a1a/b* dans la voie de l'AR. *Nr6a1b* est entièrement régulé par l'AR. *Nr6a1a* par contre est régulé à la fois par l'AR et par un ou des facteurs encore non identifiés (facteurs X).

Objectifs

2. Objectifs

L'objectif de ce travail de fin d'études est de comparer les effets de l'acide rétinoïque et des mutations des gènes *nr6a1a* et *nr6a1b* chez le zebrafish afin de déterminer les processus qui sont affectés de manière similaire et où les facteurs *nr6a1a/b* pourraient agir comme médiateurs du signal AR. Pour ce faire, des techniques d'hybridation in situ seront utilisées afin de visualiser l'expression d'une série de gènes. Nous analyserons également si les arcs branchiaux sont affectés dans les mutants *nr6a1a/b*, étant que ceux-ci sont anormaux dans les embryons *nls/nof* dépourvu d'AR. Nous déterminerons également si tous les gènes régulés par *nr6a1a/b* sont également régulés par l'AR. Cette approche nous indiquera donc si les facteurs *nr6a1a/b* n'agissent que comme médiateur de la voie de l'acide rétinoïque.

Matériel et méthodes

3. Matériel et méthodes

3.1. Lignées mutantes et transgéniques utilisées

Dans ces travaux de recherche, des lignées de zebrafish où les gènes *nr6a1a* et/ou *nr6a1b* ont été inactivés à l'aide de la méthode CRISPR/Cas9 ont été utilisées. Dans les deux cas, cette manipulation a engendré une délétion au niveau du domaine zinc finger, induisant ainsi un décalage de phase de lecture et une désactivation des gènes correspondants. Les séquences des exons mutés, nommées allèles *nr6a1a*^{ulg083} et *nr6a1b*^{ulg085}, sont illustrées dans les figures 8 et 9 respectivement, tout comme les séquences des exons des gènes non mutés.

NR6A1A

délétion de 5 nucléotides → la mutation engendre un site BtsIv2

Primers :

BPa1291 : **CAGGCTGAGCAGCGCTCTTGTC**

BPa1292 : **TCCAGCGTGTGTGTTTCTCTCAC**

→ Fragment de 249 pb

Enzyme restriction : BtsIv2

Après digestion : fragment de 249 pb pour le WT, fragments de 203 et 41 pb pour le mutant

5'→3' : GCAGTG(N)2/ ; /CACTGC

Cut Site: GCAGTG(2/0)

WT

CAGGCTGAGCAGCGCTCTTGTCTTATATGTGGAGACCGCGCCAC**AGGACT**TGCACTATGGCATT
ATTTCTGCGAGGGCTGCAAGGGTTTCTTCAAGCGCAGCATCTGCAACAAGCGTGTGTATCGA
TGCAGCCGCGACAAAACTGCGAGATGTCCCGCAAACAGCGCAACCGCTGCCAATACTGCCGC
CTGCTCAAGTGCCTGCAGATGGGCATGAACCGCAAAG**GTGAGAGAAACACACACGCTGGA**

Mutant

CAGGCTGAGCAGCGCTCTTGTCTTATATGTGGAGACCGCGC/**CACTG**CACTATGGCATTATTT
CCTGCGAGGGCTGCAAGGGTTTCTTCAAGCGCAGCATCTGCAACAAGCGTGTGTATCGATGCA
GCCGCGACAAAACTGCGAGATGTCCCGCAAACAGCGCAACCGCTGCCAATACTGCCGCCTGC
TCAAGTGCCTGCAGATGGGCATGAACCGCAAAG**GTGAGAGAAACACACACGCTGGA**

Figure 8 : Lignée sauvage et mutante pour le gène nr6a1a. Les nucléotides marqués en jaune représentent les délétions et insertions générées par la technique CRISPR/Cas9. Les nucléotides soulignés sont ceux reconnus par l'enzyme de restriction. La barre oblique rouge représente l'endroit de la coupure de l'enzyme de restriction. Les surlignages grises représentent les amorces de la PCR utilisées pour le génotypage.

NR6A1B

la mutation enlève un site BsgI

Primers :

BPa1234 : **TGCCCAATGGTTGGTTTGGCTACA**

BPa1235 : **GTGTGTCTCACCCCTGCGGTTTCATG**

→ Fragment de 387 pb

Enzyme de restriction : BsgI

Après digestion : fragments de 205 et 182 pb pour le WT, fragment de 385 pb pour le mutant

5'...GTGCAG(N16)/...3'

5'.../(N14)CTGCAC...3'

WT

TGCCCAATGGTTGGTTTGGCTACATTTGACCCAATGTAGGGGTTACAACAACCCAGCATTTTT
AGAGTGCATACTTCCCTTATAATCCCTAGTCCATGAAAATTGATAAATATACAGAGTCAGCA
GGTGTGTGTGTTTCTCTATAGATGACGGTGGTGAGCGCTGGTGTCTGATCTGTGGGG/ATCGA
GCGTCCGGCCTGCA**CTATGGTAT**TATTTCCCTGCGAGGGCTGTAAAGGCTTCTTCAAGCGCAGT
ATCTGCAACAAACGCATCTATCGCTGCAACAGAGACAAGAAGTCCAGATGTCCCGCAAACAG
CGCAACCGCTGCCAGTACTGTCCGGCTGCAGAAGTGCCTACAGATGGG**CATGAACCGCAAGGGT**
GAGACACACAC

Mutant

TGCCCAATGGTTGGTTTGGCTACATTTGACCCAATGTAGGGGTTACAACAACCCAGCATTTTT
AGAGTGCATACTTCCCTTATAATCCCTAGTCCATGAAAATTGATAAATATACAGAGTCAGCA
GGTGTGTGTGTTTCTCTATAGATGACGGTGGTGAGCGCTGGTGTCTGATCTGTGGGGATCGA
GCGTCCGGCCTGCA**TGCTATA**TATTTCCCTGCGAGGGCTGTAAAGGCTTCTTCAAGCGCAGTAT
CTGCAACAAACGCATCTATCGCTGCAACAGAGACAAGAAGTCCAGATGTCCCGCAAACAGCG
CAACCGCTGCCAGTACTGTCCGGCTGCAGAAGTGCCTACAGATGGG**CATGAACCGCAAGGGTGA**
GACACACAC

Figure 9 : Lignée sauvage et mutante pour le gène nr6a1b. Les nucléotides marqués en jaune représentent les délétions et insertions générées par la technique CRISPR/Cas9. Les nucléotides soulignés sont ceux reconnus par l'enzyme de restriction. La barre oblique rouge représente l'endroit de la coupure de l'enzyme de restriction. Les surlignages grises représentent les amorces de la PCR utilisées pour le génotypage.

3.2. Croisement des poissons et récolte des œufs

Les zebrafish mâles et femelles sont placés ensemble dans un "bac de croisement", séparés par une cloison pour encourager la production de phéromones durant la nuit. Le matin suivant, la cloison est retirée et l'eau est renouvelée pour favoriser l'accouplement. Le "bac de croisement" est équipé d'un double fond perforé, permettant une collecte facile des œufs à l'aide d'un tamis après la ponte. Les œufs ainsi récoltés sont transférés dans une boîte de Petri contenant du milieu E3 (5mM de NaCl ; 0.17 mM de KCl ; 0.33 mM de MgSO₄ ; 0.33 CaCl₂), enrichi en bleu de méthylène pour prévenir les infections bactériennes. Ensuite, les œufs sont triés pour éliminer les œufs non fécondés ainsi que les débris, minimisant ainsi le risque d'infection bactérienne.

3.3. Fixation des embryons

Les embryons sont maintenus dans une solution E3 à une température de 28°C jusqu'à atteindre le stade de développement désiré pour les manipulations, avec un renouvellement fréquent du milieu. Pour les embryons se développant au-delà de 30 heures, une solution de PTU (phénylthiourée 0.2mM) est ajoutée à la solution E3 pour inhiber leur pigmentation. Une fois les embryons parvenus au stade désiré, ils sont transférés dans une solution de PFA (paraformaldéhyde) à 4% pour les fixer, puis incubés toute une nuit à 4°C sur un agitateur. Le jour suivant, les embryons sont progressivement déshydratés dans une série de solutions de méthanol de concentrations croissantes. Ils sont ensuite conservés à -20°C.

3.4. Traitement des embryons à l'AR et au DEAB

Lorsqu'un traitement des embryons avec de l'AR ou du DEAB est souhaité, ces composés sont directement ajoutés dans le milieu E3 à la concentration requise. L'AR est ajouté (100 nM final) lorsque sa production débute dans l'embryon, vers 5,5 hpf (début de la gastrulation). Le DEAB, étant ajouté (4 µM final) avant le début de la production d'AR, est ajouté avant 5,5 hpf. Ces molécules, étant lipophiles, pénètrent directement à l'intérieur de l'embryon.

3.5. Génotypage

3.5.1. Extraction du matériel génétique

Chaque embryon qui doit être génotypé est placé dans un tube PCR. Pour extraire leur ADN, 50 µl de solution de NaOH à une concentration de 50 mM sont ajoutés à chaque tube, suivi d'une incubation de vingt minutes à 100 °C. Les échantillons sont ensuite vortexés puis refroidis sur glace. Enfin, 10 µl de solution de Tris (pH 7,5) à une concentration de 1 M sont ajoutés à chaque tube pour neutraliser le pH.

Le même protocole est utilisé pour le génotypage de poissons adultes : à la place de l'embryon, une nageoire est utilisée pour extraire l'ADN. Pour amputer cette nageoire, le poisson est mis dans une solution de tricaine. Dès qu'il est anesthésié, il est pris avec une cuillère en plastique et une partie de sa nageoire caudale est coupée et mise dans un tube Eppendorf. Le poisson est enfin remis dans de l'eau pour arrêter l'anesthésie.

3.5.2. Amplification du gène

Dans le cadre de ce mémoire, les gènes *nr6a1a* et *nr6a1b* sont amplifiés par PCR afin de procéder au génotypage. Des amorces encadrant la région d'intérêt sont utilisées pour la digestion qui est l'étape suivante. Le protocole d'amplification varie pour les deux gènes.

- Pour *nr6a1a* : L'exon 3 du gène *nr6a1a* est amplifié. La PCR est effectuée avec la polymérase Terra (Takara) en utilisant les amorces indiquées en gris dans la figure 8 pendant 35 cycles.
- Pour *nr6a1b* : L'exon 5 du gène *nr6a1b* est amplifié avec la polymérase Terra pendant 35 cycles. Les amorces utilisées sont présentées dans la figure 9.

