



HAL
open science

Rôle du monoxyde d'azote dans le développement tumoral chez le poisson zèbre. Rôle de HSF1 dans le développement chez le poisson zèbre en absence de choc thermique

Nadhir Yousfi

► To cite this version:

Nadhir Yousfi. Rôle du monoxyde d'azote dans le développement tumoral chez le poisson zèbre. Rôle de HSF1 dans le développement chez le poisson zèbre en absence de choc thermique. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2014. Français. NNT : 2014DIJOS085 . tel-01487011

HAL Id: tel-01487011

<https://theses.hal.science/tel-01487011>

Submitted on 10 Mar 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE DE BOURGOGNE
ECOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENT SANTE**

THESE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Bourgogne

Discipline : Biologie moléculaire et cellulaire

Présentée et soutenue par :

Nadhir YOUSFI

Le 16 Décembre 2014

Rôle du monoxyde d'azote dans le développement tumoral chez le poisson zèbre

Rôle de HSF1 dans le développement chez le poisson zèbre en absence de choc thermique

Directrice de thèse :
Johanna CHLUBA

Membres du jury

Pr. Johanna CHLUBA
Pr. Sophie VRIZ
Pr. Elisabeth CHRISTIANS
Dr. Ali BETTAIEB
Dr. Caroline LOUIS
Pr. Michel NARCE

Directrice de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Président du jury



Remerciements :

Je tiens tout d'abord à exprimer ma gratitude aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail :

Je remercie le Pr. Elisabeth CHRISTIANS et le Pr. Sophie VRIZ pour avoir accepté d'analyser mon travail en tant que rapporteurs, et le Dr. Ali Bettaieb et le Dr. Caroline LOUIS en tant qu'examineurs.

Je souhaite remercier le Dr Laurent LAGROST, pour m'avoir offert la possibilité de réaliser ma thèse au sein de l'unité Inserm U866.

Je tiens à remercier chaleureusement ma directrice de thèse le Pr. Johanna CHLUBA pour avoir dirigé mes travaux de thèse, de m'avoir aidé et soutenu avec beaucoup de gentillesse.

Je remercie également le Dr. Carmen GARRIDO pour m'avoir accueilli dans son équipe, et d'avoir porté beaucoup d'intérêt pour le modèle Poisson zèbre.

Je souhaite aussi remercier : Véronique LAURENS, Françoise SALVADORY, Tatiana LOPEZ, Anita RACZ, Omar ZOUNIB, André BOUCHOT, Benoit GASQUET, Arlette HAMMANN, et Catherine PAUL, ainsi que les équipes GARRIDO et EPHE.

Je tiens à remercier le Conseil Régional de Bourgogne pour le financement apporté à mon travail de thèse (N° de convention : 2010-9201AAO46S4790) au titre du FEDER dans le

cadre de l'opération Jeunes Chercheurs Entrepreneurs, au (dossier référencé n°34324), ainsi qu'à La Ligue contre le cancer pour avoir financé ma quatrième année de thèse.

Pour finir, je voudrais dire un Grand Merci à mes chers parents pour leur amour, encouragements, et prières qui ont traversé la méditerranée depuis l'Algérie tout au long de ces années. A mes frères et sœurs : Nawel, Ghouti, Abdelkrim, Wassila et Nesrine qui m'ont toujours apporté leurs soutiens de près ou de loin. A khalti pour son amour et à Tonton Sid-Ahmed pour ses aides inestimables. A mes onze neveux et nièces : Kamila, Noureddine, Ines, Rizlène, Abdelkrim, Abderahmane, Yousra, Sirine, Djawed, Sarah et Lina qui ont été une bouffée d'oxygène durant cette période et une joie de vivre. A mes amis qui m'ont écoutés et réconfortés : Hayyan, Roza, Ibrahim, Maawia, Imen, Nawel, Chiraz, Hassiba, Alexis, Sarah, Christian, Sabrina, Lucile, et Laetitia.

Et pour finir, une grande pensée à ma grand-mère à qui je dois TOUT.

Sommaire :

Liste des abréviations :.....	6
Listes des figures :	8
Liste des tableaux :	8
Introduction bibliographique générale.....	9
I. Le poisson zèbre : un organisme modèle.....	9
II. Les principales étapes du développement du poisson zèbre.....	11
1) La période « zygote » :	11
2) La période de division :.....	11
3) La période de blastula :	11
4) La période de gastrulation :.....	12
5) La période de segmentation :.....	12
6) La période pharyngienne :.....	13
7) La période d'éclosion :.....	13
8) La période larvaire précoce :.....	13
III. Le poisson zèbre comme modèle génétique.....	16
1) Le génome du poisson zèbre.....	16
2) Génétique fonctionnelle chez le poisson zèbre	18
a. La mutagenèse chimique aléatoire	19
b. La mutagenèse insertionnelle aléatoire.....	19
c. Le tilling (Targeting Induced Local Lesion In Genomes)	20
d. La mutagenèse grâce aux TALEs Nucléases.....	20
e. Le système CRISPR/cas 9	21
f. La transgénèse.....	22
g. L'invalidation transitoire grâce aux morpholinos.....	24
Chapitre 1 : Rôle du monoxyde d'azote dans le développement tumoral chez le poisson zèbre. 27	
I. Introduction :.....	27
1) Le poisson zèbre comme modèle de cancer	27
a. Modèles par mutagenèse.....	28
b. Modèles par transgénèse	29
- Modèles de cancers solides :.....	29
- Modèles de leucémies.....	30
c. Modèle par xénogreffe.....	31
2) Le Monoxyde d'azote et le développement tumoral.....	33
a. Les NOS de mammifères :	33
b. Les NOS chez le poisson zèbre	34

c.	Détection du NO.....	35
d.	Implication du monoxyde d'azote dans le développement tumoral.....	35
II.	Résultats :.....	37
III.	Conclusion et perspectives.....	68
Chapitre 2 : Rôle de HSF1 dans le développement chez le poisson zèbre en absence de stress ..		70
I.	Les protéines de la réponse aux chocs thermiques	70
1)	Les Heat Shocks Factors :	70
a.	Structure des HSFs :.....	73
b.	Régulation de HSF1 :.....	76
c.	Interaction fonctionnelle entre les différents HSFs :	79
2)	Les protéines de choc thermique.....	79
a.	Les petites HSP (sHSP) :	79
-	HSP27 :.....	80
b.	Les autres HSPs :.....	81
-	HSP70:	81
-	HSP90.....	82
-	HSP110.....	83
c.	Les protéines de la réponse au choc thermique chez le poisson zèbre :.....	84
-	HSFs :	84
-	HSP70 :.....	85
-	HSP27 :.....	85
II.	Le poisson zèbre comme modèle hématopoïétique.....	85
1)	Hématopoïèse primitive :	87
2)	Hématopoïèse définitive :	90
3)	Les cellules souches hématopoïétiques	91
4)	Les mutants zebrafish comme modèles de maladies humaines du sang.....	93
a.	Les mutants Bloodless (exsangues):.....	95
b.	Les mutants avec une anémie modérée :	97
c.	Mutants hypochromiques :	98
d.	Les mutants photosensibles :	99
III.	Les protéines de la réponse aux stress et l'hématopoïèse	99
1)	HSP70 comme régulateur de l'érythropoïèse :	99
2)	Hsp27 régulateur de la protéine Gata1 durant l'érythropoïèse	100
3)	HSF1 contrôle la différenciation des macrophages.....	100
IV.	Résultats :.....	101
1)	L'inactivation de Hsf1 mime un phénotype d'anémie modérée.....	102
2)	Hsf1 est impliqué dans la différenciation des érythrocytes.....	103

3) Le rôle de Hsp70 et sa localisation cellulaire dans l'érythropoïèse	105
4) Rôle de HSF1 dans le développement chez le poisson zèbre en absence de choc thermique.....	108
V. Discussion	146
VI. Conclusions et perspectives :	149
Bibliographie :.....	151

Liste des abréviations :

ABD : *ATP Binding Domain*
ADN : Acide Désoxyribonucléique
AGM : Aorta-Gonado-Mesonphros
ARN: Acide Ribonucléique
ARNm : Acide Ribonucléique messenger

CFP : *Cyan Fluorescent Protein*
CPTIO: 2-(4-Carboxyphenyl)-4, 4, 5, 5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide
CRISPR: *Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats/CRISPR-associated*
CSH: Cellules Souches Hématopoïétiques
CVS: Couche Vitelline Syncytiale

DAF: DiAminoFluorescéine
DAF-FM: 4-amino-5-methylamino-2'-7'-difluorescéine
DAF-FM-DA: 4-amino-5-methylamino-2'-7'-difluorescéine diacétate
DAR: DiAmino Rhodamine
DBD: *DNA Binding Domain*
DA : Domaine d'activation
DR : Domaine de régulation
DsRed: *Discosoma sp. Red Fluorescent Protein*

EGFP: *Enhanced Green Fluorescent Protein*
ENU: EthylNitrosoUrée
EPO: Erythropoïétine

FACS: Fluorescence-Activated Cell Sorting

GFP: *Green Fluorescent Protein*
HSE: *Heat Shock Elements*
HSF: *Heat Shock Factor*
HSP: *Heat shock Protein*
Hpf : Heures post fécondation
Hpi : heures post injection

ISP : Ilots Sanguins Postérieurs

Jpf : jours post-fécondation
Jpi : jours post-injections
MBT : Transition Mid-Blastuléenne
MCI : Masse Cellulaire Intermédiaire
MLA : Mésoderme Latéral Antérieur
MLP : Mésoderme Latéral Postérieur

NO : *Nitric Oxide*
NOS : *Nitric Oxyde Synthase*

PBD : *Protein Binding Domain*

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PLC : Progéniteurs Lymphoïde Commun

PMC : Progéniteurs Myéloïde Commun

PME : Progéniteurs Mégacaryocytes/Erythroïdes

PMG : Progéniteurs Monocyto-Granulocytaire

TALs : *Transcription Activators Like Effectors*

THC : Tissu Hématopoïétique Caudal

TILLING: *Targeting Induced Local Lesions In Genomes*

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*

Vascular Endothelial Growth Factor

YFP: *Yellow Fluorescent Protein*

Listes des figures :

Figure 1 : Femelle et mâle de poissons zèbres adultes	9
Figure 2 : Classification simplifiée du poisson zèbre	10
Figure 3 : Les principales étapes du développement du poisson zèbre.....	15
Figure 4 : La duplication de gènes à l'origine des Téléostéens	18
Figure 5 : Visualisation d'érythrocytes chez un embryon Tg(<i>Gata1</i> :DsRed) à 30 hpf.....	23
Figure 6 : Modes d'action des deux types de morpholinos	25
Figure 7 : Représentation schématique de xénogreffe chez l'embryon du poisson zèbre	32
Figure 8 : Mécanisme d'action du NO sur les cellules tumorales	36
Figure 9 : Les inducteurs de la réponse au choc thermique	71
Figure 10 : La machinerie des Heat Shock Factors chez les mammifères.	73
Figure 11 : Structure des HSFs chez l'homme, la souris et le poisson zèbre.....	74
Figure 12 : Structure de HSF1 α et de HSF2 α	75
Figure 13 : Cycle d'activation et d'inhibition de HSF1.....	76
Figure 14 : Les modifications post-traductionnelles de HSF1	78
Figure 15 : Structure de HSP27.....	81
Figure 16 : Structure de HSP70.....	81
Figure 17 : Structure de HSP90.....	83
Figure 18 : Morphologie des cellules sanguines matures chez l'homme et le poisson zèbre (Davidson and Zon, 2004).....	86
Figure 19 : Mise en place de l'hématopoïèse chez le poisson zèbre et la souris.....	89
Figure 20 : Différenciation des cellules hématopoïétiques chez le poisson zèbre	92
Figure 21 : Marquage <i>o</i> -dianisidine de l'hémoglobine des mutants.....	96
Figure 22 : Evaluation de l'inactivation de Hsf1 et marquage <i>o</i> -dianisidine des globules rouges des embryons à 48hpf.....	102
Figure 23: Baisse d'érythrocytes circulants dans les morphants hsf1-MO	103
Figure 24: Rôle de HSF1 dans la différenciation des globules rouges.....	104
Figure 25 : Baisse des globules rouges chez les morphants <i>hsp70</i> -MO.....	105
Figure 26 : Modèle de la protection de GATA-1 du clivage par la caspase-3 par Hsp70 au cours de la différenciation érythroblastique	106
Figure 27 : Rôle de Hikeshi dans l'érythropoïèse chez le poisson zèbre.....	107

Liste des tableaux :

Tableau 1: Avantages et limites du poisson zèbre comme modèle de cancer	28
Tableau 2 : Avantages et inconvénients de l'utilisation du poisson zèbre comme modèle de xénogreffe.	33
Tableau 3 : Mutants érythropoïétiques de poissons zèbres et maladies humaines associées.....	94

Introduction bibliographique générale

I. Le poisson zèbre : un organisme modèle

Le poisson zèbre (*Danio rerio*) est un poisson d'eau douce qui mesure à l'âge adulte 2 à 5 cm de long, présentant des bandes horizontales bleues et argentées (Figure 1). Originaire de l'Inde et de la péninsule Malaise, il habite les eaux tropicales telles que les rizières, les eaux stagnantes et les petits cours d'eau de lent débit.



Figure 1 : Femelle et mâle de poissons zèbres adultes

Le poisson zèbre mâle possède des rayures horizontales tirant sur le jaune alors que celles des femelles sont plutôt blanchâtres. Les femelles ont un abdomen plus gonflé que les mâles.

Les poissons représentent un ensemble paraphylétique, c'est-à-dire phylogénétiquement non homogène. Il comporte trois groupes : les chondrichthyens (ou poissons cartilagineux), les ostéichthyens (ou poissons osseux) et divers poissons sans mâchoires (agnathes). Le poisson zèbre est un ostéichthyen appartenant à la classe des téléostéens (Figure 2).

Il est devenu un modèle en biologie du développement à partir des années 1930, avec des études portant sur la formation du pronephros ; organe primitif du rein (Goodrich, 1930), mais ce n'est que dans les années 1980s avec la publication de George Streisinger sur la production de clones homozygotes du poisson zèbre (Streisinger et al., 1981) que l'utilisation de ce modèle s'est étendue à de nombreux autres domaines tels que la génomique, la génétique, l'hématopoïèse, et la modélisation de pathologies humaines.

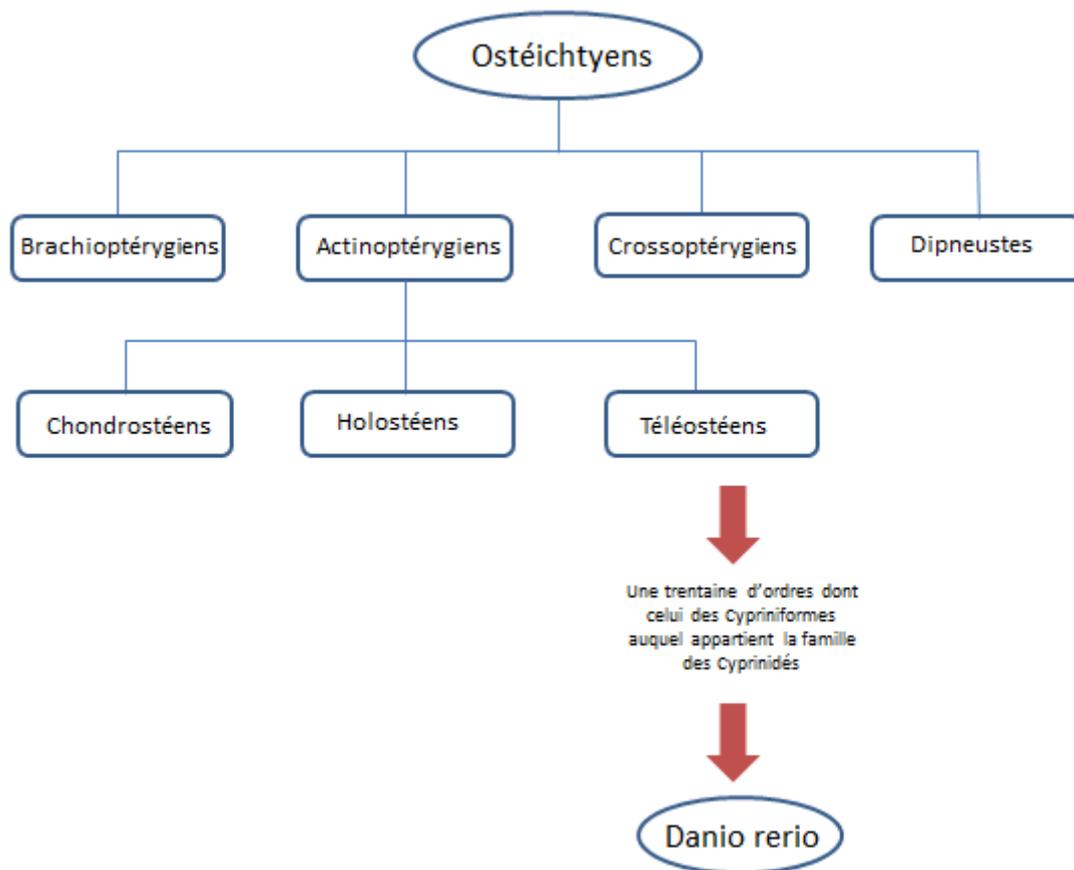


Figure 2 : Classification simplifiée du poisson zèbre

Les ostéichthyens possèdent un squelette interne osseux. Les actinoptérygiens sont des poissons aux nageoires rayonnantes. La plupart des poissons actuels se rangent dans les actinoptérygiens qui se divisent en 3 classes dont celle des Téléostéens. Les Téléostéens regroupent plus de 20000 espèces parmi lesquelles le poisson zèbre, (*Danio rerio*), de l'ordre des Cypriniformes et de la famille des Cyprinidés.

Le poisson zèbre présente de nombreux avantages qui lui permettent d'être un modèle de choix parmi les organismes modèles. Tout d'abord, le poisson zèbre est un vertébré et possède par conséquent un programme génétique plus proche de celui de l'Homme que des modèles invertébrés comme la drosophile *Drosophila melanogaster* ou le nématode *Caenorhabditis elegans*. Ensuite, son élevage est aisé et économique : par sa petite taille, le poisson zèbre peut être élevé en grand nombre dans un volume d'eau et un espace restreint. Dans des conditions optimales, une femelle peut pondre jusqu'à 200 œufs par semaine. Le poisson zèbre a également un développement très rapide : l'embryogénèse dure 24 heures et l'organogénèse est entièrement achevée après 5 jours de développement. Enfin, le développement des embryons *ex-vivo* et l'exceptionnelle transparence des œufs et des larves, favorisent la manipulation des embryons, mais surtout la visualisation de la

formation et de la fonction des organes internes dans un organisme vivant. Ceci permet aussi une observation plus aisée avec l'utilisation de gènes rapporteurs ou de marqueurs fluorescents.

II. Les principales étapes du développement du poisson zèbre

Le développement embryon-larvaire du poisson zèbre est très rapide. Il est divisé en huit périodes fondamentales constituées chacune de plusieurs stades (Kimmel et al., 1995).

1) La période « zygote » :

La période « zygote » commence après la fécondation ($t=0h$). L'œuf est alors composé d'une cellule unique et d'une zone de réserve, le vitellus. Il est entouré d'une membrane protectrice appelée le chorion. Les mouvements cytoplasmiques sont activés et le cytoplasme migre vers le pôle animal (Figure 3A)

2) La période de division :

La période de division commence $\frac{3}{4}$ d'heure après la fécondation. Après la première mitose, l'embryon est formé de deux cellules appelées blastomères. Les blastomères se divisent ensuite de façon synchrone toutes les 15 minutes et communiquent avec le vitellus par des ponts cytoplasmiques (Figure 3B).

3) La période de blastula :

La période de blastula commence par le stade 128 cellules à $t=2h15$. Le blastoderme forme alors un dôme sur le sac vitellin. Cette période est marquée par deux événements importants : la formation de la couche vitelline syncytiale (CVS) et la transition mid-blastuléenne (MBT). La couche vitelline syncytiale est formée suite à la fusion des cellules se trouvant à la frontière entre l'embryon et le vitellus. Cette couche forme dans un premier temps un anneau à la base du blastoderme puis elle s'enfonce sous ce dernier pour donner naissance à la couche vitelline syncytiale interne (CVSi). Celle-ci persiste durant tout le développement entre les cellules embryonnaires et les cellules vitellines, suggérant un rôle nutritif. La transition mid-blastuléenne intervient entre les stades 512 et 1024 cellules et

correspond au début de l'expression zygotique. Jusqu'à cet évènement, des molécules maternelles déposées dans le vitellus au moment de l'ovogénèse, assurent le métabolisme et la signalisation cellulaire. La blastula change de forme après le stade 1024 cellules ; elle s'allonge, l'axe pôle animal- pôle végétal se raccourcit, puis elle retrouve finalement une forme sphérique. A partir de ce stade sphère, le blastoderme commence à recouvrir le vitellus par des mouvements d'épibolie. La période de blastula se termine au stade 30% épibolie (le pourcentage d'épibolie représente la fraction du sac vitellin recouverte par le blastoderme).

4) La période de gastrulation :

Le stade 50% épibolie correspond au début de la période de gastrulation (t=5h15). Cette période est marquée par des mouvements morphogénétiques. Les cellules de la marge subissent des mouvements d'involution sous l'épiblaste, ce qui permet la formation de deux feuillets embryonnaires profonds, l'endoderme et le mésoderme. Ces mouvements d'involution entraînent, dans un premier temps, un épaississement uniforme de la zone marginale, appelé anneau germinatif. Des mouvements de convergence vont rapidement entraîner une accumulation de cellules qui constitue le bouclier embryonnaire. Celui-ci marque le futur pôle dorsal de l'embryon. Ces mouvements de convergence vers le pôle dorsal sont accompagnés de mouvements d'extension le long de l'axe animal-végétal. En parallèle, les mouvements d'épibolie continuent jusqu'à un recouvrement complet du vitellus par l'embryon (100% épibolie). A la fin de la période de gastrulation les axes antéro-postérieurs et dorso-ventraux sont définis et les principales régions de l'embryon (tête, tube neural, queue) sont reconnaissables morphologiquement.

5) La période de segmentation :

La période de segmentation a lieu à partir de t=10h. Cette période est marquée par une grande variété de mouvements morphogénétiques, l'apparition des rudiments des organes primaires, le développement du bourgeon caudal, l'élongation de l'embryon et la segmentation en somites, de l'antérieur vers le postérieur, du mésoderme para-axial au niveau de l'hypoblaste dorsal. Les premiers mouvements de l'embryon apparaissent, c'est-à-dire, des changements de positions au sein du chorion.

6) La période pharyngienne :

La période pharyngienne se déroule entre t=24h et 48h. Elle est marquée par le début de la pigmentation de la rétine et de la peau. La notochorde est bien développée, tous les somites sont formés, le cerveau est composé de cinq lobes, les nageoires commencent à se développer et des contractions musculaires brusques sont fréquentes. Le système circulatoire se forme.

Le cœur commence à battre au début de la période pharyngienne. Il est alors formé d'un tube droit, puis le ventricule et l'atrium deviennent chambres cardiaques morphologiquement distinctes à t=36h. Une courbure apparaît ensuite pour placer le ventricule à droite de l'atrium. A la fin de la période pharyngienne, le bulbe artériel se forme à la sortie du ventricule (Glickman and Yelon, 2002). Selon Grimes et al. , cette structure faite de muscle lisse ne doit pas être désignée comme étant une chambre cardiaque mais plutôt comme homologue au tronc aortique des vertébrés supérieurs (Grimes et al., 2006).

Durant la période pharyngienne, les cellules de la glande d'éclosion apparaissent, répandues à la surface du sac vitellin dans la région péricardiaque. Au niveau de cette zone, la couche de cellules épidermiques recouvrant le vitellus est interrompue : les cellules de la glande d'éclosion se retrouvent ainsi justes sous celles du périoderme. Elles possèdent des granules cytoplasmiques contenant des enzymes nécessaires à l'éclosion. Elles grossissent au cours de la période pharyngienne et s'élèvent à travers les cellules du périoderme pour atteindre l'espace périvitellin où seront libérées les enzymes par dégranulation. Ces enzymes fragilisent le chorion pour permettre l'éclosion.

7) La période d'éclosion :

Durant la période de l'éclosion qui commence à t=48h, l'embryon continue de grandir et la morphogenèse des organes primaires se termine. Les cartilages des nageoires et de la tête (mâchoires et arcs branchiaux) se développent et les nageoires pectorales s'allongent postérieurement. La pigmentation devient très importante et le cœur bat.

8) La période larvaire précoce :

A partir de l'éclosion, l'embryon devient une larve. Durant cette période, la larve qui a pratiquement achevé sa morphogénèse, continue de grandir, nage activement et les mouvements des nageoires pectorales, des mâchoires et des yeux apparaissent. La bouche est largement ouverte et dépasse de plus en plus vers l'avant. Le premier os, le cleithrum, apparaît au cours de cette période. La morphogénèse est alors suffisamment aboutie pour permettre à la larve de respirer, de se nourrir et de répondre à des stimuli par la fuite.

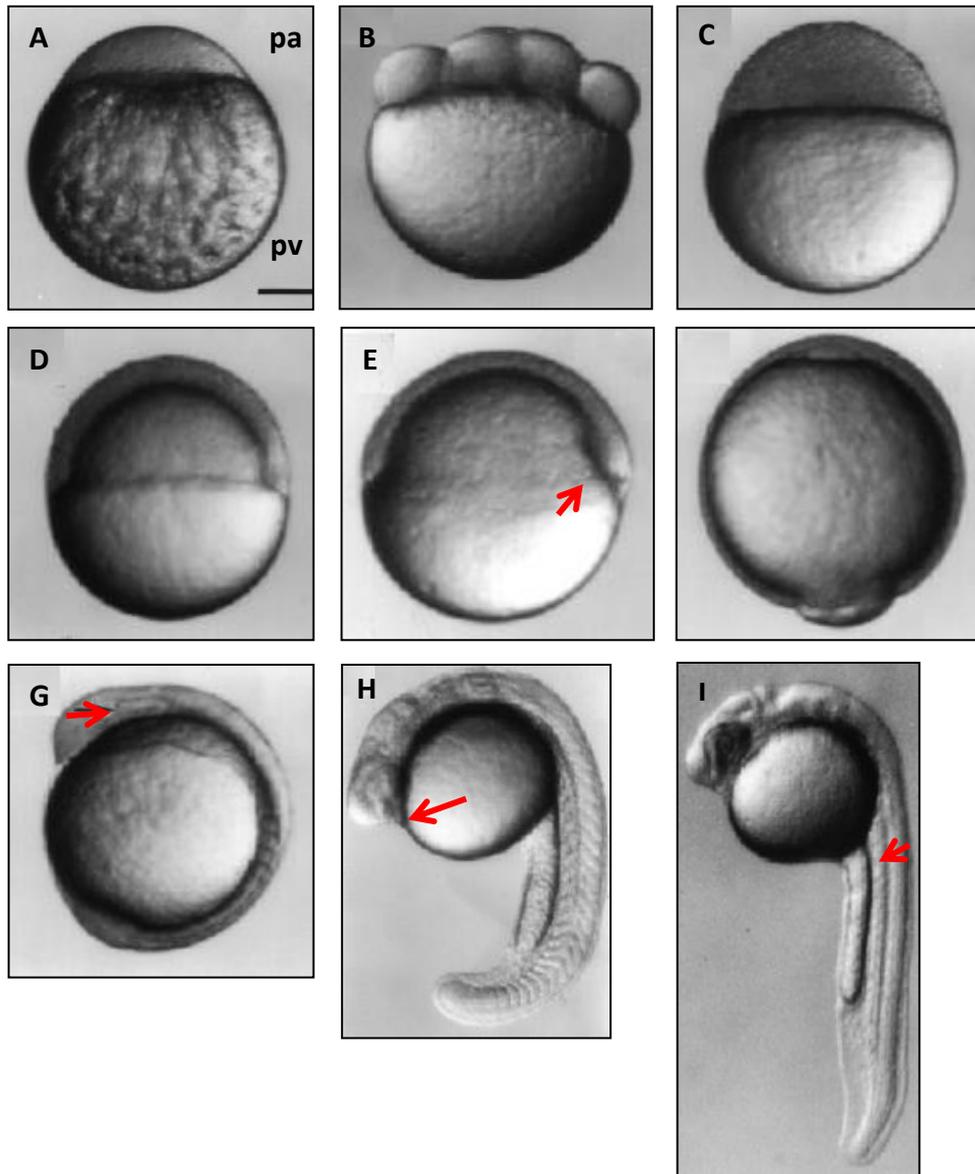


Figure 3 : Les principales étapes du développement du poisson zèbre

A : A la période zygote, la cellule unique se trouve sur le vitellus du côté de pôle animal (pa) opposé au pôle végétatif (pv). **B :** Pendant la période de division, l'embryon passe par le stade 8 cellules. **C :** Juste avant le début de l'expression des gènes zygotiques, les cellules se trouvant à la frontière entre l'embryon et le vitellus fusionnent pour former la couche vitelline syncytiale (CVS). **D :** Du stade sphère à la fin de la gastrulation, le blastoderme recouvre le vitellus par des mouvements d'épibolie. A ce stade, l'embryon est à 50% d'épibolie. **E :** Pendant la gastrulation, les mouvements d'involution des cellules de la marge sous l'épiblaste sont plus importants au niveau dorsal créant un épaississement appelé bouclier embryonnaire (flèche rouge). **F :** En fin de gastrulation, l'embryon est à 90% d'épibolie. **G-H :** Pendant la segmentation, les rudiments des organes primaires tels que les primordium optique (flèche en rouge en G), et le cœur (flèche rouge en H) apparaissent, le bourgeon caudal se développe, l'embryon s'allonge et les somites se segmentent de l'antérieur vers le postérieur. **I :** A 24h de développement (période pharyngienne), les différentes structures embryonnaires sont facilement reconnaissables : la notochorde est bien développée (flèche rouge en I), tous les somites sont formés, le cerveau est composé de cinq lobes, les nageoires apparaissent et la pigmentation commence au niveau de la rétine et de la peau. (D'après les ressources anatomiques de la base de données spécifiques ZFIN (http://zfinfo.zfin.org/zf_info/zfbook/stages/index.html))

III. Le poisson zèbre comme modèle génétique

1) Le génome du poisson zèbre

Le séquençage complet du génome du poisson zèbre a été publié en 2013 (Howe et al., 2013). Il possède environ 26000 gènes codant des protéines, dispersés sur 25 chromosomes, qui présentent 85% d'identité avec l'Homme, et 70% de gènes orthologues.

L'observation des phénomènes de polyploïdisation (duplication du matériel génétique) est fréquente et récurrente dans le monde vivant. La théorie de l'évolution par duplication de gènes (Klose et al., 1969; Wolf et al., 1969) est basée sur le fait que les duplications de gènes ou de génomes entiers (tétraploïdie) sont des événements évolutifs ayant eu un rôle important dans l'évolution des vertébrés. En effet, ces phénomènes de polyploïdisation auraient conduit à l'apparition de milliers de copies de gènes capables d'engendrer des fonctions nouvelles. Dès le début des années 1970, S. Ohno prédisait l'existence d'une ou plusieurs duplications complètes du génome à l'origine des vertébrés (Soukup, 1974). Depuis, une hypothèse a été avancée, annonçant que deux tours de duplications de génome ancestral se seraient produits au cours de l'évolution des chordés (Holland et al., 1994). Cette hypothèse est connue sous le nom d'hypothèse des "2R" (pour *2 rounds of genome duplication*) (Hokamp et al., 2003; Panopoulou and Poustka, 2005). Le premier tour de duplication serait intervenu après le clivage entre la lignée des céphalocordés et celle des vertébrés tandis que le second se serait produit avant l'émergence des gnathostomes, vertébrés à mâchoires regroupant les chondrichthyens et les ostéichthyens (Figure 4).

Le séquençage complet du génome du Tétrodon (*Tetraodon nigroviridis*) a révélé l'existence d'une troisième duplication de l'ensemble du génome survenue dans la lignée des actinoptérygiens, vers l'origine des Téléostéens (Jaillon et al., 2004). Il reste dans les génomes des poissons contemporains, de nombreuses traces de cette duplication génomique (Robinson-Rechavi and Laudet, 2001; Robinson-Rechavi et al., 2004). Ainsi, la présence de blocs synthétiques dupliqués a été observée grâce à des données de cartographie génétique comparée entre le poisson zèbre et l'Homme. De plus, ces blocs paralogues ont un rapport d'homologie de 2 pour 1 avec des blocs synténiques dans un génome non dupliqué (Postlethwait et al., 2000). Enfin grâce à des datations par « horloge

moléculaire » (l'hypothèse que les gènes évoluent tous à la même vitesse, permettant des datations), un pic de divergences moléculaire a été mis en évidence, il y a 200 à 300 millions d'années, vers l'origine des poissons téléostéens, attestant que les gènes paralogues auraient tous été dupliqués en même temps (Taylor et al., 2001), apportant ainsi la dernière preuve d'une duplication génomique.

Une conséquence a priori évidente de la duplication génomique devrait être l'augmentation du nombre de gènes. Pourtant, les estimations des nombres de gènes chez le poisson zèbre et chez l'Homme sont similaires. En fait, la plupart des gènes sont perdus après duplication. Mais la duplication peut aussi libérer une des copies pour l'exploration d'une nouvelle fonction. Après mutation, une spécialisation fonctionnelle de l'une des copies (néofonctionnalisation) a lieu. Enfin, les gènes paralogues peuvent être préservés par subfonctionnalisation : si chacun des deux gènes perd, par mutation, une part de la fonction (par exemple, l'expression dans un organe particulier), alors la sélection naturelle préserve les deux copies pour conserver la fonction complète du gène ancestral (Lynch and Conery, 2000). Ce mécanisme concerne souvent des gènes qui ont plusieurs sous-fonctions impliquées dans le développement, la physiologie ou l'immunologie.

Chez le poisson zèbre, de nombreuses études d'un gène particulier décrivent la caractérisation de deux copies, co-orthologues d'un gène unique humain (Amores et al., 1998; Chiang et al., 2001; Ishikawa et al., 2007; Nornes et al., 1998). Ces gènes supplémentaires peuvent être dus à la duplication du génome chez l'ancêtre des Téléostéens mais aussi à des polyploïdisations plus récentes. Ainsi, lorsqu'une recherche d'un gène orthologue à un gène de mammifère est effectué chez le poisson zèbre, il est important de prendre en considération la présence éventuelle d'une copie supplémentaire du gène étudié dans le génome du poisson zèbre.

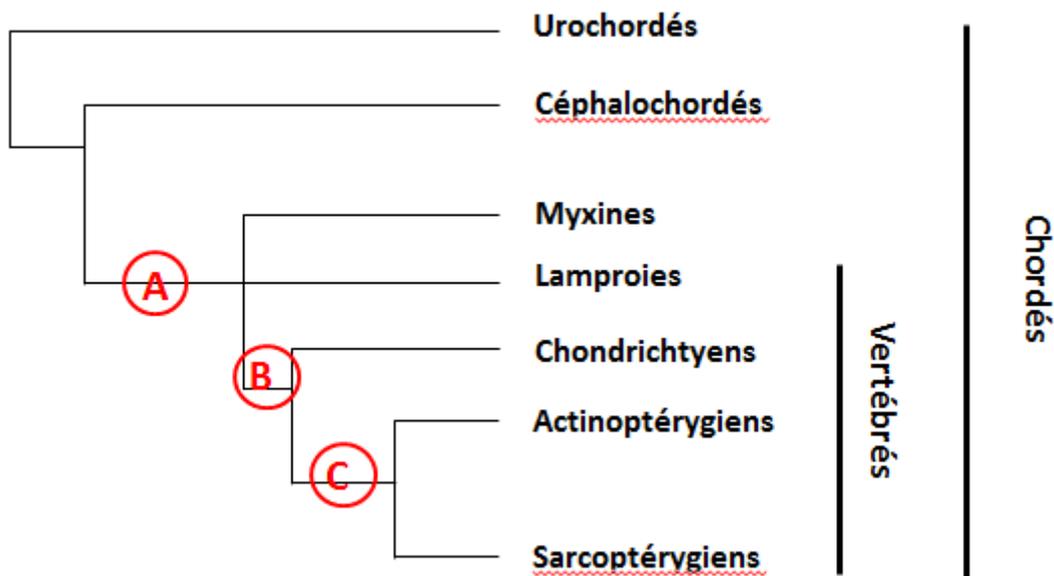


Figure 4 : La duplication de gènes à l'origine des Téléostéens

A et **B** représentent le premier et le deuxième tour de duplication à grande échelle suivant l'hypothèse de Holland et al. **C** représente la duplication qui s'est produite chez les Actinoptérygiens, vers l'origine des téléostéens. (D'après Robinson-Rechavi et al.) Les longueurs de branches sont arbitraires et ne correspondent pas au temps écoulé.

2) Génétique fonctionnelle chez le poisson zèbre

La fonction des gènes étant souvent conservée entre les vertébrés, des études fonctionnelles chez le poisson zèbre peuvent donner des informations sur les bases génétiques du développement des vertébrés et les gènes impliqués dans des pathologies humaines. Les criblages génétiques (génétique directe) représentent une méthode de choix pour identifier des gènes ayant une fonction essentielle. Différents types de mutagenèse peuvent être utilisés chez le poisson zèbre (Amsterdam, 2006).

a. La mutagénèse chimique aléatoire

La mutagénèse chimique aléatoire est largement utilisée chez le poisson zèbre pour identifier des gènes requis dans des processus spécifiques. Deux criblages de mutagénèse chimique à grande échelle ont été menés il y a quelques années, permettant d'identifier plus de 6600 mutations parmi lesquelles 1740 mutants ont été retenus (Driever et al., 1996; Haffter et al., 1996). Pour générer ces mutants, les poissons mâles adultes sont exposés au composé mutagène N-ethyl-N-nitrosourea (ENU). Cet agent synthétique alkylant induit des mutations ponctuelles en transférant son groupe éthyle à des bases de l'ADN (Grunwald and Streisinger, 1992). Le poisson zèbre est particulièrement résistant à la toxicité de l'ENU, ce qui permet d'obtenir des niveaux de mutagénèse et une atteinte de locus spécifique plus élevés que chez d'autres modèles de vertébrés. La mutagénèse nécessite ensuite d'identifier la nature moléculaire des mutations. Après un criblage à grande échelle des mutants obtenus, la stratégie du clonage positionnel permet d'identifier les gènes mutés responsables des phénotypes anormaux observés (Bahary et al., 2004; Talbot and Schier, 1999)

b. La mutagénèse insertionnelle aléatoire

La mutagénèse insertionnelle aléatoire utilisant des rétrovirus est aussi utilisée pour la recherche génétique chez le poisson zèbre (Gaiano et al., 1996; Lin et al., 1994). Un criblage de mutagénèse insertionnelle à grande échelle a été réalisé par l'équipe de N. Hopkins : 520 mutations ont été caractérisées dans environ 400 loci et 335 gènes ont été identifiés parmi ces 400 loci (Amsterdam et al., 1999; Golling et al., 2002). Les mutations insertionnelles sont induites par injection de rétrovirus pseudotypés dans les embryons au stade de la blastula. Le provirus s'insère dans l'ADN de certaines cellules donnant naissance à un embryon mosaïque. Seules les insertions situées dans les cellules à l'origine de la lignée germinale sont transmises à la descendance. Cette méthode est moins efficace que la mutagénèse chimique mais facilite l'identification du gène muté par la présence d'une étiquette moléculaire au site de la lésion, évitant ainsi le recours au clonage positionnel. L'utilisation de transposons comme méthode de mutagénèse insertionnelle chez le poisson zèbre reste moins développée (Davidson et al., 2003a; Kawakami, 2000; Raz et al., 1998).

La génétique inverse permet également de déterminer la fonction d'un gène, ceci en étudiant les conséquences phénotypiques liées à la perturbation de la fonction d'un gène d'intérêt. Différentes approches de génétique inverse sont utilisables chez le poisson zèbre telles que le TILLING, l'invalidation de gènes et la transgénèse.

c. Le tilling (Targeting Induced Local Lesion In Genomes)

Cette stratégie, établie chez *Arabidopsis thaliana* (McCallum et al., 2000), combine l'efficacité de la mutagenèse traditionnelle à l'ENU avec des protocoles de biologie moléculaire, afin d'identifier dans une population de mutants des mutations au niveau d'un gène d'intérêt (Stemple, 2004). Cette méthode a depuis été utilisée sur divers modèles animaux dont le poisson zèbre, et a déjà permis l'identification de mutations dans différents gènes d'intérêt (Wienholds et al., 2002, 2003).