Les temps et températures de chaque PCR sont présentés dans la figure 10. Après amplification, 6 µl d'ADN sont prélevés et déposés sur un gel d'agarose à 2% pour vérifier le succès de l'amplification.

nr6a1a		}	35x	nr6a1b		}	35x
Temps (secondes)	Température (°C)			Temps (secondes)	Température (°C)		
120	98			120	98		
10	98			10	98		
15	63			15	60		
30	68			30	68		
420	68			420	68		

Figure 10: Protocole d'amplification des gènes *nr6a1a* et *nr6a1b*.

3.5.3. Digestion

L'ADN amplifié est digéré par une enzyme de restriction afin de déterminer la présence des mutations ULG083 et ULG085 dans les gènes *nr6a1a* et *nr6a1b* respectivement. L'enzyme BtsI-v2 reconnaît un site de restriction sur le gène muté *nr6a1a*^{ULG083}, tandis que pour *nr6a1b*, c'est l'enzyme BsgI qui digère le gène non muté, l'allèle *nr6a1b*^{ULG085} ne possédant plus ce site (Figures 8 et 9 respectivement). La digestion par les deux enzymes a lieu pendant une nuit à 37°C.

3.5.4. Gel d'électrophorèse

Pour visualiser la digestion, une électrophorèse sur gel d'acrylamide de 8% est réalisée pour le gène *nr6a1a* et une électrophorèse sur un gel d'agarose à 2% est réalisée pour le gène *nr6a1b*.

3.6. Hybridation in situ

Pour les expériences d'hybridation in situ, le protocole suivi est basé sur celui établi par Thisse et al. [16]. Les différentes étapes de ce protocole sont détaillées ci-dessous.

3.6.1. Synthèse des sondes ARN antisens

Des amorces contenant des séquences du cDNA à amplifier et également la séquence du promoteur T3, ont été commandés pour la synthèse des sondes. Une fois les amorces reçues, une amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) est réalisée en utilisant de l'ADNc du zebrafish comme matrice. Les produits de PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % et purifiés avec des billes magnétiques AMPure, conformément aux instructions de Beckman Coulter. Les fragments d'ADN

amplifiés sont ensuite quantifiés au nanodrop. Par la suite, une réaction de transcription des fragments d'intérêt est initiée à l'aide de l'ARN polymérase du phage T3 afin de produire les sondes ARN antisens. Les réactions de transcription incluent 200 ng d'ADN, 2 µl de 10x Dig-RNA labeling mix, 2 µl de 10x transcription buffer, 1 µl d'inhibiteurs de RNase, 2 µl de polymérase T3, et de l'eau pour un volume final de 20 µl. Pour cette transcription, les UTP sont marqués à la digoxygénine (DIG), permettant la détection de la sonde. L'ADN est éliminé grâce à un traitement à la DNase RNase-free pendant 15 minutes à 37°C. La réaction est arrêtée par l'ajout de 2 µl d'EDTA 0,2 M à pH 8,0. Ensuite, deux purifications sont effectuées : la première avec une résine G50 via le « cytiva kit » (Amersham) et la deuxième par précipitation (avec NH₄-Ac et éthanol). L'ARN antisens synthétisé est ensuite isolé par centrifugation, quantifié au nanodrop, dilué dans du Hybmix+ (HybMix + ARN torula) pour atteindre une concentration de 10 ng/µl et conservé à -80°C. Toutes ces étapes sont réalisées en conditions RNase-free.

3.6.2. Hybridation des sondes

Les embryons préalablement fixés sont progressivement réhydratés dans une solution contenant une concentration croissante de PBT (PBS + Tween20 0,01%). Par la suite, une digestion à la protéinase K à 37°C est réalisée pour perméabiliser les embryons, permettant ainsi la pénétration des sondes lors de l'étape d'hybridation. La durée de la digestion varie en fonction du stade embryonnaire. En raison de la fragilité des embryons après leur digestion, ils sont refixés à la PFA 4% pour les préserver et ils sont rincés dans une solution de PBT. Avant l'hybridation des sondes, il est essentiel de procéder à une pré-hybridation pour réduire le bruit de fond. Les embryons sont incubés à une température de 65°C pendant une période de 3 à 5 heures dans une solution de HybMix+. L'ARN torula du Hybmix+ s'hybride dans les zones non spécifiques. Enfin, il est possible de procéder à l'hybridation des sondes ARN antisens préalablement fabriquées : les embryons sont placés pendant une nuit à une température de 65°C dans une solution de HybMix+ contenant du Dextran Sulfate à 5% et 10 à 50ng de sonde ARN.

3.6.3. Immunodétection des sondes

Les embryons sont d'abord rincés en diminuant progressivement la concentration de HybMix pour la remplacer par une solution de SSCT, ce qui permet d'éliminer les

sondes non hybridées. Le SSCT est ensuite substitué par une solution de PBT. Par la suite, une solution de Blocking Buffer est appliquée pendant au moins deux heures à température ambiante pour bloquer les sites non spécifiques susceptibles de lier les anticorps. Enfin, les embryons sont incubés pendant une nuit à 4°C dans une solution de Blocking Buffer contenant des anticorps anti-DIG (dilution 1/1000). Ces anticorps sont conjugués à l'alcaline phosphatase.

3.6.4. Révélation de la coloration

Les anticorps non liés aux sondes sont éliminés par une série de sept lavages avec de la solution PBT. Ensuite, les embryons sont rincés à deux reprises avec une solution de Staining Buffer (100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl pH 9.5, 0.1% Tween 20). La révélation de la coloration est réalisée en ajoutant NBT et BCIP, qui interagissent avec l'alcaline phosphatase liée aux anticorps pour former un précipité bleu visible, permettant ainsi de détecter les sondes. La durée de cette révélation varie en fonction de la sonde et du stade de développement embryonnaire. Pour stopper la réaction, les embryons sont rincés avec de la solution PBT. Ils sont ensuite transférés dans du glycérol pour être analysés au microscope.

3.6.5. Double hybridation in situ

Pour marquer deux sondes de couleurs différentes dans les mêmes embryons, une double hybridation in situ est réalisée. Les procédures décrites précédemment sont suivies comme d'habitude, à l'exception du fait que l'une des sondes est marquée avec de la fluorescéine (FLUO) plutôt qu'avec de la digoxygénine. Après l'hybridation, les anticorps fixés sont éliminés en rinçant les embryons avec une solution de Glycine-HCl à 100 mM pH 2.2 et Tween20 à 0.1%. Un lavage ultérieur avec de la solution PBT est effectué, suivi d'une incubation d'une heure dans du Blocking Buffer. Les anticorps anti-FLUO (1/500) sont ensuite ajoutés et l'incubation se poursuit toute la nuit. Le lendemain, les embryons sont lavés sept fois avec du PBT pour éliminer les anticorps non liés aux sondes, puis rincés dans du Staining Buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.2, 0.1% Tween). La révélation de la coloration est réalisée à l'aide du substrat Fast-Red.

Résultats

4. Résultats

4.1. Analyse du nombre d'arcs pharyngiens

Les anomalies détectées au niveau du pronéphros et des nageoires pectorales dans les doubles mutants *nr6a1a/b* étant similaires à ceux des mutants affectés dans la synthèse d'AR (mutants *nls* et *nof*), nous avons voulu déterminer si des malformations étaient présentes au niveau des arcs pharyngiens dans les mutants *nr6a1a/b* comme rapporté dans les mutants *nls/nof*. Les poissons *nr6a1a^{+/-}; b^{+/-}* avaient été croisés avec des poissons transgéniques *Fli::GFP* exprimant la protéine GFP dans les vaisseaux sanguins et au niveau des arcs pharyngiens. Ces poissons permettent donc d'observer directement les arcs pharyngiens en fluorescence au stéréomicroscope. Nous avons donc génotypé les poissons issus du croisement décrit ci-dessus et identifié des poissons transgéniques *Tg(fli::GFP)* porteurs de la mutation *nr6a1a* et/ou de la mutation *nr6a1b*. En croisant ces poissons entre eux, nous avons donc généré des embryons mutants homozygotes *nr6a1a* et également des embryons doubles mutants *nr6a1a/b* (aisément identifiable par l'absence de nageoires pectorales). L'observation de ces larves 6 jours après fécondation montrent une perte d'arcs branchiaux (voir figure 11).

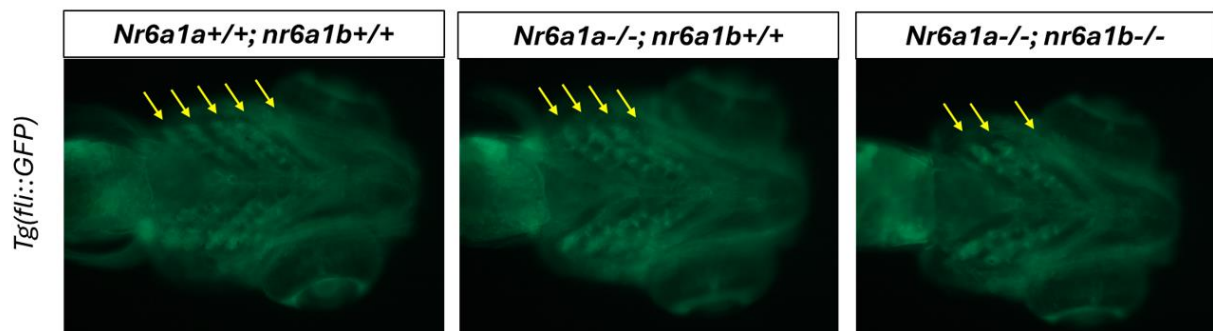


Figure 11: Analyse du nombre d'arcs branchiaux de poissons transgéniques (*fli::GFP*) et mutants pour les gènes *nr6a1a/b*. Les embryons sauvages possèdent cinq arcs branchiaux, tandis que les mutants *nr6a1a* en ont quatre et les doubles mutants en ont trois.

Les larves sauvages et les larves *nr6a1b^{-/-}* avaient cinq arcs branchiaux, les mutants *nr6a1a* en avaient quatre, et les doubles mutants en avaient trois. Aucun changement significatif n'a été observé dans la formation des vaisseaux sanguins.

Le phénotype des doubles mutants *nr6a1a/b* rappelle donc celui des mutants *neckless* et *nofin* décrits dans la littérature, qui présentent également une réduction du nombre d'arcs branchiaux, en particulier des arcs postérieurs. Ce résultat renforce donc la similarité du phénotype des mutants *nr6a1a/b* avec les mutants affectés dans la voie de l'AR.

4.2. Etude des profils d'expression de gènes régulateurs impliqués dans la formation du rein ; comparaison des effets de traitements au DEAB et à l'AR et expression dans les mutants *nr6a1a/b*.

De nombreux facteurs de transcription impliqués dans la formation du pronéphros sont régulés par l'AR. Nous avons donc comparé le profil d'expression d'une série de ces facteurs transcriptionnels dans les doubles mutants *nr6a1a/b* et dans des embryons sauvages dans lesquels la synthèse d'AR est bloquée, et également dans d'autres embryons dans lesquels l'AR est en excès. Afin de délimiter plus facilement les zones d'expression des gènes étudiés dans le mésoderme intermédiaire, nous avons réalisé des expériences d'hybridation *in situ* à double marquage en utilisant une sonde antisens *myod* marquée au FITC (voir matériels et méthodes) permettant de visualiser les somites en rouge dans les embryons. La figure 12 présente le profil d'expression pour les facteurs de transcription *evi*, *gata3*, *irxb1b*, *irx3b*, *sima1a* et *gata3* (marquage noir) dans des embryons sauvages non traités (colonne de gauche), traités par l'AR à 100nM (colonne centrale) et traités par le DEAB à 4 μ M, un inhibiteur pharmacologique des enzymes *aldh1a1/2/3* (colonne de droite). Les flèches indiquent la zone d'expression de ces gènes au niveau du mésoderme intermédiaire.

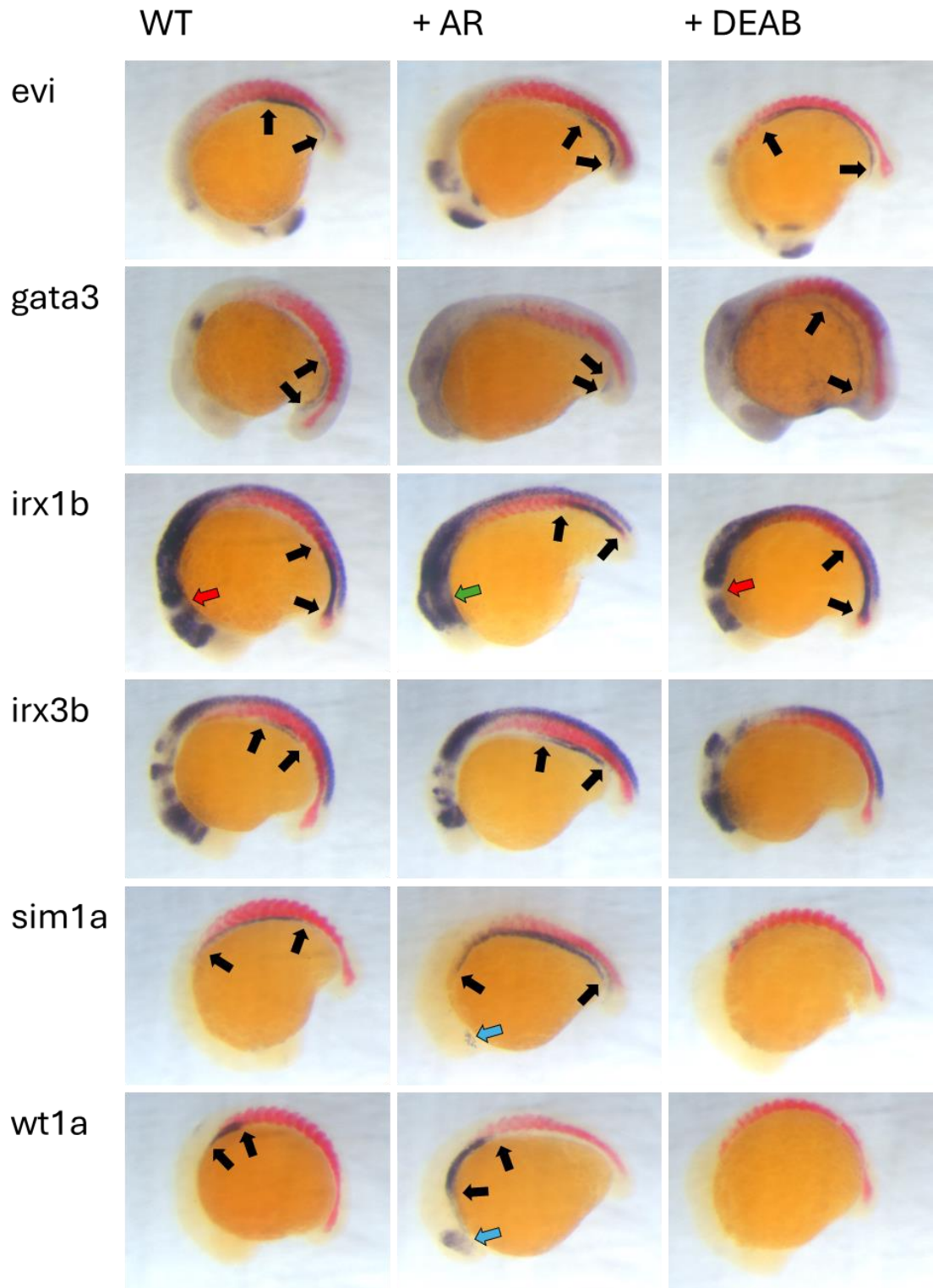


Figure 12: Résultats d'une première hybridation in situ pour différents marqueurs du pronéphros embryonnaire. L'HIS a été réalisé en trois conditions pour chaque gène : non traités, traités à l'AR et au DEAB. Les somites sont marquées en rouge par la sonde myod. 20 embryons ont été utilisés pour chaque condition et l'effet du DEAB et de l'AR était le même pour les 20 embryons.

On peut remarquer que l'expression ces gènes est affectée de manière différentes : pour les gènes *evi* et *gata3*, le traitement à l'AR restreint la zone d'expression dans le mésoderme intermédiaire, et inversement, le traitement au DEAB rallonge la zone

d'expression. Par contre, pour les gènes *irx3b*, *sim1* et *wt1a*, leur expression devient plus large dans le mésoderme intermédiaire suite au traitement à l'AR et devient plus court (ou disparaît) suite au traitement au DEAB. En outre, *sim1a* et *wt1a* sont exprimés dans l'œil dans le cas d'un traitement à l'AR (flèches bleues sur la figure 12). Concernant le gène *irx1b*, nous n'avons pas observé de changement significatif dans le mésoderme intermédiaire par les traitements à l'AR ou au DEAB. Seulement dans le cas du traitement à l'AR, une région supplémentaire dans le cerveau postérieure exprime *irx1b* (flèche verte). Cela n'est pas le cas pour les embryons non traités et les embryons traités au DEAB (flèche rouge).

Etant donné que les mutants *nr6a1a/b* présentent des similarités de phénotype avec des embryons affectés dans la synthèse d'AR, nous avons ensuite analysé si le profil d'expression des facteurs transcriptionnels étaient également affectés dans les doubles mutants *nr6a1a/b* d'une manière similaire au traitement au DEAB. Des pontes d'embryons issus de croisements entre poissons *nr6a1a+/-;nr6a1b-/-* ont été fixées au stade 15 somites et analysées par hybridation *in situ* en double marquage avec la sonde *myod* révélée en rouge.

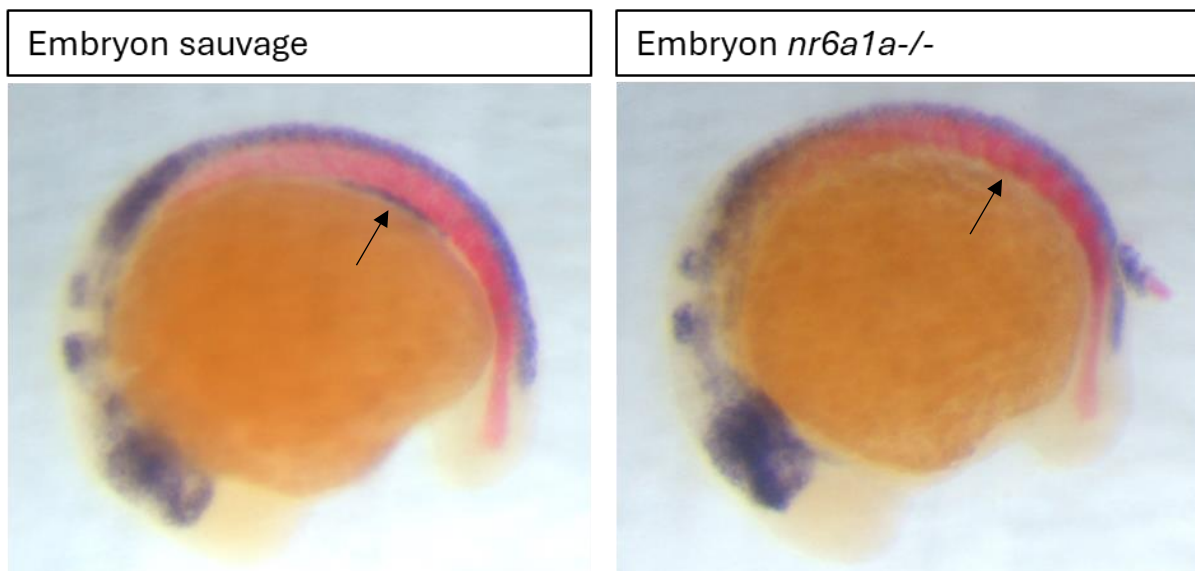


Figure 13: Résultats d'une hybridation *in situ* pour le gène *irx3b* à gauche, dans des embryons sauvages et non traités et à droite dans des embryons mutants pour le gène *nr6a1a* (*nr6a1a-/-*). Les somites sont marquées en rouge par la sonde *myod*.

Pour les gènes *wt1a*, *sim1*, *evi*, *irx1b* et *gata3*, tous les embryons de la même ponte présentaient le même marquage qui était identique à celui des embryons sauvages non-traités de l'expérience précédente. Ceci indique que les gènes *nr6a1a/b* ne régulent pas

ces facteurs de transcription à ce stade. Seule la sonde *irx3b* présentait des différences de marquage entre embryons ; en effet, certains embryons ne présentaient pas de marquage au niveau du mésoderme intermédiaire (voir figure 13). Cinq embryons ne présentant pas ce marquage au niveau du mésoderme ont été utilisés pour faire un génotypage et tous se sont révélés être des embryons *nr6a1a*^{-/-}. Cinq embryons représentant le marquage se sont révélés être soit des embryons *nr6a1a*^{+/+} soit des embryons *nr6a1a*^{+/-}. Ceci montre que *nr6a1a* agit sur l'expression du facteur *irx3b*.