Le principe du TILLING est le suivant : après traitement des mâles F0 à l'ENU, l'ADN des mâles de la génération suivante (F1) est collecté et les gènes d'intérêts sont amplifiés par PCR. Les amplicons sont mélangés et réappariés, entraînant la formation d'hétéroduplex entre les brins mutant et sauvage. Les mutations ponctuelles sont détectées dans les amplicons par séquençage direct ou par électrophorèse après traitement des hétéroduplex par l'endonucléase Cel1 qui clive les hétéroduplex au niveau des mauvais appariements. Dès qu'une mutation est détectée dans un amplicon donné, les poissons correspondants sont croisés pour générer des mutants hétérozygotes ou homozygotes pour le gène cible. Il est également possible de réaliser une fécondation *in vitro* avec des œufs sauvages et du sperme des mâles F1 mutants préalablement congelé.

d. La mutagenèse grâce aux TALEs Nucléases

Les TALEs (*Transcription Activators Like Effectors*) ont été découverts dans le cadre d'études sur les interactions hôte-pathogène observées dans les cellules végétales. En effet, les *Xanthomonas*, un genre de protéobactéries causant des maladies chez les plantes, injecte les TALEs dans la cellule végétale, qui sont par la suite transloqués dans le noyau, activant l'expression de gènes cibles, ce qui facilite la multiplication et la propagation des agents pathogènes (Boch and Bonas, 2010). Les TALEs sont généralement composés d'un domaine

de translocation N-terminal, un domaine centrale de répétition (responsable de la liaison à l'ADN) et un domaine C-terminal d'activation transcriptionnelle. Le domaine permettant la liaison à l'ADN comprend des répétitions en tandem, chacune étant constituée d'environ 34 résidus d'acides aminés hautement conservés, sauf les 12^{ème} et 13^{ème} acides aminés qui contiennent deux résidus variables appelés RVD (*Repeat Variable di-Residues*) ; capables de reconnaître un nucléotide spécifique. En associant plusieurs TALEs, contenant des RVDs spécifiques, il est possible de reconnaître n'importe quelle séquence d'ADN. La technique de TALENs quant à elle, consiste à fusionner ces TALEs à une endonucléase, capable de cliver l'ADN. L'une des endonucléases les plus utilisées est Fok1. Ainsi, Deux TALEs sont construits de part et d'autre du site que l'on veut couper. La nucléase Fok1, en dimérisant, sera capable de couper l'ADN et de provoquer une cassure double brin à l'endroit ciblé du génome. Les erreurs introduites par la machinerie de réparation d'ADN de la cellule provoqueront l'apparition de délétions/insertions ou d'altérations permanentes dans le gène cible et le rendront ainsi non fonctionnel. L'efficacité de la mutagenèse est de 70 à 100% (Bedell et al., 2012).

e. Le système CRISPR/cas 9

CRISPR/cas9 (*clustered regularly interspaced palindromic repeats/CRISPR-associated*), est un système qui permet aux bactéries de se défendre contre une invasion d'acides nucléiques étrangers dérivés de plasmides exogènes ou des bactériophages (Bhaya et al., 2011). Il s'agit d'un système à trois composants constitué par un ensemble de petits ARN CRISPR (crRNAs), d'ARN auxiliaire de transactivation des crRNAs (tracrRNA) et d'une nucléase associée au locus CRISPR (CRISPR associé=CAS). Ce locus contient de courtes répétitions palindromiques flanquant des séquences appelées « protospacers, qui après transcription, génèrent de courts ARN (crRNAs) qui reconnaissent les acides nucléiques étrangers, en s'y liant de façon spécifique. Les ARNs auxiliaires tracrRNA sont alors recrutés pour favoriser la liaison de la nucléase au complexe tracrRNA-ADN-crRNA, induisant le clivage de l'ADN étranger, et l'inactivation de l'agent pathogène (Wiedenheft et al., 2012).

Cette capacité de reconnaissance de séquence spécifique a fait de ce système CRISPR/cas9 un outil de mutagenèse performant chez le poisson zèbre, dont l'efficacité est estimée en moyenne à 84% (Hruscha et al., 2013). Le principe de mutagenèse chez le poisson zèbre est

basé sur l'utilisation d'une endonucléase cas9, qui sera exprimée à partir d'un vecteur d'expression, lequel contiendrait aussi une séquence spécifique du gène cible, avec du côté 3' une séquence NGG, reconnue par l'endonucléase cas9, qui va cliver l'ADN double brin. Le principe est ensuite le même que pour les TALENs, où les erreurs dans les réparations d'ADN vont créer des gènes non fonctionnelles.

f. La transgénèse

La transgénèse est une technique consistant à ajouter un ou plusieurs gènes au génome d'un être vivant, de façon à provoquer une ou des modifications dans les caractéristiques de ce dernier.

La transgénèse chez le poisson zèbre a débuté à la fin des années 1980 (Stuart et al., 1988). Pour établir des lignées transgéniques stables, différents protocoles ont été développés dont le plus commun est la microinjection d'ADN dans les embryons au stade unicellulaire. Cet ADN introduit dans l'œuf va former des concatémères de haut poids moléculaire qui restent extrachromosomiques et sont amplifiés environ 10 fois jusqu'à la gastrulation, avant d'être intégrés dans le génome. Cette intégration va permettre une expression mosaïque du transgène dans cette génération de poisson F0. La fréquence de transmission à la descendance est généralement inférieure à 10% (Amsterdam et al., 1995; Lin et al., 1994; Stuart et al., 1988). Un protocole a été développé pour augmenter l'efficacité de transgénèse (Grabher et al., 2004) : la co-injection de la méganucléase I-SceI, permettant des coupures rares dans le génome, favorise l'insertion du transgène. Cette méthodologie est utilisée pour surexprimer ou exprimer de façon ectopique un gène d'intérêt sous le contrôle de promoteurs particuliers. De plus, l'expression d'un gène peut être analysée grâce à l'utilisation de gènes rapporteurs sous la dépendance de promoteurs spécifiques. Parmi ces gènes rapporteurs, ceux codant pour une protéine fluorescente présentent un intérêt majeur chez le poisson zèbre. En effet, grâce à la transparence des embryons et des larves, l'expression spatio-temporelle de transgènes fluorescents peut être facilement observée, et suivie *in vivo* dans ce modèle (Amsterdam et al., 1995). Les gènes des protéines GFP (*Green Fluorescent Protein*) et DsRed (*Discosoma Red fluorescent protein*) sont les plus couramment utilisés mais ceux de YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) ou CFP (*Cyan Fluorescent Protein*) sont également disponibles. Plusieurs lignées stables de poissons transgéniques exprimant les

protéines GFP, YFP ou DsRed sous le contrôle du promoteur *mylz2* spécifique des muscles squelettiques ont pu voir le jour (Gong et al., 2003). Depuis les premières obtentions avec succès de poisson GFP, l'expression de la fluorescence verte n'est pas atténuée à la huitième génération. Il en est de même pour celle des protéines fluorescentes jaune et rouge à la quatrième et sixième génération, respectivement.

Des poissons transgéniques exprimant un gène rapporteur fluorescent ont aussi été établis pour suivre des lignées cellulaires marquées spécifiquement. Une observation dynamique des cellules et de leur comportement est ainsi possible dans un organisme vivant. De nombreux modèles ont été développés. Par exemple, l'utilisation de la protéine DsRed placée sous la dépendance du promoteur du gène *Gata1* permet de visualiser les érythrocytes (figure 5), tandis que l'utilisation de la GFP sous la dépendance du promoteur *Fli1* permet de visualiser les cellules endothéliales au cours du développement chez le poisson adulte (Lawson and Weinstein, 2002; Long et al., 1997). De même, la lignée transgénique exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur *Lck* spécifique des lymphocytes T, permet la visualisation des lymphocytes fluorescents dans le thymus (Langenau et al., 2004).

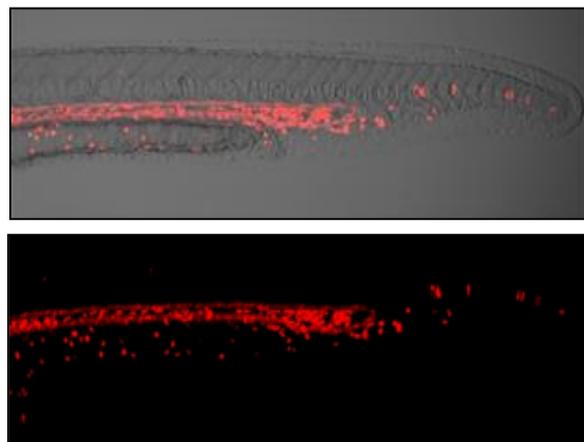


Figure 5 : Visualisation d'érythrocytes chez un embryon Tg(*Gata1* :DsRed) à 30 hpf

La transgénèse a également permis d'obtenir des modèles de cancer en injectant notamment des oncogènes sous le contrôle d'un promoteur spécifique. La transgénèse basée sur l'utilisation des transposons est aussi utilisée chez le poisson zèbre (Kawakami, 2005). Les transposons sont des agents spécialisés dans l'intégration au sein de génomes

hôtes sans causer de réarrangements chromosomiques. Même si aucun élément transposable actif n'a été trouvé dans le génome du poisson zèbre, différentes stratégies ont été utilisées pour contourner ce problème. Il a ainsi été montré que l'élément transposable autonome Tol2 du poisson Médaka (*Oryzias latipes*) peuvent créer des insertions chromosomiques dans les cellules germinales du poisson zèbre (Balciunas et al., 2004; Davidson et al., 2003b; Kawakami and Shima, 1999; Kawakami et al., 1998). Enfin, Hall et al, ont utilisé le système de transposon Tol2 pour établir des lignées transgéniques exprimant les gènes de la GFP ou de la DsRed sous le contrôle d'un promoteur spécifique de la lignée myéloïde (Hall et al., 2007). Cette technique a ainsi permis d'augmenter considérablement le taux de transgénèse (Suster et al., 2009).

g. L'invalidation transitoire grâce aux morpholinos

Les morpholinos sont des petits oligonucléotides synthétiques (généralement entre 18 et 25 bases) chimiquement transformés qui ont été conçus et développés par le Dr James E. Summerton (Gene Tools, LLC. OR, EUA) et le Dr Dwight D. Weller (AVIBioPharma Inc. WA, EUA) (Summerton and Weller, 1997). La technologie des oligonucléotides morpholinos est une technologie antisens visant à bloquer la traduction d'un ARNm cible ou l'épissage correct d'un pré-ARNm durant les premiers jours de développement (Figure 6). Les morpholinos ne sont pas dégradés par des enzymes, n'initient pas de réponse immunitaire innée et ne nécessitent pas d'activité enzymatique pour être efficaces.

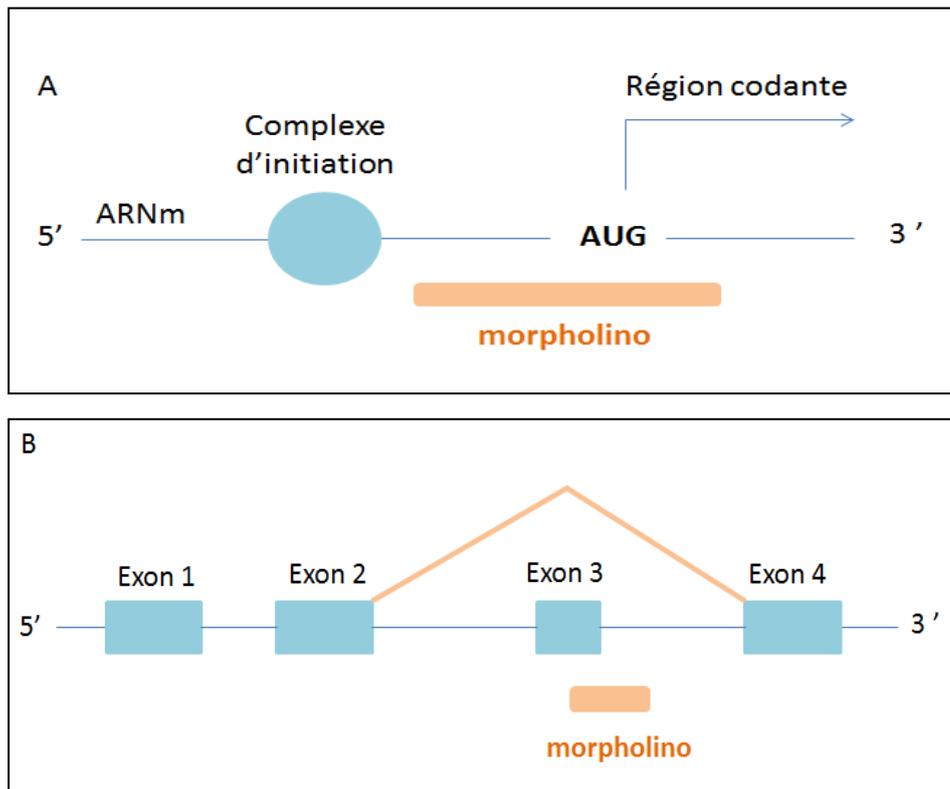


Figure 6 : Modes d'action des deux types de morpholinos

Les morpholinos sont des oligonucléotides antisens chimiquement modifiés. **A** : Ils peuvent avoir une séquence complémentaire de la région 5'UTR ou de la région entourant le site d'initiation de la traduction de façon à bloquer la traduction de l'ARNm cible par encombrement stérique. **B** : Ils peuvent aussi avoir une séquence complémentaire d'une région de jonction exon-intron pour interférer avec l'épissage d'un exon particulier dans l'ARNm cible. D'après Gene Tools (<http://www.gene-tools.com/>)

Tout d'abord développés pour des applications cliniques thérapeutiques, les morpholinos ont ensuite été introduits en biologie du développement à partir de l'an 2000. Ils ont depuis été utilisés chez de nombreux organismes modèles tels que l'oursin pourpre (*Strongylocentrotus purpuratus*) (Howard et al., 2001), l'ascidie (*Ciona savignyi*) (Satou et al., 2001), le xénope (*Xenopus laevis* et *Xenopus tropicalis*) (Heasman et al., 2000; Nutt et al., 2001), le poulet (Kos et al., 2001), la souris (*Mus musculus*) (Coonrod et al., 2001), et le poisson zèbre (Draper et al., 2001; Nasevicius and Ekker, 2000). Chez le poisson zèbre, les morpholinos sont délivrés par microinjection dans les oeufs aux stades 1 à 4 cellules. L'injection pouvant entraîner l'apparition de phénotypes non spécifiques, il est nécessaire d'utiliser des contrôles pour une juste interprétation des phénotypes observés (Heasman, 2002). La stratégie d'interférence à ARN (siRNA) a aussi été développée chez le poisson zèbre pour éteindre l'expression d'un gène de façon transitoire (Dodd et al., 2004; Liu et al.,

2005). Cependant, les morpholinos restent plus utilisés que les siRNA pour l'extinction de gènes dans ce modèle. L'utilisation de morpholinos est donc une méthode de choix pour inactiver de façon transitoire la fonction d'un gène dans un modèle comme le poisson zèbre. Une nouvelle approche a été développée permettant d'invalider l'expression de gène chez l'adulte : les vivo-morpholinos (<http://www.gene-tools.com/>), permettant d'étudier le rôle de gènes chez l'adulte mais également les gènes dont l'invalidation est létale lors du développement. Son injection directement au niveau du site d'intérêt, permet une invalidation du gène localisée. Ils sont produits de la même façon que les morpholinos classiques, auxquels est conjugué du côté 3' de l'oligonucléotide un dendrimère portant des peptides riches en Arginine, avec au total huit groupements guanidium, assurant une livraison efficace et une stabilité du morpholino. Ils sont transportés dans la cellule par endocytose, et sont résistants aux protéases et aux nucléases. (Morcos et al., 2008).

Chapitre 1 : Rôle du monoxyde d'azote dans le développement tumoral chez le poisson zèbre

I. Introduction :

1) *Le poisson zèbre comme modèle de cancer*

Les poissons servent de modèle pour l'étude du cancer depuis plus d'un siècle. Par exemple, il a été décrit que l'espèce *xiphophorus* développe spontanément des mélanomes (Friend, 1993). Le poisson zèbre a été proposé en tant que modèle en 1982, quand il a été constaté que l'exposition à des agents cancérigènes tels que diméthylnitramine provoque la formation de tumeurs à faible pénétrance (Pliss et al., 1982). En 2000, il a été reconnu que le poisson zèbre, une fois exposé aux agents mutagènes les plus courants tels que N-nitroso-N-éthylurée (ENU) et N-méthyl-nitrosoguanadine (MNNG), développe diverses tumeurs, telles que des papillomes cutanés, des adénomes du foie, des rhabdomyosarcomes et seminomes (Beckwith et al., 2000; Spitsbergen et al., 2000a, 2000b). Cependant, c'est avec l'émergence rapide de la technologie transgénique que les études sur ce modèle ont pris de l'importance. Ainsi, il a été démontré que l'expression de l'oncogène de la souris *Myc* chez le poisson zèbre a abouti à l'apparition et à la propagation rapide d'une leucémie lymphoblastique touchant les cellules T, et émergeant du thymus (Langenau et al., 2003). Depuis, de nombreux modèles de cancer à l'aide de l'expression transgénique d'oncogènes ont été créés (Berghmans et al., 2005; Stoletov and Klemke, 2008). L'émergence de tous ces modèles a fait du poisson zèbre un modèle complémentaire et alternatif aux autres modèles classiques de cancer. Le tableau 1, résume quelques avantages et limites du poisson zèbre en tant que modèle.

Tableau 1: Avantages et limites du poisson zèbre comme modèle de cancer

Le poisson zèbre comme modèle de cancer
<u>Avantages :</u> <ul style="list-style-type: none">- Possibilité d'imagerie <i>in vivo</i> des tumeurs, de leur croissance et des métastases.- Forte ressemblance avec les tumeurs humaines.- Existence de lignées transgéniques pour l'étude de l'angiogenèse et des leucémies- Perméabilité de l'embryon aux petites molécules ajoutées directement dans l'eau (études pharmacologiques)
<u>Limites :</u> <ul style="list-style-type: none">- Faible incidence de la tumorigenèse spontanée- Durée de vie courte (phénotype de cancer lié à l'âge limité)- Duplication de certains gènes (études des pertes de fonction complexes)- Gamme d'anticorps limitée (études sur l'expression protéique difficile)

Nous soulignons ci-dessous quelques-unes des techniques clés qui ont émergé en utilisant le poisson zèbre, et en particulier celles qui ont un intérêt direct dans l'étude de la pathogenèse cancéreuse humaine.

a. Modèles par mutagenèse

Cette technique basée sur l'ajout de carcinogènes directement dans l'eau, a été employée pour obtenir les premiers développements tumoraux chez le poisson zèbre. L'ajout d'un composé ou d'un mélange de composés carcinogènes chez les mammifères, permet d'induire la formation de tumeurs chez le poisson zèbre (Amatruda et al., 2002; Berghmans et al., 2005; Goessling et al., 2007). Ainsi, l'ajout de diméthylbenzantracène, d'éthylnitrosurée, de N-méthyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine ou de diéthylnitrosamine induit la formation de tumeurs variées chez le poisson zèbre comme chez le Medaka (Beckwith et al., 2000; Lam et al., 2006; Mizgireuv and Revskoy, 2006; Okihiro and Hinton, 1999; Spitsbergen et al., 2000b). Si la majorité des tumeurs obtenues grâce à cette méthode sont des tumeurs hépatiques, certaines ont été relevées au niveau d'autres organes et tissus tels que la peau sous forme de papillomes, le tissu musculaire sous la forme de thabdomyosarcome ou encore le tissu vasculaire sous la forme d'hémangiosarcomes. Ces modèles ont notamment permis de mettre en avant une homologie des mécanismes impliqués dans la carcinogénèse entre l'Homme et le poisson zèbre. Cette conservation est observée tant au niveau histologique que moléculaire, comme par exemple l'augmentation de la vitesse de prolifération cellulaire, la morphologie nucléaire atypique ou encore un

moindre niveau de différenciation. De plus, le profil des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, de l'apoptose et de la réparation de l'ADN est identique pour les tumeurs de ces deux espèces. Si l'obtention de ces modèles est aisée, plusieurs inconvénients comme l'hétérogénéité des tumeurs obtenues, la faible incidence de développement tumoral (< 10%) ou encore la lenteur de la carcinogenèse et la difficulté d'observation des tumeurs chez un poisson adulte apparaissent comme les limites de tels modèles.

b. Modèles par transgénèse

Cette seconde approche, basée sur l'expression ou la surexpression de gènes impliqués dans la tumorigenèse permet d'étudier l'impact des gènes déjà connus lors du développement cancéreux. De nombreux modèles ont ainsi pu être développés.

- *Modèles de cancers solides :*

Un modèle de cancer a été mis au point en utilisant un plasmide codant MYC-N, dont la dérégulation semble être un évènement précoce dans la progression de nombreuses tumeurs chez l'homme, placé sous le contrôle du promoteur de poisson zèbre *MyoD*, et permettant l'expression de l'oncogène au niveau du cerveau, de la corde spinale, des muscles mais aussi au niveau des cellules des îlots pancréatiques (Yang et al., 2004). Les auteurs montrent que ce transgène permet le développement de tumeurs neuroendocrines au niveau des cavités crâniennes et du pancréas. Un second modèle de carcinome pancréatique a été obtenu en exprimant un mutant *KRas^{G12V}* en fusion avec le gène rapporteur GFP sous le contrôle du promoteur *ptf1* (Park et al., 2008) : le développement tumoral, visible grâce à la protéine GFP, et l'histologie des tumeurs ainsi obtenues étaient similaires aux cancers pancréatiques humains.

L'agressivité des mélanomes et la résistance de ces tumeurs à la plupart des thérapies font de ce type de cancer, une priorité dans le développement de modèles animaux. Une mutation a été relevée au niveau de la kinase BRAF dans 60% des mélanomes humains, dont 80% de mutation BRAF^{V600E} (Davies et al., 2002; Pollock et al., 2003). C'est pourquoi un modèle transgénique a été développé en exprimant BRAF^{V600E} sous le contrôle du promoteur *mitfa* spécifique des mélanocytes (Patton and Zon, 2005). Les poissons exprimant ce transgène présentent des lésions histologiquement comparables aux naevi humains,

cependant, la progression en mélanome n'a été obtenue que chez des poissons présentant également un défaut du suppresseur de tumeur p53. Les mélanomes ainsi obtenus sont transplantables, montrant ainsi leur tumorigénicité.

Un modèle transgénique de rhabdomyosarcome embryonnaire a également été développé en exprimant kRAS^{G12D} sous le contrôle du promoteur *Rag2*, spécifique des cellules T et B, mais également actif au niveau des bulbes olfactifs et des myoblastes (Langenau et al., 2007). Des tumeurs observées dans un premier temps au niveau des muscles squelettiques, ont été relevées ensuite au niveau des organes distants comme les reins ou l'intestin.

- *Modèles de leucémies*

Un groupe a mis au point un modèle de leucémie aigue lymphoblastique des cellules T par transgénèse, en injectant une construction plasmidique portant l'oncogène cMyc murin (impliqué dans des leucémies et des lymphomes), sous le contrôle du promoteur *zRag2* (Langenau et al., 2003). Le *zRag2* permet de cibler l'expression au niveau des cellules lymphoïdes. Les poissons présentant un développement tumoral sont caractérisés par des cellules leucémiques qui colonisent le thymus, les arcs branchiaux, les muscles squelettiques, les branchies, les nageoires ou encore les bulbes olfactifs. La transplantabilité des cellules leucémiques a été aussi validée puisque des cellules extraites de poissons de la génération F0, greffées dans des poissons irradiés de 62 jours, ont été capables d'envahir la cavité péritonéale et le thymus après 14 à 26 jours.

L'autre exemple de modèle leucémique, est une seconde lignée transgénique générée après injections d'une construction portant l'oncogène EGFP-mMyc, précédé du gène DsRed2 flanqué de deux sites loxP, placé sous le contrôle du promoteur *zRag2* (Langenau and Zon, 2005). La lignée obtenue ne développe pas de leucémie et possède des thymocytes fluorescents rouges. L'ARNm de l'enzyme CRE est injecté dans des œufs au stade unicellulaire afin d'activer l'oncogène, ce qui va permettre l'excision du gène DsRed2, exprimant par la suite l'oncogène EGFPMyC dans les cellules lymphoïdes qui deviennent leucémiques et fluorescent en vert. Ce modèle présente une pénétrance de la pathologie seulement de 13%, ce qui a conduit les chercheurs à mettre au point un autre système pour augmenter l'efficacité du modèle. Ils ont ainsi remplacé le promoteur *zRag2* par le promoteur de la protéine de stress HSP70 (Feng et al., 2007). En incubant les larves 3 jours à

37° pendant 45 min, l'enzyme CRE est exprimée et le gène *DsRed2* est alors excisé. Ceci a permis de passer à une pénétrance de 81%.

c. Modèle par xénogreffe

Initialement, le standard par excellence pour la xénotransplantation *in vivo* a été défini comme la reconstitution de l'immunité humaine et de la malignité chez les souris immunodéficientes, des souris dépourvues de lymphocytes T, B, NK (Natural Killer). Mais, il existe plusieurs inconvénients majeurs dans l'utilisation de la souris comme modèle de xénogreffe. Ceux-ci incluent la longue durée de prise d'une xénogreffe visible, les difficultés de l'imagerie, l'hétérogénéité des greffes nécessitant un grand nombre d'animaux, et les coûts d'expériences dues entre autres au logement spécifique.

Le modèle poisson zèbre surmonte certaines des exigences mentionnées ci-dessus, mais évidemment, ne peut supplanter l'utilisation des modèles mammifères tels que la souris, le chien, ou le singe. La première greffe de cellules humaines chez le poisson zèbre a été réalisée par Lee et al. 2005. Cette équipe a transplanté des mélanomes dans des embryons de poisson zèbre et a démontré que ces cellules pouvaient se développer (Lee et al., 2005). Depuis, plusieurs chercheurs ont commencé à utiliser le poisson zèbre comme modèle de xénogreffe comme par exemple pour l'étude de la leucémie (Pruvot et al., 2011), ou des mélanomes (Santoriello et al., 2012).

Le développement ex-utero et la transparence des embryons permettent une imagerie directe du développement et de la progression tumorale. Il existe aussi plusieurs lignées transgéniques qui facilitent les études sur les interactions entre les cellules humaines et le microenvironnement de l'hôte, telles que la vascularisation. Par exemple, dans la lignée transgénique Tg(*Fli1*:EGFP), le promoteur de *Fli1* est capable de diriger l'expression de l'EGFP dans tous les vaisseaux sanguins tout au long de l'embryogenèse, ce qui se traduit par une vascularisation fluorescente, utilisée dans les études d'angiogenèse (Lawson and Weinstein, 2002).

La transplantation a lieu par injection mécanique, analogue à la procédure d'injection des ARNm ou des morpholinos (Figure 7), et est généralement réalisée à 48 hpf, lorsque la réponse immunitaire adaptative n'est pas encore établie, ne nécessitant pas alors

d'immunodépression (Lam et al., 2004). Chez l'adulte, l'immunodépression est nécessaire, et est effectuée par irradiation ou traitement au dexaméthasone (Langenau et al., 2004). La visualisation des cellules tumorales est possible grâce à l'utilisation de traceur cellulaire, comme le CM-Dil, un colorant ayant la particularité de fluorescer dans le rouge une fois lié à la membrane de la cellule. Il permet ainsi l'observation des mouvements et la localisation des cellules tumorales (Pruvot et al., 2011).

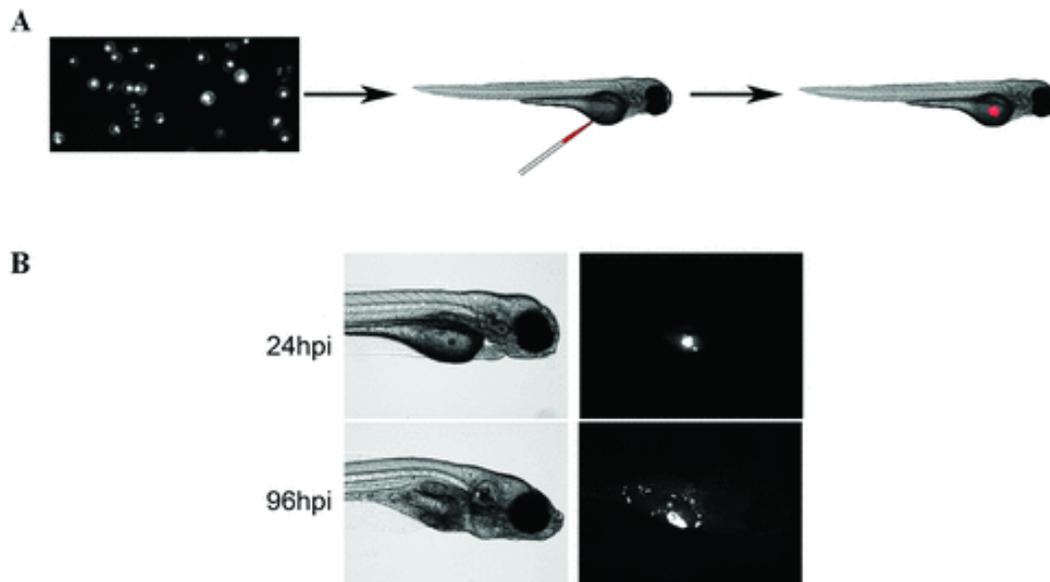


Figure 7 : Représentation schématique de xénogreffe chez l'embryon du poisson zèbre

A : Cellules leucémiques humaines THP1 fluorescentes, injectées au niveau du vitellus d'embryons à 48 hpf. **B** : la prolifération peut être visualisée et quantifiée sur plusieurs jours. Hpi : Heures Post-Injection. (d'après (Corkery et al., 2011)).

Le tableau 2, résume les avantages et les limites de ce modèle de xénogreffe.

Tableau 2 : Avantages et inconvénients de l'utilisation du poisson zèbre comme modèle de xénogreffe.

Le poisson zèbre comme modèle de xénogreffe
<u>Avantages :</u> <ul style="list-style-type: none">- Transplantation embryonnaire possible- Absence de système immunitaire adaptatif pendant les premiers jours de développement (Absence de rejet de greffe)- Petit nombre des cellules requis pour la xénogreffe.
<u>Limites :</u> <ul style="list-style-type: none">- Environnement biologique différent chez le poisson zèbre pour le développement de cellules adultes transplantées- Températures de croissance différentes (34° maximale pour le poisson zèbre et 37° pour les cellules humaines).- Transplantations orthotopiques limitées.

2) Le Monoxyde d'azote et le développement tumoral

Le monoxyde d'azote ou oxyde nitrique (NO) est un composé chimique formé d'un atome d'oxygène et d'un atome d'azote. Il s'agit d'un gaz radicalaire à demi-vie de l'ordre de la seconde dans les conditions normales de pression et de température. En outre, il est largement diffusible à travers les membranes biologiques. En tant que radical libre, il peut aussi interagir avec de nombreuses molécules cibles, lui conférant un rôle de médiateur clé dans divers processus physiologiques, par exemple au niveau cardiovasculaire ou immunitaire.

Il est synthétisé grâce à des enzymes appelées NO synthases (NOS) qui catalysent la production du monoxyde d'azote à partir de la L-arginine.

a. Les NOS de mammifères :

Chez les mammifères, trois isoformes codées par trois gènes distincts ont été identifiés. La NOS neuronale (*nNos* ou *Nos1*) est principalement exprimée au niveau du cerveau, de la moelle épinière et du système nerveux périphérique. La nNOS est impliquée dans de nombreux mécanismes comme la régulation de certaines fonctions gastro-intestinales ou respiratoires mais également dans les mécanismes de la mémoire ou encore la régulation des fonctions endocrines (Snyder and Bredt, 1992; Tuteja et al., 2004).

Exprimée dans l'endothélium vasculaire et les plaquettes sanguines, la NOS endothéliale (*eNOS* ou *NOS3*) est également retrouvée au niveau du cœur dans l'endothélium endocardique et les cardiomyocytes (Mungrue et al., 2002). L'eNOS est impliquée notamment dans la régulation de la pression artérielle, la distribution du flux sanguin et la régulation de l'adhésion et de l'activation des plaquettes et des leucocytes.

Enfin, la NOS inductible (*iNOS* ou *NOS2*) est retrouvée dans de nombreux types cellulaires comme les hépatocytes, les chondrocytes, les macrophages, les kératinocytes, les neurones, les cellules musculaires lisses, les neutrophiles, les cardiomyocytes et l'épithélium respiratoire (Lirk et al., 2002). La *NOS2* peut être induite par des cytokines pro-inflammatoires ou par différents ligands des récepteurs « Toll like » (TLR).

Si la NOS inductible est impliquée dans la réponse immunitaire face aux pathogènes, son rôle est ambivalent car elle est également impliquée dans certains processus physiopathologiques comme des maladies neurodégénératives, auto-immunes et tumorales (Jeannin et al., 2008; Kröncke et al., 1997).

b. Les NOS chez le poisson zèbre

Chez le poisson zèbre, trois gènes codant pour les NOS ont également été rapportés. Le premier gène orthologue de la *Nos1* de mammifère, est retrouvé au niveau du chromosome 5 (Holmqvist et al., 2000; Poon et al., 2008). Les deux autres gènes de *Nos* retrouvés dans le génome du poisson zèbre sont le gène de la *Nos2a* situé sur le chromosome 5 et celui de la *Nos2b* sur le chromosome 15. La *Nos2a* est exprimée au niveau des reins, des ovaires, de la peau, de l'intestin et de la rate tandis que la *nos2b* est exprimée dans la majorité des tissus (Lepiller et al., 2009). Les rôles de ces isoformes ne sont pas totalement définis. Les travaux de Lepiller *et al.* ont mis en évidence l'induction de l'expression des *nos2a* par différentes stimulations (Poly I :C, LPS), laissant présager un rôle de ces NO synthases dans la réponse immunitaire.

c. Détection du NO

Les diaminofluorophores (DAF) sont des sondes spécifiques du NO permettant la localisation spatio-temporelle de sa production par des cellules vivantes. La réaction des DAFs en présence du NO oxygéné génère des dérivés triazoles hautement fluorescents. Parmi ces DAF, le DAF-FM-DA permet la détection du NO intracellulaire. Sa production a ainsi pu être mise en évidence *in vivo* chez le poisson zèbre (Lepiller et al., 2007). En ajoutant le DAF-FM-DA directement dans le milieu, la production de NO est observée *in vivo* grâce à l'émission de fluorescence par le fluorophore et à la transparence des larves. Le NO jouant un rôle clé au cours du développement, sa production a également été rapportée en divers sites chez le poisson zèbre. Le marquage permet la détection du NO au niveau du cœur, de la notochorde et de la nageoire caudale.

d. Implication du monoxyde d'azote dans le développement tumoral

Parmi ses implications physiopathologiques, le rôle du monoxyde d'azote et des NOS au niveau du développement tumoral reste complexe car ce dernier joue un rôle ambivalent et toujours controversé. En effet, le NO, décrit à la fois comme pro-et anti-tumorigène, est impliqué dans divers processus nécessaires à la progression tumorale (figure 8), comme l'invasion cellulaire, la formation de métastases ou encore l'angiogénèse. Cette ambivalence dépend de la dose, de la durée d'exposition, de la sensibilité des cellules au NO, mais également des cellules à l'origine du NO (Fukumura et al., 2001; Jeannin et al., 2008).

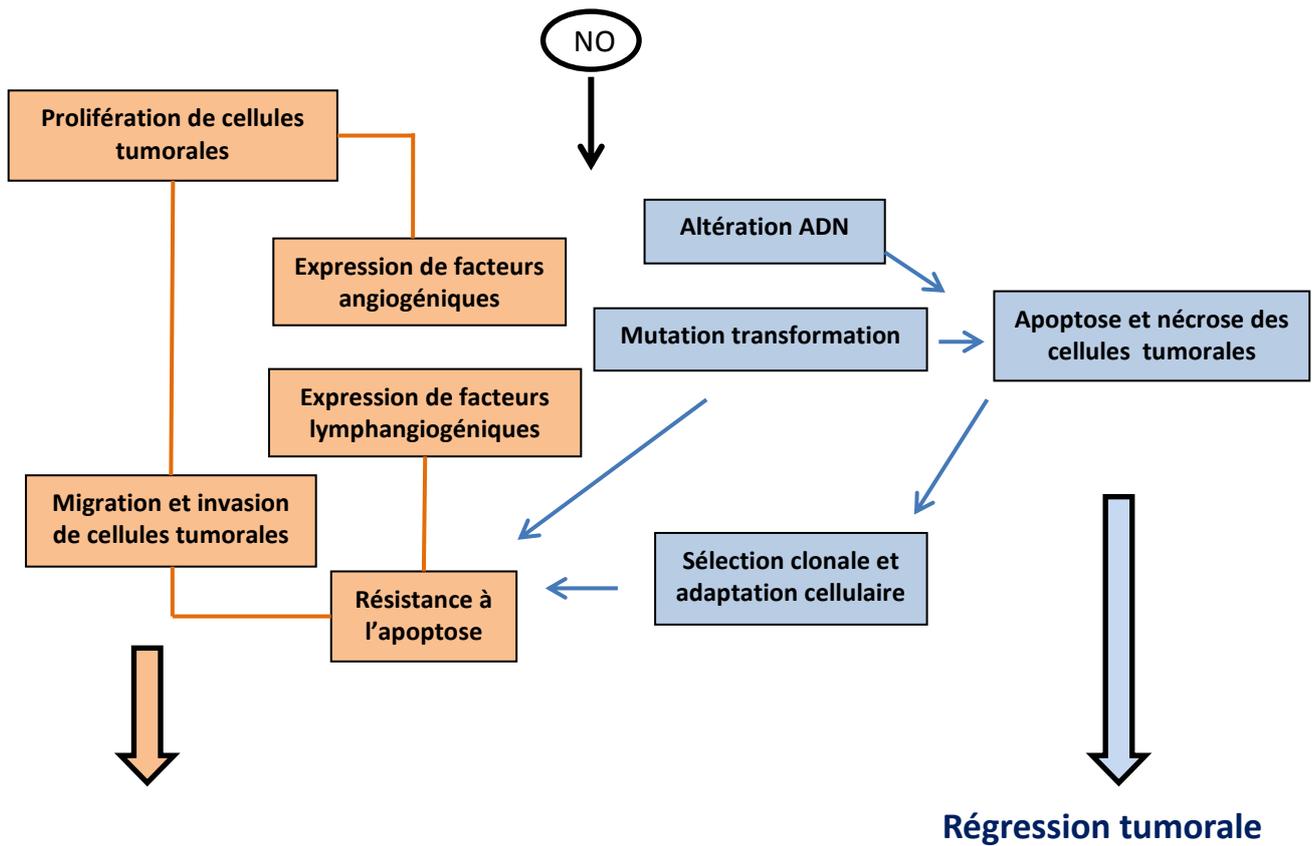


Figure 8 : Mécanisme d'action du NO sur les cellules tumorales

Le NO peut avoir un rôle pro-tumoral (en rose) ou anti-tumoral (en bleu) en fonction de la quantité et de la durée de l'exposition des cellules au NO. L'implication du NO dans la progression tumorale peut être directe en induisant la prolifération, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses, mais également indirecte en modulant l'expression de facteurs angiogéniques ou lymphangiogéniques dans les cellules tumorales. La dichotomie du rôle du NO dans le développement tumoral peut s'expliquer, notamment à forte dose, car le NO peut induire des dommages génétiques provoquant des mutations menant à la mort des cellules tumorales. Cependant, ces mutations peuvent également mener à la sélection du clone tumoral et à l'acquisition de la résistance à l'apoptose, donc à la tumorigénèse.

II. Résultats :

Dans ce contexte, nous avons entrepris la mise au point d'un modèle de transplantation de cellules tumorales gliales du rat dans des larves de poisson zèbre, afin d'étudier la production et le rôle du monoxyde d'azote dans le développement tumoral et l'angiogenèse. Les résultats sont présentés sous forme d'un article accepté dans le journal *PlosOne*.

The impact of tumor nitric oxide production on VEGFA expression and tumor growth in a zebrafish rat glioma xenograft model

Nadhir Yousfi^{¶1,2}, Benoist Pruvot^{¶2}, Tatiana Lopez^{1,2}, Lea Magadoux³, Nathalie Franche³,
Laurent Pichon², Françoise Salvadori², Eric Solary⁴, Carmen Garrido¹, Véronique Laurens^{2,3}
and Johanna Chluba^{1,2*}

¹ INSERM, UMR 866, 'Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer', Dijon, France

² University of Burgundy, Dijon, France.

³ EA 7269 Ecole Pratique des Hautes Etudes, Dijon, France.

⁴ INSERM, UMR 1009, Institut Gustave Roussy, University Paris-Sud 11, Villejuif, France

¶ These authors contributed equally

* Corresponding author

Email: Johanna.Chluba@u-bourgogne.fr (Johanna Chluba)

Abstract

To investigate the effect of nitric oxide on tumor development, we established a rat tumor xenograft model in zebrafish embryos. The injected tumor cells formed masses in which nitric oxide production could be detected by the use of the cell-permeant DAF-FM-DA (diaminofluorophore 4-amino-5-methylamino-2'-7'-difluorofluorescein diacetate) and DAR-4M-AM (diaminorhodamine-4M). This method revealed that nitric oxide production could be co-localized with the tumor xenograft in 46% of the embryos. In 85% of these embryos, tumors were vascularized and blood vessels were observed on day 4 post injection. Furthermore, we demonstrated by qRT-PCR that the transplanted glioma cells highly expressed *Nos2*, *Vegfa* and *Cyclin D1* mRNA. In the xenografted embryos we also found increased zebrafish *vegfa* expression. Glioma and zebrafish derived *Vegfa* and tumor *Cyclin D1* expression could be down regulated by the nitric oxide scavenger 2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide or CPTIO. We conclude that even if there is a heterogeneous nitric oxide production by the xenografted glioma cells that impacts *Vegfa* and *Cyclin D1* expression levels, our results suggest that reduction of nitric oxide levels by nitric oxide scavenging could be an efficient approach to treat glioma.

Introduction

Transplantation of tumor cells into immunodeficient rodents is commonly used for preclinical drug development in oncology. However, several limitations are inherent to mammalian models, such as, lack of *in vivo* tumor observation, or high costs which impedes high throughput approaches.

During the last decade, zebrafish embryos have become an attractive alternative model for xenografts because they offer many experimental advantages [1,2] and optical transparency of embryos and larvae and adult mutants [3] allows direct *in vivo* imaging of cells. As the specific immune system has not yet developed in two day-old zebrafish embryos, mammalian tumor cells can be easily grafted without rejection in this period. Xenograft models in zebrafish were obtained by injection of rodent and human tumor cells that survived and migrated in embryos, formed tumor masses [4-6], or stimulated angiogenesis [7,8]. Thanks to the transparency of the embryos, tumor cells labeled with fluorescent dyes prior to transplantation enables studies of the interactions between these cells and their environment [9-11]. These models are also useful to evaluate drug effects on cancer [12-15].

Nitric oxide (NO) is a free radical involved in physiological as well as in pathophysiological processes. In tumor biology, NO was demonstrated to promote either tumor invasion and angiogenesis or tumor regression [16-18]. Such ambivalence depends on concentration, timing, nature of cells and enzymes involved in NO production. Studies based on *in vivo* imaging of NO production in tumors should shed more light on these complex processes.

Imaging methods to visualize *in situ* NO production have been described for plant and mammalian cells by using fluorophores [19] such as diaminofluoresceins (DAFs) [20] and diaminorhodamines (DARs) [21]. In the presence of dioxygen, NO induces DAFs transformation into highly fluorescent derivatives. We demonstrated that the use of the cell permeant dia-

minofluorophore 4-amino-5-methylamino-2'-7'-difluorescein diacetate (DAF-FM-DA) enables to assess *in vivo* NO production in zebrafish embryos [22].