En conclusion, tous ces résultats montrent qu'il existe des différences flagrantes entre les embryons doubles mutants *nr6a1a/b* et les embryons dépourvus d'AR. En effet, le traitement au DEAB affecte plus de gènes régulateurs du pronéphros que les mutations *nr6a1a/b* ; seul *irx3b* est affecté par le traitement DEAB et les mutations *nr6a1a/b*. Dans les deux conditions, on observe une perte d'expression d'*irx3b* dans le mésoderme intermédiaire.

Les gènes *hox* postérieurs sont impliqués dans le développement du rein chez la souris. Nous avons analysé l'expression de deux gènes *hox*, *hoxa10b* et *hoxb13a*, dans notre mémoire. Nous avons donc comparé leur profil d'expression dans des embryons «sauvages » à celui dans les mutants *nr6a1a/b*, à celui dans des embryons dans lesquels la synthèse d'AR est bloquée, et également en excès d'AR. La figure 14 présente le profil d'expression pour des facteurs *hoxa10b* et *hoxb13a* (marquage noir) dans des embryons sauvages non traités (colonne de gauche), traités par l'AR à 100nM (colonne centrale) et traités par le DEAB (colonne de droite).

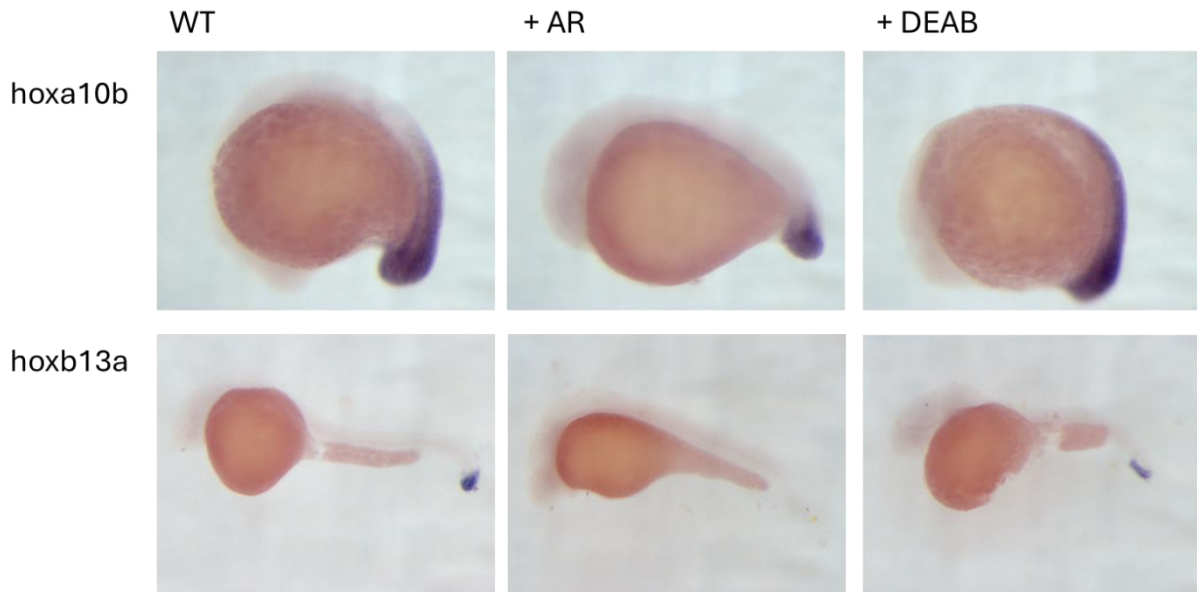


Figure 14: Résultats d'une hybridation in situ pour les gènes *hoxa10b* et *hoxb13a* . L'HIS a été réalisé en trois conditions pour chaque gène : non traités, traités à l'AR et au DEAB.

La figure 14 montre que, dans le cas du gène *hoxa10b*, le traitement au DEAB a rallongé la zone d'expression vers le côté antérieur comparé aux embryons sauvages. Le traitement à l'AR provoque un effet inverse, diminuant la zone d'expression vers le côté postérieur. Pour *hoxb13a*, le traitement au DEAB n'a pas eu d'effet significatif sur l'expression du gène. Le traitement à l'AR par contre a éteint l'expression de *hoxb13a*.

Nous avons ensuite déterminé si ces deux gènes *hoxa10b* et *hoxb13a* étaient régulés par les gènes *nr6a1a/b*. Afin de déterminer l'influence *nr6a1a* et *nr6a1b*, des pontes d'embryons issues de différents croisements ont été analysées : 1) embryons provenant de croisements de poissons *nr6a1a*^{+/-}; *nr6a1b*^{-/-} (« incross »)(dans ce cas, un quart des embryons sont des doubles mutants homozygotes), 2) de croisement de doubles hétérozygotes (1/16 des embryons sont doubles homozygotes), 3) de croisement de poisson simple mutant *nr6a1a*^{+/-}, et 4) de poissons simples mutant *nr6a1b*^{+/-}. Pour le gène *hoxb13a*, ¼ des embryons issus des croisements de poisson *nr6a1a*^{+/-}; *b*^{-/-} présentaient une expression ectopique au niveau de l'extension du jaune au stade 27 hpf (voir figure 15), en plus de l'expression normal située au bout de la queue. Cette proportion est de 1/16 pour les pontes de croisement de double hétérozygote. Cette expression ectopique allant du cloaque jusque l'extension du jaune n'est pas observée dans des pontes provenant de simples mutants *nr6a1a*. Tous ce résultats indiquent donc que cette expression ectopique n'est présente que dans les embryons

doubles mutants *nr6a1a*^{-/-};*nr6a1b*^{-/-}. Ceci fut confirmé par le génotypage de ces embryons.

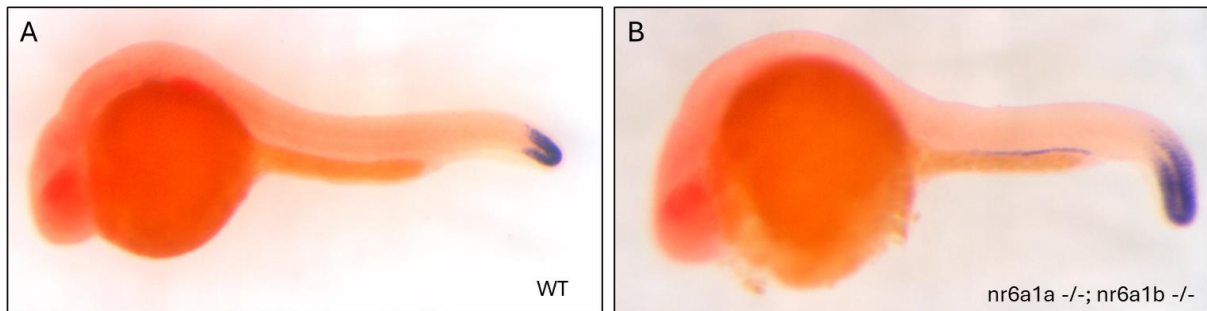


Figure 15: Résultats d'une hybridation in situ sur le gène *hoxb13a* à 30 hpf. *Hoxb13a* est détecté en noir. (A) Embryon sauvage. (B) Embryon double mutant homozygote pour *nr6a1a* et *nr6a1b*.

Concernant le gène *hoxa10b*, On remarque que ¼ des embryons provenant de croisements de poissons *nr6a1a*^{-/+};*nr6a1b*^{-/-} («ponte 1») ou provenant de croisements de poissons simples mutants *nr6a1a*^{+/-} présente un décalage antérieur de l'expression *hoxb10a* (voir figure 16B et 16D). Ce décalage d'expression n'est pas observé dans les embryons issus de croisements de poissons *nr6a1b* (voir figure 16C). Tous ces résultats indiquent que c'est la mutation homozygote de *nr6a1a* qui provoque ce rallongement antérieur de l'expression d'*hoxa10b* et que *nr6a1b* n'a pas d'influence significative. Ceci fut confirmé par le génotypage de 23 embryons. Il est important de noter que le rallongement antérieur d'expression *hoxa10b* est similaire dans les embryons sauvages traités au DEAB. Par contre, l'expression ectopique observé au-dessus de l'extension du jaune pour *hoxb13a* n'est pas observé dans les embryons traités au DEAB.

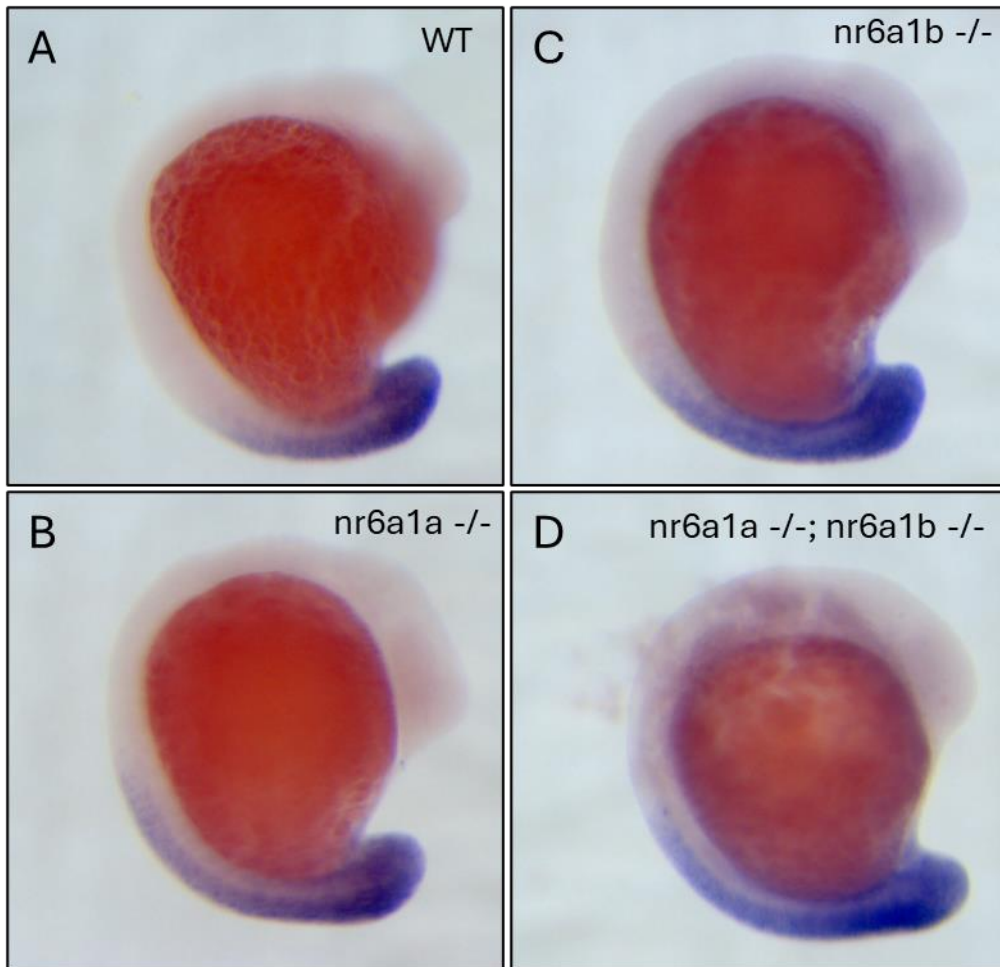


Figure 16 Résultats d'une hybridation *in situ* sur le gène *hoxa10b* au stade 15 somites. *Hoxa10b* est détecté en noir. (A) Embryon sauvage. (B) Embryon mutant homozygote pour *nr6a1a*. (C) Embryon mutant homozygote pour *nr6a1b*. (D) Embryon double mutant homozygote pour *nr6a1a* et *nr6a1b*.

4.3. Etude de l'expression de *evx1*, un gène marqueur du cloaque.

Étant donné que les mutants *nr6a1a/b* présentent également des malformations du tractus génital et du cloaque, nous avons analysé un gène impliqué dans leur formation. Le gène *evx1* a été étudié à 48 hpf (hours post fertilization) chez des embryons provenant d'une ponte de poissons doubles hétérozygotes *nr6a1a+/-;nr6a1b+/-*. De nouveau, une double hybridation *in situ* a été effectuée, où *tbx5* marque en rouge les bourgeons des nageoires pectorales.

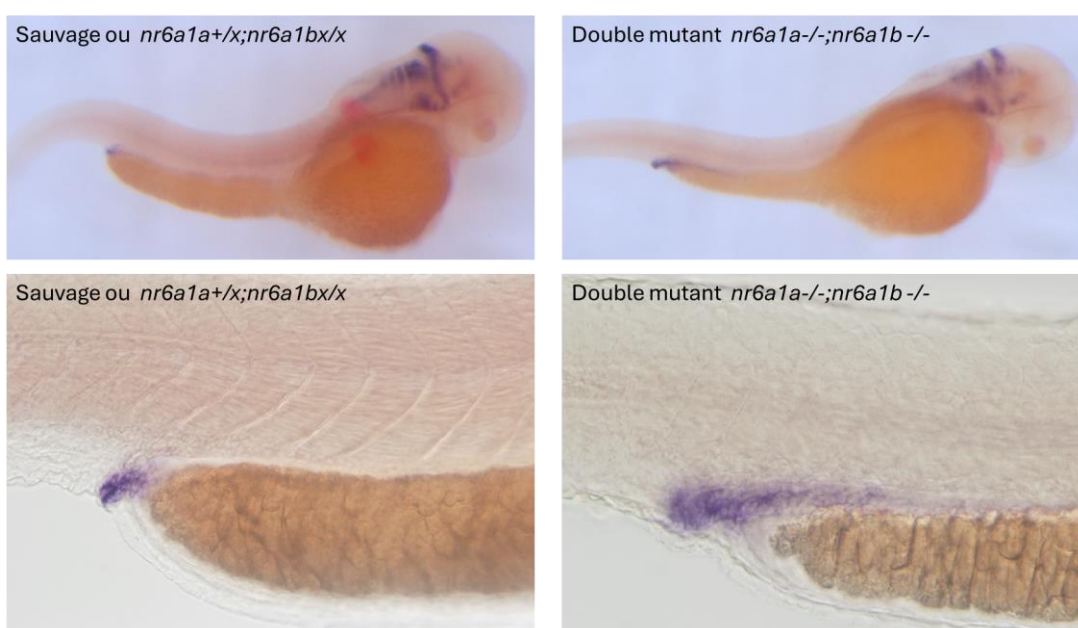


Figure 17: Résultats d'une hybridation *in situ* à 48 hpf pour le gène *evx1* qui intervient dans la formation du cloaque. Les bourgeons des nageoires pectorales sont marquées en rouge par la sonde *tbx5*. Dans les phénotypes dans cette figure, le "x" est utilisé pour représenter soit un "+" soit un "-", afin de simplifier la lecture et d'éviter de noter tous les phénotypes possibles.

La figure 17 montre que les embryons sauvages représentent une expression de *evx1* bien restreinte au niveau du cloaque. Par contre, un petit nombre d'embryons présentaient une expression plus allongée antérieurement ; le génotypage de ces embryons a révélé qu'ils correspondent à des doubles mutants (*nr6a1a-/- ; nr6a1b-/-*).

Suite à ces résultats, nous avons également réalisé des hybridations *in situ* au stade 30 hpf sur des embryons qui ont été traités au DEAB et au BMS493 . Pour cela nous avons croisé des poissons sauvages et nous avons traité une partie des

embryons issus de cette ponte au DEAB à partir de 6 hpf et une autre partie au BMS493 à partir de 10 hpf. Le BMS493 est un antagoniste des récepteurs de l'acide rétinoïque et un traitement au BMS493 permet alors d'inhiber spécifiquement l'activité des RAR et de la voie de l'acide rétinoïque.

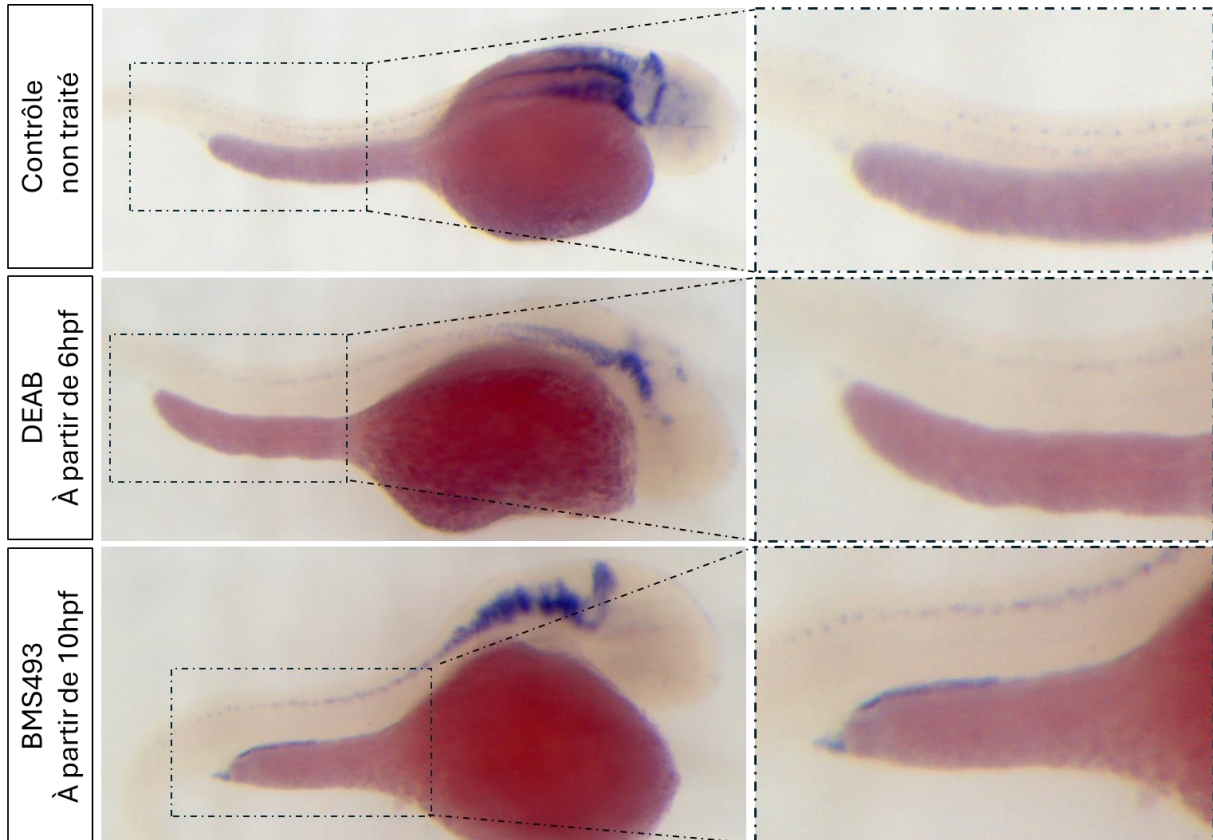


Figure 18: Résultats d'une hybridation in situ pour le gène *evx1*. L'expérience a été réalisée en trois conditions différentes : sur des embryons non traités (en haut de la figure), sur des embryons qui ont été traités au DEAB à partir de 6 hpf (au milieu) et sur des embryons qui ont été traités au BMS493 à partir de 10 hpf (en bas).

Les embryons sauvages, tout comme ceux traités au DEAB, montrent une très faible expression du gène *evx1* (figure 18). En revanche, les embryons traités avec le BMS493 présentent une expression au niveau du cloaque ainsi que juste au-dessus de l'extension du jaune.

Cette expression ectopique au-dessus de l'extension du jaune rappelle l'expression plus large observée dans les embryons *nr6a1a*^{-/-} ; *nr6a1b*^{-/-}. Il est cependant surprenant que cette expression ectopique n'est pas observée dans les embryons traités au DEAB.

4.4. Etudes des gènes impliqués dans la synthèse et dans la dégradation de l'AR

Des études réalisées précédemment chez le xénope suggéraient que le gène *nr6a1* semblait contrôler l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme de l'AR (*aldh1a2* et *cyp26a1*). Il était donc intéressant de vérifier si, chez le zebrafish, le profil d'expression des deux gènes orthologues étaient affectés dans les mutants *nr6a1a/b*. L'hybridation *in situ* de la sonde *aldh1a2* a révélé que tous les embryons provenant du croisement des poissons *nr6a1a+/-;nr6a1b-/-* présentent le même marquage au stade 15 somites (voir figure 19) indiquant que ce gène n'est pas régulé par le gène *nr6a1a*.