In this study, we analyzed the NO production in glioma xenografts by *in vivo* imaging of DAF labeled zebrafish embryos and performed mRNA expression analysis of *NO synthase (Nos)* genes of the tumors and the host. As the xenografts increased in size over time and had vascularized after four days following transplantation, we evaluated the effect of NO on Vascular Endothelial Growth factor-A (*Vegfa*) and *Cyclin D1* gene expression and on tumor growth.

Materials and methods

Cell cultures

The glioma cell line GV1A1 was established from a glioma induced by *N*-ethyl-*N*-nitrosourea in a BD-IX rat [23,24]. The cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% (vol) fetal bovine serum (Invitrogen) and Glutamax-I (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France).

Ethical Statement

The zebrafish experiments that are described in the present study were conducted at the University of Burgundy according to the French and European Union guidelines for the handling of laboratory animals. The animal procedures carried out in this study were reviewed and approved by the local Ethics Committee «Comité d'éthique de l'expérimentation animale Grand Campus Dijon» (C2EA Grand Campus Dijon n°105).

Zebrafish

Adult wild-type (WIK, ZIRC, Oregon) zebrafish were maintained in a recirculating aquaculture system (Müller & Pflieger, Germany). Photoperiod was 14 L:10D (light:dark), and the mean ranges for conductivity, pH, and temperature in the system were 600-700 μ S, 6.0-

8.0 and 26–28°C, respectively. The transgenic line Tg (*fli*: EGFP; ZIRC, Oregon) expressing EGFP in endothelial cells was maintained under the same conditions. Staging of zebrafish embryos and larvae was performed as described by Kimmel et al., 1995 [25]. Throughout the manuscript, the age of embryos is indicated as hours post-fertilization (hpf) or days post-fertilization (dpf). Three days before xenotransplantation, females were placed in mating tanks with males. The next morning, mating was initiated by light stimuli and the resulting fertilized eggs were collected. Eggs were collected within one hour of laying and kept at 28° in Petri dishes containing source water (Volvic, France) supplemented with methylene blue (0.3 µg/ml).

Implantation procedure

Just before transplantation, 48-hpf zebrafish embryos were dechorionized using Pronase (2mg/ml; Roche Diagnostics), anesthetized with tricaine (0.168mg/L) and arrayed on a Petri dish. The glass needles used to inject the cells were made from a glass capillary (1 mm O.D.60.78 mm I.D.; Harvard Apparatus) using a PP-830 gravity puller (Narishige). GV1A1 glioma cells were labeled with red or green lipophilic fluorescent tracking dyes (CM-DiI, Invitrogen, or CellTracker™ Green CMFDA (5-chloromethylfluorescein diacetate; Invitrogen)) before transplantation according to the manufacturer's instructions. The avascular region of the yolk sac was then injected with a volume of the above-described suspension containing 100–200 cells using the glass needles and the FemtoJet injection system (Eppendorf, Hamburg, Germany). 50 embryos were injected per experimental and control groups. The number of injected cells was counted microscopically by transferring the same volume of injected cells on glass slides using the same glass capillary tubes and injection pressure and duration. The injected embryos were maintained for 1 hour at 28°C prior to incubation at 34°C. At 1 day post injection (dpi), transplanted embryos were examined with a fluorescence stereomicroscope to select embryos containing fluorescent

cells. The embryos were then transferred in fresh water (Volvic, France) for further observations. Before microscopy, embryos were anesthetized with tricaine (0.168mg/mL) and after experiments they were euthanized at 6 dpf (or 4 dpi) by an overdose of tricaine (0.3 mg/mL).

Treatments

Diaminofluorescein-FM-diacetate (DAF-FM-DA) and diaminorhodamine-4M AM (DAR-4M AM) were purchased from Alexis Biochemical (Coger, Paris, France). Embryos were either selected at 1 dpi and transferred into water containing DAF (5 μ M) or DAR (20 μ M) and incubated at 34°C for 72 hours, or were selected at 1 dpi and incubated for at least 1 hour with indicated DAF or DAR concentrations at 4 dpi. Embryos were rinsed in water before observation. *In vivo* imaging was performed on anesthetized embryos.

The NO donor glyceryl trinitrate (GTN; Merck, Lyon France) was prepared as a 1% stock solution in ethanol and was directly added to the water at 0.35 μ M, 3.5 μ M and 35 μ M concentrations from 4 dpf to 6 dpf.

The NO scavenger 2-(4-Carboxyphenyl)-4, 4, 5, 5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (CPTIO; C221) was purchased from Sigma Aldrich and added to the water (200 μ M) after transplantation. The CPTIO containing water was replaced daily until 6 dpf.

Microscopy

Tricaine anesthetized embryos were put in a small drop of water spotted on a slide and were observed with a Leica MZFLIII fluorescence stereomicroscope bearing appropriate filters. Images of tissue sections were acquired with a Leitz Aristoplan fluorescent microscope coupled to a Leica D-LUX 3LMS camera. *In vivo* images of fluorescent labeled embryos were taken at the CEllmaP platform in Dijon with a Zeiss AxioVert 200M inverted fluorescence microscope (Zeiss, Göttingen, Germany) and appropriate filters (excitation 475/40 nm,

emission 530/50 nm) and a cooled charged-coupled device camera controlled with AxioVision software (Zeiss). Live images of tumor cells were collected at the DImaCell platform in Dijon with a Nikon A1-MP biphoton confocal microscope with a 25x objective. For tumor growth observation we used an Axio zoom V16 (Zeiss) microscope, composed of motorized stereo zoom microscope, a fluorescence light HPX 200 C, coupled to a Zeiss HRm CCD camera and a computer. ZEN software controlled all of the stations and the images were acquired with a 2.3x objective.

For individual tumor development analysis, each xenografted embryo was grown in separate well in 12 well plates. Tumor growth was monitored at 1dpi and 4 dpi by imaging the zebrafish embryos with a Zeiss AxioZoom V16 Macroscope with a constant exposure time. Images were acquired using 2.3x objective and analyzed with ZEN software. For the estimation of tumor size decrease red fluorescence of the tumor surface was measured with ZEN software and data was transferred to Microsoft Excel for further calculations. By this method it is only possible to quantify tumor cell loss as the overall CM-Dil charge remains stable in a growing tumor.

Histological studies

Xenografted and DAF loaded embryos were fixed in formalin (10%) for 24 h at room temperature after euthanasia with an overdose of tricaine (0.3 mg/mL). A gradual dehydration in ethanol and xylene was performed. The embryos were embedded in melted paraffin and sectioned at a 5µm thickness. Tissue sections were placed on charged slides, deparaffinised in xylene, and rehydrated through graded alcohol solutions. The sections were then stained with 4', 6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, Sigma) to visualize cell nuclei.

Whole-mount alkaline phosphatase staining

Euthanatized embryos were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS (pH 7.0) for 2 h at room temperature and then rinsed in PBS. Whole-mount staining of the fixed embryos for endogenous alkaline phosphatase activity was performed according to Nicoli and Presta [7]. Embryos were equilibrated in Tris-HCl (0.1 M; pH 9.5), MgCl₂ (50 mM), NaCl (0.1 M) and Tween (0.1%) 20 for 30 min and stained with nitroblue tetrazolium (0.4 mg/ml) and X-phosphate (0.1 g/ml; Roche) in the same buffer for 5–15 min. Staining reaction was stopped by adding PBST.

Reverse-transcription and real-time polymerase chain reaction

Total RNA from pooled embryos (batches of 20 embryos per point per experiment) was isolated with Trizol (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and reverse transcribed by Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) with random hexamers (Promega). Specific forward and reverse primers are summarized in supplementary S1 Table 1. Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) was performed with AmpliTaq Gold polymerase in an Applied Biosystems 7500 Fast thermocycler using the standard SyBr Green detection protocol (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Briefly, 12 ng of total cDNA, 50 nM (each) primers, and 1x SyBr Green mixture were used in a total volume of 20 μL. All qPCRs were done at least three times in triplicate. Expressions of all genes were normalized respective of rat and zebrafish beta-actin expression levels.

Embryo dissociation and fluorescence activated cell sorting (FACS)

For FACS analysis of endothelial cells, *Tg (fli:EGFP)* embryos were dissociated as described previously [26] and analyzed in a on a BD Bioscience LSRII cytometer.

Data analysis

Results are presented as mean \pm SE of triplicates from at least 3 independently performed experiments. Statistical differences between two groups were determined by Student's t-test and multiple comparisons by ANOVA. $P \leq 0.05$ (*) was considered to be statistically significant. NS indicates non-significant differences.

Results

Glioma cells grow in zebrafish embryos and produce NO

Around 100-200 GV1A1 glioma cells labeled with CM-Dil or CellTracker™ Green were injected into the yolk sac of 2 dpf embryos, which were then observed daily from 1 to 4 dpi to follow tumor formation (S1 Fig.). An immune rejection is not possible at this stage as the thymus is not yet functional; according to previous reports, adaptive immunity is not reached before 4 weeks after hatching [27] and only a very small number of T cells could only be observed from 9 dpf [28]. At 1 dpi, the fluorescent cells were detected in the yolk sac and at 4 dpi tumors had significantly grown and formed masses (Fig. 1A).

Fig. 1. Nitric Oxide detection in xenografted glioma cells.

(A) Embryos injected with CM-Dil labeled cells were imaged at 1 dpi (A) and 4 dpi (A'). (B) Embryos injected with CellTracker™ Green labeled cells were incubated at 4 dpi with DAR (20 μ M). The white arrow indicates the outgrowth. (B') Green labeled glioma cells, (B'') red DAR signal. The specific co-localization is reported in the merge (B'''). (C) CM-Dil labeled glioma cells transplanted in the yolk and incubated with DAF (5 μ M). Specific co-localization is reported in the merge (C'''). White arrows indicate the tumor area.

In order to detect NO production we labeled the embryos with the DAF DAF-FM-DA (4-amino-5-methylamino-2'-7'-difluorescein diacetate), a green fluorescent dye that enables de-

tection of NO production by visualization of a green fluorescent emission. NO production can thus be observed in living Zebrafish embryos by imaging [22]. The fluorophore DAR DAR-4M AM (diaminorhodamine-4M AM) was used to obtain a red label. DAR allowed us to detect NO production by emitted red fluorescence in glioma cells that were labeled with green fluorescent CellTracker™ Green. Embryos injected with green or red fluorescent labeled glioma cells were incubated with 20µM DAR or 5µM DAF. The signal detected with 20µM DAR is equivalent to that reported with 5µM DAF and generates fluorescent signals in the bulbus arteriosus, notochord, cleithrum and caudal fin [22]. Fluorescence reflecting NO production resulted in a reproducible signal in glioma areas and outgrowths at 4 dpi in the yolk sack (Figs. 1B and 1C; S2 Fig. A). In some cases, NO production was also detected in tumor environment (Fig. 1B). A case was found where DAF fluorescence formed a fine peritumoral network pattern suggesting NO production by tumor invading blood vessels (S2 Fig. B). The percentage of embryos with tumor-NO co-localization was determined. With DAF and DAR, NO production was detected in the tumor areas in 46 % of embryos (Table 1). The NO production had no impact on the survival of embryos (Table 1).

Table 1. Detection of NO production and survival of rat glioma cell xenografted zebrafish larvae

	Test	Number of embryos 1 dpi	Number of embryos 4 dpi	Survival (%) 4dpi	Number of larvae with NO production associated to tumor area 4 dpi	NO production and tumor association (%)
DAF 5 μ M	A	40	21	52.5	9	42.86
	B	40	20	50	11	55
	C	40	11	27.5	5	45.45
	D	40	8	20	3	37.5
	E	40	18	45	8	44.44
	F	40	13	37.14	7	53.85
			% min	38.69	% min	46.52
			SE	5.3	SE	2,74
DAR 20 μ M	A	39	18	46.15	8	44.44
	B	44	19	43.18	9	47.37
	C	46	19	41.3	9	47.37
			% min	43.55	% min	46.39
			SE	1.41	SE	0.98

Embryos were incubated at 1 dpi with 5 μ M DAF-FM-DA or 20 μ M DAR-4M AM. DAF-FM-DA labelling was carried out 6 times on 40 larvae and DAR-4M AM labelling was done 3 times on 39 to 46 larvae. The embryos were counted again at 4 dpi and NO production was detected by imaging with a Leica MZFLIII fluorescence stereomicroscope.

To identify the nitric oxide producing cells sections of xenografted DAF labeled embryos (Figs. 2A and 2B) were performed. The DAF signal is conserved in histological sections, so it could be observed in cytoplasm and in the nucleus of tumor cells as described previously by

Saini *et al.* [29]. Tumor cells were detected by red fluorescent cell tracker spot signals in perinuclear vesicles and large DAPI labeled nuclei. The size difference of the nuclei allowed us to distinguish rat glioma cells from zebrafish cells (Fig. 2B). In addition, DAPI labeling revealed a dividing tumor cell showing that the cells proliferate at 4 dpi (Fig. 2B). Live imaging of 4 dpi xenografted embryos with a biphoton confocal microscope confirmed NO in rat glioma cells (Figs. 2C and 2D). This DAF signal is specific as it disappeared after treatment with the NO scavenger CPTIO (Fig. 2D).

Fig. 2. Histology of xenografted tumors and detection of NO in cells.

Embryos engrafted with red fluorescent glioma cells and labelled with DAF-FM-DA. Embryos were fixed at 4dpi and sectioned at a 5 μ m thickness. NO production, detected with DAF signal (A', A'') was observed in cytoplasm and cell nuclei of tumor cells (yellow arrow). (B) Magnification of yellow framed areas. DAPI labeling was used to detect nuclei (B'''), enabling detection of the large glioma nuclei and of a dividing tumor cell (white arrow); purple arrows indicate nuclei from zebrafish cells. (C), (D) *In vivo* images of CM-Dil labelled glioma cells taken with a biphoton confocal microscope in 4 dpi DAF treated embryos. White arrows indicate tumor cells. (C) CM-Dil labelled red fluorescent tumor cells, (C'') DAF signal, (C''') merge. (D) Red fluorescent glioma cells in DAF and CPTIO treated embryos, (D'') CPTIO decreases DAF fluorescence intensity, showing the specificity of the DAF fluorescence. (D''') merge. White arrows indicate the tumor cells. Scale bars are 10 μ M

NO is catalyzed from L-arginine by nitric oxide synthase (NOS) enzymes, which have been identified in vertebrates, invertebrates and bacteria. Three isozymes exist in mammals: NOS1, NOS2 and NOS3 [30], and in zebrafish, NOS1, NOS2a and NOS2b [31-33]. In order to determine which *Nos* are expressed by the glioma cells *in vitro* and which are induced by the xenografts in zebrafish we performed qRT-PCR analyses. *Nos2* was clearly overexpressed in

the xenografted glioma cells when compared to *Nos1* and *Nos3* (Fig. 3A). In contrast, *Nos2* expression in cultured glioma cells depended on the cell density and was very variable (not shown). In zebrafish, *nos1* was the highest expressed NO synthase gene in both, control and xenografted embryos; there was no significant difference between control and xenografted groups. The same was the case for *nos2b*. However, for *nos2a*, the *nos* isoform that corresponds to mammalian *Nos2*, a significant increase was observed in the xenografted embryos (Fig. 3B).

Fig. 3. QRT-PCR analysis of *nos* gene expression in control and xenografted embryos.

(A) In xenografted embryos, rat *Nos2* is highly expressed in comparison to *Nos1* and *Nos3*.
(B) Zebrafish *nos1* gene is strongly expressed in transplanted and control embryos. A significant difference is only observed for *nos2a*. Error bars represent SE, * $p \leq 0,05$, ** $<0,01$ (one way ANOVA).

Effect of NO production on angiogenesis

NO is a key mediator in angiogenesis and tumor progression, but is also known to promote or inhibit vessel formation depending on concentration and duration of exposure [16]. We analyzed blood vessel formation using alkaline phosphatase labeling [7] in xenografted embryos in which we detected tumor NO production. Neovascularisation in close proximity of the tumors was observed in 85% (12/14) of the embryos presenting NO production in the tumor area (Fig. 4B). In these embryos, the network profile of phosphatase alkaline detection overlapped with the NO production profile obtained with DAF labeling (Figs. 4C and 4E) and the glioma mass (Figs. 4D and 4E). Overlap of CM-Dil and DAF signal is only partial and indicated by the arrow in Fig. 4E. In non-injected embryos, there are no vessels in this region, as reported earlier by Nicoli et al. 2007 [34], also shown in the control embryo (Fig. 4F).

Fig. 4. Alkaline phosphatase assay of xenografted DAF-FM-DA treated embryos.

Embryos were injected with red CM-Dil labeled tumor cells, incubated at 4 dpi in DAF (5 μ M) and fixed at 4dpi before detection of alkaline phosphatase activity. (A) Bright field image of the embryos before treatments. (B) Neovascularisation was observed in 12 of 14 (85.5%) embryos presenting NO production in tumor environment. (D) Fluorescence detection of glioma cells, (C) DAF signal, (E) merge. The white arrows indicate the part of the tumor mass that co-localizes with DAF fluorescence signal. (F) A control embryo with absence of vessels in this region of the yolk.

In order to find a correlation between NO production and angiogenesis, we measured the mRNA levels of rat *Vegfa* and zebrafish *vegfa* in the presence and absence of CPTIO, a NO scavenger. QRT-PCR revealed a decrease of glioma *Vegfa* expression (Fig. 5A). The link between NO production and *Vegfa* expression was verified by comparing DAF-positive and DAF-negative tumors. DAF negative tumors expressed less *Vegfa* than the NO producing tumors (Fig. 5B). Two *vegfa* genes exist in zebrafish: *vegfaa* and *vegfab* [35]. Zebrafish *vegfaa* levels also decreased in presence of the CPTIO (Fig. 5C). As the expression of *vegfab* remained unchanged in xenografted embryos, results are not shown.

Fig. 5. QRT-PCR analysis of *Vegfa* expression in control and xenografted embryos

(A) Glioma cell *Vegfa* expression significantly decreases in presence of the NO scavenger CPTIO. Error bars represent SE, **<0, 01, Student's t-test. The same effect was observed for zebrafish *vegfaa* (C), compared to non xenografted embryos and CPTIO treatment. Error bars represent SE, * $p \leq 0, 05$ (one way ANOVA). (B) Embryos were stained with DAF-FM-DA at 4 dpi and separated in DAF signal positive and negative groups. *Vegfa* mRNA level is higher in the DAF positive group. One representative experiment from three independent experiments is shown. (D) Tg (*fli*: EGFP) CPTIO treated embryos that did not receive

xenograft were lysed and endothelial cells sorted by FACS. The bars represent the mean percentage of sorted endothelial cells in presence and absence of CPTIO. Error bars represent SE, * $p < 0, 05$, Student's t-test. (E) Zebrafish embryos were incubated with increasing concentrations of GTN. Expression of zebrafish *vegfaa* is dose dependent at the indicated concentrations. One representative experiment from three independent experiments is shown.

The effect of NO on endothelial cells was confirmed by incubation of non-xenografted embryos of the transgenic line Tg (*fli:EGFP*) in 200 μ M of CPTIO from 2 dpf to 6 dpf. At 6 dpf, the embryos were dissociated and the number of endothelial cells were quantified by FACS analysis. In fact, a significant decrease in endothelial cell numbers was observed when embryos were treated with CPTIO compared to controls (Fig. 5D). This result correlates with the increase of zebrafish *vegfaa* expression when non-xenografted embryos were treated with increasing concentrations of the nitric oxide donor GTN (Fig. 5E).

NO and tumor growth

We assessed the effect of NO on tumor growth by imaging untreated and CPTIO treated xenografted embryos and by comparing tumor size at 1 dpi and 4 dpi in both groups. At 4 dpi, in the untreated group tumors have grown with local invasion of the yolk (Fig. 6A), whereas in the CPTIO group, the tumor size decreased (Fig. 6B). Moreover, at 4 dpi the tumors of CPTIO treated embryos displayed 20% lower fluorescence intensity per tumor surface than those of the control group (Fig. 6C), which is a sign of a loss of tumor cells.

Fig. 6. The effect of NO on tumor growth.

CM-Dil labeled glioma cells were injected into the yolk of zebrafish embryos at 2 dpf and incubated with CPTIO (200 μ M). Images were taken at 1 dpi and 4 dpi. Images (A, A'') and (B, B'') show the tumors at 1 dpi and 4 dpi for CPTIO treated embryos and controls. At 4 dpi,

tumors have increased in size in untreated embryos (A''-A''') in comparison to CPTIO treated embryos (B''-B'''). (C) Percentage of fluorescence intensity of the tumor surfaces was determined by ZEN software (n=10). Images were taken with an Axio zoom V16 (Zeiss) microscope, with the same exposure time for all embryos. Error bars represent SEM, *** $p < 0,001$, (one way ANOVA). (D) QRT-PCR analysis of *Cyclin D1* gene expression in untreated and CPTIO treated xenografted embryos. *Cyclin D1* expression was decreased upon CPTIO treatment. One representative experiment from four independent experiments is shown.

Cyclin D1 regulates the transition from the G1 phase to the S phase of the cell cycle. Amplification or over-expression of *Cyclin D1* plays a pivotal role in the development of a subset of human cancers, including those of the breast, liver, retina and esophagus [36,37]. The expression of rat *Cyclin D1* was analyzed in the xenografts by qRT-PCR, in order to see if there is a correlation with NO production. In fact, a decrease of rat *Cyclin D1* expression was noted in CPTIO treated xenografted embryos when compared to the control (Fig. 6D). This indicates that the glioma cell proliferation is hampered by the absence of nitric oxide.

Discussion

There is increasing evidence that NO plays a role in tumor angiogenesis, vascular functions, tumor progression and metastasis [16-18]. Most of the *in vivo* experimentations performed so far were carried out in mammalian models or *in vitro* where it is difficult to assess the importance of tumor environment, space repartition and dynamics of NO production along tumor growth [38].

A BD-IX rat glioma xenograft model was developed in zebrafish to study tumor NO production and its effects *in vivo*. When injected in the yolk sac, tumor cells formed masses at the

injection site. We show that the NO specific probes DAF-FM-DA and DAR-4M-AM revealed NO production in tumor areas and inside tumor cells. NO could be co-localized with the tumor cells as shown by histological and biphoton confocal analysis (Fig. 2). NO could also be detected in regions near tumors, and in one case DAF fluorescence had a vessel-like pattern, suggesting the presence of NO in the blood vessels (S2 Fig. B). However, only 45% of tumors or parts of tumors were positive for NO. This could be explained by cellular heterogeneity in this mixed rat glioma line [23] or shear stress that has been reported to be able to induce *NOS2* expression[39,40].

NO is produced by specific enzymes, the NOS family. The rat G1A1 glioma cell line used in this study expressed *Nos2* and low levels of the other *Nos*. While *Nos2* expression was highly variable *in vitro*, it was over-expressed and stable in the xenografts. When we analyzed zebrafish *nos* expression in whole embryos injected with the glioma cells, we did not detect any significant increase in zebrafish *nos1* and *nos2b* isoforms but saw an increase of *nos2a* levels, suggesting an effect of tumor-produced NO on zebrafish cells.

In several earlier reports, tumor xenografts have been shown to be vascularized in zebrafish [8,34,41]. Angiogenesis was also detected in a large proportion of the zebrafish embryos displaying NO production in the xenografted gliomas, indicating that our model allows the exploration of the relationships between these events [42]. Tumor angiogenesis has been shown to be induced by tumor-derived VEGFA production in zebrafish [11,34,43,44]. Our data confirms rat *Vegfa* expression in the xenografts but also show increase of *vegfaa* expression in the xenografted embryos. The significant decrease of glioma-derived and zebrafish *Vegfa* expression in the presence of CPTIO confirmed this NO link with angiogenesis. In addition, CPTIO treatment decreased the number of endothelial cells of non-xenografted zebrafish embryos.

Finally, we show that NO scavenging by CPTIO has an effect on tumor growth. When the xenografted embryos were treated with CPTIO, the tumor fluorescence intensity was decreased by 20% compared to the controls at 4 dpi. This decrease can be explained by a loss of cells, as the control group did not change in CM-Dil fluorescence intensity. This result is supported by a decrease of *Cyclin D1* expression under CPTIO treatment. This data confirms an earlier report showing that total inhibition of NO by scavengers reduced tumor vascularization and tumor growth [45].

In conclusion, we demonstrate that glioma cell xenograft model in zebrafish enables *in vivo* imaging of tumor NO production and the study of NO effects on tumor growth. This model may be useful for preclinical development of anti-angiogenic or other antitumor drugs targeting NO.

Acknowledgements

The authors would like to thank André Bouchot and Benoit Gasquet at the CellimaP platform (Dijon) and Pascale Winckler at DImaCell/PIMS platform (Dijon) for their help on image acquisition and processing, Arlette Hamman for FACS analysis and Dominique Cathelin for the gift of the glioma cells.

References

1. Li P, White RM, Zon LI. Transplantation in zebrafish. *Methods Cell Biol.* 2011; 105: 403-417.
2. Taylor AM, Zon LI. Zebrafish tumor assays: the state of transplantation. *Zebrafish.* 2009; 6: 339-346.
3. White RM, Sessa A, Burke CJ, Bowman TV, LeBlanc J, Ceol CJ et al. Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis. *Cell Stem Cell.* 2008; 7: 183-189.
4. Haldi M, Ton C, Seng WL, McGrath P. Human melanoma cells transplanted into zebrafish proliferate, migrate, produce melanin, form masses and stimulate angiogenesis in zebrafish. *Angiogenesis.* 2006; 9: 139-151.
5. Topczewska JM, Postovit LM, Margaryan NV, Sam A, Hess AR, Wheaton WW, et al. Embryonic and tumorigenic pathways converge via Nodal signaling: role in melanoma aggressiveness. *Nat Med.* 2006; 12: 925-932.
6. Lee LM, Seftor EA, Bonde G, Cornell RA, Hendrix MJ. The fate of human malignant melanoma cells transplanted into zebrafish embryos: assessment of migration and cell division in the absence of tumor formation. *Dev Dyn.* 2005; 233: 1560-1570.
7. Nicoli S, Presta M. The zebrafish/tumor xenograft angiogenesis assay. *Nat Protoc.* 2007; 2: 2918-2923.
8. Stoletov K, Montel V, Lester RD, Gonias SL, Klemke R. High-resolution imaging of the dynamic tumor cell vascular interface in transparent zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104: 17406-17411.
9. Marques IJ, Weiss FU, Vlecken DH, Nitsche C, Bakkers J, Lagendijk AK, et al. Metastatic behaviour of primary human tumours in a zebrafish xenotransplantation model. *BMC Cancer.* 2009; 9: 128.
10. Ghotra VP, He S, de Bont H, van der Ent W, Spaik HP, van de Water B, et al. Automated whole animal bio-imaging assay for human cancer dissemination. *PLoS One.* 2012; 7: e31281.
11. He S, Lamers GE, Beenakker JW, Cui C, Ghotra VP, Danen EH, et al. Neutrophil-mediated experimental metastasis is enhanced by VEGFR inhibition in a zebrafish xenograft model. *J Pathol.* 2012; 227: 431-445.
12. Geiger GA, Fu W, Kao GD. Temozolomide-mediated radiosensitization of human glioma cells in a zebrafish embryonic system. *Cancer Res.* 2008; 68: 3396-3404.
13. Zhao H, Tang C, Cui K, Ang BT, Wong ST. A screening platform for glioma growth and invasion using bioluminescence imaging. *J Neurosurg.* 2009; 111: 238-246.
14. Pruvot B, Jacquelin A, Droin N, Auberger P, Bouscary D, Tamburini J, et al. Leukemic cell xenograft in zebrafish embryo for investigating drug efficacy. *Haematologica.* 2011; 96: 612-616.
15. Corkery DP, Delleire G, Berman JN. Leukaemia xenotransplantation in zebrafish--chemotherapy response assay in vivo. *Br J Haematol.* 2011; 153: 786-789.
16. Burke AJ, Sullivan FJ, Giles FJ, Glynn SA. The yin and yang of nitric oxide in cancer progression. *Carcinogenesis.* 2013; 34: 503-512.
17. Jenkins DC, Charles IG, Thomsen LL, Moss DW, Holmes LS, Baylis SA, et al. Roles of nitric oxide in tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92: 4392-4396.
18. Fukumura D, Kashiwagi S, Jain RK. The role of nitric oxide in tumour progression. *NATURE REVIEWS CANCER.* 2006; 6: 521-534.
19. Nagano T, Yoshimura T. Bioimaging of nitric oxide. *Chem Rev.* 2002; 102: 1235-1270.

20. Kojima H, Urano Y, Kikuchi K, Higuchi T, Hirata Y and Nagano T. Fluorescent Indicators for Imaging Nitric Oxide Production. *Angewandte Chemie*. 1999; 38: 3209 - 3212.
21. Kojima H, Hirotsu M, Nakatsubo N, Kikuchi K, Urano Y, Higuchi T, et al. Bioimaging of Nitric Oxide with Fluorescent Indicators Based on the Rhodamine Chromophore. *Anal Chem*. 2001; 73: 1967–1973.
22. Lepiller S, Laurens V, Bouchot A, Herbomel P, Solary E, and Chluba J. Imaging of nitric oxide in a living vertebrate using a diamino-fluorescein probe. *Free Radic Biol Med*. 2007; 43: 619-627.
23. Cornain S, Carnaud C, Silverman D, Klein E, Rajewsky MF. Spleen-cell reactivity against transplanted neurogenic rat tumors induced by ethylnitrosourea: uncovering of tumor specificity after removal of complement-receptor-bearing lymphocytes. *Int J Cancer*. 1975; 16: 301-311.
24. Duvillard C, Benoit L, Moretto P, Beltramo JL, Brunet-Lecomte P, Correia M, et al. Epinephrine enhances penetration and anti-cancer activity of local cisplatin on rat subcutaneous and peritoneal tumors. *Int J Cancer*. 1999; 81: 779-784.
25. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*. 1995; 203: 253-310.
26. Covassin L, Amigo JD, Suzuki K, Teplyuk V, Straubhaar J, and Lawson ND. Global analysis of hematopoietic and vascular endothelial gene expression by tissue specific microarray profiling in zebrafish. *Dev Biol*. 2006; 299: 551-562.
27. Trede NS, Langenau DM, Traver D, Look AT, Zon LI. The use of zebrafish to understand immunity. *Immunity*. 2004; 20: 367-379.
28. Danilova N, Hohman VS, Sacher F, Ota T, Willett CE, and Steiner LA. T cells and the thymus in developing zebrafish. *Dev Comp Immunol*. 2004; 28: 755-767.
29. Saini R, Patel S, Saluja R, Sahasrabudhe AA, Singh MP, Habib S, et al. Nitric oxide synthase localization in the rat neutrophils: immunocytochemical, molecular, and biochemical studies. *J Leukoc Biol*. 2006; 79: 519-528.
30. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012; 33: 829-837, 837a-837d.
31. Lepiller S, Franche N, Solary E, Chluba J, Laurens V. Comparative analysis of zebrafish *nos2a* and *nos2b* genes. *Gene*. 2009; 445: 58-65.
32. Poon KL, Richardson M, Korzh V. Expression of zebrafish *nos2b* surrounds oral cavity. *Dev Dyn*. 2008; 237: 1662-1667.
33. Poon KL, Richardson M, Lam CS, Khoo HE, Korzh V. Expression pattern of neuronal nitric oxide synthase in embryonic zebrafish. *Gene Expr Patterns*. 2003; 3: 463-466.
34. Nicoli S, Ribatti D, Cotelli F, Presta M. Mammalian tumor xenografts induce neovascularization in zebrafish embryos. *Cancer Res*. 2007; 67: 2927-2931.
35. Bahary N, Goishi K, Stuckenholtz C, Weber G, Leblanc J, Schafer CA, et al. Duplicate *VegfA* genes and orthologues of the KDR receptor tyrosine kinase family mediate vascular development in the zebrafish. *Blood*. 2007; 110: 3627-3636.
36. Klein EA, Assoian RK. Transcriptional regulation of the cyclin D1 gene at a glance. *J Cell Sci*. 2008; 121: 3853-3857.
37. Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology*. 2004; 145: 5439-5447.
38. Wink DA, Ridnour LA, Hussain SP, Harris CC. The reemergence of nitric oxide and cancer. *Nitric Oxide*. 2008; 19: 65-67.
39. Gosgnach W, Messika-Zeitoun D, Gonzalez W, Philippe M, Michel JB. Shear stress induces iNOS expression in cultured smooth muscle cells: role of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000; 279: C1880-1888.

40. Ozawa N, Shichiri M, Iwashina M, Fukai N, Yoshimoto T, and Hirata Y. Lamina shear stress up-regulates inducible nitric oxide synthase in the endothelium. *Hypertens Res.* 2004; 27: 93-99.
41. Nicoli S, Presta M. The zebrafish/tumor xenograft angiogenesis assay. *Nat Protoc.* 2007; 2: 2918-2923.
42. Frerart F, Lobysheva I, Gallez B, Dessy C, Feron O. Vascular caveolin deficiency supports the angiogenic effects of nitrite, a major end product of nitric oxide metabolism in tumors. *Mol Cancer Res.* 2009; 7: 1056-1063.
43. Zhao C, Wang X, Zhao Y, Li Z, Lin S, Wei Y, et al. A novel xenograft model in zebrafish for high-resolution investigating dynamics of neovascularization in tumors. *PLoS One.* 2011; 6: e21768.
44. Yang X, Cui W, Yu S, Xu C, Chen G, Gu A, et al. A synthetic dl-nordihydroguaiaretic acid (Nordy), inhibits angiogenesis, invasion and proliferation of glioma stem cells within a zebrafish xenotransplantation model. *PLoS One.* 2014; 9: e85759.
45. Flitney FW, Pritchard RJ, Kennovin GD, Bisland SK, Hirst DG, and Fricker SP. Antitumor actions of ruthenium(III)-based nitric oxide scavengers and nitric oxide synthase inhibitors. *Mol Cancer Ther.* 2001; 10: 1571-1580.

Supporting Information

S1 Table. Primers used for qRT-PCR.

S1 Fig. Xenotransplantation procedure. DAF: DAF-FM-DA, DAR: DAR-4M AM, PA: Alkaline phosphatase assay.

S2 Fig. Images of nitric oxide detection in xenografted embryos. Embryos were injected with CM-Dil labeled glioma cells. At 4dpi DAF (5 μ M) was added to the water. After rinsing embryos were imaged with an inverted fluorescence microscope. (A) Bright field image of a xenografted embryo at 4 dpi; (A') CM-Dil labeled tumor cells; (A'') DAF label; (A''') merge. The white arrows indicate tumor mass. An embryo with a different DAF-FM-DA pattern is shown in (B). Glioma cells are red, DAF signal appears green. (B) glioma cells; (B') magnification from (B); (B'') DAF signal; (B''') merge. The white arrows indicate tumor cells, the yellow arrows the network-like DAF fluorescence pattern resembling blood vessels.