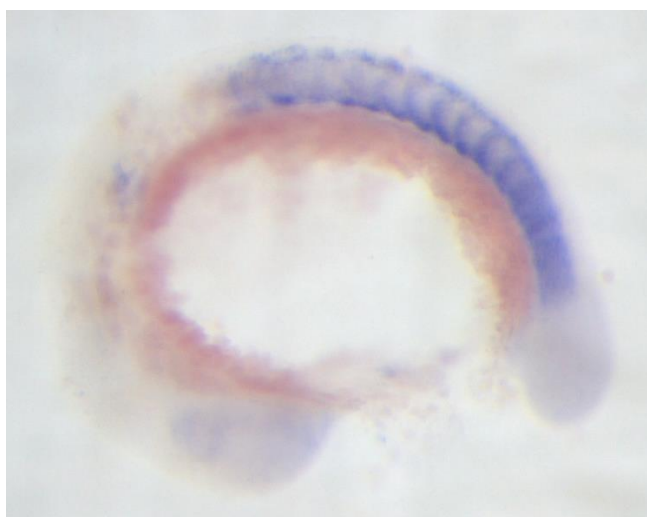


Figure 19: Résultats d'une Hybridation In Situ pour le gène *aldh1a2* au stade 15 somites.

Par contre, avec la sonde *cyp26a1*, des différences de marquage furent identifiées : environ un quart des embryons ne présentaient pas de marquage dans les somites postérieures (image A, figure 20) alors que les autres présentaient un tel marquage (image B). Les embryons de phénotype sauvage montrent une expression de *cyp26a1* localisée dans la queue (flèche verte) et les somites antérieurs (flèche noire). En revanche, le phénotype mutant *nr6a1a/b* se caractérise non seulement par une expression de *cyp26a1* dans la queue et les somites antérieurs ou plutôt moyens, mais également par une expression supplémentaire dans la rétine (flèche rouge) et les somites postérieurs.

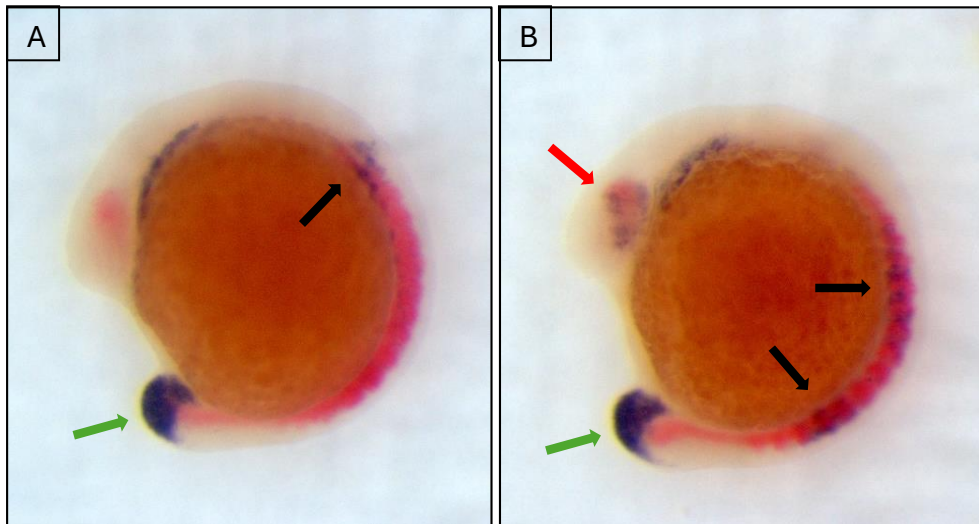


Figure 20: Résultats d'une Hybridation In Situ pour le gène *cyp26a1* au stade 15 somites. *Myod* marque les somites en rouge et *cyp26a1* est marqué en noir dans la rétine et dans les somites. **A :** Le phénotype sauvage présente une expression de *cyp26a1* dans la queue (flèche verte) et dans les somites antérieurs (flèche noire). **B :** Le phénotype mutant *nr6a1a/b* présente également une expression de *cyp26a1* dans la queue et dans les somites antérieurs/moyens, mais en plus, *cyp26a1* est exprimé dans la rétine (flèche rouge) et dans les somites postérieurs.

Le génotypage a montré que les embryons sans marquage des somites postérieures correspondent à des embryons *nr6a1a+/+* et les autres sont des homozygotes mutants *nr6a1a-/-* ou des hétérozygotes. Afin de déterminer si l'on peut discerner les mutants homozygotes mutants des hétérozygotes, nous avons réanalysé les embryons présentant un marquage dans les somites postérieures. Nous avons remarqué que certains embryons présentaient un marquage dans la rétine alors que la majorité n'en présentait pas. De plus les embryons ayant ce marquage au niveau de la rétine présentent généralement un marquage très fort dans les somites postérieures. Nous avons donc pris en photo 21 embryons et génotypé ceux-ci. Les résultats révèlent que les embryons doubles mutants (les embryons g-i sur la figure 21) présentent une forte expression de *cyp26a1* au niveau des somites postérieures (indiquée par des flèches rouges pleines) ainsi qu'au niveau de la rétine (indiquée par des flèches noires pleines). Cette augmentation d'expression est nettement supérieure comparée aux autres génotypes étudiés.

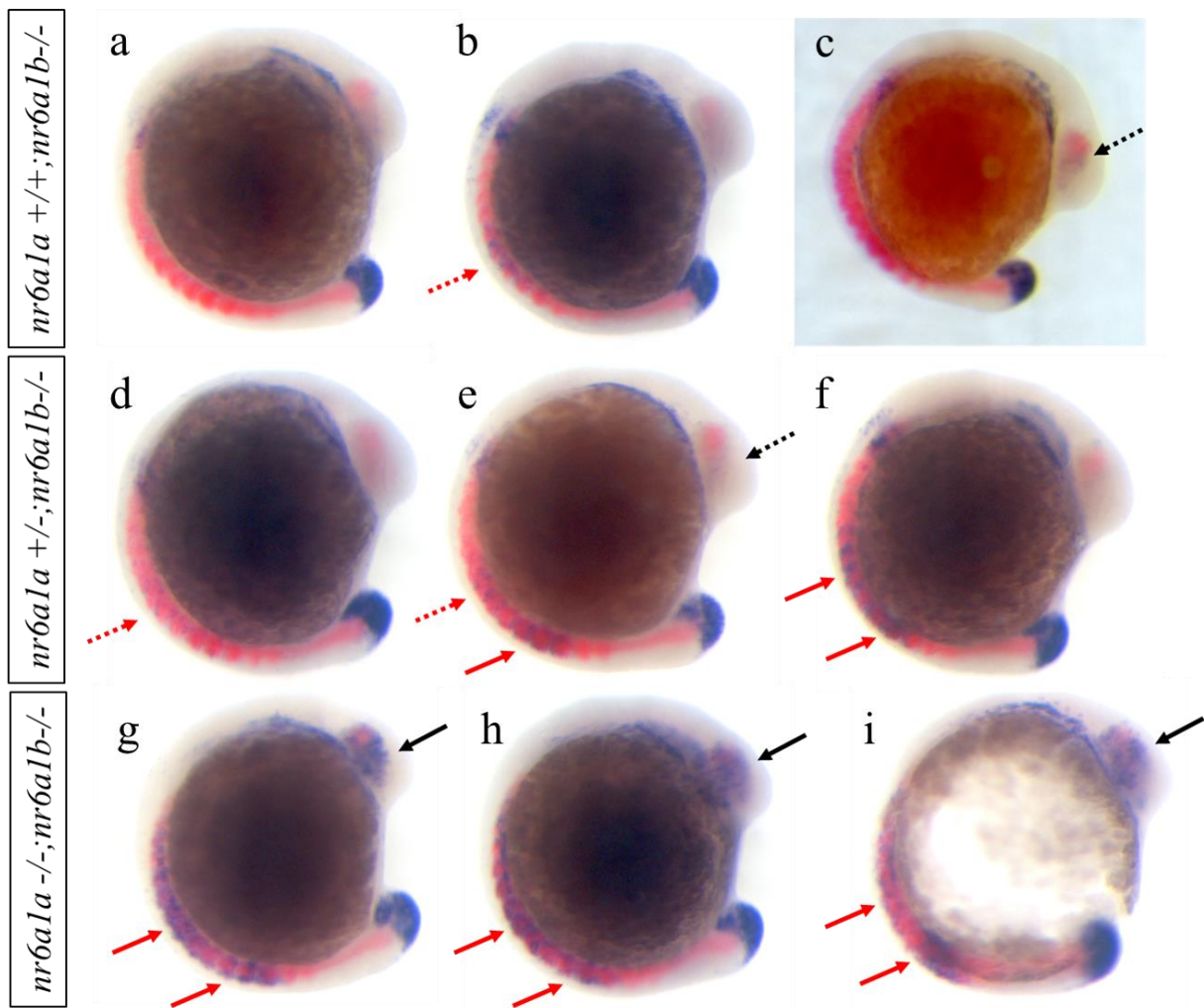


Figure 21: Résultats d'une hybridation in situ sur le gène *cyp26a1* au stade 15 somites sur différents génotypes du gène *nr6a1*. En rouge, *myoD* marque les somites et *cyp26a1* est détecté en noir dans des embryons mutants pour les deux gènes *nr6a1a* et/ou *nr6a1b*.

Les embryons présentant un génotype hétérozygote pour *nr6a1a* et homozygote mutant pour *nr6a1b* (embryons d-f) montrent également une augmentation de l'expression de *cyp26a1* dans les somites postérieures, bien que cette augmentation soit généralement moins prononcée. Sur la figure 21, elle est signalée par des flèches rouges en pointillé. L'expression dans la rétine chez ces génotypes est faible.

En contraste, les embryons mutants simples *nr6a1b-/-* (embryons a-c) n'affichent généralement pas d'expression notable de *cyp26a1* dans les somites postérieures. Toutefois, une expression faible peut occasionnellement être observée, comme c'est le cas pour l'embryon b. De même, une expression très faible est parfois détectée dans la rétine chez des embryons mutants *nr6a1b*, à l'exemple des embryons c et f.

Ces résultats indiquent que le gène *nr6a1a* joue un rôle répresseur sur l'expression de *cyp26a1* tant au niveau des somites que de la rétine. De plus, l'inactivation d'un seul allèle de *nr6a1a* suffit à induire une augmentation perceptible de l'expression de *cyp26a1*, soulignant l'importance de la dose génique de *nr6a1a* dans la régulation de ce gène cible.

Une troisième expérience d'hybridation in situ (HIS) a été réalisée pour approfondir l'étude du gène *cyp26a1*. Des poissons de phénotype sauvage ont été croisés, et les embryons résultants ont été traités avec de l'acide rétinoïque (AR) et du DEAB, puis fixés au stade des 15 somites.

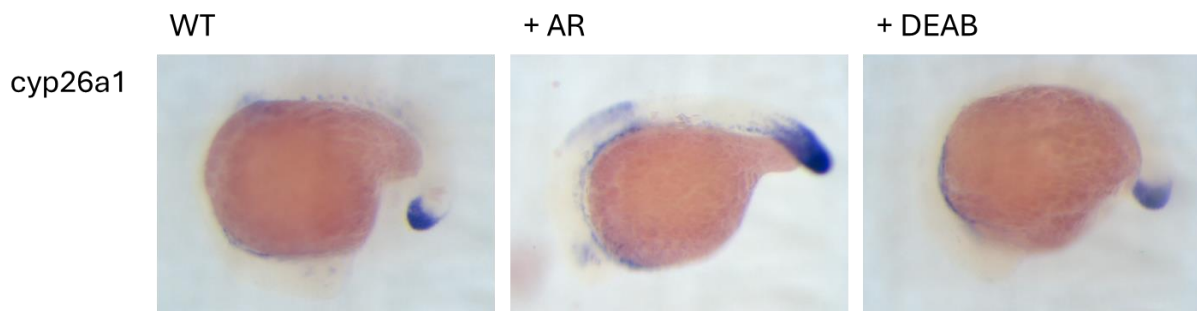


Figure 22: Résultats d'une hybridation in situ pour le gène *cyp26a1* . L'HIS a été réalisé en trois conditions : non traités, traités à l'AR et au DEAB.

Comme le montre la figure 22, les embryons traités avec de l'acide rétinoïque présentent une zone d'expression de *cyp26a1* nettement plus étendue dans la queue par rapport aux embryons sauvages. La longueur de la zone d'expression n'a pas été influencé de manière significative dans les embryons traités au DEAB.

Les résultats de cette HIS renforcent l'hypothèse que *nr6a1a* est un régulateur clé dans la voie de l'acide rétinoïque, modulant spécifiquement l'expression de *cyp26a1* en réponse à cette signalisation.

Nous avons également analysé l'expression du gène *cyp26a1* à un stade plus précoce, 10 hpf, correspondant à la fin de la gastrulation, et à 48 hpf sur des embryons provenant de croisement de poissons doubles hétérozygotes. Aucune différence de marquage n'a pu être détectée entre les embryons au stade 10hpf (voir figure 23).

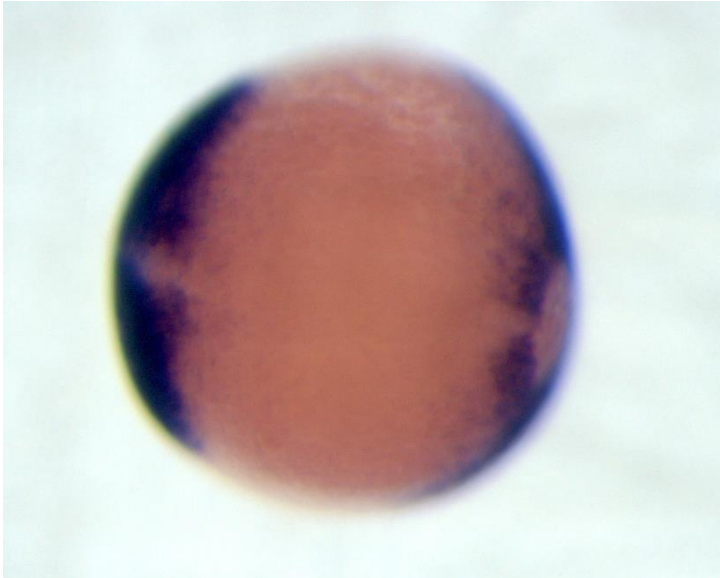


Figure 23: Résultats d'une hybridation in situ sur le gène *cyp26a1* à 10 hpf, vue dorsale. *Cyp26a1* est détecté en noir.

L'hybridation in situ à 48 hpf a été réalisée en présence de la sonde *tbx5* marquée au FITC permettant l'identification aisée des embryons doubles mutants *nr6a1a*^{-/-};*nr6a1b*^{-/-} par l'absence de marquage au niveau des nageoires pectorales. Ces embryons double mutants présentent une expression ectopique de *cyp26a1* au niveau de l'extension du jaune (flèches noires dans la figure 24C) alors que les autres embryons (présentant le marquage *tbx5* en rouge) ont une expression faible au niveau du cloaque (figure 24A). De plus, d'autres régions marquées par la sonde *cyp26a1* présentent des différences :

1) plusieurs arcs branchiaux sont marqués dans les embryons *tbx5*⁺ (flèches noires dans la figure 24B) alors que 2 arcs branchiaux sont détectés dans les embryons *tbx5*⁻ (figure 24D).

2) une région du tronc est marquée proche des nageoires pectorales dans les embryons *tbx5*⁺ (flèche bleue dans la figure 24B) alors que celle-ci n'est pas visible dans les embryons *tbx5*⁻.

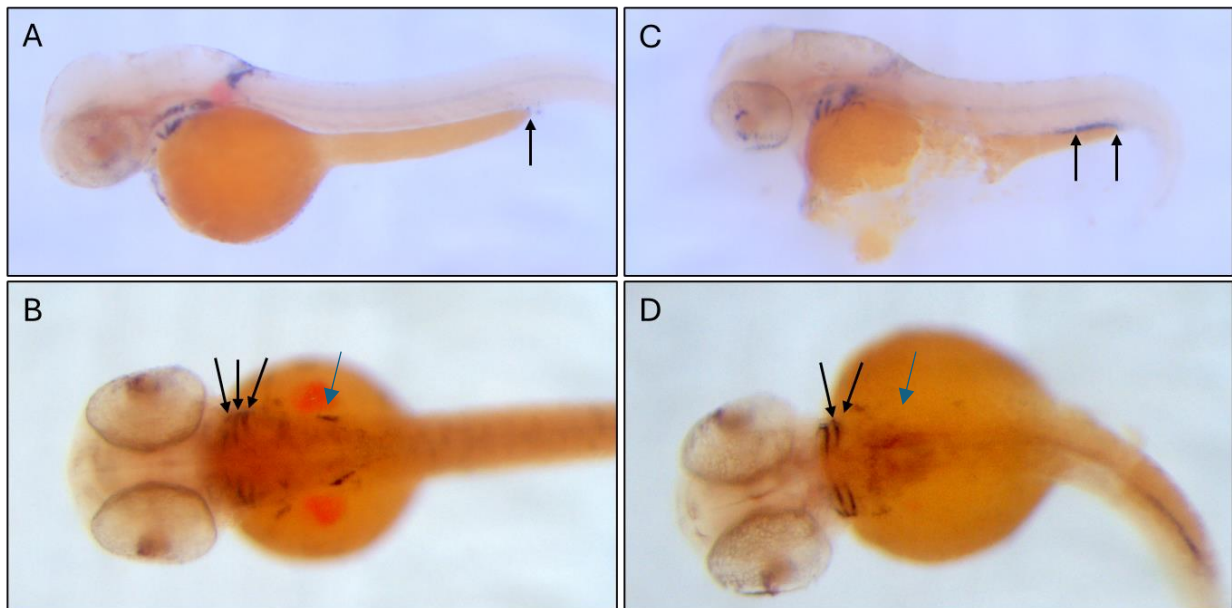


Figure 24: Résultats d'une hybridation in situ sur le gène *cyp26a1* à 48 hpf. En rouge, *tbx5* marque les bourgeons des nageoires pectorales et *cyp26a1* est détecté en noir. **(A)** Vue latérale d'un embryon sauvage. **(B)** Vue dorsale d'un embryon sauvage. **(C)** Vue latérale d'un embryon double mutant pour les deux gènes *nr6a1a* et *nr6a1b*. **(D)** Vue dorsale d'un embryon double mutant pour les deux gènes *nr6a1a* et *nr6a1b*.

Les HIS réalisés à ces deux stades distincts indiquent que *cyp26a1* est régulé par *nr6a1* dès le stade des 15 somites, et à 48 hpf. Ces résultats renforcent l'hypothèse que *nr6a1* réprime *cyp26a1*. De plus, ces résultats confirment la première expérience présentée où une diminution du nombre des arcs branchiaux dans les embryons doubles mutants *nr6a1a/b* a déjà été décrite.

Discussion

5. Discussion

Les résultats de ce travail fournissent des aperçus sur le rôle des gènes *nr6a1a* et *nr6a1b* dans le développement embryonnaire et la régulation de la voie de l'acide rétinoïque. Les observations de la première expérience montrent que les embryons mutants pour *nr6a1a* présentent une réduction progressive du nombre d'arcs branchiaux, avec les mutants simples ayant quatre arcs et les doubles mutants ayant trois arcs, comparés aux cinq arcs observés dans les embryons sauvages. Ce phénotype des mutants *nr6a1a/b* rappelle celui des mutants *neckless* et *nofin*, connus pour des altérations similaires dans le nombre d'arcs branchiaux, renforçant ainsi l'hypothèse que *nr6a1a* et *nr6a1b* sont impliqués dans des mécanismes de régulation affectant la voie de l'AR. Les différences au niveau des arcs branchiaux sont également visibles dans l'analyse de l'expression de *cyp26a1* à 48 hpf, ce gène étant exprimé dans les arcs branchiaux. On remarque en effet que le nombre d'arcs est restreint dans les embryons doubles mutants homozygotes. Les gènes *nr6a1a/b* pourraient donc être des médiateurs de la voie de signalisation AR dans la formation des arcs branchiaux.

L'analyse de l'expression des gènes impliqués dans la formation du pronéphros a révélé que 5 gènes (*evi*, *gata3*, *irx3b*, *sim1a* et *wt1a*) sont régulés dans le mésoderme intermédiaire par l'AR au stade 15 somites. Parmi ceux-ci, seul le gène *irx3b* est régulé par *nr6a1a*. Ces résultats suggèrent donc que, au niveau du mésoderme intermédiaire, *nr6a1a* n'agit pas comme un médiateur majeur de l'AR. Les facteurs RAR agissent donc sur une panoplie de gènes de manière indépendante de *nr6a1a*.