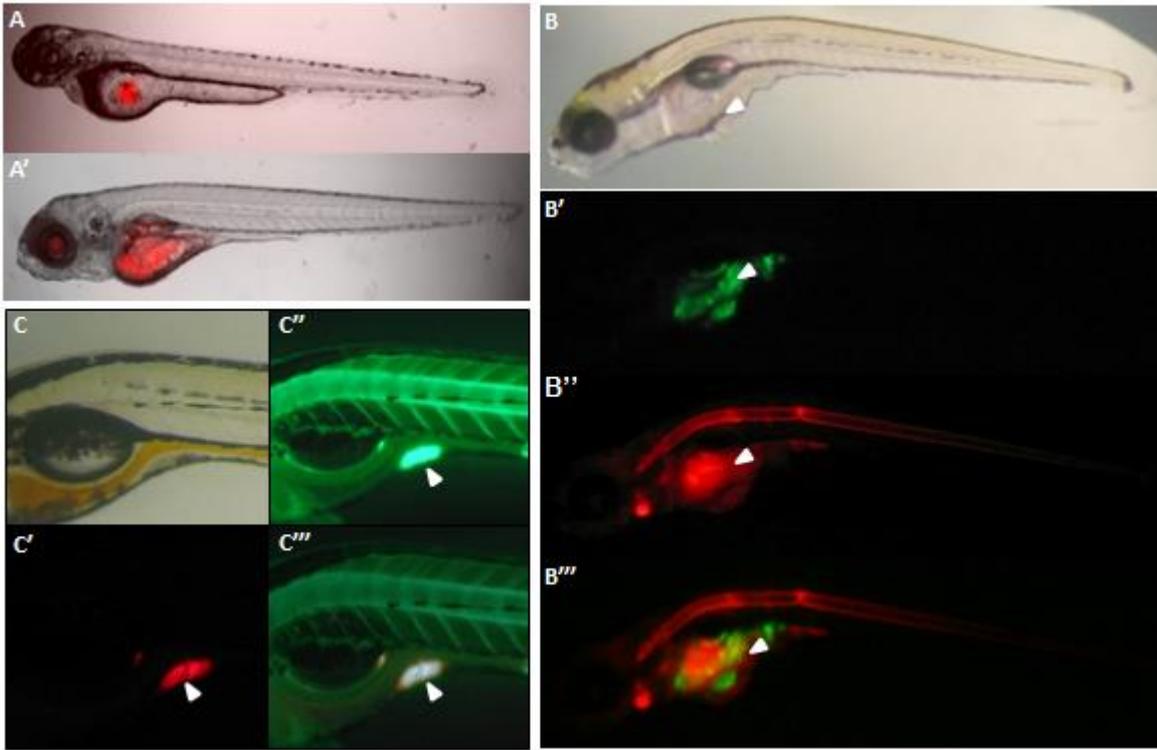


Figure 1

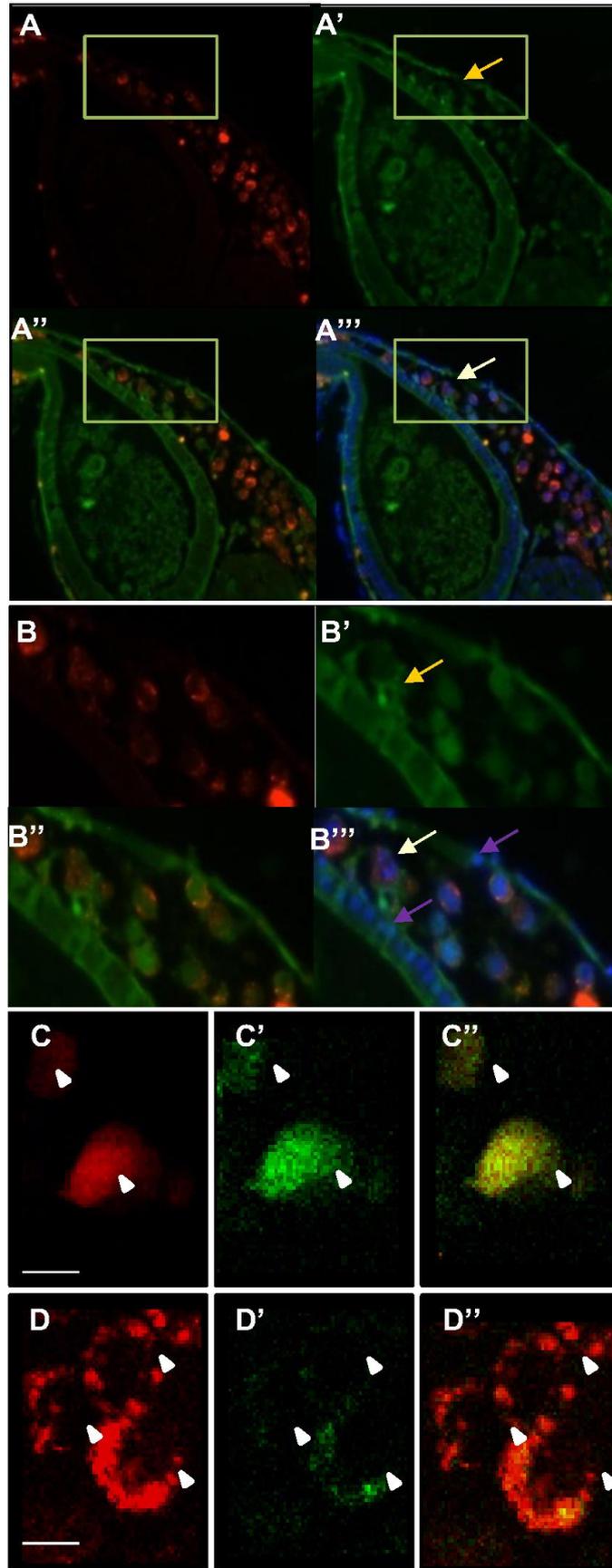


Figure 2

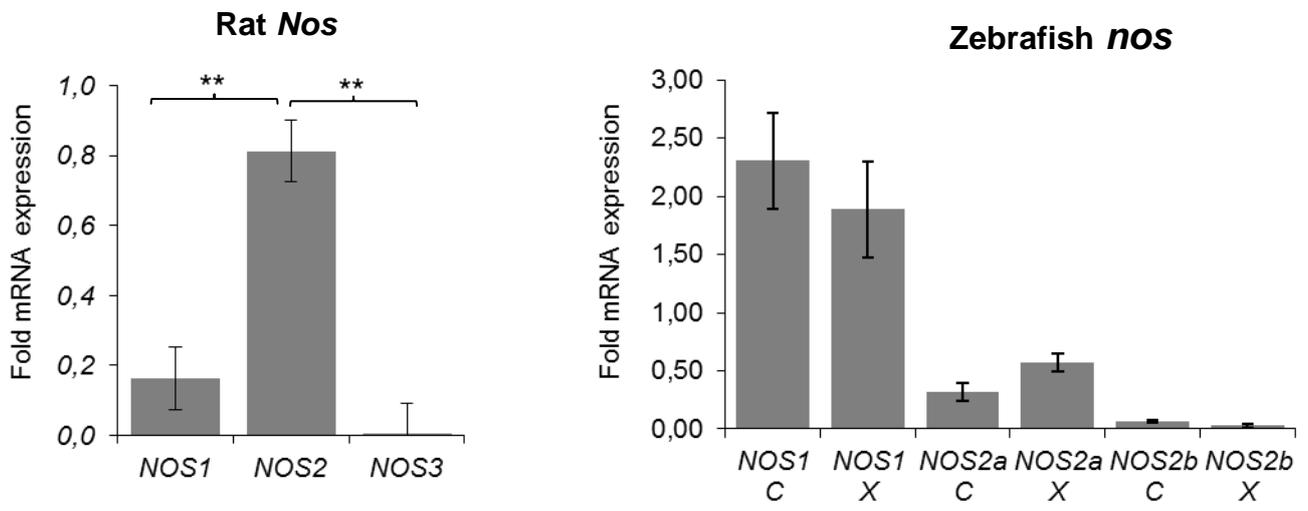


Figure 3

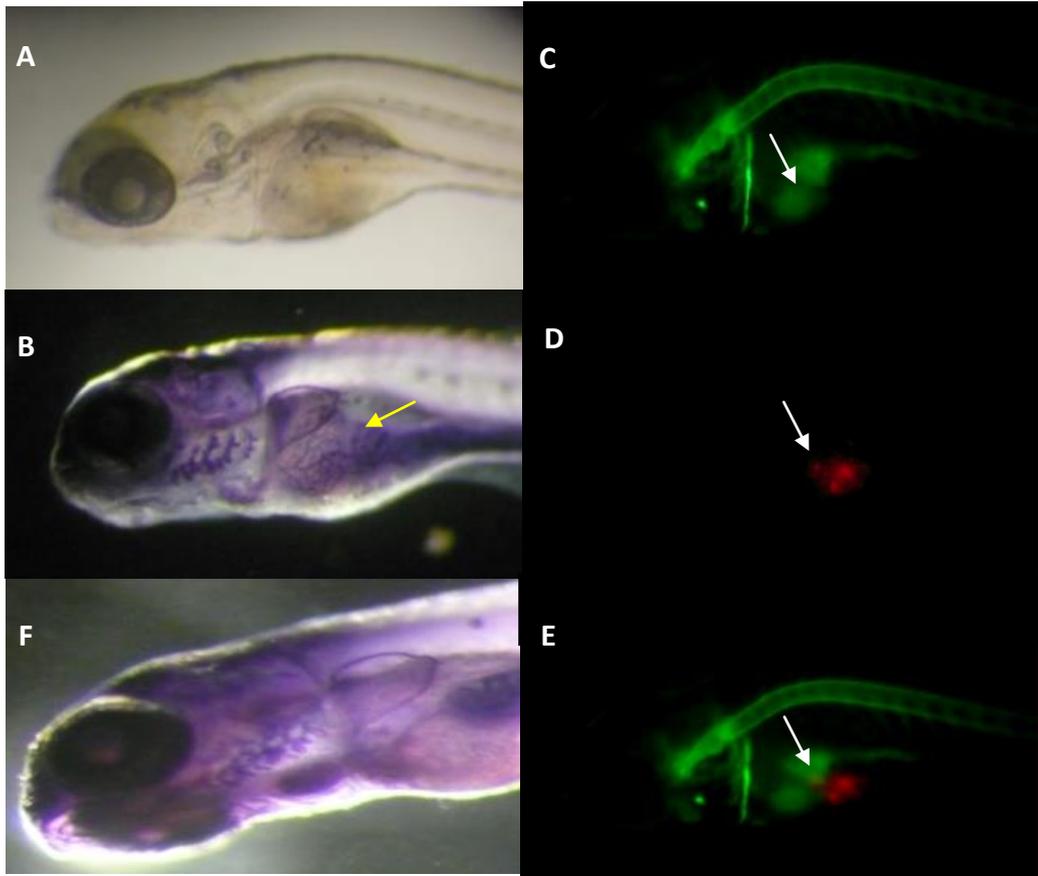


Figure 4

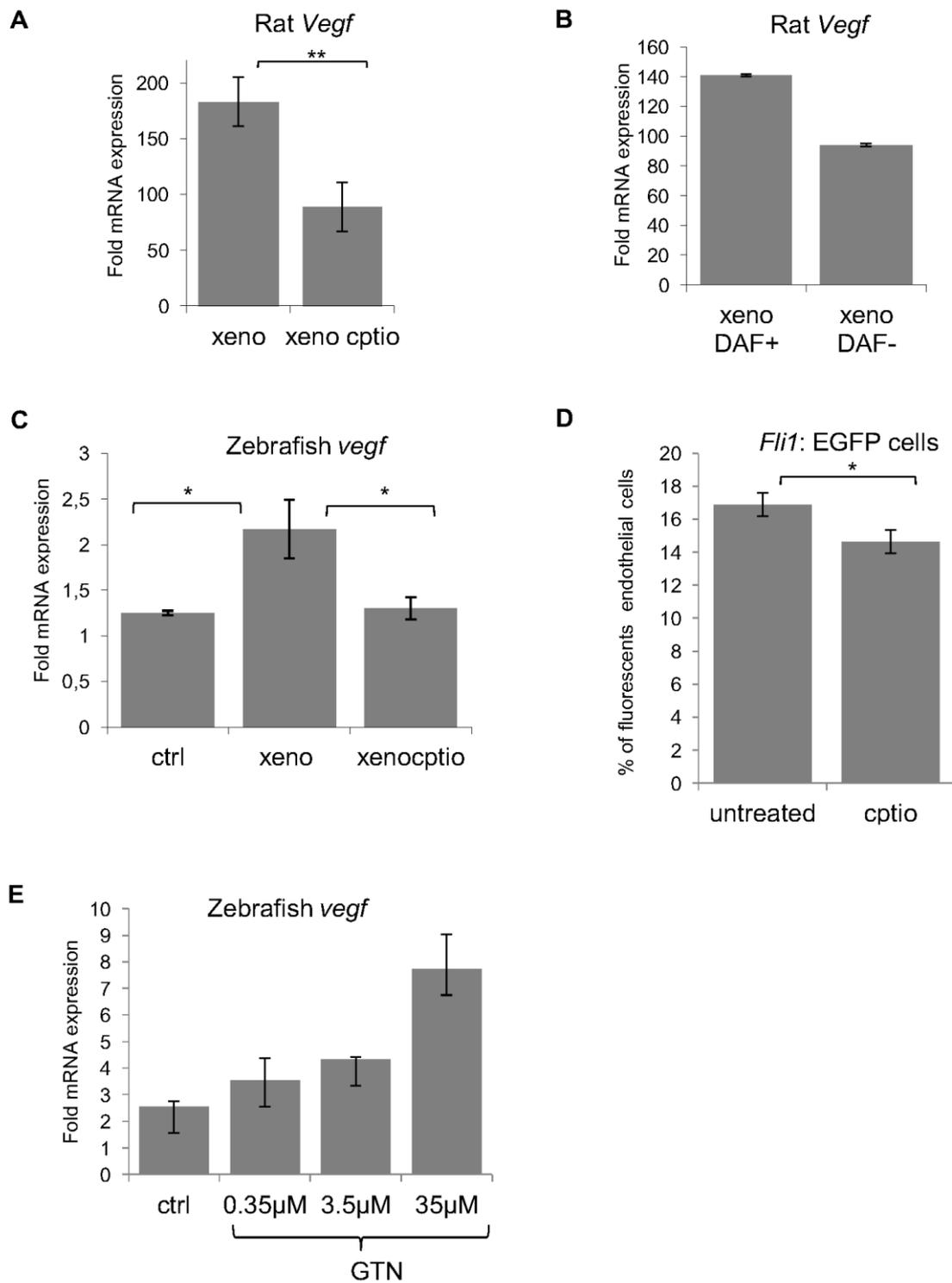


Figure 5

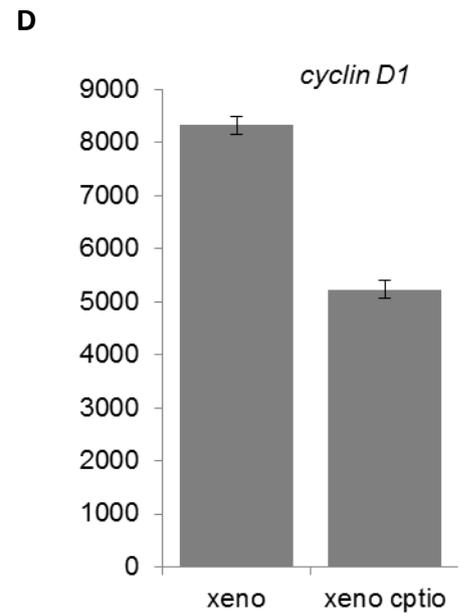
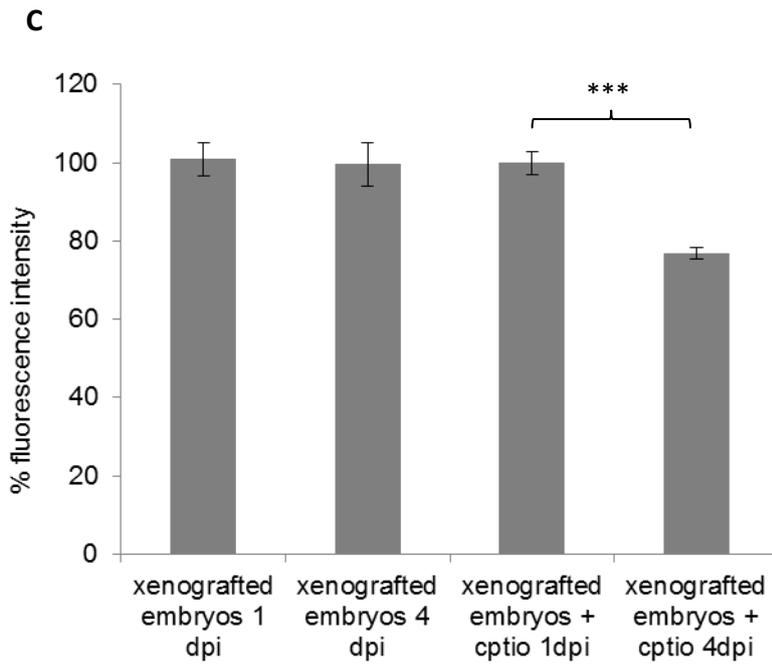
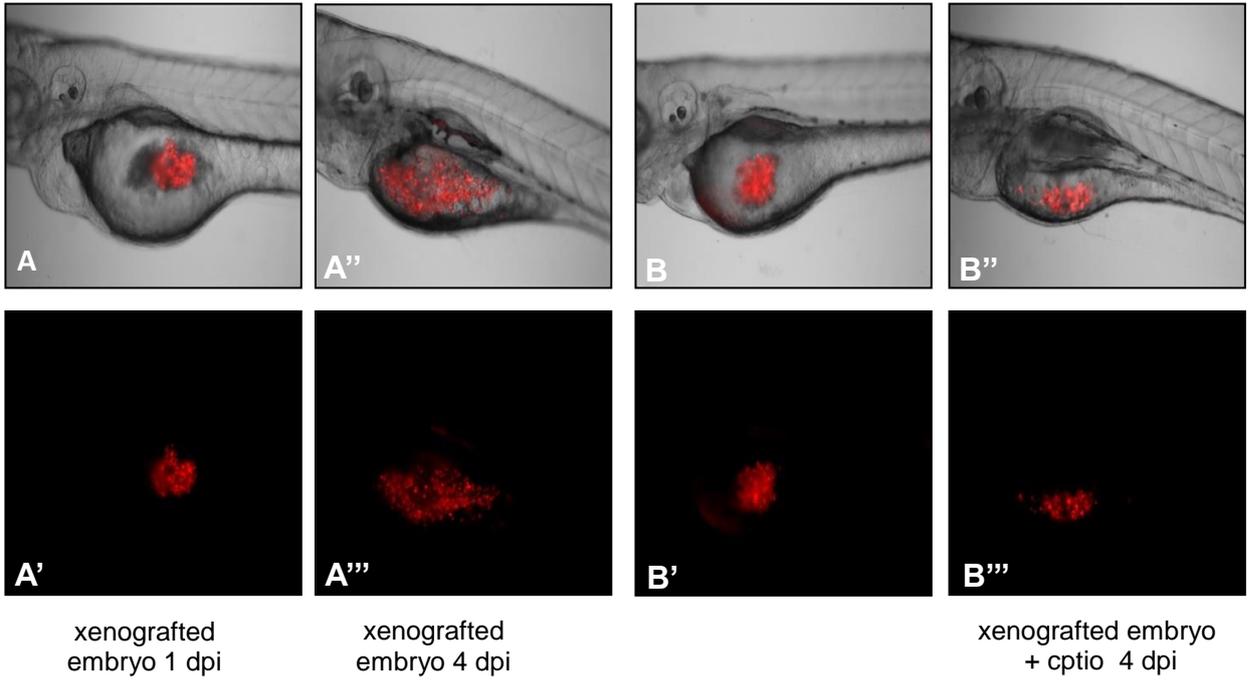
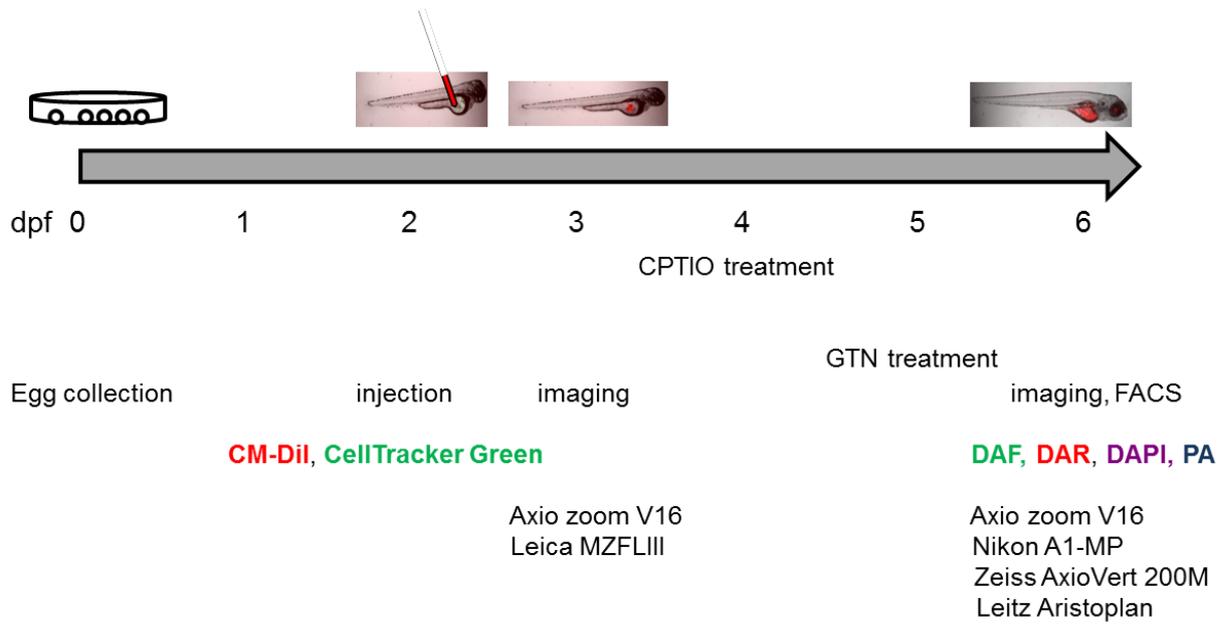


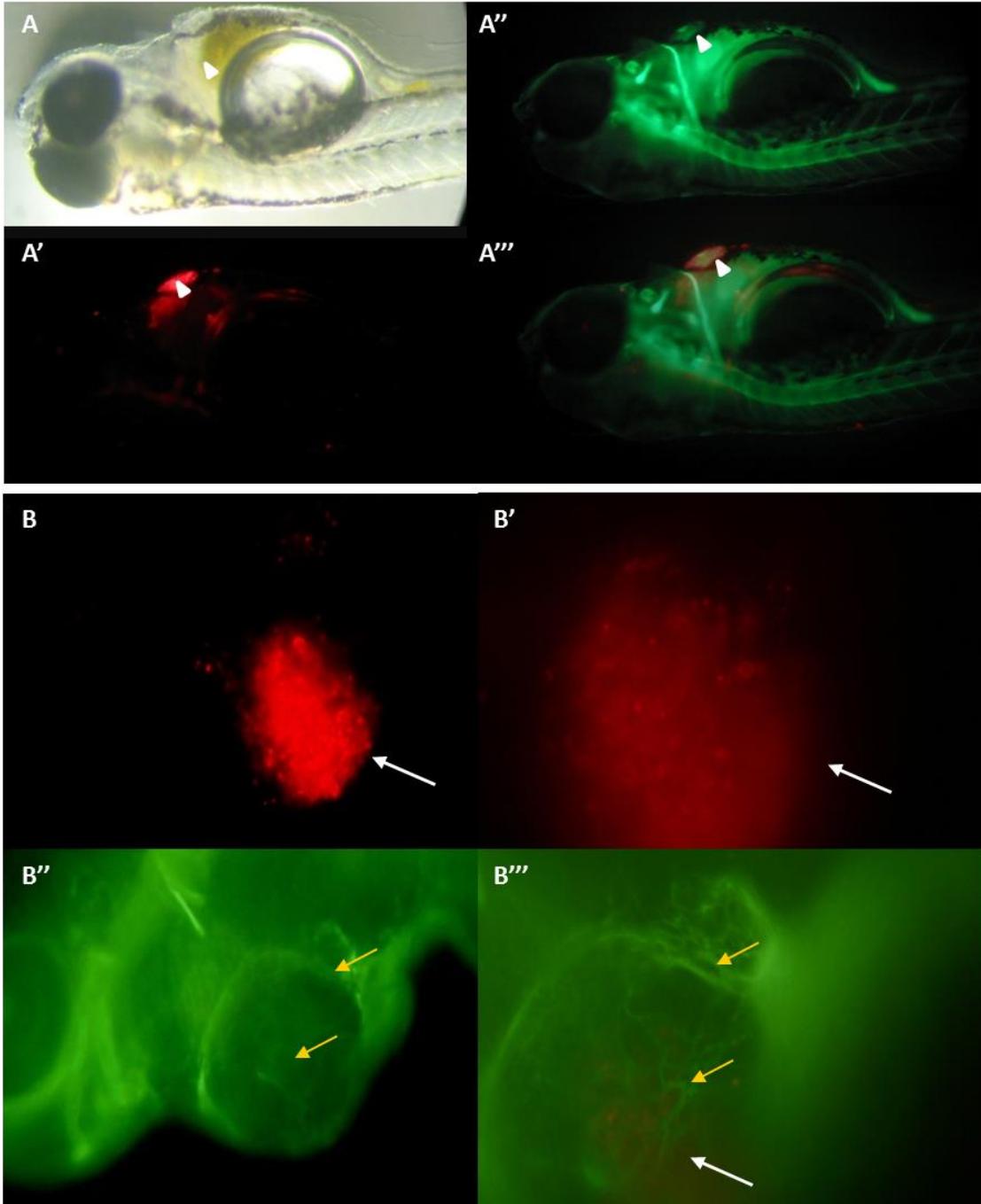
Figure 6

S1 Table 1. Primers used for qRT-PCR

Gene name	Primers	PCR product length	Accession number
Rat genes			
<i>Actb</i>	Fw: ACCCGCGAGTACAACCTTC Rv: GCAGCGATATCGTCATCCA	83 bp	NM_031144.3
<i>Vegfa</i>	Fw: ACCAGCGCAGCTATTGCCGT Rv: AGGGGCACACAGGACGGCTT	100 bp	NM_001110333.2
<i>Cyclin D1</i>	Fw: AAGGTTTtagggccatgtctg Rv: GGAGACCACATCTCCGTCTT	96 bp	NM_171992.4
<i>Nos1</i>	Fw: GACAACGTTcctgtgggtcc Rv: CCGTTCTTGGTGGGAGAC	86 bp	NM_052799.1
<i>Nos2</i>	Fw: CTCTCAGCAGCATCCACG Rv: GCGGCTGGACTTCTCACT	83 bp	NM_012611.3
<i>Nos3</i>	Fw: CCGAGGCAATCTTCGTTT Rv: GCTGGCTGTTCCAGATCC	83 bp	NM_021838.2
Zebrafish genes			
<i>actb</i>	Fw: CCCAGACATCAGGGAGTGAT Rv: CACAATACCGTGCTCAATGG	117 bp	NM_131031.1
<i>vegfaa</i>	Fw: TGTCGGGACGCATTTCGAGCG Rv: CGAGCACACACGTACATCCCGTCC	87 bp	NM_001110349.2
<i>vegfab</i>	Fw: TGCTGTTcgcgtgctccagt Rv: GCTTCTGCCTCCCTCTCTGGGT	91 bp	NM_001044855.2
<i>nos1</i>	Fw: GAAAGAGATCGAGCCTGTGC Rv: TCCTATCGATGACCCTCTGG	83 bp	NM_131660.1
<i>nos2a</i>	Fw: TGTCTTTGGCCTGGGTTC Rv: GCTCCGCAAGCTTGTCAT	77 bp	NM_001104937.1
<i>nos2b</i>	Fw: TTGGTCTTGGCTCTCGGA Rv: GATGGCTCCCAGTGTTGC	83 bp	NM_001113501.1



S1 Figure



S2 Figure

III. Conclusion et perspectives

Nos travaux nous ont permis d'étudier le rôle du monoxyde d'azote dans le développement tumoral, dans un modèle de xénogreffe *in vivo*. La particularité de cette étude est la mise en évidence dans un modèle vivant, de la production du NO par imagerie, et son association au développement tumoral.

Le marquage des gliomes par traceur chimique permet de suivre *in vivo* les cellules transplantées pendant au moins 5 jours. Au-delà, le marqueur risque d'être dégradé, ou alors l'intensité de fluorescence des cellules injectées de diminuer au cours des divisions cellulaires jusqu'à ne plus être détectable. Afin de pallier ce problème de marquage, et permettre un suivi plus long, nous pourrions utiliser la même lignée de gliome exprimant de manière stable la protéine GFP. Mais malgré une fluorescence continue, les larves transplantées présentent une survie limitée au-delà des 6 jours suivant l'injection.

Grâce aux deux marquages DAF-FM-DA et DAR-4M-AM, la production du NO a été liée aux cellules gliales du rat xénogreffées chez le poisson zèbre, et ceci en corrélation avec l'expression de la *Nos2* de rat identifiée par qPCR. Il a déjà été rapporté que les cellules gliales expriment la protéine NOS2, et que cette expression est en corrélation avec la progression tumorale (Eyler et al., 2011). Concernant l'expression différentielle de la *nos2a* du poisson zèbre entre larves contrôles et xénogreffées, le développement d'un modèle transgénique exprimant une protéine rapportrice sous le contrôle du promoteur de *nos2a* permettrait de corréler son expression avec la présence ou non d'une tumeur. Ceci ne permettrait pas d'expliquer cette variation de l'expression, mais seulement de nous confirmer le lien entre *nos2a* et développement tumoral. Il serait alors intéressant d'essayer de comprendre le rôle de *nos2a* dans le développement tumoral, et par quelle cellule de l'environnement tumorale elle serait exprimée.

Nous démontrons aussi l'effet de la réduction du taux du monoxyde d'azote par le scavenger du NO, le CPTIO. Nos résultats indiquent une baisse de l'expression des facteurs de croissance des cellules endothéliales (VEGF) jouant sur la vascularisation et la croissance de la tumeur, en présence du CPTIO. La diminution de la vascularisation à laquelle on s'attendrait

pourrait être mise en évidence par l'utilisation de la lignée transgénique Tg(*fli1*:EGFP), qui se traduit par une vascularisation fluorescente, et qui nous permettrait de visualiser une angiogenèse altérée.

Le traitement des larves xéno-greffées au CPTIO a aussi révélé un effet de ce capteur de NO sur la croissance tumorale par une perte de cellules, et la diminution de l'expression d'un marqueur de prolifération cellulaire (cyclin D1),

Avec ces résultats, nous montrons que la production du NO par des cellules de gliome xéno-greffées chez le poisson zèbre a un effet sur la croissance tumorale, et que ce modèle pourrait être utile pour le développement préclinique d'études ciblant le NO, médicaments anti-tumoraux ou alors de molécules anti-angiogéniques.

Chapitre 2 : Rôle de HSF1 dans le développement chez le poisson zèbre en absence de stress

I. Les protéines de la réponse aux chocs thermiques

L'organisme vivant est souvent confronté à des conditions environnementales qui diffèrent de l'état physiologique normal, induisant ainsi des changements moléculaires dans le but de s'adapter aux nouvelles conditions. Parmi les stress que peuvent subir ces cellules ; l'augmentation de la température, se traduisant par une synthèse de protéines appelées : protéines de choc thermique ou HSPs (Heat Shock Proteins).

Ces réponses aux stress ont été décrites pour la première fois chez la drosophile il y a plus de 50 ans (Ritossa, 1962), ensuite dans la levure, ainsi que dans plusieurs organismes. L'une des protéines les plus étudiées, HSP70 présente une homologie de 72% entre l'homme et la drosophile, et de 84% entre l'homme et le poisson zèbre.

Les protéines HSPs ont pour rôle de donner aux protéines nouvellement formées ou anormales une conformation tridimensionnelle adéquate. Elles ont aussi une fonction de « chaperon » du fait de leur association à ces protéines dénaturées, qui désorganisent le métabolisme cellulaire provoquant une toxicité (Burel et al., 1992). L'agrégation de ces protéines active la transcription des gènes *Hsp* et par conséquent la synthèse des HSPs qui corrigent par la suite les altérations morphologiques.

1) *Les Heat Shocks Factors :*

La capacité des cellules à répondre aux conditions de stress et produire en grande quantité les protéines HSP's dépend de l'activité de facteurs de transcription appelés Heat Shock Factors (HSFs). Ces protéines se lient au niveau de la région 5' des gènes *Hsp*, sur des séquences spécifiques présentes en plusieurs copies : les HSE (*Heat Shock Elements*) et induisent l'expression des différentes HSPs (Sorger and Pelham, 1987). L'activation de ces facteurs de transcription n'est pas seulement la conséquence d'une augmentation de température, mais aussi d'autres stimuli comme schématisé dans la figure 9.

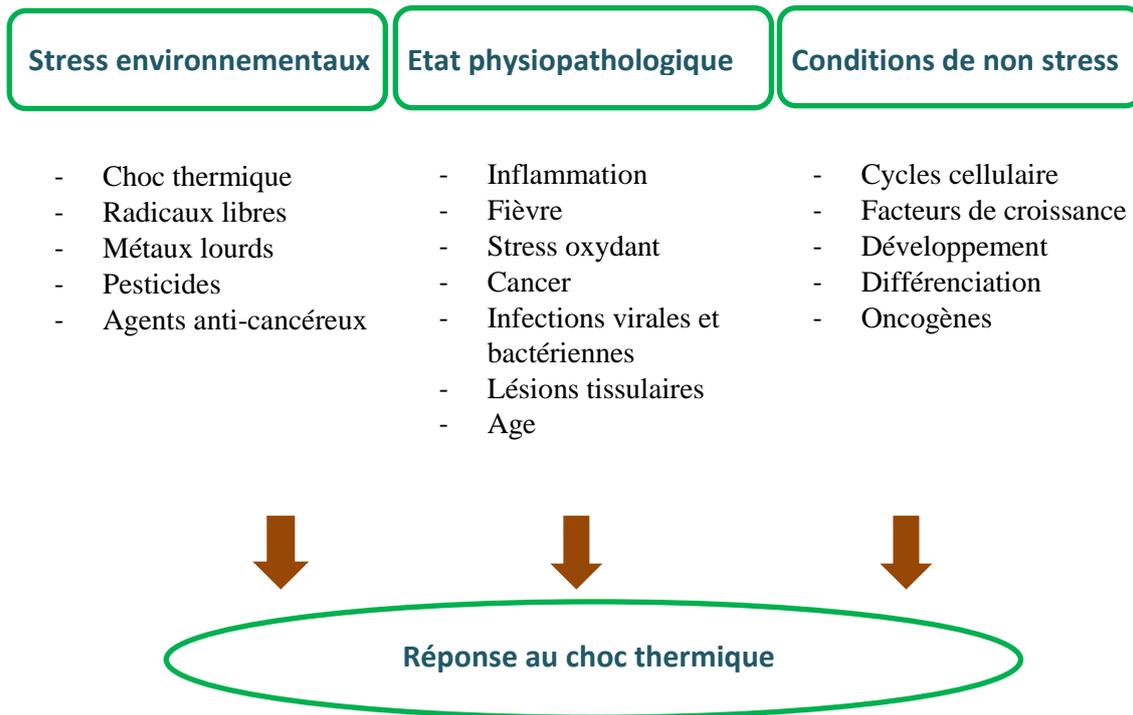


Figure 9 : Les inducteurs de la réponse au choc thermique

Ces facteurs de transcription ont été conservés durant l'évolution, car identifiés pour la première fois chez *saccharomyces cerevisiae* (Wiederrecht et al., 1988), et identifié par la suite dans d'autres espèces. Alors qu'il n'existe qu'un seul HSF chez la levure, la drosophile et le nématode, différents HSFs ont été décrits chez les vertébrés et les plantes (Akerfelt et al., 2007; Nakai, 1999; Nover et al., 1996).

HSF1 et HSF2 sont retrouvés chez tous les vertébrés. HSF4 était pendant longtemps caractéristique des mammifères, mais il a été récemment identifié chez le poisson zèbre (Swan et al., 2012). HSF3 connu pour être spécifique aux espèces aviaires, a été lui aussi identifié chez la souris (Fujimoto et al., 2010; Nakai, 1999).

Plusieurs fonctions ont été attribuées aux différents HSFs, de par leurs implications dans différents processus physiologiques et pathologiques, en régulant l'expression de leurs gènes cibles. Ainsi, HSF1, le plus étudié, est défini comme le principal régulateur des réponses aux chocs thermiques. Son inactivation s'est traduite par une absence de thermotolérance et de la protection contre l'apoptose induite par le choc thermique (McMillan et al.,

1998). Son rôle a été aussi confirmé chez les souris HSF1-knockout qui présentent un retard dans le développement, infécondité des femelles, forte production du TNF α (Tumor Necrosis Factor alpha), et absence de protection contre les réponses inflammatoires (Xiao et al., 1999). Quant à HSF2, il a été décrit comme ayant un rôle dans les processus de développement et de différenciation comme la spermatogénèse, la corticogénèse et la différenciation des cellules érythroleucémiques humaines K562 (Chang et al., 2006; Sistonen et al., 1992; Wang et al., 2004). HSF4 est impliqué dans la formation du cristallin, ou dans la maintenance de l'épithélium olfactif en coopération avec HSF1, mais n'est pas impliqué dans les réponses aux stress thermiques (Fujimoto et al., 2004; Takaki et al., 2006). HSF3 est le nouveau membre de la famille des HSFs chez les mammifères. Les auteurs ayant fait sa découverte chez la souris, rapportent son rôle dans l'activation de gènes suite à un choc thermique, mais autres que les gènes HSP. Parmi ses gènes cibles, PDZK3 et PROM2, impliqués dans l'organisation cytosquelettique et les jonctions entre les cellules.

Les fonctions biologiques des différents HSFs sont reprises dans la figure 10.

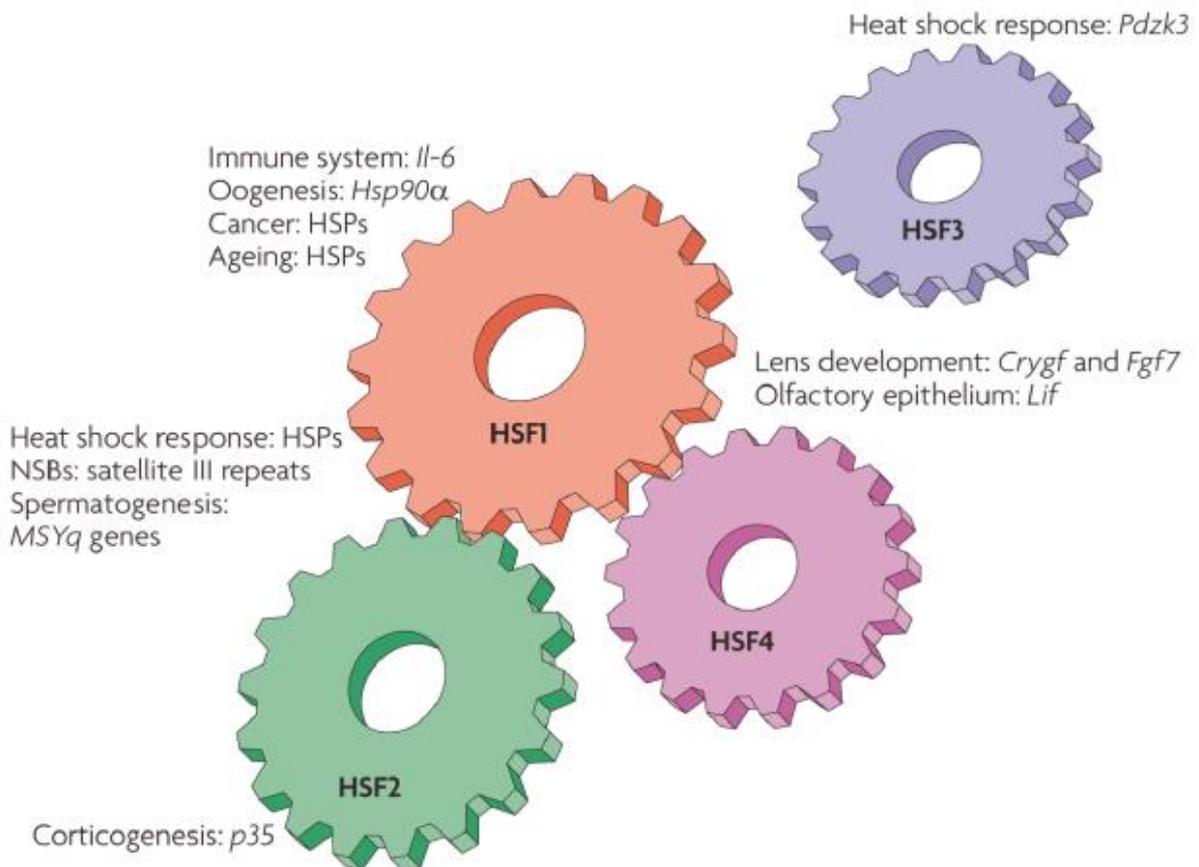


Figure 10 : La machinerie des Heat Shock Factors chez les mammifères.

Les HSFs contribuent à plusieurs processus physiologiques normaux et pathologiques par la régulation directe de leurs gènes cibles. HSF1 est le principal régulateur de la réponse au choc thermique, mais il est connu maintenant que HSF2, en formant un hétérocomplexe avec HSF1 module aussi cette expression. HSF1 est également un régulateur de la réponse immunitaire et du cancer, et il lui a été attribué avec HSF2 des fonctions dans plusieurs processus de développement, tels que l'ovogenèse, la spermatogenèse et la corticogenèse. HSF4 est impliqué dans le développement des différents organes sensoriels, en coopération avec HSF1, mais n'a aucun rôle dans la réponse au choc thermique. Le HSF3 murin récemment identifié chez les mammifères, participe à la réponse au choc thermique en se liant au promoteur *Pdzk3*, contenant le domaine PDZ. Actuellement, il n'est pas connu si HSF3 interagit avec les autres HSFs, et est schématisé par conséquent séparément des autres. *Crygf* : cristalline gamma F, *FGF7* : facteur de croissance des fibroblastes 7, *IL-6* : l'interleukine-6; *MSYq* (*male-specific region of the mouse Y chromosome long arm*) : le bras long du chromosome de souris Y où se trouve la région spécifique du mâle. D'après (Akerfelt et al., 2010)

a. Structure des HSFs :

Comme tous les autres facteurs de transcription, les HSFs sont composés de domaines fonctionnels conservés au cours de l'évolution. La figure 11 schématise la structure des HSFs chez différentes espèces.

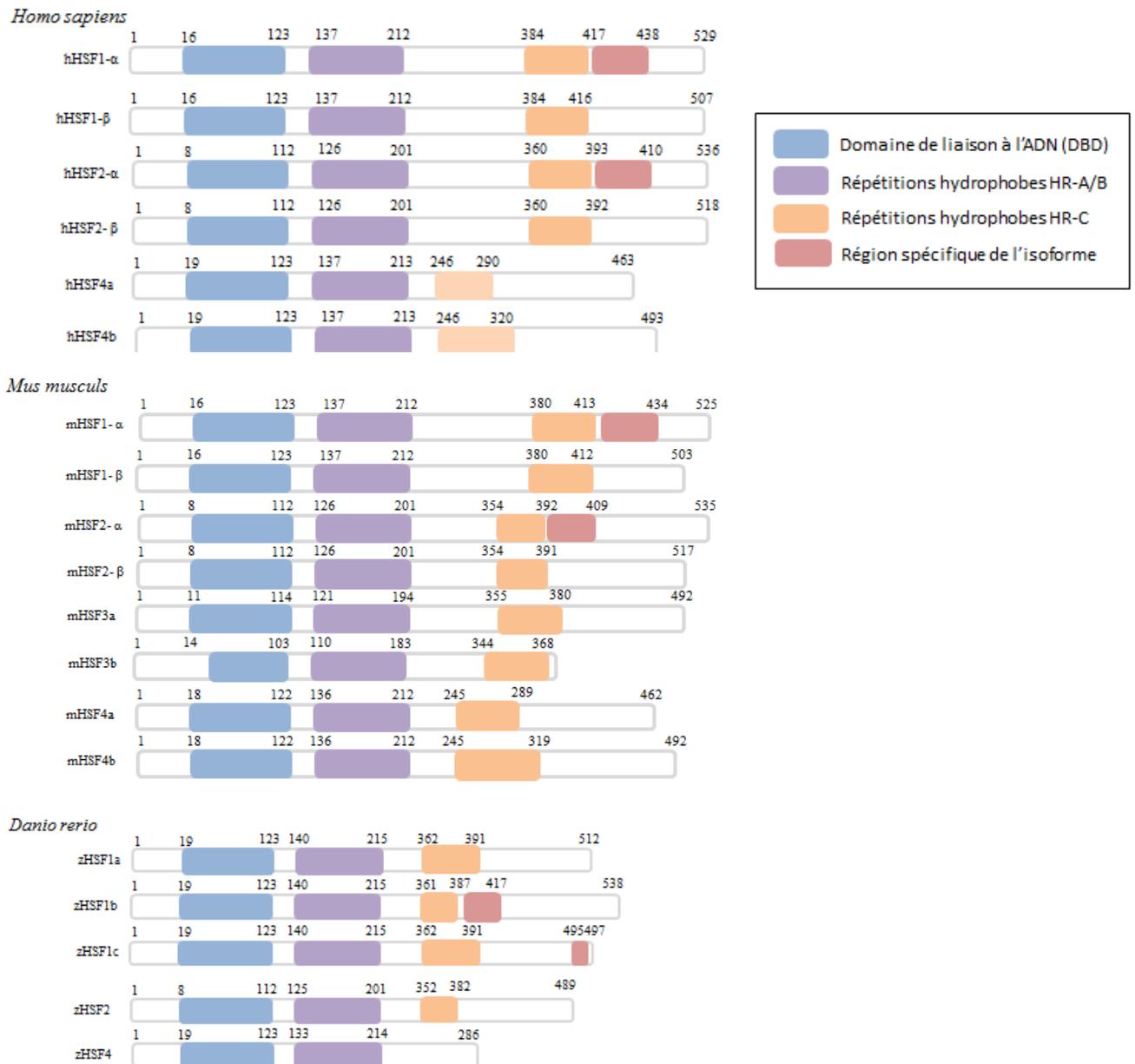


Figure 11 : Structure des HSFs chez l'homme, la souris et le poisson zèbre.

- Domaine de liaison à l'ADN ou **DBD** pour **DNA Binding Domain** : est le domaine le plus conservé, situé en N terminal et constitué d'une structure en hélice-boucle-hélice (Harrison et al., 1994; Vuister et al., 1994). Ce domaine permet la fixation du facteur à l'ADN, mais aussi l'oligomérisation et l'activité transcriptionnelle (Takemori et al., 2009).

- Un domaine adjacent au DBD d'environ 80 résidus, se présentant sous forme de 3 répétitions hydrophobes (**HR-A et HR-B**), garantissant la trimérisation (Sorger and Nelson, 1989).
- Une autre région contenant les régions hydrophobes (**HR-C**), serait responsable de la suppression spontanée de la trimérisation de HSF (Rabindran et al., 1993), ce qui pourrait expliquer la trimérisation constitutive de HSF4 qui est dépourvu des répétitions HR-C (Tanabe et al., 1999).

Chez HSF1, sur la partie extrême de la région C-terminal de la protéine, se trouve le **domaine d'activation**, présent aussi chez tous les HSF (Wu, 1995), à part chez la levure qui possède 2 domaines se trouvant dans les parties N et C-terminal, et HS4a qui n'en possède pas (Nieto-Sotelo et al., 1990; Sorger, 1990; Tanabe et al., 1999).