Concernant la régulation de *irx3b*, il serait intéressant de déterminer si ce gène est régulé seulement par *nr6a1a* en analysant une ponte de simple mutant *nr6a1a*. En effet, parmi les gènes affectés dans les mutants *nr6a1a/b*, certains ne sont régulés que par *nr6a1a*, comme par exemple le gène *hoxa10b* ; d'autres, comme *hoxb13a*, sont régulés par les deux gènes de manière redondante, l'expression de ceux-ci étant anormale que dans les doubles mutants. Le gène *evx1* semble être régulé de manière redondante car seulement les doubles mutants présentent une expression ectopique de ce gène. Nous avons remarqué qu'une expression ectopique similaire peut être provoqué par un traitement des embryons sauvages avec la drogue BMS493, antagonistes des récepteur

RAR, lorsque celle-ci est administrée à partir de 10hpf. Il est donc possible que *nr6a1a/b* soient des médiateurs de l'AR pour ce gène. Par contre, le blocage de la synthèse d'AR par traitement DEAB à partir de la gastrulation (5.5hpf) ne reproduit pas cet effet. Le « timing » des traitements semble donc important pour déterminer si un gène est régulé par l'AR. D'autres traitements devront donc être réalisés pour tenter de comprendre ces observations.

Enfin, l'étude de l'expression de *cyp26a1* montre que *nr6a1a* réprime l'expression de *cyp26a1* au niveau des somites et de la rétine. La découverte que *nr6a1* réprime l'expression de *cyp26a1*, alors que *cyp26a1* dégrade l'AR qui active *nr6a1*, met en évidence une boucle de rétroaction potentielle entre ces deux gènes. Cette régulation mutuelle pourrait jouer un rôle crucial dans le maintien de l'équilibre entre la signalisation de l'acide rétinoïque et la régulation des processus de développement.

Le(s) gène(s) *nr6a1a/b* pourraient donc être nécessaire pour maintenir des concentrations d'AR dans des régions de l'embryon. Dans les mutants *nr6a1a/b*, l'AR pourrait être dégradé, du moins après la gastrulation. Ceci pourrait éventuellement expliquer les ressemblances de phénotype avec les mutants *nls/nof*, affecté dans la synthèse d'AR. Cette hypothèse pourrait éventuellement être testée en ajoutant de l'AR exogène sur des embryons mutants *nr6a1a/b* après la gastrulation afin de déterminer si cela pourrait compléter les anomalies. Les doses d'AR ajoutées ne devront cependant pas être trop excessives pour ne pas affecter le développement.

Si l'action principale de *nr6a1a/b* est de maintenir des concentrations d'AR dans l'embryon, comment expliquer que seulement *irx3b* est affecté dans les mutants *nr6a1a/b* et pas les autres gènes qui sont régulés par la voie AR ? Ceci pourrait être dû au stade à partir duquel *cyp26a1* est régulé par *nr6a1a*. En effet, ce contrôle commence bien après la gastrulation, durant la somitogenèse. Le gène *irx3b* pourrait être régulé plus tardivement que les autres gènes.

En conclusion, notre travail a mis en évidence une régulation du gène *cyp26a1* qui pourrait expliquer les ressemblances de phénotypes des doubles mutants *nr6a1a/b* avec les mutants affectés dans la voie de l'AR. Des expériences futures seront nécessaires pour déterminer si l'action principale de *nr6a1a/b* est de maintenir les doses d'AR dans l'embryon.

6. Bibliographie

- [1] « Rare diseases - European Commission ». Consulté le: 13 mai 2024. [En ligne]. Disponible sur: https://health.ec.europa.eu/european-reference-networks/rare-diseases_en
- [2] J. Zhang, C. Zhang, E. Gao, et Q. Zhou, « Next-Generation Sequencing-Based Genetic Diagnostic Strategies of Inherited Kidney Diseases », *Kidney Dis.*, vol. 7, n° 6, p. 425-437, 2021, doi: 10.1159/000519095.
- [3] R. K. Miller, Éd., *Kidney Development and Disease*, vol. 60. in Results and Problems in Cell Differentiation, vol. 60. Cham: Springer International Publishing, 2017. doi: 10.1007/978-3-319-51436-9.
- [4] M. Dohet, « Etude du rôle des gènes nr6a1a et nr6a1b dans le développement du zebrafish », Université de Liège, Liège, 2023.
- [5] G. F. Gerlach et R. A. Wingert, « Kidney organogenesis in the zebrafish: insights into vertebrate nephrogenesis and regeneration », *WIREs Dev. Biol.*, vol. 2, n° 5, p. 559-585, sept. 2013, doi: 10.1002/wdev.92.
- [6] J. Li, P. Mascarinas, et E. McGlenn, « The expanding roles of Nr6a1 in development and evolution », *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 12, p. 1357968, févr. 2024, doi: 10.3389/fcell.2024.1357968.
- [7] E. Samarut, D. Fraher, V. Laudet, et Y. Gibert, « ZebRA: An overview of retinoic acid signaling during zebrafish development », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.*, vol. 1849, n° 2, p. 73-83, févr. 2015, doi: 10.1016/j.bbagr.2014.05.030.
- [8] Z. H. Yan, A. Medvedev, T. Hirose, H. Gotoh, et A. M. Jetten, « Characterization of the Response Element and DNA Binding Properties of the Nuclear Orphan Receptor Germ Cell Nuclear Factor/Retinoid Receptor-related Testis-associated Receptor », *J. Biol. Chem.*, vol. 272, n° 16, p. 10565-10572, avr. 1997, doi: 10.1074/jbc.272.16.10565.
- [9] Y.-C. Chang *et al.*, « Nr6a1 controls Hox expression dynamics and is a master regulator of vertebrate trunk development », *Nat. Commun.*, vol. 13, n° 1, p. 7766, déc. 2022, doi: 10.1038/s41467-022-35303-4.
- [10] C. N. Cheng et R. A. Wingert, « Nephron proximal tubule patterning and corpuscles of Stannius formation are regulated by the sim1a transcription factor and retinoic

- acid in zebrafish », *Dev. Biol.*, vol. 399, n° 1, p. 100-116, mars 2015, doi: 10.1016/j.ydbio.2014.12.020.
- [11] R. A. Wingert et A. J. Davidson, « Zebrafish nephrogenesis involves dynamic spatiotemporal expression changes in renal progenitors and essential signals from retinoic acid and *irx3b* », *Dev. Dyn.*, vol. 240, n° 8, p. 2011-2027, août 2011, doi: 10.1002/dvdy.22691.
- [12] D. M. Wellik, P. J. Hawkes, et M. R. Capecchi, « Hox11 paralogous genes are essential for metanephric kidney induction », *Genes Dev.*, vol. 16, n° 11, p. 1423-1432, juin 2002, doi: 10.1101/gad.993302.
- [13] K. A. Drake, M. Adam, R. Mahoney, et S. S. Potter, « Disruption of Hox9,10,11 function results in cellular level lineage infidelity in the kidney », *Sci. Rep.*, vol. 8, n° 1, p. 6306, avr. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-24782-5.
- [14] G. Begemann, T. F. Schilling, G.-J. Rauch, R. Geisler, et P. W. Ingham, « The zebrafish *neckless* mutation reveals a requirement for *raldh2* in mesodermal signals that pattern the hindbrain », *Development*, vol. 128, n° 16, p. 3081-3094, août 2001, doi: 10.1242/dev.128.16.3081.
- [15] H. Grandel *et al.*, « Retinoic acid signalling in the zebrafish embryo is necessary during pre-segmentation stages to pattern the anterior-posterior axis of the CNS and to induce a pectoral fin bud », *Development*, vol. 129, n° 12, p. 2851-2865, juin 2002, doi: 10.1242/dev.129.12.2851.
- [16] B. Thisse, « Thisse Lab - In Situ Hybridization Protocol - 2010 update - Protocols - Confluence ». Consulté le: 22 juillet 2024. [En ligne]. Disponible sur: <https://zfin.atlassian.net/wiki/spaces/prot/pages/369265015/Thisse+Lab+-+In+Situ+Hybridization+Protocol+-+2010+update>

Mémoire présenté par : KOCH Luca

Promoteur : Dr. PEERS Bernard

Laboratoire : *Zebrafish Development & Disease Models* (ZDDM)

Année académique : 2023-2024

Etude du rôle des facteurs *nr6a1a* et *nr6a1b* dans le développement embryonnaire du poisson zèbre

Le laboratoire *Zebrafish Development & Disease Models* (ZDDM) collabore avec le service de génétique humaine et vise à identifier des variants génétiques potentiellement pathogènes chez des patients souffrant de malformations rénales. Dans ce cadre, des mutations dans le gène *nr6a1* ont été découvertes par séquençage de l'exome entier chez deux familles. Pour évaluer la responsabilité de ce gène dans les malformations rénales, les gènes orthologues *nr6a1a* et *nr6a1b* ont été inactivés chez le poisson-zèbre par la technique CRISPR/Cas9.

Ce travail a comme objectif de comparer les effets de l'acide rétinoïque et des mutations des gènes *nr6a1a* et *nr6a1b* chez le zebrafish pour déterminer si ces gènes agissent comme médiateurs du signal de l'acide rétinoïque. Pour cela, des techniques d'hybridation in situ ont été utilisées pour visualiser l'expression de plusieurs gènes dans les mutants *nr6a1a/b* et sur des embryons traités par le DEAB. L'étude analyse également si les arcs branchiaux sont affectés chez les mutants *nr6a1a/b* comme c'est le cas dans les embryons dépourvus d'acide rétinoïque.

Cette étude montre qu'une partie des gènes régulés par l'AR, est également sous le contrôle de *nr6a1*, c'est notamment le cas pour le gène *irx3b*. De même, *evx1*, un marqueur du cloaque, est régulé de manière redondante par *nr6a1a/b* et par l'AR. En outre, la régulation de *cyp26a1* par *nr6a1a* révèle une potentielle boucle de rétroaction, où *nr6a1* réprime *cyp26a1*, qui à son tour dégrade l'AR, impliquant ces gènes dans le maintien des concentrations d'AR dans l'embryon. Cette régulation pourrait expliquer les similitudes phénotypiques entre les mutants *nr6a1a/b* et les mutants affectés dans la synthèse de l'AR. *Nr6a1a/b* pourraient être essentiels pour maintenir les concentrations d'AR dans l'embryon. Des expériences futures seront nécessaires pour confirmer cette hypothèse et pour mieux comprendre le rôle précis de *nr6a1a/b* dans la régulation de l'AR.