HSF1 possède aussi un **domaine de régulation** contrôlant le domaine d'activation, alors que chez HSF2, ce domaine est contrôlé par plusieurs domaines régulateurs (Figure 12)

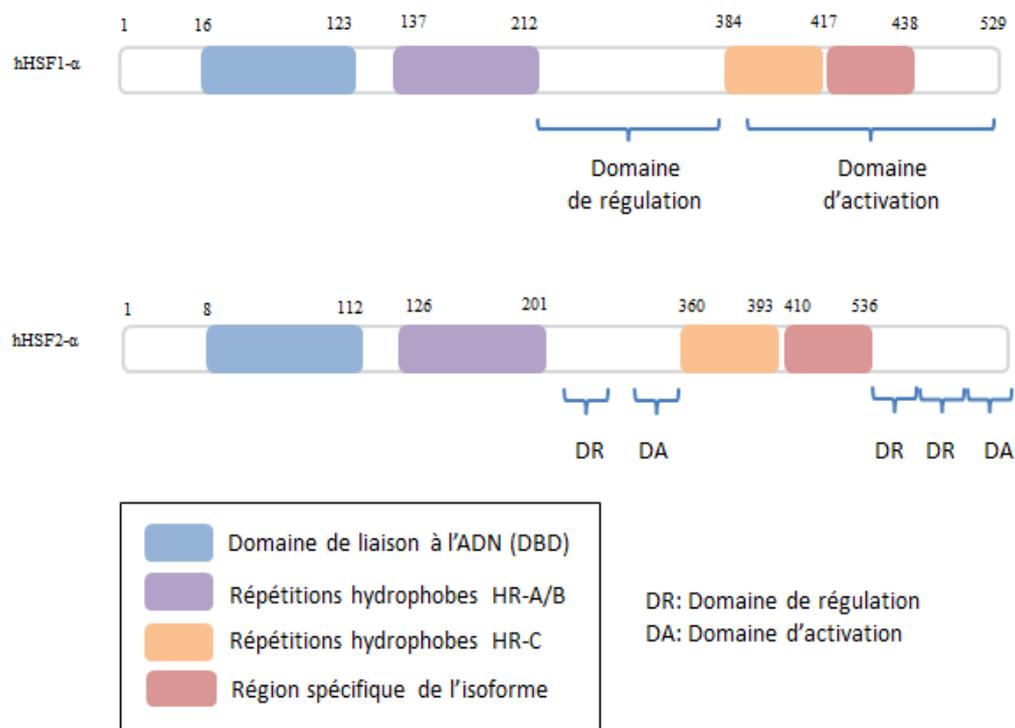


Figure 12 : Structure de HSF1 α et de HSF2 α

b. Régulation de HSF1 :

Le passage de la forme monomérique inactive à la forme trimérique active, à forte affinité pour l'ADN, est la première étape dans l'activation de HSF1, mais aussi de tous les HSF eucaryotes (Figure 13).

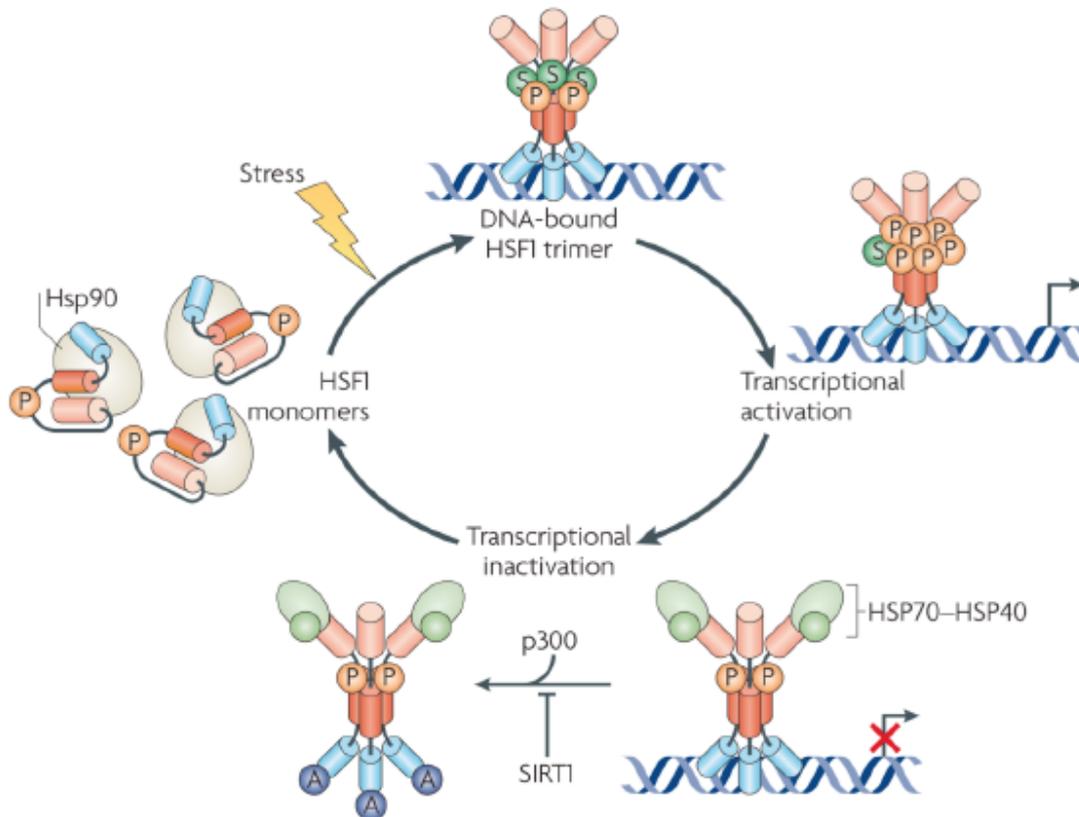


Figure 13 : Cycle d'activation et d'inhibition de HSF1

A l'état de repos, HSF1 est un monomère à la fois dans le cytoplasme et le noyau, en interaction avec HSP90. Suite au stress, HSF1 se dissocie de HSP90, lui permettant de se trimériser et de se lier aux HSE au niveau des gènes HSP. Plusieurs modifications post-traductionnelles, comme la phosphorylation et la sumoylation, sont impliquées dans la régulation de la capacité de transactivation de HSF1. HSF1 acquiert l'activité de transcription, qui est abrogée lors de la phase d'amortissement. Celle-ci comporte deux étapes de régulation : le feedback négatif de HSP, qui réprime la transactivation de HSF1, et l'inhibition de la liaison à l'ADN par l'acétylation de Lys80 dans le domaine de liaison à l'ADN de HSF1. SIRT1 régule la phase d'atténuation de la réponse au choc thermique en empêchant l'acétylation de HSF1. (D'après (Akerfelt et al., 2010))

Il y aurait ainsi des preuves d'interaction de HSF1 avec d'autres HSP à différents stades de l'activation du facteur. En absence de stress, HSF1 sous forme de monomère se trouve au niveau du cytoplasme, interagissant faiblement avec d'autres molécules chaperonnes, tels que HSP90, qui empêche son oligomérisation en le séquestrant (Ali et al.,

1998; Zou et al., 1998a). Cette forme inactive pourrait être aussi due à l'interaction de la région HR-C avec le domaine contenant les régions hydrophobique HR-A/B, inhibant la trimérisation (Rabindran et al., 1993), une interaction rompue après le stress. Une fois trimérisé, HSF1 peut rester encore inactif, tant qu'un complexe de protéines cochaperones interagit avec son domaine régulateur, comme HSP90, la protéine co-chaperone p23 (connue aussi sous le nom PTGES3), et immunophilin FK506-binding protein 5 (FKBP52 ; connu aussi sous le nom de FKBP4)(Bharadwaj et al., 1999; Duina et al., 1998; Guo et al., 2001; Pratt and Toft, 1997; Zou et al., 1998a, 1998b). Une forte expression de HSP70 et HSP90 régule négativement HSF1, et empêche la trimérisation après un choc thermique (Shi et al., 1998). Une fois HSF1 activé, il interagit avec HSP70 et la co-chaperone HSP40, mais au lieu de supprimer l'activité de liaison de HSF1 à l'ADN, cette interaction inhibe sa capacité d'activation (Abravaya et al., 1992; Baler et al., 1992; Shi et al., 1998).

Bien que le mécanisme d'inhibition reste encore mal connu, le feed-back négatif par les produits (HSPs), dépendant de l'activité transcriptionnelle de HSF1, fournit une étape importante dans le contrôle de l'activité de HSF1 par rapport à la quantité de protéines HSPs produites et la quantité de protéines dénaturées.

HSF1 est ensuite transloqué au niveau du noyau, et se lie à l'ADN grâce au domaine DBD sur les séquences spécifiques, appelés HSE (*Heat Shock Elements*), qui se présentent sous forme d'au moins 3 répétitions inversées de la séquence nGAAn (Yamamoto et al., 2009). L'architecture de ces motifs ainsi que leur nombre influenceraient le recrutement spécifique des différents HSFs (Yamamoto et al., 2009). Cette interaction seule ne suffit pas à l'activation de la transcription des gènes HSPs. Ainsi, chez la levure, même en absence de stimuli, HSF1 est lié de façon constitutive à l'ADN, sans provoquer d'activité transcriptionnelle (Jakobsen and Pelham, 1988; Sorger and Pelham, 1988). Il a été aussi démontré que des anti-inflammatoires non stéroïdiens induisent dans un modèle in vitro de cellules humaines la liaison du trimère HSF1 au niveau des HSE, mais sans pour autant induire une transcription (Jurivich et al., 1992), ce qui signifie qu'un autre évènement serait nécessaire à l'activation du facteur.

Après activation, HSF1 subit plusieurs modifications post-traductionnelles, comme la phosphorylation, la sumoylation et l'acétylation. Il a été décrit que HSF1 serait déjà phosphorylé même en état de non stress au niveau de 12 sérines (Guettouche et al., 2005).

Parmi ces résidus, la ser230 et ser326, se trouvant sur le domaine régulateur de HSF1 sont phosphorylés en réponse au stress, et contribuent à la fonction de transactivation du facteur (Guettouche et al., 2005; Holmberg et al., 2001). La phosphorylation d'autres sérines comme ser303 et ser307 serait quant à elle impliquée dans la régulation négative de l'activité transcriptionnelle de HSF1 en absence de stress.

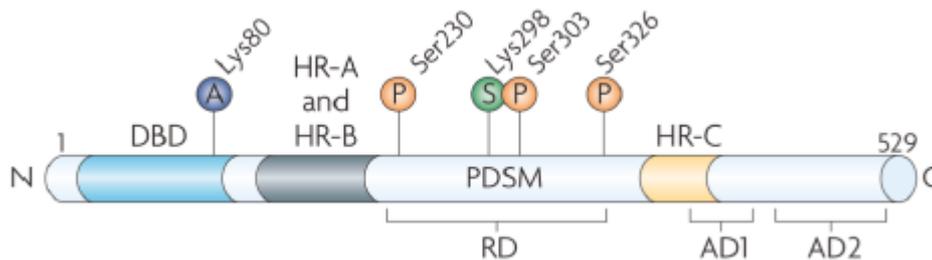


Figure 14 : Les modifications post-traductionnelles de HSF1

A indique les sites identifiés pour l'Acétylation, P pour la phosphorylation, S pour la sumoylation. Le domaine de liaison à l'ADN (DBD) et les répétitions hydrophobes (HR-A et HR-B, et HR-C) sont indiqués comme sur la figure 11, ainsi que le domaine de régulation (RD) et les domaines d'activation (AD1 et AD2). (D'après (Akerfelt et al., 2010))

Il a été rapporté aussi que la phosphorylation du résidu Ser303 serait indispensable à la sumoylation du résidu Lysine 298, un autre phénomène post-traductionnel nécessaire à l'activité de HSF1 (Hietakangas et al., 2003). La sumoylation dépendante de la phosphorylation est inversement proportionnelle à l'intensité du choc thermique et par conséquent à l'activité du Heat Shock Factor 1, il semblerait alors que cette modification régule négativement HSF1 (Hietakangas et al., 2006). Alors que la phosphorylation et la sumoylation sont temporellement liées au choc thermique, l'autre modification post-traductionnelle, l'acétylation prend effet avec l'atténuation de l'activité de HSF1. Ainsi, la sous-expression de la déacétylase SIRT 1 (Sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1) accélère la phase d'atténuation de la réponse au choc thermique, ce qui permet l'acétylation de HSF1 et par la suite le relargage de HSF1 des sites HSE des gènes HSP. Dans le cas où l'expression SIRT1 augmente, la fixation du facteur au niveau de l'ADN est prolongée grâce à l'état déacétylé de HSF1 (Westerheide et al., 2009). Il a été conclu de ces découvertes que la phase d'atténuation de HSF1 est régulée par 2 mécanismes, le premier étant le feedback des protéines HSP qui se traduit par de faibles interactions avec HSF1, et le deuxième par le rôle joué par SIRT1 dans la liaison de HSF1 aux sites HSE.

c. Interaction fonctionnelle entre les différents HSFs :

Bien que HSF1 soit le régulateur par excellence de la réponse au choc thermique, HSF2 se fixe aussi au niveau du promoteur des gènes HSP. Mais cette liaison n'est possible qu'en présence de HSF1, et sauf si le domaine de liaison à l'ADN de HSF1 n'est pas altéré (Ostling et al., 2007). Néanmoins, HSF2 module positivement et négativement l'expression stress-inductible des gènes HSP, indiquant le rôle joué par HSF2 lors des réponses au choc thermique. Ainsi, les deux facteurs de transcription formeraient des hétérotrimères grâce à leurs domaines d'oligomérisation, et se lieraient au promoteur de HSP70, et ceci pas seulement en état de stress, mais aussi lors de la différenciation des cellules K562 induites par l'hémine (Ostling et al., 2007).

2) Les protéines de choc thermique

Les Heat Shock Protein (HSP), appelées aussi protéines de stress, constitue une classe de protéines fortement conservée à travers l'évolution. Les HSPs possèdent des fonctions cytoprotectrices, et agissent comme des chaperonnes pour beaucoup de protéines cellulaires. Les principaux rôles attribués à ces protéines sont : l'import des protéines dans les compartiments cellulaires, la conformation des protéines mal conformées, la dégradation des protéines instables, et la prévention de l'agrégation des protéines. Chez les mammifères, les HSPs sont divisées en deux groupes selon leur poids moléculaire, les grandes HSPs ; à savoir HSP110, HSP90, HSP70, et HSP60, et les petites HSPs qui comprennent HSP27. Ces protéines présentent la particularité d'être exprimées soit de façon constitutive ou de façon induite, et dans différents compartiments cellulaires. Les HSPs du premier groupe sont ATP-dépendantes, et ont besoin par conséquent d'autres protéines co-chaperonnes pour permettre leur conformation et de fixer l'ATP, contrairement aux petites HSPs, qui elles sont ATP-indépendantes (Parcellier et al., 2003).

a. Les petites HSP (sHSP) :

Le groupe des petites HSPs ou small HSP (sHSP) comprend des protéines dont le poids moléculaire varie entre 15 et 30 kda, et partagent beaucoup d'homologie de séquences et de propriétés biochimiques telles que la phosphorylation et l'oligomérisation (Garrido et al.,

2012). Elles sont ATP-indépendantes, et ont pour rôle principal la protection de la cellule de l'agrégation des protéines mal conformées, ainsi qu'une fonction cytoprotectrice dans des conditions de stress, et possèdent une très grande capacité d'oligomérisation (Garrido et al., 2012). Les sHSP chez l'homme sont au nombre de 10 et sont différemment exprimées, à savoir soit ubiquitaires, soit tissus spécifiques (Kampinga et al., 2009). Structurellement, toutes les sHSP possèdent un domaine central appelé domaine α -cristalin, formé de 80 à 90 résidus (figure 15), très conservé entre les différentes protéines. Mis à part ce domaine, les sHSP ne partagent pas beaucoup de similarité au niveau de la séquence. Par contre, au niveau de la partie N-terminale qui est moins conservée, il existe une petite région riche en proline et phénylalanine, qui contient un ou deux motif WD/PF, et qu'on retrouve dans plusieurs sHSPs (Thériault et al., 2004). Ce motif serait impliqué dans le processus d'oligomérisation. Les sHSPs les plus étudiées sont HSP27 (HSPB1), l' α -A-cristalline (HSPB4) et l' α -B-cristalline (HSPB5).

- *HSP27* :

HSP27 est une protéine cytosolique, possédant 3 sérines S15, 78 et 82, qui sont susceptibles d'être phosphorylées, et modulent avec le motif WD/PF l'oligomérisation de la protéine, formant des oligomères qui peuvent aller jusqu'à 1000kda (Garrido, 2002). Ainsi, la phosphorylation de HSP27, un processus réversible, favoriserait de petits oligomères, alors que la déphosphorylation favoriserait le contraire. Ce processus dynamique d'oligomérisation dépendant de la phosphorylation, ainsi que de l'état de stress (Garrido, 2002), joue un rôle important dans l'affinité de HSP27 envers les protéines qu'elle chaperonne (Bruey et al., 2000).

La phosphorylation de HSP27 est induite en réponse à différents stress, comme le choc thermique, les facteurs stimulant la différenciation, certains agents mutagènes, des cytokines inflammatoires, des agents anti-cancéreux, ainsi que des agents oxydants (Vertii et al., 2006). Son expression est ubiquitaire, et à différents stades de développement et de différenciation. Elle a été récemment décrite comme ayant un rôle dans la dégradation de GATA-1 (un facteur de transcription érythroïde) durant le stade terminal de différenciation des érythroblastes (de Thonel et al., 2010).

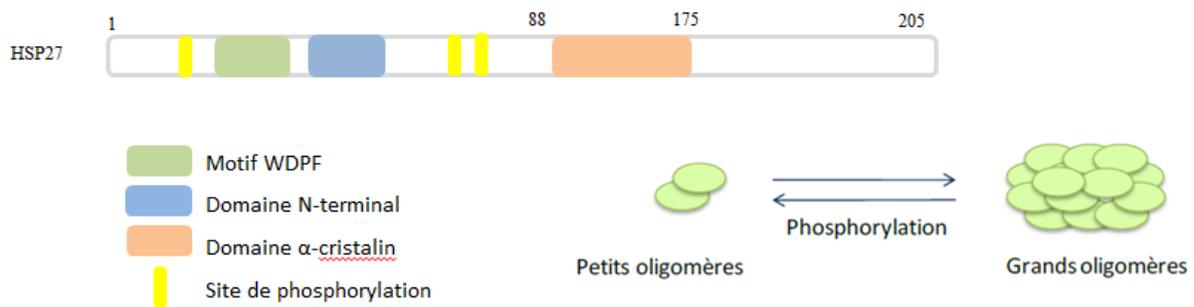


Figure 15 : Structure de HSP27

b. Les autres HSPs :

- *HSP70*:

La famille HSP70 constitue la classe la plus conservée et la mieux étudiée des HSPs. Ainsi il y aurait 95% d'homologie entre l'homme et la souris, et 85% avec le poisson zèbre. Elle englobe les protéines allant de 66 à 78 kDa qui sont codées par une famille multigénique, constituée de 11 gènes chez l'homme (Tavaria et al., 1996). Certaines d'entre elles sont principalement localisées dans le cytosol comme la HSP70 inducible (appelé simplement HSP70 ou HSP72 ou HSPA1) ou la HSC70 exprimé de façon constitutive (Hsp73 ou HSPA8). D'autres se trouvent dans les mitochondries (mtHSP70) ou dans le réticulum endoplasmique (GRP78 / Bip) (Jäättelä et al., 1998).

Les protéines HSP70s eucaryotes contiennent deux domaines fonctionnels: le domaine NH2-terminal comportant un domaine de liaison à l'ATP : ATP-Binding Domain (ABD), et le domaine de liaison au peptide : Peptide Binding Domain, se trouvant en C-terminal (PBD) (figure 16).



Figure 16 : Structure de HSP70

La forme inductible de HSP70 est issue de deux gènes, *Hsp70.1 (Hspa1a)* et *Hsp70.3 (Hspa1b)*, situés sur le chromosome 6 et dont les loci sont très proches (Milner and Campbell, 1990). Ils ne comportent pas d'intron et sont fortement inductibles par un stress. Ces deux gènes codent pour deux protéines identiques HSPA1A et HSPA1B regroupées indifféremment sous le nom de HSP70.

Dans des conditions normales, la protéine HSP70 fonctionne comme un chaperon moléculaire ATP-dépendant, en aidant le repliement des polypeptides nouvellement synthétisés, l'assemblage des complexes multi-protéiques et le transport de protéines à travers les membranes cellulaires (Shi and Thomas, 1992). Plusieurs protéines telles que HSP40, HSP110, CHIP, HOP, HIP, SAC-1 et SAC-3 ont été identifiées comme co-chaperonnes de HSP70. Elles peuvent se lier soit au domaine ABD, soit au domaine PBD de HSP70, modulant ainsi l'activité de chaperon de la protéine.

Des études d'inactivation du gène inductible montrent que HSP70 joue un rôle important dans l'apoptose. Des cellules embryonnaires de souris dont les deux gènes qui codent pour HSP70 inductible sont invalidés, sont très sensibles à l'apoptose induite par une large gamme de stimuli létaux (Schmitt et al., 2003).

Peu de choses sont connues sur les modifications post-traductionnelles de HSP70. Toutefois, certains auteurs rapportent que la protéine pourrait être transitoirement phosphorylée sur des résidus divers, tels que S400 et Y524 (Frisan et al., 2012; Knowlton et al., 2000).

HSP70 a été décrite comme étant exprimée de façon constitutive dans les érythrocytes du *Xenopus laevis*, mais son rôle reste encore mal connu (Winning and Browder, 1988).

- *HSP90*

Quatre protéines appartiennent à la famille HSP90: HSP90 α (HSPC2), HSP90 β (HSPC3), GP96 (HSPC4) et TRAP1 (HSPC5) (Kampinga et al., 2009). Les deux isoformes de HSP90 (HSP90 α et HSP90 β), identiques à 86%, sont essentiels à la survie des cellules eucaryotes. Ils sont constitutivement abondants, et représentent 1-2% des protéines cytosoliques, mais leur expression peut encore être stimulée par un stress. A ce jour, on ne distingue pas encore les 2 isoformes, qui sont regroupés sous le terme HSP90.

HSP90 est constituée de trois domaines importants (figure 17)

- Le domaine N-terminal, avec un site de liaison à l'adénine, responsable de l'activité ATPase de la protéine.
- Le domaine central fortement chargé qui possède une grande affinité pour les co-chaperonnes et les protéines clientes de HSP90.
- Le domaine de dimérisation C-terminal qui contient le motif EEVD. Ce motif lie les co-chaperonnes qui régulent la fonction ATPase de HSP90.

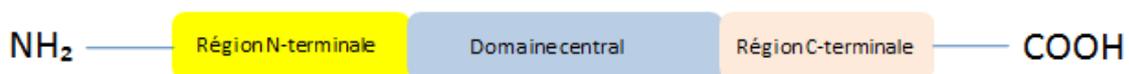


Figure 17 : Structure de HSP90

Un des rôles majeurs de HSP90 est la stabilisation de protéines appelées protéines clientes des HSP90. Parmi ces protéines clientes, les deux grandes classes sont les facteurs de transcription, comme les récepteurs aux hormones stéroïdiennes (Picard et al., 1990), et les protéines kinases telle que Akt/PKB (Protéine Kinase B)(Csermely et al., 1998)

- *HSP110*

Contrairement aux autres HSPs qui ont été intensément étudiées depuis plus de 30 ans, les chercheurs n'ont commencé à s'intéresser à HSP110 qu'au début des années 1990 (Chen et al., 1996; Lee-Yoon et al., 1995), alors que plusieurs études avaient également identifié une HSP de 110 kDa dans les premières études de la réponse au choc thermique chez les mammifères (Landry et al., 1982). Fait intéressant, certaines des premières études de Hsp110, ont démontré que son expression dans des cellules de mammifère est en corrélation avec le phénomène de la thermotolérance en coordination avec Hsp70 et Hsp90 (Subjeck et al., 1982).

Comme la plupart des HSPs, HSP110 est constitué d'un domaine en N-terminal responsable de l'activité ATPase.

c. Les protéines de la réponse au choc thermique chez le poisson zèbre :

La plupart des études sur l'expression des HSPs chez les poissons ont été effectués sur le poisson zèbre. Il possède deux familles de gènes : Les hsp constitutives, et les hsp inductibles, et qui sont tissus-dépendants au cours du développement embryonnaire. Les transcrits des hsp inductibles s'accumulent suite à un choc thermique d'une heure à 34 ° C avec une induction maximale à 37 ° C (Lele et al., 1997; Martin et al., 2002) . Cette réponse au choc thermique et à différentes toxines chimiques semble être médiée par l'activité de Hsf1, dont trois isoformes (Hsf1a, Hsf1b et Hsf1c) ont été retrouvées chez le poisson-zèbre (Rabergh et al., 2000; Wang et al., 2001). Récemment, HSF2 a été aussi cloné, et il a été démontré que les gènes HSF1 et HSF2 ont des profils d'expression similaires au niveau du cerveau durant le développement (Yeh et al., 2006).

- *HSFs* :

Le rôle des HSFs pendant le développement des vertébrés non mammifères tels que le poisson-zèbre dans des conditions physiologiques normales reste encore inconnu. Une étude a été conduite afin d'identifier le besoin de HSF1 pendant le développement embryonnaire chez le poisson zèbre. La génétique reverse utilisant les morpholinos (MO), à savoir des oligonucléotides anti-sens modifiés afin de bloquer la traduction du messenger de *hsf1*, a ainsi démontré que les embryons déficients en *hsf1* présentent un phénotype reproductible caractérisé par des yeux plus petits par rapport aux contrôles sauvages. Cette taille des yeux se traduit par un cristallin immature et une structure de la rétine désorganisée (Evans et al., 2007). L'inactivation de *hsf2* quant à elle, n'a pas donné le même phénotype que MO-*hsf1*, suggérant que *hsf1* et *hsf2* jouent des rôles distincts dans le développement chez le poisson zèbre.

Il a été déjà démontré que plusieurs HSP sont nécessaires pour l'embryogenèse normale du poisson zèbre, plus particulièrement en jouant un rôle dans le développement des yeux, des muscles, et dans la motilité des neutrophiles (Evans et al., 2005; Krone et al., 2003; Lam et al., 2013; Lele et al., 1999; Middleton and Sheldon, 2013).

- *HSP70* :

Ainsi, il a été démontré que la forme inductible de *hsp70* (*hsp70-4*) est exprimée au cours du développement embryonnaire au niveau du cristallin, à des températures de croissance normales. En plus, un fragment du promoteur de ce gène de 1,5 kb est suffisant pour diriger l'expression du gène rapporteur GFP au niveau du cristallin, ce qui suggère le rôle du gène *hsp70* durant le développement embryonnaire. L'inactivation de HSP70 s'est traduite par des embryons présentant des yeux de petite taille par rapport aux contrôles (Evans et al., 2005). L'inactivation de *hsf1* a donné le même phénotype que celle de *hsp70*, avec une baisse significative de l'expression de la protéine chez les embryons MO-*hsf1*, démontrant le rôle joué par un *hsf1* dans la régulation de *hsp70* durant le développement (Evans et al., 2007).

- *HSP27* :

Concernant la protéine HSP27 (*hspb1*), plusieurs implications lui ont été attribuées récemment en dehors de son rôle classique dans la bonne conformation des protéines. Elle est abondamment exprimée dans les tissus musculaires embryonnaires d'une grande variété d'espèces de vertébrés. Une analyse morphométrique quantitative des muscles craniofaciaux d'embryons de poissons zèbres, a révélé une réduction de 47% à la surface des coupes transversales de myofibre, dans des embryons dont le gène *hsp27* a été inactivé par rapport aux témoins (Middleton and Shelden, 2013). Dans une autre étude, une forte expression de *hsp27* après choc thermique a été corrélée avec l'augmentation du nombre des neutrophiles circulants chez des embryons de poisson zèbre (Lam et al., 2013).

II. Le poisson zèbre comme modèle hématopoïétique

Durant le développement embryonnaire des vertébrés, la formation des cellules sanguines s'étale sur deux vagues ou phases successives à différents sites anatomiques (Robb, 1997). Les premières cellules qui sont les globules rouges embryonnaires, se développent dans les îlots sanguins extra-embryonnaires chez les mammifères, un processus d'hématopoïèse embryonnaire appelée aussi « phase primitive ». Chez la souris, cela se produit à partir du septième jour embryonnaire. La proximité des premières cellules sanguines et vasculaires dans le sac vitellin, montre qu'elles seraient issues d'un seul progéniteur, les

hémangioblastes, donnant naissance aux deux lignées cellulaires (Pardanaud et al., 1989). La formation des cellules sanguines se déplace ensuite vers le foie fœtal, et par la suite à la moelle osseuse chez l'adulte. Cette phase est appelée « hématopoïèse définitive ».

L'utilisation du poisson zèbre dans l'étude de l'hématopoïèse remonte aux années 1970, avec l'analyse morphologique des cellules sanguines. La figure 18 montre les ressemblances morphologiques entre les différentes cellules sanguines matures chez l'homme et le poisson zèbre. Les études de l'hématopoïèse se sont accentuées encore plus ces dernières années avec la découverte de nouveaux mutants et l'émergence de nouvelles lignées transgéniques afin de mieux comprendre le rôle des gènes contrôlant l'hématopoïèse.

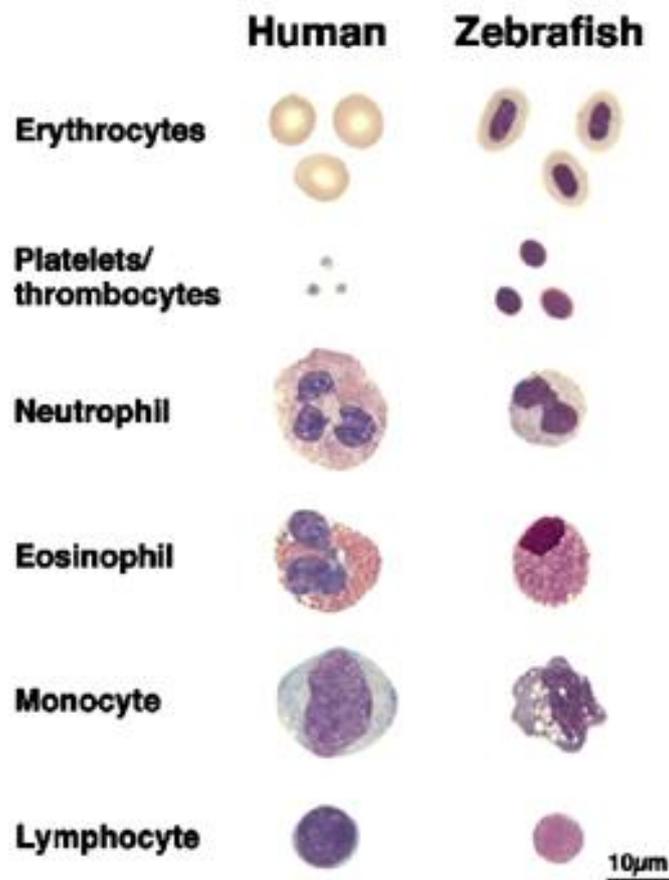


Figure 18 : Morphologie des cellules sanguines matures chez l'homme et le poisson zèbre (Davidson and Zon, 2004)

1) Hématopoïèse primitive :

L'hématopoïèse au cours du développement embryonnaire se produit sur deux phases successives, et sur différents sites anatomiques (Figure 19). La première vague dite aussi phase primitive produit principalement des érythrocytes et certains macrophages primitifs chez le poisson zèbre.

Chez les mammifères et les oiseaux, le site de l'hématopoïèse primitive se trouve dans le sac vitellin extra-embryonnaire, tandis que chez le poisson zèbre le site se trouve à deux endroits intra-embryonnaires: le mésoderme latéral antérieur (MLA) et le mésoderme latéral postérieur (MLP) qui formera plus tard la masse cellulaire intermédiaire (MCI) (Hsia and Zon, 2005). La myélopoïèse primitive a lieu dans le MLA, alors que l'érythropoïèse primitive se produit dans la MCI (Davidson et al., 2003b; Detrich et al., 1995). Le mutant *spadetail* a une myélopoïèse normale dans le MLA, mais ne parvient pas à fabriquer des cellules érythroïdes dans la MCI, indiquant une régulation génétique indépendante des progéniteurs dans ces deux régions (Thompson et al., 1998).

Au stade 2 somites, ou 10 hpf, la production de cellules souches hématopoïétique (CSH) se produit d'abord seulement au niveau du MLP, pour se retrouver ensuite aussi au niveau du MLA, sous le contrôle du gène *scl* (*Stem Cell Leukemia*), indiquant la production des CSH et des angioblastes qui sont des précurseurs vasculaires (Davidson et al., 2003b). D'autres facteurs de transcription hématopoïétiques, tels que *lmo2* et *gata2*, et des facteurs de transcription vasculaires, tels que *fli1* et *flk1*, sont également co-exprimés avec le gène *scl*, ce qui suggère l'existence d'une population d'hémangioblastes bipotente (Dooley et al., 2005).

Les cellules du MLP qui expriment les marqueurs sanguins et vasculaires, migrent à 18 hpf à un nouveau site hématopoïétique formant la MCI. Plus tard, ces mêmes cellules se différencient en proérythroblastos et en cellules endothéliales pour former le système vasculaire. Le facteur de transcription *gata1* est crucial pour l'érythropoïèse primitive, ainsi environ 300 proérythroblastos *gata1+* quittent la MCI et entrent dans la circulation autour de 28 hpf. Ces érythrocytes primitifs sont morphologiquement différents des érythrocytes chez le poisson zèbre adulte, qui ont moins de cytoplasme et un large noyau allongé. Tous les érythrocytes chez le poisson zèbre sont nucléés, contrairement à ceux des mammifères qui ne conservent leur noyau que pendant la phase primitive mais pas chez l'adulte. Il a été

montré que pendant les 4 premiers jours, seuls les érythrocytes primitifs circulent et que leur déclin commence autour de 6 jpf pour laisser place aux érythrocytes de la phase définitive (Weinstein et al., 1996). Cette observation suggère que les cellules de sang de la vague primitive sont laissées dans la circulation pendant près d'une semaine après fécondation, même si l'érythropoïèse primitive s'arrête environ à 24 hpf, comme indiqué par la diminution des niveaux de facteurs de transcription hématopoïétiques dans la MCI (Hsia and Zon, 2005).

Le second site de l'hématopoïèse primitive, le MLA, est le site de production de progéniteurs myéloïdes, exprimant les facteurs de transcription tels que *fli1*, *gata2*, *lmo2*, et *scl*, mais aucune expression de *gata1* n'y est détectée puisqu'il n'y a pas de production de proérythroblastes. Par contre le facteur de transcription spécifique myéloïde *pu1* (*spi1*) est exprimé à partir du somite 3, soit 11 hpf. Ces précurseurs myéloïdes *pu.1+/scl+* se différencient en macrophages et en granulocytes (Bennett et al., 2001). Toutes les cellules myéloïdes expriment le marqueur *I-plastine*, mais seuls les granulocytes expriment la myéloperoxydase (*mpx*). Les granulocytes seront *mpx+*, alors que les monocytes et macrophages seront *mpx-/I-plastin+*.

Au niveau de la MCI, les facteurs *pu1* et *gata1* sont coexprimés entre 16 et 20 hpf. L'équilibre entre l'expression de ces deux facteurs permet la régulation fine de la production des cellules érythroïdes et myéloïdes (Berman et al., 2005; Galloway et al., 2005).

Le dernier site de l'hématopoïèse primitive décrit est l'îlot sanguin postérieur (ISP). Dans ce site, qui deviendra par la suite le site d'hématopoïèse caudal au cours de l'hématopoïèse définitive, sont retrouvés entre 24 et 48 hpf à la fois des cellules proérythroïdes et promyéloïdes (Bertrand et al., 2007). Cependant, ces progéniteurs érythromyéloïdes bipotents n'ont pas la capacité d'autorenouveau spécifique des cellules souches hématopoïétiques, qui apparaissent réellement au cours de la formation de l'hématopoïèse définitive.

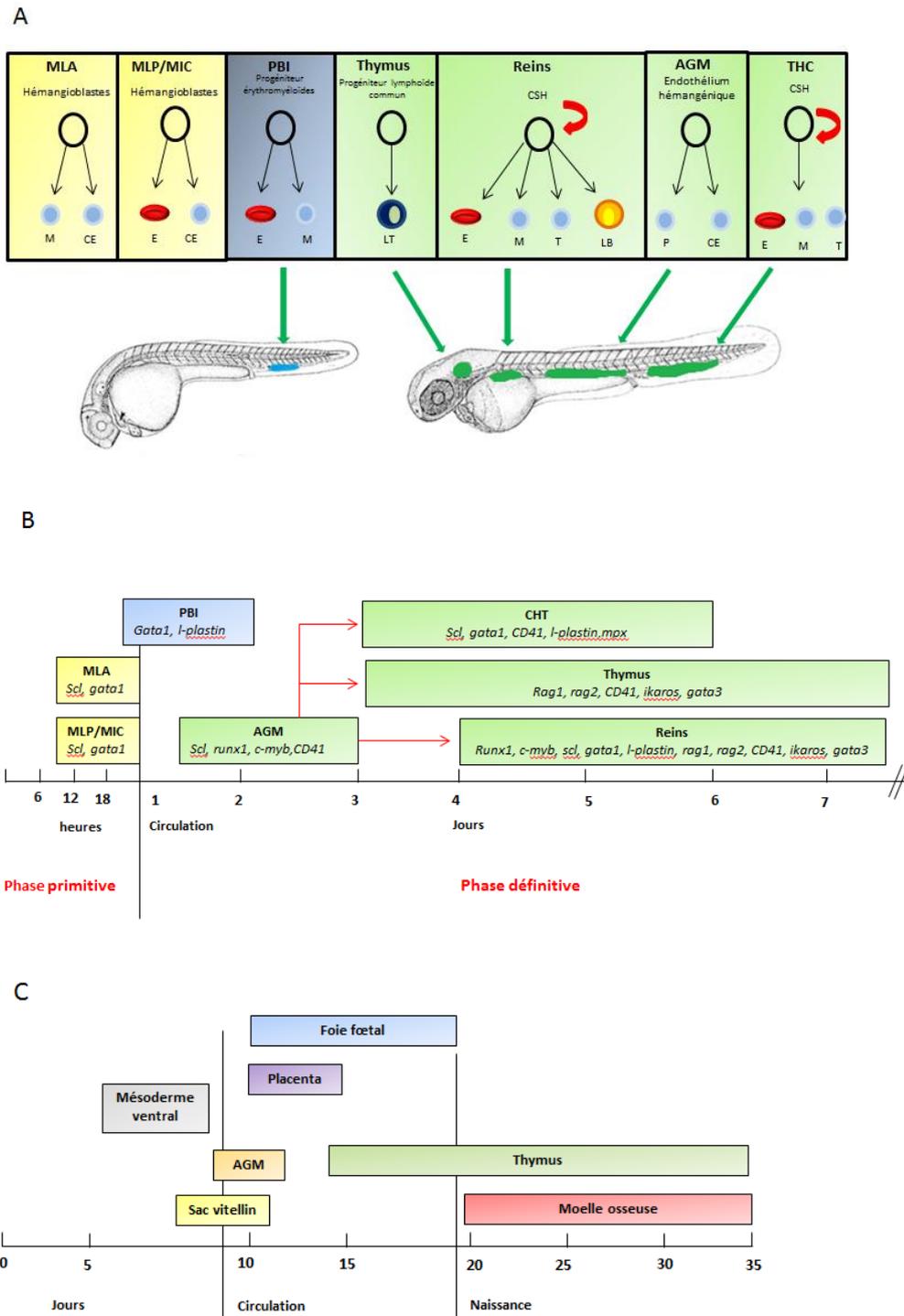


Figure 19 : Mise en place de l'hématopoïèse chez le poisson zèbre et la souris

L'hématopoïèse chez le poisson zèbre au cours du développement (A,B) a lieu par vagues successives au niveau de différents organes comme le mésoderme latéral antérieur (MLA) et le mésoderme latérale postérieur (MLP) qui formera par la suite la masse cellulaire intermédiaire (MCI), Aorta Gonado Mesonephros (AGM), le tissu hématopoïétique Caudal (THC), le thymus et les reins. Chez la souris (C), la mise en place de l'hématopoïèse se déroule également par vagues successives au niveau du mésoderme ventral, du sac vitellin, de l'AGM, du placenta, du foie foetal, thymus et enfin de la moelle osseuse. Abréviation : M : Myéloïdes, CE : Cellules Endothéliales, E : Erythroïdes, LT : Lymphocytes T, T : Thrombocytes, LB : Lymphocytes B, P : Progéniteurs. (D'après Chen and Zon, 2009).

2) Hématopoïèse définitive :

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) multipotentes sont capables d'autorenouveau et peuvent générer tous les types de cellules sanguines au cours de l'hématopoïèse définitive. Ces cellules sont tout d'abord détectées chez le poisson au niveau de l'équivalent de l'aorta-gonado-mesonephros (AGM) chez les mammifères.

- Aorta Gonado Mesonephros (AGM) :

Runx1 est un facteur de transcription qui a un rôle majeur dans l'hématopoïèse définitive et qui est exprimé par les CSH chez le poisson adulte. L'expression de *runx1* est retrouvée au niveau des CSH mais également dans les cellules endothéliales de l'AGM peu après 24 hpf (Bertrand et al., 2008; Kissa et al., 2008). Ces cellules endothéliales semblent être l'équivalent des cellules des hémangioblastes de la MCI car elles sont susceptibles d'être des progéniteurs communs aux cellules endothéliales mais également aux premières CSH « définitives ». Dès 36 hpf, l'îlot sanguin postérieur est remodelé pour former un nouveau site hématopoïétique : le Tissu Hématopoïétique Caudal (THC).

- Tissu Hématopoïétique Caudal (THC) :

Au niveau de ce site, dérivé de l'ISP, des CSH sont retrouvées dès 3 jpf. Ces CSH sont issues de l'AGM et vont migrer au niveau de ce site mais également dans le pronephros. Le THC est également un site d'érythropoïèse et de myélopoïèse (Jin et al., 2009; Murayama et al., 2006; Zhang and Rodaway, 2007). Après 6 jours de développement, l'hématopoïèse change de lieu pour atteindre son site définitif.

Enfin le site définitif de l'hématopoïèse, équivalent de la moelle osseuse chez les mammifères est le rein où des CSH sont retrouvées entre les tubules rénaux. Les cellules sanguines définitives sont composées d'érythrocytes, de granulocytes, de monocytes, de lymphocytes et de thrombocytes (Carradice and Lieschke, 2008)

3) Les cellules souches hématopoïétiques

La production de cellules souches hématopoïétiques se déroule au niveau de différents tissus selon les espèces. Chez la souris, l'hématopoïèse débute dans le mésoderme ventral, puis le sac vitellin, l'AGM, le foie fœtal et enfin au niveau de la moelle osseuse (figure19C). Le placenta est également reconnu comme un site de production hématopoïétique au cours du développement en parallèle de l'activité de l'AGM (Inman and Downs, 2007). Les cellules hématopoïétiques dérivent de cellules souches dites « à long terme » capables d'autorenouveau. Les cellules souches hématopoïétiques « à court terme » peuvent se différencier en Progéniteurs Myéloïdes ou Lymphoïdes Communs (PMC ou PLC). Les PLC sont à l'origine des lymphocytes T et B alors que les PMC se différencient en cellules matures telles que les érythrocytes, les mégacaryocytes, les éosinophiles ou encore les monocytes (Figure 20). La conservation des lignages et des fonctions des cellules hématopoïétiques matures dans l'évolution permet de supposer un schéma de différenciation des cellules hématopoïétiques identique à celui rapporté chez la souris. La majorité des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation hématopoïétique chez les mammifères ont des orthologues chez le poisson zèbre, laissant supposer une conservation des mécanismes de régulation de cette différenciation (Davidson and Zon, 2004; de Jong and Zon, 2005; Okihira and Hinton, 1999).

Cellules souches pluripotentes

Cellules souches multipotentes

Précurseurs

Cellules matures

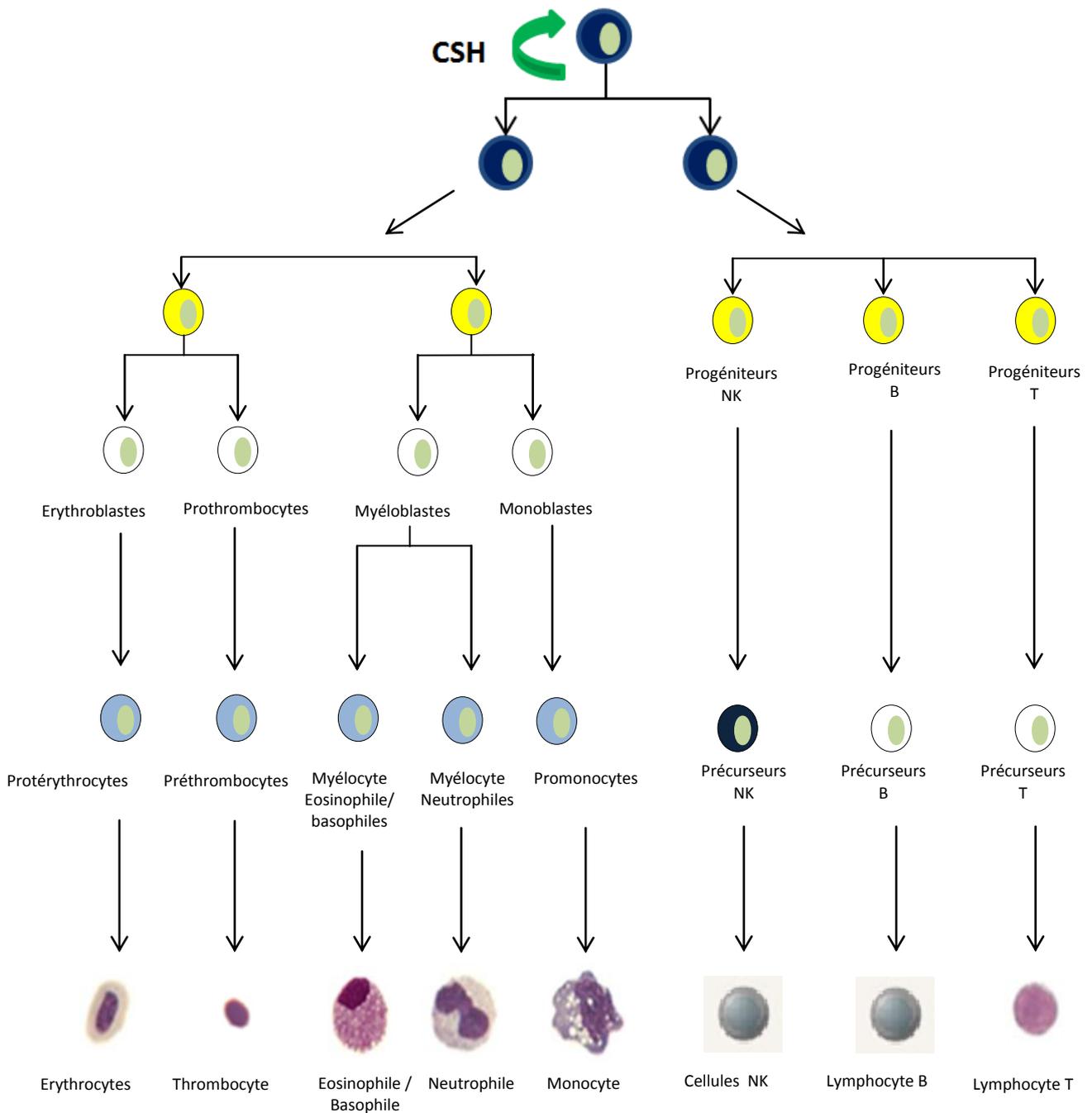


Figure 20 : Différenciation des cellules hématopoïétiques chez le poisson zèbre

Les cellules sanguines dérivent des cellules souches hématopoïétiques CSH capables d'autorenouveau qui se différencieront en Erythroblastes, Prothrombocytes, Myéloblastes, en progéniteurs de cellules T, B ou NK. Les Erythroblastes se différencient en Erythrocytes, les prothrombocytes en thrombocytes, les monoblastes en monocytes, et les myéloblastes peuvent se différencier en Eosinophiles, basophiles ou en neutrophiles. Les Progéniteurs lymphoïdes se différencient en Lymphocytes B et T. Si la majorité de l'hématopoïèse a lieu dans le rein, seule la différenciation des cellules T a lieu au niveau du thymus (D'après Davidson and Zon, 2004)

4) Les mutants zebrafish comme modèles de maladies humaines du sang

Comme les globules rouges sont les premières cellules à apparaître dans le sang au cours de l'embryogenèse, l'étude de l'érythropoïèse fournit un point d'entrée important dans la biologie du développement et la formation du sang ou hématopoïèse. En outre, l'analyse des mécanismes par lesquels les protéines, telles que les globines, sont fortement et spécifiquement exprimées durant le développement des cellules érythroïdes a servi de paradigme pour la régulation transcriptionnelle chez les eucaryotes supérieurs (Orkin, 1995). Par conséquent, l'utilisation de nouveaux outils génétiques et l'exploitation de nouvelles voies de signalisations pour étudier l'érythropoïèse est susceptible de fournir d'importantes découvertes en biologie fondamentale et sur les maladies humaines.

D'intéressants phénotypes ont été étudiés grâce à la mutagenèse chimique induite, fournissant un nombre important de mutants de poissons zèbres, dont la plupart reflètent des maladies humaines (tableau 3).

Tableau 3 : Mutants érythropoïétiques de poissons zèbres et maladies humaines associées

Mutant	Abréviation	Gène	Maladie humaine	Référence
<i>chardonnay</i>	<i>cdy</i>	Divalent metal transporter 1 (DMT-1)	Anémie microcytaire	(Donovan et al., 2002)
<i>chablis</i>	<i>cha</i>	Protein 4.1R	Elliptocytose héréditaire	(Shafizadeh et al., 2002)
<i>chianti</i>	<i>cia</i>	Transferrin receptor 1	/	(Wingert et al., 2004)
<i>dracula</i>	<i>dra</i>	Ferrochelatase (fch)	Protoporphyrine érythropoïétique	(Childs et al., 2000)
<i>moonshine</i>	<i>mon</i>	Tif 1 γ	/	(Ransom et al., 2004)
<i>retsina</i>	<i>ret</i>	Band 3	Anémie dysérythropoïétique congénitale de type II	(Paw et al., 2003)
<i>riesling</i>	<i>ris</i>	B-spectrin	Sphérocytose héréditaire	(Liao et al., 2000)
<i>Vlad tepes</i>	<i>vlt</i>	Gata-1	Anémie dysérythropoïétique et thrombocytopénie familiale	(Lyons et al., 2002)
<i>yquem</i>	<i>yqe</i>	Uroporphyrinogen decarboxylase (urod)	porphyrie érythropoïétique congénitale humaine	(Wang et al., 1998)
<i>Sauternes</i>	<i>sau</i>	δ -aminolevulinate synthase (alas2)	Anémie sidéroblastique congénitale	(Brownlie et al., 1998)
<i>weissherbst</i>	<i>weh</i>	Ferroportin 1	hémochromatose de type IV	(Donovan et al., 2000)
<i>zinfandel</i>	<i>zin</i>	Locus Globine	Similaire à la thalassémie	(Brownlie et al., 2003)

Ces mutants ont été initialement identifiés par l'observation d'une importante baisse de cellules sanguines circulantes. Les phénotypes ont été confirmés et caractérisés par hybridation in situ pour évaluer l'expression de facteurs de transcription hématopoïétique connus comme *gata1* et *scl*. Ces phénotypes peuvent être divisés en plusieurs sous-

catégories: ceux qui n'ont pas de globules rouges (mutants exsangues), ceux présentant une anémie progressive, une anémie hypochrome, ou photosensibilité (Ransom et al., 1996).

a. Les mutants **Bloodless** (exsangues):

Plusieurs mutants identifiés présentent ce phénotype « *bloodless* ». Les mutants ***Moonshine (mon)*** par exemple, ne parviennent pas à exprimer *gata-1* normalement, et ils ont une anémie sévère résultant de la perturbation des deux vagues primitives et définitives de l'hématopoïèse (Ransom et al., 2004). Le gène *moonshine (mon)* code pour le facteur de transcription TIF1 γ , qui joue un rôle essentiel dans la différenciation érythroïde précoce (Ransom et al., 2004). Entre 5 à 7 dpf, les embryons (*mon*) n'ont que 5% à 10% des globules rouges circulants que l'on trouve dans les embryons de type sauvage (Ransom et al., 2004). En effet, alors que les embryons de type sauvage ont entre 1000 et 3000 érythrocytes nucléés circulants, les mutants (*mon*) n'ont que 50 à 100 cellules circulantes, pas d'hémoglobine détectable, tel que démontré par le marquage *o*-dianisidine (Figure 21) (Ransom et al., 1996). Les rares cellules circulantes que l'on voit ont une morphologie de proérythroblaste, suggérant un blocage de la différenciation. La plupart de ces embryons sévèrement anémiques ne vivent pas au-delà de 10 à 14 dpf, mais quelques rares larves survivent jusqu'à l'âge adulte, et sont caractérisés par une cardiomégalie due à cette anémie sévère, et à un débit cardiaque élevé (Ransom et al., 2004). Il a été aussi observé que l'expression de *gata1* et *gata2* est fortement diminuée, ainsi que celle de marqueurs lymphoïdes et myéloïdes.

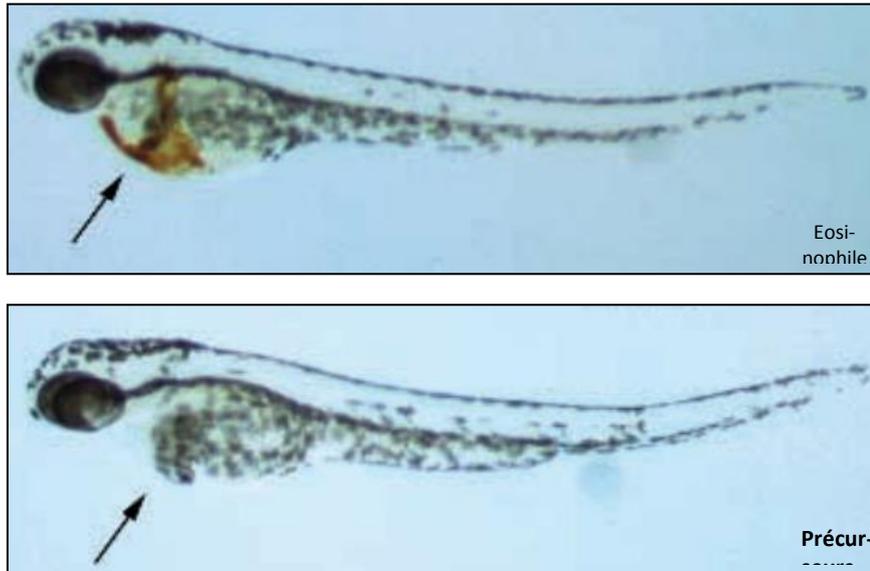


Figure 21 : Marquage o-dianisidine de l'hémoglobine des mutants

L'hémoglobine est fortement marquée au niveau de l'embryon contrôle sauvage (wt), alors qu'elle est absente chez le mutant *moonshine (mon)*.

Un autre mutant présentant une anémie sévère est caractérisé par une mutation touchant le gène *gata1*, donnant lieu au mutant ***vlad tepes (vlt)*** (Lyons et al., 2002). Ces embryons ont jusqu'à 24 hpf, une expression normale des marqueurs de progéniteurs hématopoïétiques embryonnaires tels que *lmo-2*, *scl*, et *cbfb*. Il a été observé chez ces mutants, un développement normal de cellules myéloïdes et lymphoïdes, ainsi qu'une expression correcte de leurs marqueurs *pu.1*, *l-plastin*, et *c/ebp1*, *ikaros* and *rag-1*. L'expression intacte des marqueurs myéloïdes et lymphoïdes, indique un développement normal de ces types de cellules dans les mutants du *vlt* (Lyons et al., 2002), mais malgré la présence de progéniteurs hématopoïétiques normaux, la mutation de *gata1* rend ces cellules incapables de se différencier en lignée érythroïde.

Les mutants ***bloodless (bls)*** n'ont pratiquement aucune circulation des globules rouges jusqu'à environ 5 dpf, lorsque les cellules produisant l'hémoglobine commencent à apparaître, coïncidant avec le début de l'hématopoïèse définitive (Liao et al., 2002). La mutation *bls* est héritée suivant un mode autosomique dominant, avec une pénétrance incomplète. De ce fait, le phénotype varie d'une absence complète d'érythrocytes primitifs,

à une anémie très sévère. L'hématopoïèse qui a lieu au niveau des reins semble normale chez les poissons *b/s* adultes, démontrant que seule l'hématopoïèse primitive est affectée.

b. Les mutants avec une anémie modérée :

D'autres mutants présentant une anémie moins sévère ont été identifiés. On compte parmi eux les mutants suivants : *cabernet (cab)*, *chablis (cha)*, *grenache (gre)*, *merlot (mot)*, *riesling (ris)*, *retsina (ret)*, et *thunderbird (tbr)* (Ransom et al., 1996; Weinstein et al., 1996). Ces mutants initient une hématopoïèse normale, présentent une expression de *gata1* similaire à celle des embryons sauvages, et le marquage *o*-dianisidine n'indique aucune baisse en globules rouges. L'anémie est par contre visible à partir de 2 à 4 dpf, suggérant des mutations qui affectent la prolifération ou la stabilité des globules rouges matures.

Ces mutations touchent en général des protéines du cytosquelette. Par exemple, les mutants ***mot*** et ***cha***, connus pour porter des mutations dans le même gène, ont une hématopoïèse primitive normale, mais développent une anémie environ à 4 dpf (Shafizadeh et al., 2002). À 24 hpf, les mutants *mot/cha* homozygotes présentent une expression normale de *gata1*, *scl*, et de globine embryonnaire, indiquant une érythropoïèse intacte, alors que les globules rouges matures sont hémolysés. Seuls quelques mutants *mot* homozygotes survivent jusqu'à l'âge adulte, mais nécessitent une alimentation fréquente et de l'oxygène en abondance dans l'eau. Ces poissons ont une anémie et leurs globules rouges sont arrêtés au stade des érythroblastes basophiles. Ces mutations touchent le gène *epb41b* codant pour la protéine membranaire 4.1, exprimée dans les globules rouges, et qui se lie à la spectrine, une autre protéine membranaire. La protéine *epb41* permet ainsi l'ancrage du complexe spectrine-actine au niveau du cytosquelette de la membrane érythrocytaire (Shafizadeh et al., 2002). Chez l'homme, une carence en la protéine membranaire 4.1 provoque une élliptocytose héréditaire, une cause rare d'anémie hémolytique caractérisée par des globules rouges de forme élliptique (Tse and Lux, 1999).

β -spectrine est l'une des protéines composantes les plus abondantes du cytosquelette des érythrocytes (Tse and Lux, 1999). Une mutation touchant le gène codant pour cette protéine se traduit par un mutant dit ***ris*** chez le poisson zèbre (Liao et al., 2000). À 4 dpf, les mutants *ris* homozygotes sont gravement anémiques, et leurs érythrocytes ont une forme ronde avec de grands noyaux, par opposition à la forme élliptique caractéristique des érythrocytes du

poisson zèbre adulte. La morphologie des cellules rappelle celle observée chez les patients atteints de sphérocytose héréditaire humaine, résultat d'une mutation au niveau du gène *SPTB* humain (spectrin, beta, erythrocytic) (de Jong and Zon, 2005). Les mutants adultes sont caractérisés aussi par une augmentation du nombre de progéniteurs hématopoïétiques au niveau des reins, un phénotype analogue à l'augmentation du nombre de progéniteurs des érythrocytes dans la moelle osseuse chez les patients humains atteints de sphérocytose héréditaire.

Comme pour les mutants *mot/cha* et *ris*, les mutants *ret* deviennent anémiques aux environs de 4 dpf, peu après le début de l'hématopoïèse définitive. Contrairement aux mutants précédemment décrits présentant des anomalies de protéines membranaires, les érythrocytes circulant dans les mutants *ret* sont arrêtés au stade des érythroblastes, et une grande proportion (environ 27%) ont deux noyaux évocateurs d'un défaut de mitose (Paw et al., 2003a). Ce phénotype est analogue d'une maladie humaine connue sous le nom d'anémie dysérythropoïétique congénitale de type II (Heimpel, 2004; Heimpel et al., 2003; Paw, 2001; Paw et al., 2003b). Des études ont démontré qu'une mutation du gène *Band 3* est responsable de ce phénotype, et aurait un rôle important dans la division chromosomique lors de l'anaphase. Ainsi, un défaut au niveau de cette protéine altérerait la mitose au niveau des érythroblastes chez le poisson zèbre (Paw, 2001; Paw et al., 2003b).

c. Mutants hypochromiques :

Les mutants hypochromiques chez le poisson zèbre ont des érythrocytes de petite taille avec un cytoplasme pâle (hypochromie) indiquant une baisse du niveau de l'hémoglobine. Un des mutants présentant ce type d'érythrocytes, est le mutant *zin* dont le gène muté se trouve au niveau du locus globine du chromosome 3. Ces mutants hypochromiques présentent un déséquilibre au niveau de l'expression des chaînes d'hémoglobine, similaire à celui observé chez les patients humains atteints de thalassémie (Brownlie et al., 2003).

Le métabolisme du fer est un composant essentiel de la synthèse de l'hème, et donc les défauts de son absorption, de son stockage et son trafic peuvent conduire à une sorte d'anémie hypochromique chez l'homme. Le mutant *weh* présente une baisse du taux d'hémoglobine, mais un nombre normal en globules rouges. Cette mutation est localisée au niveau du gène de la ferroportine 1, codant pour un transporteur de fer (Donovan et al.,

2000; Fraenkel et al., 2005). Ce gène conservé chez l'homme et la souris, a la même fonction chez le poisson zèbre, et des mutations à son niveau ont été identifiées chez des patient présentant une hémochromatose de type IV (Montosi et al., 2001; Njajou et al., 2001).

d. Les mutants photosensibles :

Il existe un autre type de mutants, mimant des maladies humaines, touchant les propriétés physiques des érythrocytes. On les appelle des mutants photosensibles, dont les érythrocytes ont la particularité d'autofluorescer et de se lyser lorsqu'ils sont longuement exposés à la lumière. Ce phénotype est similaire à celui observé chez les patients atteints de porphyrie érythropoïétique congénitale humaine. Le poisson zèbre est l'un des modèles les plus utilisés dans l'étude de cette maladie (Wang et al., 1998). Par exemple, la mutation touchant le gène *yqe* donne naissance au mutant *yquem*, se traduisant par des symptômes de la porphyrie, due à des défauts de biosynthèse de l'hème.

III. Les protéines de la réponse aux stress et l'hématopoïèse

1) HSP70 comme régulateur de l'érythropoïèse :

L'érythropoïèse est finement régulée par deux cytokines importantes, le *stem cell factor* (SCF) et l'érythropoïétine (Epo). La diminution des taux d'Epo induit l'activation des caspases et l'apoptose des progéniteurs érythroïdes. Il a été démontré que la caspase-3 est activée, et nécessaire durant la maturation terminale des érythroblastes (Zermati et al., 2001). Son rôle est de cliver la lamine B et acinus (une protéine activée par clivage), entraînant respectivement la condensation du noyau et de la chromatine des érythroblastes. Également, contrairement à ce qui se produit au cours de l'apoptose, le facteur de transcription GATA-1 n'est pas clivé par la caspase-3 au cours de la différenciation érythroïde terminale. Ainsi, la régulation de l'érythropoïèse est non seulement liée au niveau d'activation des caspases mais aussi, en aval de cette activation, à l'accessibilité de leurs cibles et notamment à celle du facteur de transcription GATA-1. Une hypothèse a été alors formulée : la protéine de choc thermique HSP70 pourrait être impliquée dans la régulation de l'accessibilité des caspases à leurs cibles. Au cours de la différenciation érythroblastique,

HSP70 est exprimée de façon constitutive et se localise dans le noyau où elle interagit avec GATA-1. À ce niveau, elle protège ce facteur du clivage par la caspase-3 (Ribeil et al., 2007). En accord avec le rôle d'HSP70 comme protéine protectrice de GATA-1, le sevrage en Epo, qui induit l'apoptose, s'accompagne de la sortie nucléaire d'HSP70, ce qui permet alors à la caspase-3 de cliver GATA-1 et d'induire une augmentation de l'activation des caspases et l'apoptose. Ainsi, l'Epo protège les cellules érythroïdes en cours de différenciation du clivage de GATA-1 par la caspase-3 en assurant le maintien de la localisation nucléaire de HSP70. Il reste à élucider les mécanismes par lesquels HSP70 migre dans le noyau de façon synchrone à l'activation des caspases et comment l'Epo induit la rétention d'HSP70 dans le noyau.

2) Hsp27 régulateur de la protéine Gata1 durant l'érythropoïèse

Dans une autre étude, il a été démontré in vitro que l'absence de HSP27 dans des progéniteurs de globules rouges provoque une augmentation quantitative de la protéine GATA-1, cliente de la HSP27, se traduisant par un arrêt de la différenciation érythroïde terminale (de Thonel et al., 2010). Plus précisément, ils constatent que, pendant les derniers stades de différenciation érythroïde, HSP27 phosphorylée pénètre dans le noyau, se lie à GATA-1, et induit son ubiquitination et sa dégradation au niveau du protéasome, à condition que le facteur de transcription soit acétylé. Ils ont conclu que HSP27 joue un rôle dans la mise au point de la différenciation érythroïde terminale en régulant la quantité de GATA-1.

3) HSF1 contrôle la différenciation des macrophages

En plus de leur rôle cyto-protecteur dans des conditions de stress, les HSP sont impliquées dans des voies de différenciation spécifiques. Il a été rapporté que HSP90 aurait un rôle dans la différenciation de monocytes de sang périphérique humain en macrophages en présence de M-CSF, un facteur stimulant leur différenciation (Didelot et al., 2008). Une étude récente montre que la suppression de HSF1 affecte la différenciation M-CSF-dépendante des cellules de la moelle osseuse chez la souris (Jego et al., 2014). Ils en concluent que HSF1 aurait ainsi un double rôle, réguler en premier lieu l'expression du gène SPI1 / PU.1, un facteur de transcription essentiel pour la différenciation des macrophages, et en second lieu, induire l'expression de HSP70 qui interagit avec SPI1 / PU.1 pour protéger le facteur de transcription de la dégradation par le protéasome.

IV. Résultats :

Pris dans leur ensemble, les protéines de la réponse au stress joueraient un rôle dans des processus physiologiques autres que des réponses aux stress, tels que la différenciation des érythrocytes (HSP27 et HSP70) et des macrophages (HSF1).

A la lumière de ces résultats, nous nous sommes intéressés au rôle que pourrait jouer HSF1 dans la différenciation des érythrocytes, dans des conditions de non stress thermique, chez le poisson zèbre comme modèle *in vivo*, et pendant les premiers stades de développement.

1) L'invalidation de *Hsf1* mime un phénotype d'anémie modérée

Afin d'évaluer l'importance de *Hsf1* dans le processus d'érythropoïèse, nous avons procédé à l'invalidation du gène *Hsf1* en utilisant un morpholino pour bloquer la traduction de la protéine HSF1, et ceci dans des œufs fécondés de poisson zèbre au stade 1 cellule.

Nous avons réalisé par la suite un marquage *o*-dianisidine, un marqueur de l'hémoglobine dans le but de mettre en évidence les globules rouges au niveau de l'embryon au stade 48 hpf. Nous avons ainsi observé que les morphants *Hsf1* présentaient moins de globules rouges matures par rapport aux contrôles au niveau du vitellus, zone d'observation pour ce type de marquage chez le poisson zèbre (figure 22B)

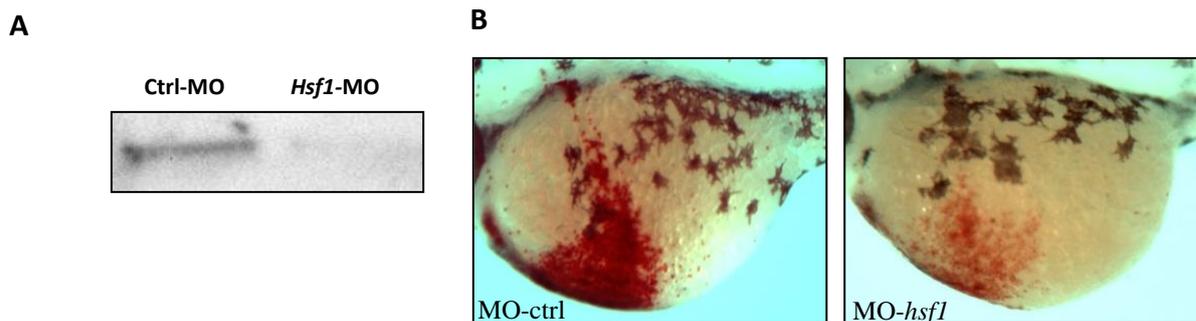


Figure 22 : Evaluation de l'invalidation de *Hsf1* et marquage *o*-dianisidine des globules rouges des embryons à 48hpf

A : Analyse Western Blot pour vérifier l'efficacité du morpholino *Hsf1*. **B :** Marquage *o*-dianisidine d'embryons de poisson zèbre à 48 hpf. L'hémoglobine est fortement marquée au niveau du vitellus des embryons injectés avec le morpholino contrôle MO-ctrl ($n=36$), alors qu'elle est faiblement marquée chez les morphant *Hsf1* ($n=38$).

Nous avons confirmé cette observation par l'invalidation de *hsf1* dans la lignée transgénique Tg(*Gata1*-dsRed), où nous avons observé une baisse des érythrocytes circulants, visible au niveau de l'artère et veine caudales (Figure 23).

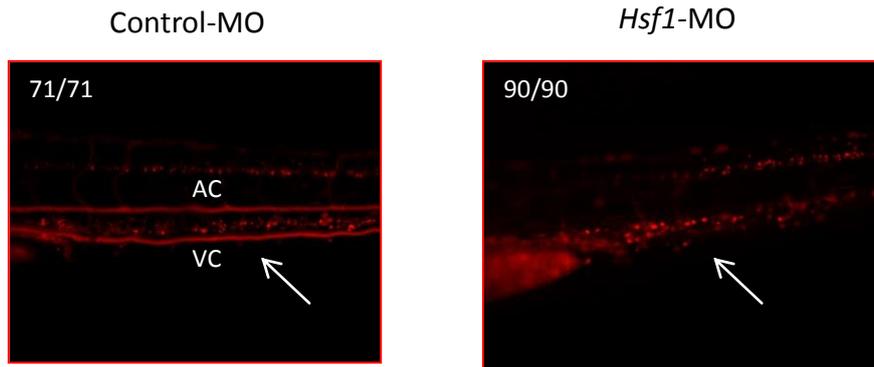


Figure 23 : Baisse d'érythrocytes circulants dans les morphants *hsf1*-MO

Embryons de la lignée transgénique Tg(*Gata1*-dsRed) à 72 hpf. Nous observons moins d'érythrocytes circulants chez les morphants *hsf1*-MO par rapport aux contrôles, au niveau de l'artère caudale (AC) et de la veine caudale (VC).

2) *Hsf1* est impliqué dans la différenciation des érythrocytes

Nous avons par la suite isolé les globules rouges de ces morphants, et avons réalisé un marquage May-Grunwald Giemsa, afin d'observer la morphologie des cellules, pour les comparer aux globules rouges d'embryons contrôles. Sur la base de la taille des cellules et celles des noyaux, ainsi que la coloration du cytoplasme, il est possible de définir quatre stades de différenciation des globules rouges primitives de 30h à 5 jpf : stade érythroblastes basophiliques, stade érythroblastes polychromatophilique, stade érythroblastes orthochromatophilique, et érythrocytes matures (Figure 24 A) (Qian et al., 2007).

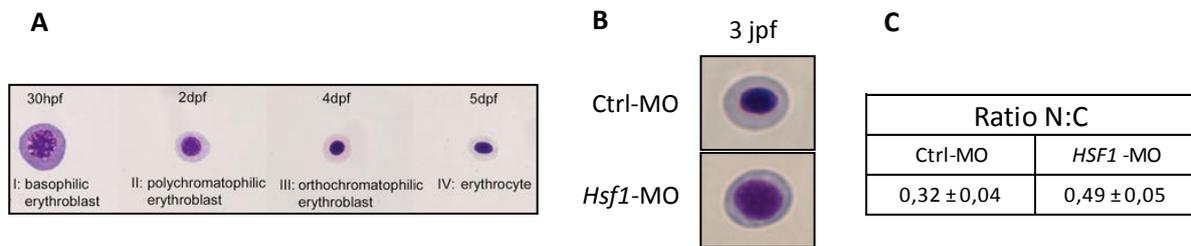


Figure 24: Rôle de HSF1 dans la différenciation des globules rouges

A : Coloration May-Grunwald Giemsa des globules rouges à différents stades de développement. Les globules rouges peuvent être classés en quatre grandes étapes de développement : Stade I, érythroblastes basophilique ; stade II, érythroblastes polychromatophilique ; stade III, érythroblastes orthochromatophilique ; stade IV, érythrocyte. **B :** Quand Les érythroblastes des morphants contrôles sont au stade III (érythroblastes orthochromatophilique), ceux des morphants *hsf1* sont au stade précédent (érythroblastes polychromatophiliques). **C :** Ratios des surfaces des noyaux et cytoplasmes des érythroblastes des deux morphants. Le ratio N:C est plus important chez les morphants *Hsf1*-MO (n=20) par rapport aux morphants contrôles (n=14). Les données représentent la moyenne plus ou moins l'écart-type pour n cellules.

Nous avons constaté que les érythroblastes des embryons dont le gène *hsf1* est inactivé, présentent la morphologie d'un érythroblaste au stade érythroblaste polychromatophilique, alors que les érythroblastes des embryons contrôles, sont au stade au stade suivant à savoir orthochromatophilique (figure 24B). Ce défaut de différenciation peut être aussi déterminé par le calcul du ratio de la surface du noyau sur celle du cytoplasme (N:C). Il diminue au cours de la différenciation puisque le noyau se condense et occupe de moins en moins de surface dans le cytoplasme.

Nous constatons qu'au même stade, à savoir 3 jpf, le ratio des érythroblastes des morphants *Hsf1*-MO est plus grand que celui des morphants contrôles, confirmant le défaut de différenciation.

Comme HSF2 a été décrit comme ayant un rôle dans la différenciation cellulaire dans des modèles *in vitro* (Chang et al., 2006; Sistonen et al., 1992; Wang et al., 2004), nous avons voulu écarter l'hypothèse de son implication dans ce processus de différenciation des érythroblastes, en inactivant *hsf2* par un morpholino. Nous n'avons alors observé aucune différence avec les morpholinos contrôles quant au marquage à l'*o*-dianisidine, ou au niveau du nombre d'érythrocytes circulant, suggérant que *hsf1* est responsable du phénotype anémique.

3) Le rôle de Hsp70 et sa localisation cellulaire dans l'érythropoïèse

L'hypothèse formulée pour expliquer le défaut de différenciation des érythroblastes chez les embryons dont le gène *Hsf1* est inactivé, est HSP70 qui est sous le contrôle de son facteur de transcription HSF1. HSP70 est décrite comme ayant un rôle de protection de Gata1 contre le clivage par la caspase 3 pour assurer la différenciation des érythroblastes (Ribeil et al., 2007). Afin de vérifier *in vivo* l'implication de HSP70 dans le processus d'érythropoïèse, nous avons inactivé *Hsp70* en injectant un morpholino spécifique du gène dans des œufs de poisson zèbre au stade une cellule. Grâce au marquage *o*-dianisidine, et à la lignée transgénique Tg(*Gata1*-dsRed), nous avons observé un très faible marquage de l'hémoglobine pour les morphants *Hsp70* par rapport aux contrôles et moins d'érythrocytes circulants (figure 25). Le ratio N:C des érythroblastes étant plus important chez les morphants *hsp70*, indique aussi un défaut de différenciation.

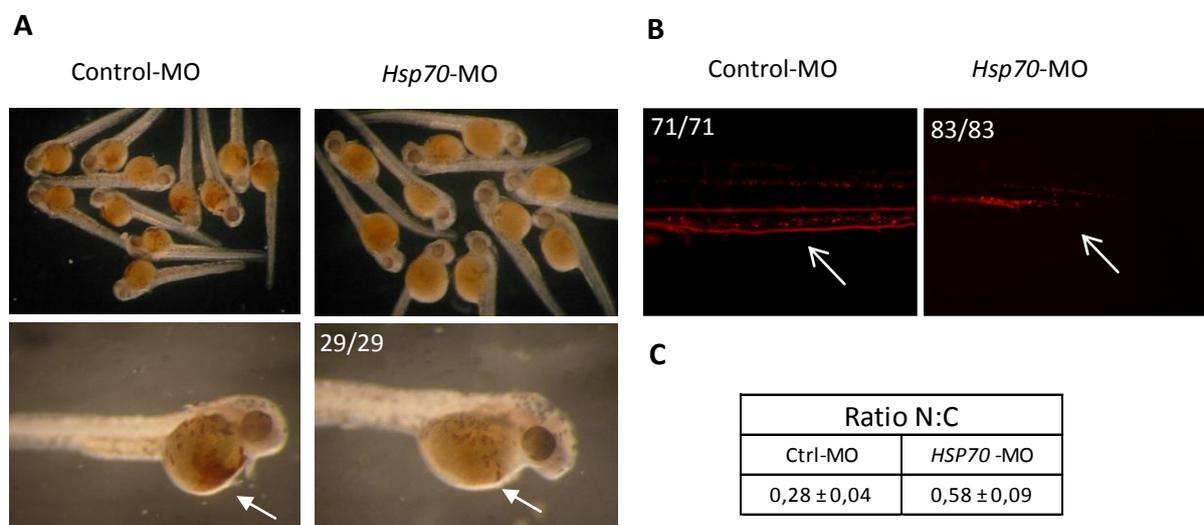


Figure 25 : Baisse des globules rouges chez les morphants *hsp70*-MO

A : Marquage *o*-dianisidine d'embryons à 48hpf, montrant une faible coloration du vitellus des embryons *hsp70*-MO, indiquant une anémie. **B :** Embryons de la lignée transgénique Tg(*Gata1*-dsRed) à 48hpf. Nous observons une forte baisse d'érythrocytes circulants chez les morphants *hsp70*-MO par rapport aux contrôles. **C :** Ratios des surfaces des noyaux et cytoplasmes des érythroblastes des deux morphants.

Ribeil et al, ont démontré *in vitro* que HSP70 est impliquée dans le processus de différenciation des érythroblastes, en protégeant GATA1 du clivage par la caspase-3 (Ribeil

et al., 2007). La localisation nucléaire de HSP70 serait alors une étape importante de ce processus (figure 26).

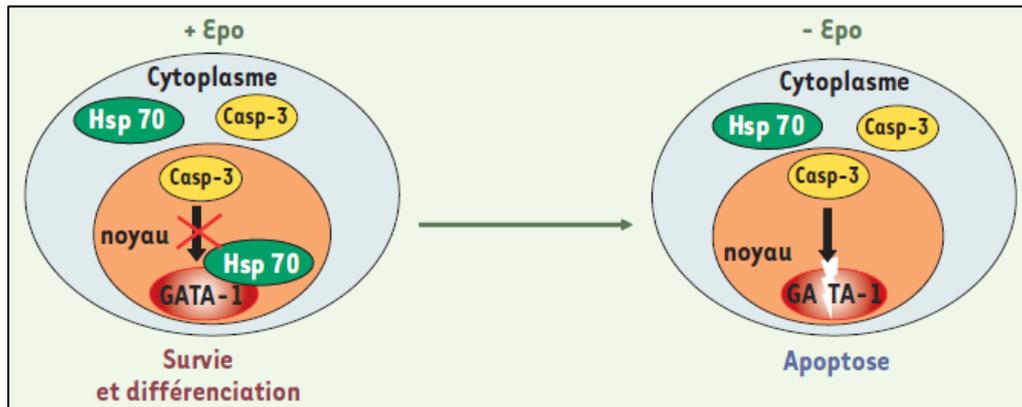


Figure 26 : Modèle de la protection de GATA-1 du clivage par la caspase-3 par Hsp70 au cours de la différenciation érythroblastique

En présence d'Epo, HSP70 est maintenue au niveau du noyau protégeant GATA1 du clivage par la caspase-3, mais elle est délocalisée en son absence, permettant le clivage de GATA1, et entraînant par conséquent l'arrêt de différenciation et l'apoptose des progéniteurs érythroblastiques. (Vandekerckhove et al., 2008)

Une nouvelle protéine a été récemment identifiée appelée HIKESHI, codée par le gène C11orf73, et rapportée comme étant responsable de la translocation de HSP70 du cytoplasme vers le noyau (Kose et al., 2012). Cette protéine a été décrite pour l'instant seulement dans un modèle cellulaire humain (HeLa) et *Arabidopsis* (Koizumi et al., 2014), et ceci dans un état de stress thermique, ainsi que chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, mais dans des conditions de non stress (Oda et al., 2014). L'analyse bio-informatique nous a informée sur la conservation du gène C11orf73 chez le poisson zèbre, encore annoté zgc:110091. La protéine d'environ 25 kda, présente une homologie de séquence à hauteur de 71% avec son homologue chez l'homme. Kose et al. rapportent que le knockdown de HIKESHI *in vitro* maintient HSP70 au niveau du cytoplasme, démontrant le rôle de transporteur de HIKESHI pour HSP70 (Kose et al., 2012).

L'hypothèse avancée était que si HIKESHI est responsable du transport de HSP70, son absence l'empêcherait de se trouver dans le noyau et protéger par la suite GATA1 du clivage, se traduisant par une altération du processus de différenciation érythroïde.

Afin de déterminer le rôle de HIKESHI dans l'érythropoïèse *in vivo* chez le poisson zèbre, nous avons suivi la même méthodologie que pour HSF1 et HSP70, en injectant un morpholino Hikeshi (*Hikeshi-MO*) au stade une cellule, et empêcher ainsi la traduction de la protéine. Nous avons observé un phénotype très semblable à celui des autres morphants *Hsf1-MO* et *Hsp70-MO*, à savoir un une faible coloration de l'hémoglobine après un marquage *o*-dianisidine, mais seulement dans 70% des embryons injectés (26/32), contrairement aux autres morphants où le phénotype d'anémie est observable dans 100% des embryons (figure 27). Le marquage May-Grunwald Giemsa nous révèle des érythroblastes au stade II polychromatophyliques pour les morphants *Hikeshi-MO*, alors qu'elles sont au stade suivant pour les morphants contrôles. Le calcul du ratio N:C nous confirme aussi ce défaut de différenciation.

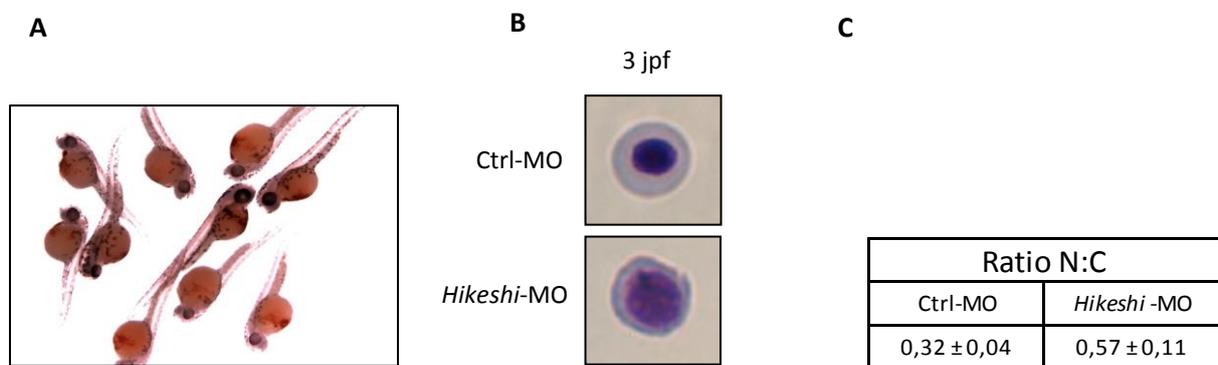


Figure 27 : Rôle de Hikeshi dans l'érythropoïèse chez le poisson zèbre

A : Marquage *o*-dianisidine à 48hpf de morphants contrôles (n=30) et morphants Hikeshi (n=32). **B** : Coloration May-Grunwald Giemsa d'érythroblastes à 3jpf. **C** : Ratio des surfaces de noyau sur cytoplasmes d'érythroblastes à 3 jpf.

Tous ces résultats appuient un rôle de *hsf1* dans l'érythropoïèse, soit directement ou indirectement, par le biais de *hsp70*.

4) Rôle de HSF1 dans le développement chez le poisson zèbre en absence de choc thermique

Nos résultats démontrent l'implication de HSF1 dans l'érythropoïèse, un phénomène considéré comme indépendant de tout type de stress. Jego et al., confirment aussi le rôle joué par HSF1 dans le contrôle de la différenciation des macrophages (Jego et al., 2014).

Sur la base de ces découvertes, nous avons entrepris une étude transcriptomique de HSF1, afin d'identifier des gènes « hématopoïétiques » qui seraient régulés par HSF1, mais de cribler aussi des gènes liés au développement embryonnaire, puisque l'étude se fait sur des embryons de poisson zèbre à 48hpf, et en absence de choc thermique, afin d'évaluer le rôle de ce facteur de transcription dans des processus physiologiques autres que ceux pour lesquels il est souvent décrit, à savoir des réponses aux stress.

L'identification de nouveaux gènes régulés directement ou indirectement par HSF1, a été réalisée après invalidation du gène *hsf1* par un morpholino spécifique au stade unicellulaire, suivie d'une analyse transcriptomique au stade 48 hpf, grâce à la technique RNAseq. Cette dernière est considérée actuellement comme la méthode de prédilection dans l'analyse de l'expression génique, puisqu'elle permet le séquençage de tous les transcrits même en faible quantité, ainsi que leur variants, et en les alignant avec le génome de l'espèce d'intérêt. Cette technique permet de détecter tous les gènes, même s'ils ne sont pas encore annotés dans les bases de données génomiques, contrairement aux puces à ADN, qui elles sont basées sur l'hybridation avec des sondes de gènes connus.

Les résultats de cette analyse sont présentés sous forme d'un article, qui sera prochainement soumis.

Genome-wide transcriptomic characterization of non-heat shocked zebrafish embryos reveals essential roles of HSF1 in physiology and development

Nadhir Yousfi, Olivier Armant, Tatiana Lopez, Uwe Strähle, Carmen Garrido and Johanna Chluba#

1 INSERM, UMR 866, 'Equipe Labellisée Ligue contre le Cancer', Dijon, France, Faculty of Sciences, UFR SVTE, University of Burgundy, 21000 Dijon, France.

2 Institute of Toxicology and Genetics, Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Postfach 3640, 76021 Karlsruhe, Germany.

Key words: HSF1, transcriptome, zebrafish, morpholino knockdown

Correspondence to

Johanna CHLUBA

Inserm UMR866,

Faculty of Biology

6, boulevard Gabriel

21000 Dijon, France

Phone: 33 3 80 39 62 23

Fax: 33 3 80 39 62 23

Email: Johanna.Chluba@u-bourgogne.fr

Abstract

The heat shock response is an ancient mechanism which is highly conserved in evolution and protects cells from stress. Heat shock factor 1 (HSF1) is the master transcription factor for heat-shock protein (HSP) genes. The transcriptome of HSF1 under normal physiological conditions and without additional induced heat shock or stress has never been analyzed in a whole vertebrate organism. To address this question, HSF1 proteins were ablated in zebrafish embryos by use of morpholinos and the transcriptional profile of these embryos was investigated by RNASeq. Differential expression of hsf1-morphants revealed 1432 genes up-regulated and 2083 genes down-regulated, showing a role of HSF1 largely beyond the regulation of hsp genes. The resulting expression data were subjected to pathway enrichment analyses and compared to phenotypes of zebrafish hsf1-morphants and those reported from Hsf1 knockout mice. We found misregulated genes that could correlate with phenotypes such as the small eyes, neutropenia or anemia of the zebrafish morphant embryos and reduced myelin, impaired cilia beating or different circadian rhythm that have been reported from Hsf1-knockout mice. In addition, we could attribute GO pathways related to immune response and to the muscle fiber regeneration function of HSF1. From these data we conclude that HSF1 plays a broad role in physiology, immunology, anatomical structure or development under normal physiological conditions and its activity seems to be linked to circadian rhythm. We propose that HSF1 is a transcription factor that plays an important role in the adaptive plasticity to environment, from cellular to whole organism levels.

Introduction

The heat shock response is a highly conserved mechanism in all organisms, from yeast to human, induced by different proteotoxic signals like heat, oxidative stress, heavy metals, toxins or infections. The Heat Shock response is translated by the synthesis of numerous proteins called Heat Shock Proteins (HSPs), which major role is to prevent inappropriate protein aggregation and to mediate transport of immature or damaged proteins to the target organelles for final packaging, degradation or repair (Hartl and Hayer-Hartl, 2002) (Walter and Buchner, 2002). These proteins are under that control of transcription factors called Heat Shock Factors (HSFs) (Christians et al., 2002). Upon activation, HSFs associate into homotrimers and induce the transcription of the Hsp genes by binding the Heat Shock Elements (HSE) located in the 5' region of their promoter (Morimoto, 1998). In vertebrates, four HSFs (HSF1-HSF4) have been identified. HSF1 is the major stress-inducible transcriptional activator of the heat shock response but there are now many evidences that this factor plays also an important role under non-stress conditions (Vihervaara and Sistonen, 2014). In humans, HSF1 has been reported to play an important factor in cancer cells (Dai et al., 2007; Mendillo et al., 2012). Its inactivation in cells abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis (McMillan et al., 1998). It has a critical role in female fertility, in the maintenance of olfactory epithelium in adult mice (Takaki et al., 2006) and in regulating immune response and inflammation (Christians et al., 2000) (Inouye et al., 2004). In zebrafish, HSF1 depletion by morpholino modified antisense oligonucleotides (MO) results in a small eye phenotype (Evans et al., 2007).

In order to get a more global view on the role of HSF1, we wanted to investigate the role of HSF1 in normal physiological conditions in an entire organism. Zebrafish embryos are an ideal vertebrate model for such kind of studies and genes can easily be knocked down by morpholinos. In this study, we investigated the transcriptional profiles using RNASeq in 48hpf hsf1 knockdown and control zebrafish embryos and compared the gene expression profile to phenotypes observed in zebrafish and mice.

Materials and Methods

Ethics Statement

All protocols in this study were conducted in strict accordance with the French and European guidelines for the care and use of laboratory animals. No specific ethics approval was required for this project, as all zebrafish (*Danio rerio*) used in this study were between 0 and 5 days old.

Zebrafish lines and maintenance:

Zebrafish were maintained in a recirculating aquaculture system (Müller & Pflieger, Germany). Photoperiod was 14 L:10D (light:dark), and the mean ranges for conductivity, pH, and temperature in the system were 600-700 μ S, 6.0-8.0, and 26–28°C, respectively. Experiments were performed using the F1 of the wild-type line WIK (ZIRC) and the transgenic lines: Tg(*gata1a:dsRed*), a gift from David Langenau, Tg(*fli1:egfp*) (ZIRC, USA), Tg(*mpx:egfp*), a gift from SA Renshaw and T.J. Chico, Sheffield, UK. Eggs were collected within one hour of laying and kept at 28° in Petri dishes containing source water (Volvic, France) supplemented with 0.3 μ g/ml of methylene blue, and from 24 hours post fertilization (hpf) onwards with 0.003% 1-phenyl-2-thiourea (Sigma-Aldrich) to prevent melanin synthesis.

Microinjection of zebrafish embryos:

Gene knock-down experiments were performed using morpholino-modified antisense oligonucleotides (MO; Gene Tools, LLC; Philomath OR, USA). They were labeled with Lissamine or Fluorescein to facilitate screening of successfully injected eggs. For the *hsf1*-MO2 we used the same sequence as described by Evans et al. 2007 (Evans et al., 2007): 5'-CACGGAGAGTTTAGTGATGATTTCT-3' Fluorescein. In addition, we designed a second morpholino, *hsf1*-MO1: 5'-GGCCCCACACTGTGATACTCCATCA-3' Lissamine. As controls we used a morpholino for *hsf2*: 5'-GACGTTTCGAGCTGTGTTTCATTTTG-3' Fluorescein (Evans et al., 2007) and the standard control-MO (Gene Tools): 5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3' Lissamine or Fluorescein. The morpholinos were injected into one to two cell stage embryos at 250 μ M. This was the lowest effective concentration and was determined by titration experiments followed by morphological

examination. After injection, only eggs with uniform fluorescence, a marker for successful MO injection were used for the experiments.

Western blot:

To assess the efficacy of hsf1-MO, at least 20 zebrafish embryos at 48hpf were used for protein extraction, following the ZFIN protocol (<https://wiki.zfin.org>). Equal amounts of protein (30µg) were loaded on the wells, separated in a 10 % running gel and transferred to a nitrocellulose membrane. Immunoblotting was accomplished using an anti-HSF1 antibody (SPA-901, stressgen), an antisarcomeric actin antibody (SigmaAldrich, clone 5C5) or anti-HSP27 polyclonal serum (a generous gift of Eric Shelden) (Tucker et al., 2009) and anti-HSP70 (pAB Hsp70/Hsp72 Rabbit ADI-SPA-812, Enzo Life sciences. The secondary antibodies used: peroxidase-conjugated AFFINIPURE goat anti-rabbit IgG (H+L) (111-035-144, Jackson Immunoresearch) and peroxidase-conjugated AFFINIPURE goat anti-mouse IgG (H+L) (115-035-146, Jackson Immunoresearch).

Quantitative real-time RT-PCR

QPCR primers were designed for candidate genes using the Probe Finder software (Primer 3 plus). Three independent biological replicates of the control and MO-treated groups were included in the analysis and all reactions were carried out in triplicates. Reverse transcription was performed with 1 µg of total RNA extracted with Trizol from two distinct pools of 48 hpf zebrafish embryos using M-MLV reverse transcriptase and Oligo(dT) primers (Promega) following the manufacturer's instructions. The final RT product was diluted 3 times in water. Briefly, 2 µL of RT served as templates in the PCR reaction consisting of Go Taq qPCR master mix (Promega). qPCR was performed in the StepOnePlus system (Applied Biosystems). Before qPCR analysis, the standard curve of each primer pair was generated by the regression of Cq values and a series of 5-fold cDNA dilutions from the mixture of all samples to be analyzed. The amplification efficiency of primers was calculated from the slope of corresponding standard curve. Expression levels were normalized against hprt1. The sequences of the primers used for QPCR are provided upon request.

Whole Embryo staining for hemoglobin:

Histochemical staining of hemoglobin by o-dianisidine (Sigma) was performed as described (Lieschke et al., 2001) (Erickson et al., 2007).

Microscopy and imaging:

All zebrafish imaging experiments were performed on the CellImaP platform in Dijon. Images of embryos were taken with an Axio zoom V16 (Zeiss), composed of a motorized stereo zoom microscope, a fluorescence light HPX 200 C coupled to a Zeiss HRm CCD camera and a computer. ZEN software controlled all of the stations and the images were acquired with a 2.3x objective.

RNA sample preparation for RNAseq:

Total RNA was extracted from approximately 80 embryos at 48hpf using Trizol with two extraction/precipitation steps (<http://www.itg.kit.edu/874.php>). The quality and integrity of the total RNA was determined by electrophoresis in agarose gel.

RNAseq, mapping and quantification of reads:

Extracted total RNA samples were tested on RNA nanochips (Bioanalyser 2100, Agilent), and showed no sign of degradation (RNA index number > 8). Sequencing libraries were generated from 1 µg of RNA samples with the TruSeq stranded mRNA kit (Illumina). Size and quality of sequencing libraries were determined on DNA-chip (Bioanalyser 2100, Agilent).

Multiplexed samples each at 7pM were loaded on a single lane Illumina Flow cell v3. Paired end reads (2×50 nucleotides) were obtained with a HiSeq1000 sequencer using SBS v3 kits (Illumina). Cluster detection and base calling were performed using the standard Illumina pipeline RTAv1.17.21.3. Quality of reads was assessed with CASAVA v1.8.1 (summarized in Table 1). Alignment to the zebrafish (Zv9) genome was made with bowtie v0.12.7 (Langmead et al., 2009) and tophat v2.0.11 (Trapnell et al., 2009) with the options -r 180 mate-std-dev 80 -b2-sensitive -no-novel-juncs -a 5 -p 8 -library-type fr-unstranded and using the exon-exon junctions coordinates from Ensembl (release 75). More than 70% reads aligned against Zv9 genome. The total number of reads mapped generated with this method 343 million reads (80 million reads per biological replicate, after pooling reads from technical replicates) of high quality (Q30>98%). Quantification of gene expression was performed with

HTSeq v0.5.3p3 and DESeq2 (Anders and Huber, 2010). Assessment of the biological replicates reproducibility was performed by principal component analysis on variance stabilized in R environment.

Cluster analysis

Variance stabilized expression data obtained from DESeq2 were used for hierarchical clustering. We selected the 3515 genes showing a statistical difference between control and MO injected embryos (Log2 fold change ≥ 0.5 , p-value ≤ 0.01). Hierarchical clustering was carried out by computing Pearson's correlation on normalized expression data and the complete-linkage method with the R packages hclust and gplots.

Gene Ontology (GO) term analysis

For the GO term enrichment analysis we used BinGO 2.4.2 (Maere et al., 2005), zebrafish annotations were obtained from the Gene Ontology project (www.geneontology.org). The GO terms of the HSF1 misregulated genes were compared to a gene universe that was restricted to the expressed genes on the RNASeq data that could be linked to a ZFIN ID. To identify statistically significantly overrepresented GO categories, a hypergeometric test was performed followed by FDR correction (Benjamini and Hochberg, 1995). GO terms with corrected p-values below 0.05 were considered as significantly enriched.

Results

Morpholino knockdown of hsf1 and resulting phenotypes

To study the function of HSF1 in non heat shock conditions we performed knockdown analysis of the hsf1 gene in zebrafish embryos. We injected hsf1 morpholinos (MO) and control MO in the yolk from wild type and transgenic zebrafish. The embryos were raised in constant dark up to 48 hpf or 52 hpf at 28°C with no other induced stress besides taking them out in the morning for checking the embryos. The efficiency of the morpholinos was verified by western blot analysis from proteins of the hsf1-MO and control-MO treated embryos. As injection of 500 μ M lead to high mortality, we used 250 μ M where we achieved knockdown of HSF1 that can be seen at the protein level. Hsf1 knockdown reduced HSP70 at protein level as expected, while HSP27 was increased (Fig.1).

HSF1 depleted embryos have small eye phenotype that was reported by others (Evans et al., 2007; Tucker et al., 2011) and confirmed by this study. The eye diameter of 52 hpf embryos were significantly smaller than that of the control morphants (Fig 2A, 2B). Average eye surface area of hsf1-MO was 171.103 μm^2 compared to an average eye surface area of 240.103 μm^2 of the control embryos. This represented an average decrease of the eye surface area of 30%. As described by Evans and colleagues (Evans et al., 2007), there also was a visible difference in pigmentation that was slightly reduced in comparison to control embryos (Evans et al., 2007) (Fig 2C). In addition to the small eye phenotype we found a not yet described change in comparison to the controls, what was earlier hatching. At 48 hpf, 48% of hsf1-MO embryos had already hatched in comparison to 7% of the control embryos (Fig.3). The earlier hatching was not due to a higher mobility of the embryos but to a more fragile envelope as a simple touch on the chorion resulted in its split.

As heat shock proteins have been shown to play a role in erythrocyte differentiation in human cells (Chen et al., 2011; de Thonel et al., 2010; Frisan et al., 2012; Ribeil et al., 2007) and in mice (Chen et al., 2011) we used dyes and transgenic zebrafish to examine the effect of hsf1-knockdown on hematopoiesis and erythropoiesis. In fact, at 48 hpf, there were less erythrocytes in the circulation in Tg (*gata1: dsRed*) hsf1-MO embryos compared to control embryos. This was confirmed by o-dianisidine staining (Fig4A and B). In addition, using transgenic embryos Tg (*mpx: egfp*) embryos we observed less neutrophils at 72 hpf, (Fig. 4C and D).

Transcriptome profile analysis

In order to understand molecular changes in absence of HSF1 we performed a transcriptome analysis by RNAseq. Zebrafish embryos present the advantage they allow to perform the analysis of the transcriptome of an entire organism. Biological duplicates of both control and hsf1-MO injected embryos samples of 48 hpf embryos were subjected to total RNA extraction and RNA-seq analysis. High-throughput sequencing generated 81,12-91,33 million (M) pairs of raw reads for each sample and more than 98% of the raw reads passed quality filtering ($Q > 30$) (Table1). More than 70% of reads align the zebrafish genome.

Principle component analysis (PCA) revealed that the samples were similar for both conditions showing reproducibility of the data (Fig. 5A). The differentially expressed genes between the control and hsf1-MO injected samples were displayed in Fig. 5B in red. Genes

with Log₂ fold change $\geq 0,5$, p-value ≤ 0.1 were considered to be differentially expressed. Using a cut-off of Log₂ fold change $\geq 0,5$, p-value ≤ 0.01 the numbers of up- and down-regulated genes in hsf1-MO injected embryos were 3515 of 33740 detected genes in total with 1432 up regulated and 2083 down regulated genes. Genes regulated by HSF1 are listed in supplementary file.

To validate the expression profiles from RNA-seq analysis, relative mRNA levels for 12 genes were measured by qPCR. The data from qPCR and RNA-seq exhibited good agreement on both up- and down-regulated genes. The correlation between RNA-seq and qPCR data was analyzed by Spearman's rho test and a highly statistical significance [$r(12) = 0.82$, $p = 0.001$] was observed.

Cluster analysis of control and hsf1-morphant embryos

The expression level of genes regulated by HSF1 is visualized by the heat map, displaying the down-regulated genes in blue, moderate expressed in green and high expression in yellow (Fig. 6, cu-ff of Log₂ fold change $\geq 0,5$, p-value ≤ 0.01). Hierarchical clustering of the 3515 genes expressed differently between wild type and hsf1-MO embryos revealed groups of co-regulated genes with shared gene ontologies (GO) sms. Thus, down-regulated group genes are implicated in cytoskeleton arrangement, muscle development, neurogenesis and mitosis, whereas overexpressed genes are involved in oxidative stress.

Functional classes of genes up or down regulated in morphant embryos

In order to evaluate which types of functions would be most prominent in the HSF1 regulated gene sets, we performed enrichment analysis of specific Gene Ontology (GO) categories within the ontologies of “biological process”, “molecular function” and “cellular component” with Cytoscape. The up-regulated and the down-regulated gene sets were compared with all genes categorized in the zebrafish databank. Although this analysis is limited by the currently still incomplete annotation of zebrafish genes, it allowed us to identify statistically enriched functions in our HSF1 dependent gene sets and to obtain a clear and also global picture of HSF1 implication in these multiple processes. The human orthology is always questionable and actually does not provide much different data. The hierarchical organization of the three gene ontology fields is shown in Fig. 7 for up-regulated genes and in Fig. 8 for down-regulated genes. Up-regulated genes are mostly related to «cellular

processes », « cellular metabolic processes » and « transport » including « RNA transport », « RNA processing ». They also comprise genetic networks involved in energy production and cellular homeostasis like mitochondrial transport (FDR < 1.10⁻³), glycolysis (FDR < 1.10⁻⁴), ribosome biogenesis (FDR < 1.10⁻³), oxygen transport (FDR < 1.10⁻²), nucleotide and amino acid biosynthesis (FDR < 1.10⁻⁴), all indicative of an overall increase in cellular metabolism activities. More specific processes are also found like the regulation of the circadian clock and erythrocyte maturation. GO categories of down-regulated genes are more heterogeneous and can be attributed to diverse « developmental processes » (all significant FDR < 1.10⁻²) such as skeletal and cardiac tissue development, neurogenesis, cell cycle, eye morphogenesis and pronephros development . In line with the observation of severely deformed embryos injected with 500 μ M hsf1-MO (results not shown), the most down regulated genes by RNAseq were found in cytoskeleton organization and myofibril assembly.

HSF1 is known as regulator of heat shock gene expression. Even, if there was no GO category found in this study concerning response to stress, most hsp genes are down-regulated with some exceptions, such as hspb1/hsp27 (see Table 2). In contrast, for the other small heat-shock proteins, α -crystallin/hspb4 (cryaa), β -crystallin/hspb5 (cryaba and cryabb) we could not find any differential expression. Hsp27 and hsp70 mRNA expression correlates with protein analysis of hsf1-morphants which was done by Westernblot, where a down-regulation of Hsp70 protein content was observed and an increase of Hsp27.

Genes or GO pathways involved in zebrafish hsf1 morphant phenotypes

Eye development genes

One of the most visible phenotypes, reported by Evans (Evans et al., 2007) and confirmed this study is the small size of eyes. In fact, GO analysis reveals in the “biological process” field several categories concerning the eye such as « eye development » or « eye morphogenesis » or « camera eye development ». The most important genes involved eye development are pax6, eya2, six and dach, genes which are conserved from Drosophila to vertebrates (Relaix and Buckingham, 1999). The inactivation of Pax6.2 (Pax6l) using morpholinos in zebrafish embryos resulted in small eye phenotype, supporting a role in retinal development (Ravi et al., 2013). Interestingly, in our hsf1-morphants, expression of pax6b, pax6l, eya2, dachb and six7 genes are all down-regulated, suggesting that HSF1 could be necessary for the maintenance or the induction of the expression of these genes (Table 3).

However, a part of this phenotype could also be due to the fact that *hsf4* expression is also down-regulated as revealed by the RNAseq analysis (Log2: -1,7, p-value 0,002). HSF4 is known to play a role in lens development in mice.

Hatching enzyme genes

Another phenotype we observed was advanced hatching of the *hsf1*-MO embryos. The expression of genes encoding the zebrafish hatching enzymes *He1b* and surprisingly also *He2* which seems to be rarely expressed in zebrafish embryos were both up regulated (Sano et al., 2008) (Table 3). This enzyme digests the egg envelope proteins at the time of hatching (Sano et al., 2008).

Genes linked to anemia and neutropenia

Among the most down-regulated genes in *hsf1*-MO embryos are spectrin beta, erythrocytic (*sptb*) and erythrocyte membrane protein band 4.1b (*epb41b*) and *hcls1* (Table 3). *Sptb* and *epb41b* are important for red blood cell morphogenesis and their drastic down regulation could explain the anemia in the *hsf1* morphants. *Sptb* appears in several GO categories such as «system development», “anatomical structure development”, or “cell differentiation”. Spectrins are key cytoskeleton proteins with roles in membrane integrity, cell morphology, organelle transport and cell polarity of varied cell types during development (Dubreuil and Grushko, 1998). *Sptb* has been identified as the mutated gene of the zebrafish Riesling (*ris*) mutant which suffers from profound anemia. The developing red cells of *ris* mutants fail to assume terminally differentiated erythroid morphology (Liao et al., 2000).

The second down regulated gene, *epb41b* is also involved in erythrocyte shape. The zebrafish erythrocyte protein 4.1 mutants *merlot* and *chablis* exhibit severe hemolytic anemia (Shafizadeh et al., 2002). Both genes, *sptb* and the erythrocyte protein 4.1, have been shown to be involved in human elliptocytosis (Gallagher, 2004).

Another phenotype which we only revealed by using the transgenic embryos Tg (*mpx: egfp*) was moderate neutropenia. The best candidate gene that could explain this phenotype and that is highly down regulated (30 fold) is the hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1 (*Hcls1*) (Table 3). *Hcls1* is normally highly expressed in human myeloid cells and in the majority of tested patients with acute myeloid leukemia *HCLS1* protein expression is elevated but in contrast, *HCLS1*-deficient mice are neutropenic (Skokowa et al., 2012).

Genes or GO pathways involved in murine hsf1 knockout phenotypes

The hsf1 knockout (KO) mouse has first been described in 1998 (McMillan et al., 1998). Since this time several characteristics of the hsf1 KO mice have been reported. We compared differential gene expression from RNAseq data to knockout phenotypes described in the mouse and we could link several GO profiles or genes to them.

Oxidative stress response

Two articles report an altered redox homeostasis in hsf1 KO mice (Bierkamp et al., 2010; Yan et al., 2002). Interestingly, several genes involved in the response to oxidative stress are also up-regulated (Table 3), like thioredoxin and thioredoxin reductase. Thioredoxin acts as antioxidant and the activity of thioredoxin is regulated by thioredoxin reductase. Both play a role in protection against oxidative stress. Another up regulated gene is glutathione peroxidase 4 (gpx4). This enzyme has a high preference for lipid hydroperoxides and its role is also to protect against oxidative damage. Superoxide dismutase 1 (SOD1) is an enzyme that alternately catalyze the dismutation (or partitioning) of the toxic superoxide (O_2^-) radical into either ordinary molecular oxygen (O_2) or hydrogen peroxide (H_2O_2). This enzyme is also an important oxidant. Furthermore, peroxiredoxins (prdx1-5) appear up-regulated. These genes encode antioxidant enzymes which reduce hydrogen peroxide. The up-regulation of all these genes can be considered as a indirect indicator of oxidative stress. The enrichment of the GO category of the cellular component field « cell homeostasis » or “cell redox homeostasis” (Fig. 7) lends further support for oxidative stress and activated antioxidant mechanisms. The oxidative stress may be explained by the reduced heat shock proteins and mitochondrial dysfunction (Bierkamp et al., 2010) but also to elevated glycolysis according to our GO profile. The genes described above seem not be directly regulated by HSF1. For example thioredoxin has been shown to be induced by activation of HSF2 and not HSF1 (Leppa et al., 1997).

Ciliary beating

Postnatal hsf1 KO mice suffer from chronic sinusitis and mild hydrocephalus which are associated with impaired mucociliary clearance and cerebrospinal flow. Further analysis revealed reduced amplitude of ciliary beating in various organs such as nasal cavity, trachea or oviduct (Takaki et al., 2007). The authors concluded that HSP90 is required for ciliar function and showed that HSP90 promotes tubulin polymerization. Our data show that the

reasons of impaired ciliary movement go beyond the direct action of HSP90. We found enrichment in the GO field « cellular process » for « cilium movement », « epithelial cilium movement » and « cilium movement involved in the determination of left/right asymmetry ». The genes in this field that are down-regulated are the centrosomal protein 131 and 70 and the centrosomal proteins Retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR) and OFD1. All these genes are involved in the normal formation and function of cilia. These proteins play additional roles: Cep70 is also known to interact with α -tubulin to localize to the centrosome and is required for the organization and orientation of the mitotic spindle. CEP131 is present in sperm flagella and loss of CEP131 results in male infertility (Hall et al., 2013) .

Brain abnormalities, decreased myelin and abnormal behavior

Hsf1-KO mice display different brain abnormalities (Hashimoto-Torii et al., 2014). Homma et al. discovered that hsf1-KO mice display progressive myelin loss that accompanies severe astrogliosis (Homma et al., 2007) (Santos and Saraiva, 2004). In fact, several genes involved in the generation of myelin in the central nervous system (CNS) are strongly down-regulated in hsf1-MO zebrafish embryos. One of them is the transcription factor Myelin Regulatory Factor (myrf). Myrf is required during development and also in adults (Bujalka et al., 2013) for the generation of myelin. The myelin transcription factors myt1a, myt1b and myt1la represent an additional group of transcription involved in this process. It has been described that Myelin transcription factor 1 (Myt1) is a zinc-finger DNA binding protein that influences developing oligodendrocyte progenitor cell proliferation, differentiation, and myelin gene transcription in vitro (Vana et al., 2007) and plays a role in remyelination in multiple sclerosis (Vana et al., 2007). Furthermore, disruption of myt11 gene is associated with schizophrenia (Lee et al., 2012) and autism (Meyer et al., 2012). The dystrophin gene Dp71 (dmd) expression is also low in hsf1-MO larvae (Log2 fold: -1,3, p value: 0,004) and confirms data recently published by Tan et al., 2014 (Tan et al., 2014). Dp71 plays a role in behavior and Dp71 KO mice are characterized by reduced novelty-seeking and exploratory behavior with impairments in spatial learning and memory (Daoud et al., 2009). We also have mention that one of the most down regulated gene, is the microcephaly gene aspm (Log2 fold: -4,9, p-value 4,29E-26), which plays a role in brain size in development and is discussed for its role in adaptive brain evolution (Montgomery and Mundy, 2014) (Montgomery et al., 2011).

Circadian cycle

An interesting phenotype of Hsf1 KO mice is a altered circadian rhythm. These mice have a longer free running period compared to wild type mice (Reinke et al., 2008) (Asher and Schibler, 2011). As expected, we encountered misregulated circadian clock genes in hsf1-MO embryos but among the up and not down-regulated genes. The GO analysis reveals in the cellular process field the term “entrainment of the circadian clock”. Indeed, the most highly up-regulated gene of the entire set is period 2 (per2) (induced 5,7 fold). Also other core clock genes are up regulated like cryptochrome (cry) cry1a and cry3 or the thyroid embryonic factor 2 (tefb). Per2, cry1a or cry3 genes have been reported to be light induced in zebrafish larvae (Weger et al., 2011), while tef2 peaks at the end of the night under light dark cycles (Weger et al., 2011) (Ben-Moshe et al., 2010).

Other down regulated genes

Immune response, complement activation

There exists no report on the down-regulation of complement protein expression in hsf1-KO mice, but it is worth to mention here because this pathway figures in GO network “biological process” with the terms “complement activation” and “activation of plasma proteins involved in acute inflammatory response”. Down regulated genes are C5, C3a, C7a and the factors B and H. An interesting gene that does not belong to this pathway, but plays a role in immune response is immunodeficiency virus type I enhancer-binding protein 2a (Hivep2a) with 16 fold lower expression in hsf1-MO embryos. This protein binds to the enhancers of MHC class I, interleukin-2 receptor and interferon-beta genes. Hivep2 (or schurri-2) plays a role in T cell selection (Takagi et al., 2001) and differentiation (Kimura et al., 2007; Nakayama and Kimura, 2010). Interestingly, HIVEP2 deficiency confers behavioral phenotypes related to schizophrenia in mice (Takao et al., 2013).

Muscle fibers

Hsf1-KO mice have been reported to have less muscle weight (Nishizawa et al., 2013) and according this rapport soleus muscle was also less well regenerated after injury than wild-type mice. However, there was no sign of sarcopenia or atrophy in these mice and we did not find drastic changes in hsf1-MO embryos. It was however very surprising to discover that among the highest down regulated genes are many muscle myosin heavy chain genes. All slow muscle myosin heavy chain (smyhc) genes are strongly down regulated: smyhc1 is 69 fold

down regulated, *smyhc2* 44 fold and *smhyc3* 6 fold and also the fast muscle chain fiber genes *myhc4* (39 fold), *myhz2* (42 fold) and *myhz1.1*, *1.2* and *1.3* (45 fold) (Table 4). The GO term cellular process with “actin cytoskeleton organization”, “actomyosin structure organization or “myofibril assembly” or “muscle tissue morphogenesis” is clearly over-representated.

Discussion

In this study we could identify, depending of the cutoff, from 3000 to 5000 genes that are misregulated in the absence of HSF1 under normal physiological conditions. The combination of the sensitivity of high throughput sequencing and the use of an entire vertebrate organism represents a further step beyond previous studies done on cells or organs by microarray technology (Ryno et al., 2014; Trinklein et al., 2004) (Logan and Somero, 2010). In the 48 hpf *hsf1*-MO embryos, the expression of most heat shock proteins was down regulated under these conditions (Table 2). From our results we can also conclude that HSF1 controls genes that encode transcription factors, and in fact many transcription factors are down-regulated and GO pathway “regulation of biological process” with “regulation of transcription” is overrepresented (Fig. 8). There should also be an effect on RNA as the fields “gene expression” and “RNA processing” are present in up and down-regulated processes (Tables 7 and 8).

By relating dysregulated genes or GO networks to phenotypes that we observed in zebrafish and which were reported from *hsf1*-KO mice, we could identify or confirm the roles of HSF1 in developmental and metabolic processes. The small eye phenotype in zebrafish can be related to the GO networks and to specific misregulated gene expression of eye specific transcription factors. However, the case was different for anemia. The field “erythrocyte maturation” forms an up regulated network in the “cellular process” field. All genes specific for maturation, including *gata1* or GATA1 dependent hemoglobin genes are over-expressed. The strongest down-regulated genes concerning specifically erythrocytes were the erythrocytic spectrin b and band 4.1 protein genes. A deficiency of these proteins causes a weakness of the erythrocyte membrane. Both are known to be responsible for elliptocytosis with increased red cell destruction anemia in zebrafish and humans. However, in the morphants we could not detect a decrease of macrophages as reported for *hsf1*-KO mice by Jegu et al. (Jegu et al., 2014). In contrast, we detected less neutrophils in the embryos what could correlate to the low *hcls1* expression. It is possible that this difference is due to

differences in the regulation of myelopoiesis between mice and zebrafish. It is also possible that the effect on macrophages could appear at later stages.

Concerning the redox–stress found in *hsf1*-KO mice, we only found indirect signs in the embryos, the up-regulation of anti-oxidant genes. One of these genes, thioredoxin is known not to be regulated by HSF1 but by HSF2. In contrast, expression of Nrf2 (*nfe2l2a* and *nfe2l1b*) itself, the master transcription factor of the anti-oxidant response is down regulated (Log2: -1,5, p-value: 2,7E-6 and log2: -1,25, p-value: 0,00006) and seems unexpectedly regulated by HSF1.

Ciliary beating, a defect described in *hsf1* KO mice is a highly represented down-regulated GO network in *hsf1*-morphants and there is again a very good correlation between RNAseq data and the *hsf1*-KO mouse phenotype. The centrosomal proteins involved in this process play also a role in mitosis. In addition, Cep 131 and is important for genome stability (Staples et al., 2012).

Hsf1-KO mice suffer from neurodegeneration and loss of myelin. These negative effects have been attributed to low HSP contents in the central nervous system. HSF1 activating drugs, such as Riluzole have a proven neuroprotective effect (Liu et al., 2011) and also suppressed experimental autoimmune encephalomyelitis (Gilgun-Sherki et al., 2003). The effect of this drug has been attributed to inhibition of glutamate release and also enhanced expressions of HSP70 and HSP90. Our results suggest that HSF1 could have an effect beyond the simple chaperon induction, as the expression several transcription factors directly involved in oligodendrocyte differentiation and myelinisation, *myrf* and *myt1* are significantly down regulated in *hsf1*-morphants. It is possible that Riluzole could also have a positive effect in neurodegenerative diseases like Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and multiple sclerosis (Killestein et al., 2005) by inducing myelin regeneration.

Several genes that we detected to be regulated by HSF1, like *myt1* or *hivp2* are involved in schizophrenia. This correlates with the finding that schizophrenia patients show higher variability in the levels of HSF1 activation induced by environmental challenges compared to controls (Hashimoto-Torii et al., 2014). Another report on *HSF1*^{-/-} mice revealed aberrant affective behavior with low anxiety and sociability but elevated depression-like and aggressive behavior and less resistance to unusual stressful events (Uchida et al., 2011).

There exists link between HSF1 and circadian rhythm, which is reflected in the GO analysis, and increasing literature can be found on HSF1, heat and circadian rhythm. Not only, hsf1-KO mice have a longer running period (Reinke et al., 2008), heat shock has been shown to enhance internal circadian synchronization via HSF1 (Buhr et al., 2010). We found in hsf1-MO an up-regulation of the circadian genes *per2*, *cry1a* and *cry3* in comparison to control-MO embryos while no differential expression was observed for *period3*. *Per2* expression is normally very low at 48 hpf and cyclic regulation appears later (Delaunay et al., 2003), so we suppose that there could be a shift in *per2* gene expression due to the absence of HSF1. It remains to verify if expression of *per2* or other light inducible genes will be lower in the hsf1-MO embryos than in the controls at later stages and after light induction. In fact, light induction has been reported to up regulate *per3*, *cry1a* and also *hsp90a.2*, *hsp70l* or *hsp9* gene expression in zebrafish larvae (Weger et al., 2011) (Li et al., 2013). It seems that body temperature rhythms induced by light, movement, heat or cold shock are likely to contribute to the synchronization of peripheral oscillators in the intact animal via the modulation of HSF1 activity (Asher and Schibler, 2011) (Kornmann et al., 2007).

Among the many genes that are differently regulated, an interesting finding is the down-regulation of proteins of the complement pathway. This could explain one effect of fever on the innate immune system. According the RNAseq data fever should enhance bacterial lysis via the complement system. Noteworthy is also a highly down regulated gene involved in immune response, *hivep2*. *HIVEP2* plays a role in T cell differentiation and seems to be involved in allergy but also schizophrenia. It is striking too see that schizophrenia patients have an increased risk of immune disorders (Stringer et al., 2014).

The most drastic misregulated genes in our study encode genes for myosin heavy chains, in particular for slow and fast muscles. In fact, Hsf1-KO mice have a significant lower body weight and muscle mass, but the values of the KO mice do not correspond to our RNAseq data. We did not observe a drastic change in muscles in the zebrafish morphants. One explanation could be post-transcriptional modifications of myosin genes in the hsf1-morphants. In this line, we can also mention the reports on heat shock increasing or recover muscle mass (Kojima et al., 2007) (Uehara et al., 2004).

In conclusion, our study shows, that HSF1 is a transcription factor that activates many other transcription factors, probably in a cascade. Many pathways are linked development and also to adaptation to external conditions. We can also state, that many functions of HSF1 proteins cannot be explained only by the chaperon function of the induced heat shock proteins. Finally, the RNAseq data seem to confirm that HSF1 activity is linked to the circadian clock and this should allow the regularly expression of heat shock proteins even under normal physiological conditions.

Acknowledgements

This work was supported by the INSERM, the Ministère de l'Éducation Nationale et de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, the Ligue Nationale Contre le Cancer, the University of Burgundy, and the Conseil Régional de Bourgogne. The authors would like to thank Ilhem Dehimi pour preliminary experiments on hsf1-morphants, Corentin Daguinot for help with bioinformatic data analyses and André Bouchot for his help on the CellimaP platform in Dijon. We are grateful to Benoist Pruvot for critically reading and improving the manuscript. N.Y. was supported by a fellowship of the Feder Program « Jeunes chercheurs entrepreneurs (ref. n°34324) and a fellowship of the Ligue Nationale Contre le Cancer.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Anders, S., and Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome biology* 11, R106.
- Asher, G., and Schibler, U. (2011). Crosstalk between components of circadian and metabolic cycles in mammals. *Cell Metab* 13, 125-137.
- Ben-Moshe, Z., Vatine, G., Alon, S., Tovin, A., Mracek, P., Foulkes, N.S., and Gothilf, Y. (2010). Multiple PAR and E4BP4 bZIP transcription factors in zebrafish: diverse spatial and temporal expression patterns. *Chronobiol Int* 27, 1509-1531.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate - a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological*, 289-300.
- Bierkamp, C., Luxey, M., Metchat, A., Audouard, C., Dumollard, R., and Christians, E. (2010). Lack of maternal Heat Shock Factor 1 results in multiple cellular and developmental defects, including mitochondrial damage and altered redox homeostasis, and leads to reduced survival of mammalian oocytes and embryos. *Dev Biol* 339, 338-353.
- Buhr, E.D., Yoo, S.H., and Takahashi, J.S. (2010). Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. *Science* 330, 379-385.
- Bujalka, H., Koenning, M., Jackson, S., Perreau, V.M., Pope, B., Hay, C.M., Mitew, S., Hill, A.F., Lu, Q.R., Wegner, M., et al. (2013). MYRF is a membrane-associated transcription factor that autoproteolytically cleaves to directly activate myelin genes. *PLoS Biol* 11, e1001625.
- Chen, T.H., Kambal, A., Krysiak, K., Walshauer, M.A., Raju, G., Tibbitts, J.F., and Walter, M.J. (2011). Knockdown of Hspa9, a del(5q31.2) gene, results in a decrease in hematopoietic progenitors in mice. *Blood* 117, 1530-1539.
- Christians, E., Davis, A.A., Thomas, S.D., and Benjamin, I.J. (2000). Maternal effect of Hsf1 on reproductive success. *Nature* 407, 693-694.
- Christians, E.S., Yan, L.J., and Benjamin, I.J. (2002). Heat shock factor 1 and heat shock proteins: critical partners in protection against acute cell injury. *Crit Care Med* 30, S43-50.
- Dai, C., Whitesell, L., Rogers, A.B., and Lindquist, S. (2007). Heat shock factor 1 is a powerful multifaceted modifier of carcinogenesis. *Cell* 130, 1005-1018.
- Daoud, F., Candelario-Martinez, A., Billard, J.M., Avital, A., Khelfaoui, M., Rozenvald, Y., Guegan, M., Mornet, D., Jaillard, D., Nudel, U., et al. (2009). Role of mental retardation-associated dystrophin-gene product Dp71 in excitatory synapse organization, synaptic plasticity and behavioral functions. *PLoS One* 4, e6574.
- de Thonel, A., Vandekerckhove, J., Lanneau, D., Selvakumar, S., Courtois, G., Hazoume, A., Brunet, M., Maurel, S., Hammann, A., Ribeil, J.A., et al. (2010). HSP27 controls GATA-1 protein level during erythroid cell differentiation. *Blood* 116, 85-96.
- Delaunay, F., Thisse, C., Thisse, B., and Laudet, V. (2003). Differential regulation of Period 2 and Period 3 expression during development of the zebrafish circadian clock. *Gene Expr Patterns* 3, 319-324.
- Dubreuil, R.R., and Grushko, T. (1998). Genetic studies of spectrin: new life for a ghost protein. *Bioessays* 20, 875-878.
- Erickson, T., Scholpp, S., Brand, M., Moens, C.B., and Waskiewicz, A.J. (2007). Pbx proteins cooperate with Engrailed to pattern the midbrain-hindbrain and diencephalic-mesencephalic boundaries. *Dev Biol* 301, 504-517.
- Evans, T.G., Belak, Z., Ovsenek, N., and Krone, P.H. (2007). Heat shock factor 1 is required for constitutive Hsp70 expression and normal lens development in embryonic zebrafish. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 146, 131-140.

Frisan, E., Vandekerckhove, J., de Thonel, A., Pierre-Eugene, C., Sternberg, A., Arlet, J.B., Floquet, C., Gyan, E., Kosmider, O., Dreyfus, F., et al. (2012). Defective nuclear localization of Hsp70 is associated with dyserythropoiesis and GATA-1 cleavage in myelodysplastic syndromes. *Blood* 119, 1532-1542.

Gallagher, P.G. (2004). Hereditary elliptocytosis: spectrin and protein 4.1R. *Semin Hematol* 41, 142-164.

Gilgun-Sherki, Y., Panet, H., Melamed, E., and Offen, D. (2003). Riluzole suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for the treatment of multiple sclerosis. *Brain Res* 989, 196-204.

Hall, E.A., Keighren, M., Ford, M.J., Davey, T., Jarman, A.P., Smith, L.B., Jackson, I.J., and Mill, P. (2013). Acute versus chronic loss of mammalian Azi1/Cep131 results in distinct ciliary phenotypes. *PLoS Genet* 9, e1003928.

Hartl, F.U., and Hayer-Hartl, M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295, 1852-1858.

Hashimoto-Torii, K., Torii, M., Fujimoto, M., Nakai, A., El Fatimy, R., Mezger, V., Ju, M.J., Ishii, S., Chao, S.H., Brennand, K.J., et al. (2014). Roles of heat shock factor 1 in neuronal response to fetal environmental risks and its relevance to brain disorders. *Neuron* 82, 560-572.

Homma, S., Jin, X., Wang, G., Tu, N., Min, J., Yanasak, N., and Mivechi, N.F. (2007). Demyelination, astrogliosis, and accumulation of ubiquitinated proteins, hallmarks of CNS disease in hsf1-deficient mice. *J Neurosci* 27, 7974-7986.

Inouye, S., Izu, H., Takaki, E., Suzuki, H., Shirai, M., Yokota, Y., Ichikawa, H., Fujimoto, M., and Nakai, A. (2004). Impaired IgG production in mice deficient for heat shock transcription factor 1. *J Biol Chem* 279, 38701-38709.

Jego, G., Lanneau, D., De Thonel, A., Berthenet, K., Hazoume, A., Droin, N., Hamman, A., Girodon, F., Bellaye, P.S., Wettstein, G., et al. (2014). Dual regulation of SPI1/PU.1 transcription factor by heat shock factor 1 (HSF1) during macrophage differentiation of monocytes. *Leukemia* 28, 1676-1686.

Killestein, J., Kalkers, N.F., and Polman, C.H. (2005). Glutamate inhibition in MS: the neuroprotective properties of riluzole. *J Neurol Sci* 233, 113-115.

Kimura, M.Y., Iwamura, C., Suzuki, A., Miki, T., Hasegawa, A., Sugaya, K., Yamashita, M., Ishii, S., and Nakayama, T. (2007). Schnurri-2 controls memory Th1 and Th2 cell numbers in vivo. *J Immunol* 178, 4926-4936.

Kojima, A., Goto, K., Morioka, S., Naito, T., Akema, T., Fujiya, H., Sugiura, T., Ohira, Y., Beppu, M., Aoki, H., et al. (2007). Heat stress facilitates the regeneration of injured skeletal muscle in rats. *J Orthop Sci* 12, 74-82.

Kornmann, B., Schaad, O., Bujard, H., Takahashi, J.S., and Schibler, U. (2007). System-driven and oscillator-dependent circadian transcription in mice with a conditionally active liver clock. *PLoS Biol* 5, e34.

Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., and Salzberg, S.L. (2009). Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* 10, R25.

Lee, Y., Mattai, A., Long, R., Rapoport, J.L., Gogtay, N., and Addington, A.M. (2012). Microduplications disrupting the MYT1L gene (2p25.3) are associated with schizophrenia. *Psychiatr Genet* 22, 206-209.

Leppa, S., Pirkkala, L., Chow, S.C., Eriksson, J.E., and Sistonen, L. (1997). Thioredoxin is transcriptionally induced upon activation of heat shock factor 2. *J Biol Chem* 272, 30400-30404.

Li, Y., Li, G., Wang, H., Du, J., and Yan, J. (2013). Analysis of a Gene Regulatory Cascade Mediating Circadian Rhythm in Zebrafish. *PLoS Computational Biology* 9, e1002940.

Liao, E.C., Paw, B.H., Peters, L.L., Zapata, A., Pratt, S.J., Do, C.P., Lieschke, G., and Zon, L.I. (2000). Hereditary spherocytosis in zebrafish riesling illustrates evolution of erythroid

beta-spectrin structure, and function in red cell morphogenesis and membrane stability. *Development* 127, 5123-5132.

Lieschke, G.J., Oates, A.C., Crowhurst, M.O., Ward, A.C., and Layton, J.E. (2001). Morphologic and functional characterization of granulocytes and macrophages in embryonic and adult zebrafish. *Blood* 98, 3087-3096.

Liu, A.Y., Mathur, R., Mei, N., Langhammer, C.G., Babiarz, B., and Firestein, B.L. (2011). Neuroprotective drug riluzole amplifies the heat shock factor 1 (HSF1)- and glutamate transporter 1 (GLT1)-dependent cytoprotective mechanisms for neuronal survival. *J Biol Chem* 286, 2785-2794.

Logan, C.A., and Somero, G.N. (2010). Transcriptional responses to thermal acclimation in the eurythermal fish *Gillichthys mirabilis* (Cooper 1864). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299, R843-852.

Maere, S., Heymans, K., and Kuiper, M. (2005). BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics* 21, 3448-3449.

McMillan, D.R., Xiao, X., Shao, L., Graves, K., and Benjamin, I.J. (1998). Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis. *J Biol Chem* 273, 7523-7528.

Mendillo, M.L., Santagata, S., Koeva, M., Bell, G.W., Hu, R., Tamimi, R.M., Fraenkel, E., Ince, T.A., Whitesell, L., and Lindquist, S. (2012). HSF1 drives a transcriptional program distinct from heat shock to support highly malignant human cancers. *Cell* 150, 549-562.

Meyer, K.J., Axelsen, M.S., Sheffield, V.C., Patil, S.R., and Wassink, T.H. (2012). Germline mosaic transmission of a novel duplication of *PXDN* and *MYT1L* to two male half-siblings with autism. *Psychiatr Genet* 22, 137-140.

Montgomery, S.H., Capellini, I., Venditti, C., Barton, R.A., and Mundy, N.I. (2011). Adaptive evolution of four microcephaly genes and the evolution of brain size in anthropoid primates. *Mol Biol Evol* 28, 625-638.

Montgomery, S.H., and Mundy, N.I. (2014). Microcephaly genes evolved adaptively throughout the evolution of eutherian mammals. *BMC Evol Biol* 14, 120.

Morimoto, R.I. (1998). Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* 12, 3788-3796.

Nakayama, T., and Kimura, M.Y. (2010). Memory Th1/Th2 cell generation controlled by *Schnurri-2*. *Adv Exp Med Biol* 684, 1-10.

Nishizawa, S., Koya, T., Ohno, Y., Goto, A., Ikuita, A., Suzuki, M., Ohira, T., Egawa, T., Nakai, A., Sugiura, T., et al. (2013). Regeneration of injured skeletal muscle in heat shock transcription factor 1-null mice. *Physiol Rep* 1, e00071.

Ravi, V., Bhatia, S., Gautier, P., Loosli, F., Tay, B.H., Tay, A., Murdoch, E., Coutinho, P., van Heyningen, V., Brenner, S., et al. (2013). Sequencing of *Pax6* loci from the elephant shark reveals a family of *Pax6* genes in vertebrate genomes, forged by ancient duplications and divergences. *PLoS Genet* 9, e1003177.

Reinke, H., Saini, C., Fleury-Olela, F., Dibner, C., Benjamin, I.J., and Schibler, U. (2008). Differential display of DNA-binding proteins reveals heat-shock factor 1 as a circadian transcription factor. *Genes Dev* 22, 331-345.

Relaix, F., and Buckingham, M. (1999). From insect eye to vertebrate muscle: redeployment of a regulatory network. *Genes Dev* 13, 3171-3178.

Ribeil, J.A., Zermati, Y., Vandekerckhove, J., Cathelin, S., Kersual, J., Dussiot, M., Coulon, S., Moura, I.C., Zeuner, A., Kirkegaard-Sorensen, T., et al. (2007). Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* 445, 102-105.

Ryno, L.M., Genereux, J.C., Naito, T., Morimoto, R.I., Powers, E.T., Shoulders, M.D., and Wiseman, R.L. (2014). Characterizing the altered cellular proteome induced by the stress-independent activation of heat shock factor 1. *ACS Chem Biol* 9, 1273-1283.

Sano, K., Inohaya, K., Kawaguchi, M., Yoshizaki, N., Iuchi, I., and Yasumasu, S. (2008). Purification and characterization of zebrafish hatching enzyme - an evolutionary aspect of the mechanism of egg envelope digestion. *FEBS J* 275, 5934-5946.

Santos, S.D., and Saraiva, M.J. (2004). Enlarged ventricles, astrogliosis and neurodegeneration in heat shock factor 1 null mouse brain. *Neuroscience* 126, 657-663.

Shafizadeh, E., Paw, B.H., Foott, H., Liao, E.C., Barut, B.A., Cope, J.J., Zon, L.I., and Lin, S. (2002). Characterization of zebrafish merlot/chablis as non-mammalian vertebrate models for severe congenital anemia due to protein 4.1 deficiency. *Development* 129, 4359-4370.

Skokowa, J., Klimiankou, M., Klimenkova, O., Lan, D., Gupta, K., Hussein, K., Carrizosa, E., Kusnetsova, I., Li, Z., Sustmann, C., et al. (2012). Interactions among HCLS1, HAX1 and LEF-1 proteins are essential for G-CSF-triggered granulopoiesis. *Nat Med* 18, 1550-1559.

Staples, C.J., Myers, K.N., Beveridge, R.D., Patil, A.A., Lee, A.J., Swanton, C., Howell, M., Boulton, S.J., and Collis, S.J. (2012). The centriolar satellite protein Cep131 is important for genome stability. *J Cell Sci* 125, 4770-4779.

Stringer, S., Kahn, R.S., de Witte, L.D., Ophoff, R.A., and Derks, E.M. (2014). Genetic liability for schizophrenia predicts risk of immune disorders. *Schizophr Res*.

Takagi, T., Harada, J., and Ishii, S. (2001). Murine Schnurri-2 is required for positive selection of thymocytes. *Nat Immunol* 2, 1048-1053.

Takaki, E., Fujimoto, M., Nakahari, T., Yonemura, S., Miyata, Y., Hayashida, N., Yamamoto, K., Vallee, R.B., Mikuriya, T., Sugahara, K., et al. (2007). Heat shock transcription factor 1 is required for maintenance of ciliary beating in mice. *J Biol Chem* 282, 37285-37292.

Takaki, E., Fujimoto, M., Sugahara, K., Nakahari, T., Yonemura, S., Tanaka, Y., Hayashida, N., Inouye, S., Takemoto, T., Yamashita, H., et al. (2006). Maintenance of olfactory neurogenesis requires HSF1, a major heat shock transcription factor in mice. *J Biol Chem* 281, 4931-4937.

Takao, K., Kobayashi, K., Hagihara, H., Ohira, K., Shoji, H., Hattori, S., Koshimizu, H., Umemori, J., Toyama, K., Nakamura, H.K., et al. (2013). Deficiency of schnurri-2, an MHC enhancer binding protein, induces mild chronic inflammation in the brain and confers molecular, neuronal, and behavioral phenotypes related to schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 38, 1409-1425.

Tan, J., Tan, S., Zheng, H., Liu, M., Chen, G., Zhang, H., Wang, K., Tan, S., Zhou, J., and Xiao, X.Z. (2014). HSF1 functions as a transcription regulator for Dp71 expression. *Cell Stress Chaperones*.

Trapnell, C., Pachter, L., and Salzberg, S.L. (2009). TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics (Oxford, England)* 25, 1105-1111.

Trinklein, N.D., Murray, J.I., Hartman, S.J., Botstein, D., and Myers, R.M. (2004). The role of heat shock transcription factor 1 in the genome-wide regulation of the mammalian heat shock response. *Mol Biol Cell* 15, 1254-1261.

Tucker, N.R., Middleton, R.C., Le, Q.P., and Shelden, E.A. (2011). HSF1 is essential for the resistance of zebrafish eye and brain tissues to hypoxia/reperfusion injury. *PLoS One* 6, e22268.

Tucker, N.R., Ustyugov, A., Bryantsev, A.L., Konkil, M.E., and Shelden, E.A. (2009). Hsp27 is persistently expressed in zebrafish skeletal and cardiac muscle tissues but dispensable for their morphogenesis. *Cell Stress Chaperones* 14, 521-533.

Uchida, S., Hara, K., Kobayashi, A., Fujimoto, M., Otsuki, K., Yamagata, H., Hobara, T., Abe, N., Higuchi, F., Shibata, T., et al. (2011). Impaired hippocampal spinogenesis and

neurogenesis and altered affective behavior in mice lacking heat shock factor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 1681-1686.

Uehara, K., Goto, K., Kobayashi, T., Kojima, A., Akema, T., Sugiura, T., Yamada, S., Ohira, Y., Yoshioka, T., and Aoki, H. (2004). Heat-stress enhances proliferative potential in rat soleus muscle. *Jpn J Physiol* 54, 263-271.

Vana, A.C., Lucchinetti, C.F., Le, T.Q., and Armstrong, R.C. (2007). Myelin transcription factor 1 (Myt1) expression in demyelinated lesions of rodent and human CNS. *Glia* 55, 687-697.

Vihervaara, A., and Sistonen, L. (2014). HSF1 at a glance. *J Cell Sci* 127, 261-266.

Walter, S., and Buchner, J. (2002). Molecular chaperones--cellular machines for protein folding. *Angew Chem Int Ed Engl* 41, 1098-1113.

Weger, B.D., Sahinbas, M., Otto, G.W., Mracek, P., Armant, O., Dolle, D., Lahiri, K., Vallone, D., Ettwiller, L., Geisler, R., et al. (2011). The light responsive transcriptome of the zebrafish: function and regulation. *PLoS One* 6, e17080.

Yan, L.J., Christians, E.S., Liu, L., Xiao, X., Sohal, R.S., and Benjamin, I.J. (2002). Mouse heat shock transcription factor 1 deficiency alters cardiac redox homeostasis and increases mitochondrial oxidative damage. *EMBO J* 21, 5164-5172.

Tables

Table 1: RNASeq quality check

Lane	Name	Index	Bases (M)	Reads	%PF	%Raw cluster	% >Q30
1	MO-HSF1	CGATGT	4,019	81,128,694	97.13	23.30	98.47
1	MO-HSF1	TGACCA	4,204	85,114,710	96.84	24.45	98.22
1	MO-CTRL	ACAGTG	4,228	85,714,066	96.72	24.62	99.46
1	MO-CTRL	GCCAAT	4,497	91,331,352	96.54	26.23	99.30

Table 2: Misregulated *hsp* genes in *hsf1*-MO embryos

Genes symbol	Gene name	log2 fold change	p-value
Down-regulated genes			
<i>hspa4a</i>	heat shock protein 4a	-1,50	0,000581
<i>hspa4b</i>	heat shock protein 4b	-2,98	1,11E-14
<i>hspa4l</i>	heat shock hsp 70 like hsp110 family	-2,87	2,43E-11
<i>hsp70-4</i>	hsp70 like cognate duplicate	-1,73	0,035150
<i>hsp90aa1.1</i>	heat shock protein 90, alpha (cytosolic)	-1,74	8,03E-05
<i>hsp90ab1</i>	heat shock protein 90, alpha (cytosolic), class B member 1	-1,55	0,000385
<i>hsp90b1</i>	heat shock protein 90, beta (grp94), member 1	-2,81	2,07E-07
Up-regulated genes			
<i>hspb1</i>	<i>heat shock protein, alpha-crystallin-related, 1; hsp27</i>	+1,83	0,000020
<i>hspe1</i>	heat shock 10 protein 1 (chaperonin 10)	+1,55	1,24E-06
<i>hspd1</i>	heat shock 60kD protein 1 (chaperonin)	+1,40	9,47E-06

Table 3: Misregulated genes in *hsf1*-MO embryos linked to phenotypes

Genes symbol	Gene name	log2 fold change	p-value
Zebrafish <i>hsf1</i>-morphant phenotypes			
Small eye phenotype			
<i>pax6b</i>	<i>paired box gene 6b</i>	-1,98	1,23E-05
<i>pax6l</i>	<i>paired box gene 6l</i>	-1,67	0,000389
<i>eya2</i>	<i>eyes absent homolog 2</i>	-1,37	3,14E-05
<i>dachb</i>	<i>dachshund</i>	-1,77	8,11E-05
<i>six7</i>	<i>sine oculis</i>	-1,44	0,005621
Hatching			
<i>he1b</i>	<i>hatching enzyme 1b</i>	+1,88	5,47E-11
<i>he2</i>	<i>hatching enzyme 2</i>	+3,08	0,00018
Anemia			
<i>sptb</i>	<i>spectrin, beta, erythrocytic</i>	-3,91	1,06E-35
<i>epb41b</i>	<i>erythrocyte membrane protein band 4.1b</i>	-4,66	1,28E-16
Neutropenia			
<i>hcls1</i>	<i>hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1</i>	-4,88	1,56E-21
Mouse <i>hsf1</i>-KO phenotypes			
Oxidative stress response			
<i>txn</i>	<i>thioredoxin</i>	+1,19	0,00159
<i>txnrd1</i>	<i>thioredoxin reductase 1</i>	+1,06	0,00051
<i>gpx4a</i>	<i>glutathione peroxidase 4a</i>	+1,49	0,00018
<i>gpx4b</i>	<i>glutathione peroxidase 4b</i>	+0,98	0,00147
<i>sod1</i>	<i>superoxide dismutase 1</i>	+1,09	0,00040
<i>prdx1</i>	<i>peroxiredoxin-1</i>	+1,59	2,82E-06
Cilia and ciliary beating			
<i>ofd1</i>	<i>oral-facial-digital syndrome 1</i>	-2,88	2,86E-08
<i>rpgrb</i>	<i>retinitis pigmentosa GTPase regulator b</i>	-1,79	0,004100
<i>azi1</i>	<i>centrosomal protein 131 cep131</i>	-3,54	1,50E-08
<i>cep70</i>	<i>centrosomal protein 70</i>	-1,49	0,001420
Myelin loss			
<i>myrf</i>	<i>myelin regulatory factor</i>	- 1,70	1,74E-05
<i>myt1a</i>	<i>myelin transcription factor 1a</i>	-3,23	5,72E-12
<i>myt1b</i>	<i>myelin transcription factor 1b</i>	-1,67	8,18E-05
<i>myt1la</i>	<i>myelin transcription factor like 1a</i>	-2,53	5,23E-11
Circadian cycle			
<i>per2</i>	<i>period circadian protein homolog 2</i>	+2,52	0,00012
<i>cry3</i>	<i>cryptochrome 3</i>	+1,27	0,00038
<i>cry-dash</i>	<i>cryptochrome DASH</i>	+2,16	0,00117
<i>cry1a</i>	<i>cryptochrome1a</i>	+2,16	0,03622
<i>tefb</i>	<i>thyrotropic embryonic factor</i>	+1,34	0,00167

Table 4: Other misregulated genes in *hsf1*-MO embryos

Genes symbol	Gene name	log2 fold change	p-value
Immune response, complement pathway			
<i>c7a</i>	<i>complement component 7a</i>	-0,98	0,004030
<i>c5</i>	<i>complement component 5</i>	-2,55	1,76E-07
<i>c3a</i>	<i>complement component 3a</i>	-3,64	3,20E-11
<i>cfh</i>	<i>complement factor H</i>	-1,91	5,02E-05
<i>b</i>	<i>complement factor B</i>	-1,82	0,016210
<i>hivp2a</i>	<i>immunodeficiency virus type 1 enhancer-binding protein</i>	-4,06	3,34E-20
Muscle fiber genes			
<i>smyhc1</i>	<i>slow myosin heavy chain 1</i>	-6,17	3,47E-55
<i>smyhc2</i>	<i>slow myosin heavy chain 2</i>	-5,46	1,35E-03
<i>smyhc3</i>	<i>slow myosin heavy chain 3</i>	-2,64	0,001172
<i>myhc4</i>	<i>myosin heavy chain 4</i>	-5,30	1,40E-50
<i>myhz2</i>	<i>myosin, heavy polypeptide 2, fast muscle</i>	-5,39	1,45E-50
<i>myhz1.1</i>	<i>myosin, heavy polypeptide 1.1, skeletal muscle</i>	-5,57	3,60E-35
<i>myhz1.2</i>	<i>myosin, heavy polypeptide 1.2, skeletal muscle</i>	-5,54	9,93E-33
<i>myhz1.3</i>	<i>myosin, heavy polypeptide 1.3, skeletal muscle</i>	-5,49	2,58E-47

Figure legends

Figure 1: The Effect of *hsf1* knockdown on protein expression

Western blot analysis of proteins of *hsf1*-MO and control-MO zebrafish embryos. Embryos were allowed to develop to 48 hpf at 28°C with and without subsequent heat shock at 37°C for 90 min before protein extraction. Equivalent protein loading was confirmed by Coomassie blue staining of embryo extracts following SDS-PAGE.

Figure 2: Small eye phenotype and reduced pigmentation in *hsf1*-morphants

Normal (a) and small (b) eye phenotype of 52 hpf control-morphants and *hsf1*-morphants. The *hsf1*-MO treated embryos show less pigmentation (b). (c) Graph bars illustrating average change in surface of the eye area of *hsf1*-MO injected embryos in comparison to control-MO injected embryos. Average eye surface decreased from $243.10^3 \mu\text{m}^2$ in control-MO (n=25) to $159.10^3 \mu\text{m}^2$ in *hsf1*-MO injected embryos (n=25). Reduction in eye surface differed significantly from control embryos determined by statistical analyses (unpaired *t* test; * $p < 0.0001$). Standard errors of means are shown for each data set. 28% of control embryos displayed slight reduction in pigmentation (47/166) compared to 78% of *hsf1*-MO embryos (133/171).

Figure 3: Effect of *hsf1* knockdown on hatching

Graph bars demonstrate an increase in the average percentage of hatched embryos at 48 hpf in *hsf1*-MO injected embryos. The average was calculated from five independent experiments with a total number of embryos of 481 for ctrl-MO and 424 for *hsf1*-MO. The difference in percentage of hatching is significant between the two conditions (unpaired *t* test; * $p < 0.001$). Standard errors of means are shown in for each data set.

Figure 4: Anemia and neutropenia in *hsf1*-MO embryos

(a, b) whole-mount *o*-dianisidine staining of control-MO and *hsf1*-MO embryos at 48 hpf, showing a decrease of blood cells in *hsf1*-MO embryos. This phenotype was observed in 100% of embryos injected with *hsf1*-MO (n=38) compared to control-MO (n=36). (c, d) Tg (*mpx:GFP*) embryos were injected with control-MO and *hsf1*-MO. At 72 hpf we noticed a decrease in neutrophils in 100% of *hsf1*-MO embryos (n=36) compared to controls (n=24).

Figure 5: Analysis of RNA-seq data.

(a) Principle component analysis of gene expression in the control (ctl) and *hsf1* morphants. (b) Correlation of gene expression between the control and *hsf1* morpholino treated group. The up- and down-regulated genes were shown in red. Cut-off: $|\text{Log}_2 \text{ fold change}| \geq 0,5$, $p\text{-value} \leq 0.01$

Figure 6: Hierarchical clustering of the differential expression of *hsf1*-MO and control-MO

Cluster analysis of the RNASeq experiments. Up-regulated transcripts are shown in yellow-orange down-regulated genes in blue with the color intensity indicating \log_2 fold change values. Four major clusters could be identified within the down-regulated gene group and two in the up-regulated group (Cutoff: $|\text{Log}_2 \text{ fold change}| \geq 0, 5$, $p\text{-value} \leq 0.01$; done on 3515 misregulated genes).

Figure 7: Gene Ontology hierarchy and enrichment statistics for the biological process ontology of up-regulated genes in *hsf1* morphants.

GO terms within the biological process ontology that are significantly enriched (adjusted $p < 0.05$) in the *hsf1* knockdown gene set are indicated in color, with the color shade corresponding to the enrichment p-value.

Figure 8: Gene Ontology hierarchy and enrichment statistics for the biological process ontology of down-regulated genes in *hsf1* morphants.

GO terms within the biological process ontology that are significantly enriched (adjusted $p < 0.05$) in the *hsf1* knockdown gene set are indicated in color, with the color shade corresponding to the enrichment p-value.

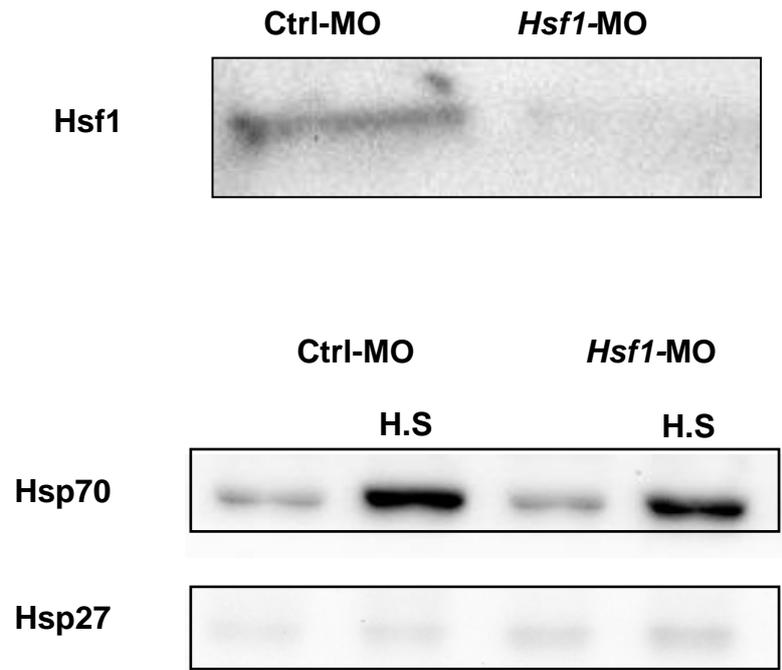


Figure 1

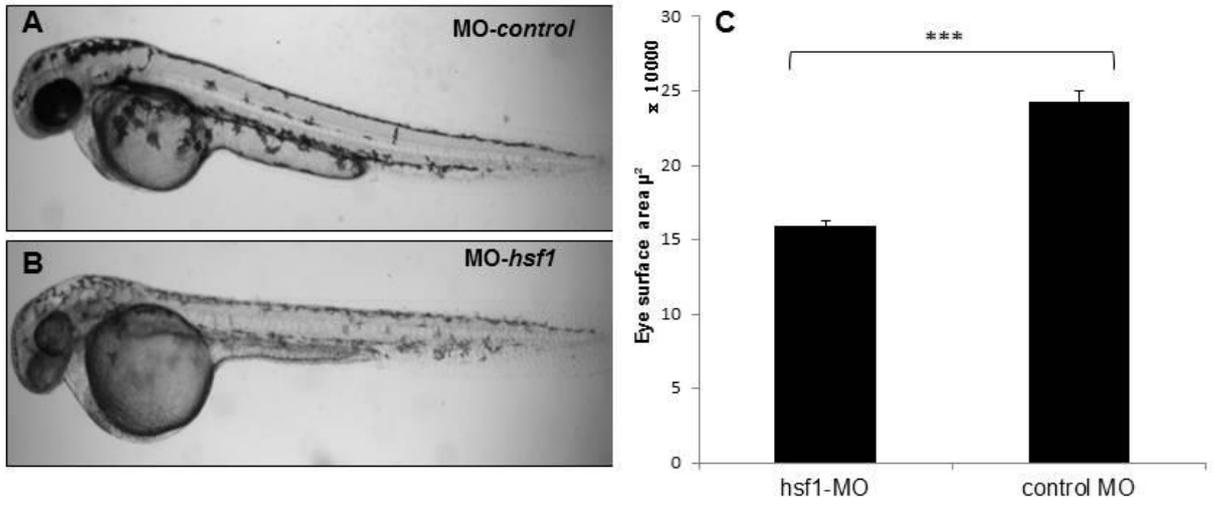


Figure 2

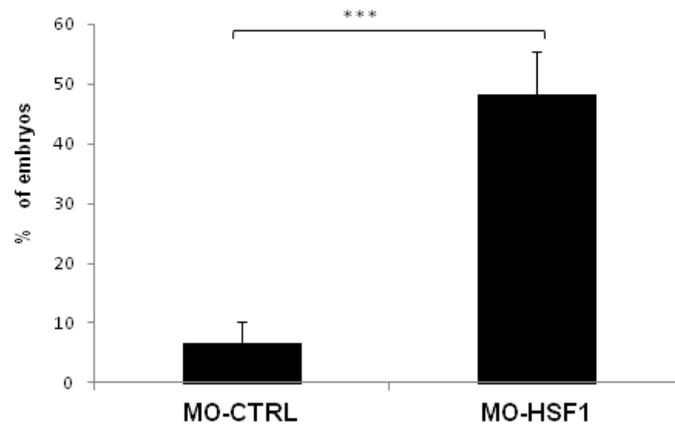


Figure 3

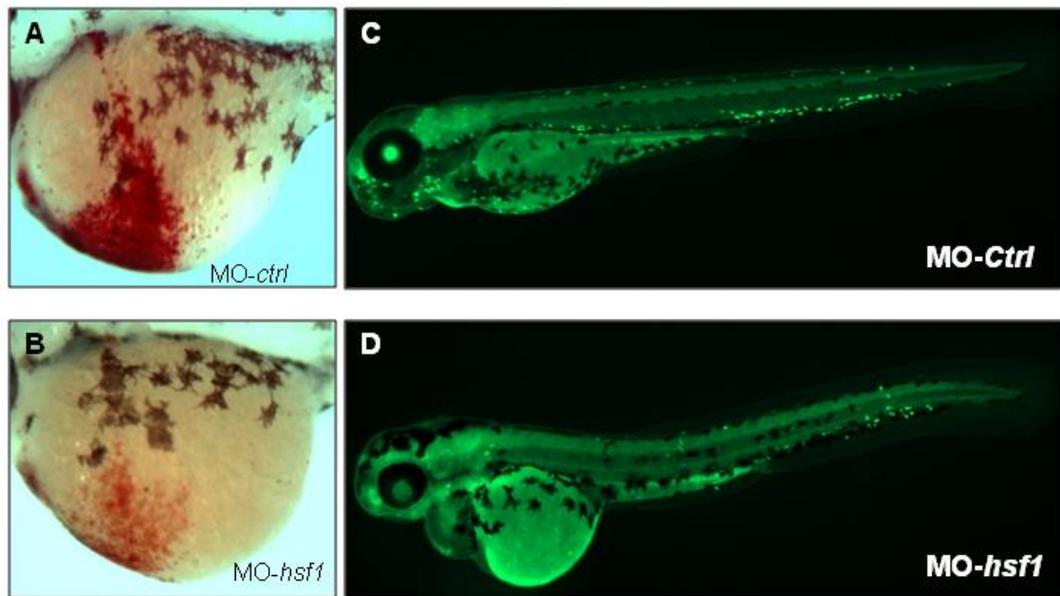


Figure 4

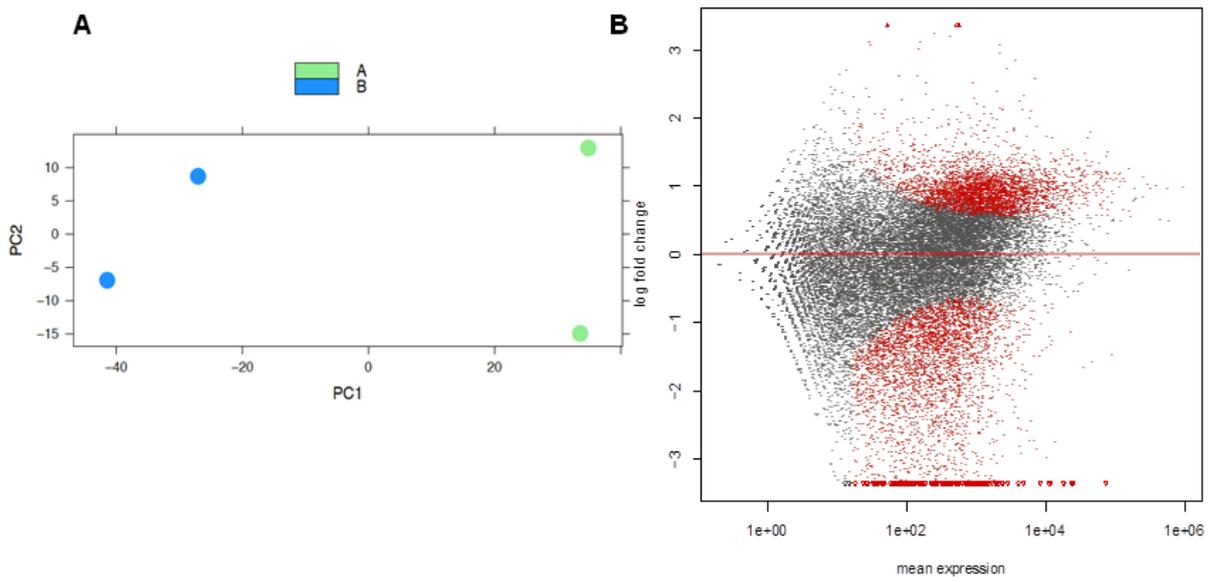
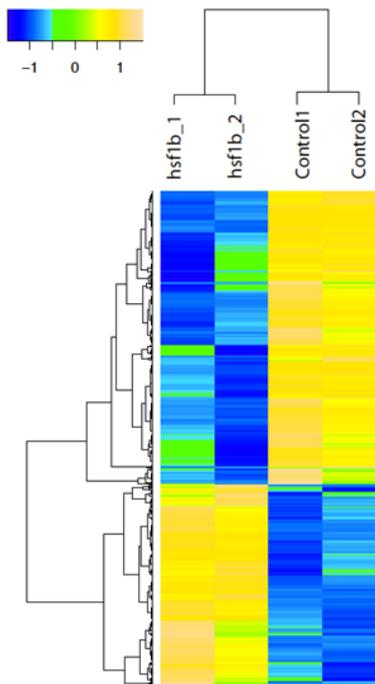


Figure 5



Done on 3515 misregulated genes

Downregulated Group enriched in genes involved in:

- cytoskeleton arrangement, FDR < 1.10^{-14}
- muscle development, FDR < 1.10^{-6}
- neurogenesis FDR < 1.10^{-6}
- mitosis FDR < 1.10^{-5}

Upregulated:

- oxidative stress FDR < 1.10^{-18}
- (cytoskeleton FDR < 1.10^{-2})

Figure 6

V. Discussion

Tous ces résultats, indiquent le rôle joué par les protéines de la réponse au stress thermique dans l'érythropoïèse chez le poisson zèbre. Avec l'inactivation de *hsf1* et le phénotype anémique associé, on s'attendait à un effet direct sur l'expression de GATA1, un très important facteur de transcription érythroïde. L'absence d'anticorps qui fonctionne contre GATA1 chez le poisson zèbre, ne nous a pas permis d'apprécier l'expression protéique de GATA1 chez les morphants *hsf1*, par contre l'analyse de l'expression génique par qPCR nous a révélé une augmentation de son expression. Une analyse bio-informatique afin de trouver des sites HSE où HSF1 se fixerait afin d'induire l'expression de *gata1* n'a rien révélé, nous indiquant un lien indirect de HSF1 sur l'expression de *gata1*. De plus, cette augmentation ne s'accorde pas avec le phénotype anémique.

Le défaut de différenciation des érythroblastes observé chez les morphants *hsf1*, nous a amenés à explorer la voie de HSP70, dont le rôle dans la différenciation des érythroblastes a été démontré *in vitro* (Ribeil et al., 2007). Nous avons constaté une anémie chez les morphants *hsp70*, et avons démontré pour la première fois le rôle de HSP70 dans l'érythropoïèse *in vivo*.

Le lien entre HSP70 et érythropoïèse est aussi démontré grâce aux résultats que nous avons obtenus avec l'inactivation de HIKESHI, une protéine responsable du transport de HSP70 du cytoplasme vers le noyau afin de protéger GATA1 du clivage par la caspase-3. Ces résultats restent encore préliminaires, puisque nous n'avons pas pu confirmer l'inactivation de *Hikeshi* par western blot, vu l'indisponibilité d'un anticorps anti-HIKESHI qui fonctionne chez le poisson zèbre. Néanmoins le rôle de HSP70 dans l'érythropoïèse est lié à la dégradation de GATA1 qui ne serait plus protégé en absence de HSP70. Pourtant l'inactivation de *hsf1* qui se

traduirait par une baisse de l'expression de HSP70 et par conséquent, une dégradation de GATA1, n'est pas le résultat obtenu, puisque grâce à l'analyse transcriptomique, nous constatons une surexpression des gènes GATA1-dépendants. Nous en concluons que GATA1 est bien fonctionnelle, et que le rôle de HSF1 dans l'érythropoïèse ne pourrait être HSP70 indépendant.

L'anémie observée peut être expliquée par une forte baisse de l'expression des gènes *sptb* et *epb41*, responsables de la structure cytosquelettique des érythrocytes, et dont les mutants poissons zèbres sont utilisés comme modèles d'étude de l'Elliptocytose humaine. Le phénotype observé serait alors indépendant d'une fonction de protection de Gata1 par HSP70. Par contre, nous ne pouvons pas exclure une fonction de *hsp70* dans ce processus, car nous voyons un phénotype similaire avec des morpholinos *hsp70*.

HSF1, étant le facteur de transcription induisant l'expression de HSP70, son inactivation qui se traduit par une baisse de l'expression de *hsp70*, réduit aussi celle d'autres *hsps* telles que *hsp90* et *hspa4a* (faisant partie de la famille *hsp110* (Crawford et al., 2011)), ainsi qu'une augmentation de *hsp27* (Tucker et al., 2011), qui ont permis de valider les résultats de l'analyse transcriptomique faite sur des morphants *hsf1*.

Grâce à cette étude transcriptomique, nous avons aussi pu identifier des gènes, non connus pour être régulés directement par HSF1, mais impliqués dans l'érythropoïèse. Ainsi, nous avons constaté une baisse d'expression de gènes comme *pbx1a*, *pbx1b* et *meis1*, dont l'inactivation par morpholino chez le poisson zèbre se traduit par une anémie (Cvejic et al., 2011). Nous avons aussi noté une surexpression des gènes de globines (comme par exemple *hbbe3* et *hbbe1*), ce qui indique une fonctionnalité de GATA1. Ces mêmes gènes sont réprimés aussi en conditions physiologiques normales par les gènes *sox6* et *bcl11ab*. Mais

puisque ces deux gènes sont négativement régulés chez les morphants *hsf1*, la surexpression des gènes de globines serait attendue.

Nous démontrons aussi le rôle joué par HSF1 dans le développement embryonnaire chez le poisson zèbre, puisque son inactivation s'est traduite par des embryons présentant de petits yeux et un défaut dans la pigmentation, mais aussi une neutropénie. En plus de ces phénotypes observés et étudiés, nous avons révélé aussi une dérégulation de certains gènes dont les phénotypes ont été décrits chez des souris knock-out pour le gène *Hsf1*. Par exemple, les souris KO pour le gène *Hsf1* se caractérisent par un défaut dans la fonction des battements ciliaires. Ceci pourrait être corrélé avec une baisse de l'expression du gène *Hsp90*, décrit comme nécessaire pour cette fonction (Takaki et al., 2007). L'analyse *gene ontology* a permis d'identifier des gènes dont la fonction moléculaire est attribuée au fonctionnement des battements ciliaires tels que *Centrosomal protein 131*, *RPGR* et *OFD1*.

VI. Conclusions et perspectives :

Au cours de ces travaux, nous avons mis en évidence le rôle de HSF1 dans des processus autres que les réponses aux stress thermique. Nous confirmons son implication dans le développement chez le poisson zèbre, par exemple au niveau des yeux, de la pigmentation et de l'hématopoïèse, et nous soulignons aussi son rôle dans le contrôle de l'éclosion des embryons. Nous avons également détecté des dérégulations de gènes qui correspondent à des phénotypes observés chez les souris *Hsf1* knockout.

Les résultats apportés par l'étude transcriptomique peuvent servir de point de départ pour identifier de nouveaux rôles de HSF1 chez le poisson zèbre, mais aussi chez d'autres modèles.

Concernant la fonction de HSF1 et HSP70 dans l'érythropoïèse dans ce modèle, elle reste encore à explorer. Néanmoins, nous apportons par des études préliminaires des indications *in vivo* du rôle joué par HSP70 dans ce processus, et ouvrons une porte pour l'étude de HIKESHI et son rôle dans le transport de HSP70, et la différenciation des érythroblastes.

Dans le but de mieux comprendre le rôle joué par HSP70 dans ce processus de différenciation, il serait inévitable d'isoler les globules rouges de morphants poisson zèbre *hsf1*-MO et *hsp70*-MO, afin de localiser HSP70 durant les étapes de différenciation. Il serait aussi important d'isoler les globules rouges des morphants *hikeshi*-MO, afin de déterminer s'ils présentent un problème de différenciation, et localiser HSP70, qui en absence de la protéine HIKESHI, bloquerait son transport vers le noyau, se traduisant par des érythroblastes non différenciés. Il serait aussi intéressant de savoir si les érythroblastes des morphants HSP70 et Hikeshi présentent une mort cellulaire de type apoptotique qui

impliquerait la caspase-3. Ceci confirmerait le rôle de HSP70 dans la protection de GATA1 du clivage par la caspase-3 dans un modèle *in vivo*. Mais avant, une confirmation du rôle de Hikeshi dans un modèle *in vitro* de cellules K562 en différenciation (cellules érythroleucémiques humaines) serait nécessaire afin de valider son rôle dans le transport de HSP70 durant la différenciation érythroblastique.

La localisation nucléaire de HSP70 durant la différenciation terminale érythroïde est essentielle dans un processus physiologique, ou un processus pathologique comme dans le cas des β -thalassémie (Arlet et al., 2014). Ainsi l'identification d'un rôle de Hikeshi dans ce mécanisme cellulaire pourrait en faire une nouvelle molécule cible dans les études portant sur les pathologies des globules rouges.

Concernant le rôle de HSF1 dans l'érythropoïèse, la forte baisse dans l'expression des gènes codant pour des protéines cytosquelettiques des érythrocytes (spectrine et epb41) chez les morphants *hsf1*, ainsi qu'une augmentation dans l'expression de GATA1 indiquerait un rôle de *hsf1* qui serait indépendant de la dégradation de GATA1. Par conséquent, le phénotype anémique observé pourrait être lié à la fragilité cytomembranaire des érythrocytes. Une recherche de sites HSE et d'une interaction de HSF1 avec les promoteurs des gènes cibles permettrait d'apporter la preuve du contrôle par HSF1 de ces deux gènes, mais aussi d'autres gènes dont le rôle dans l'érythropoïèse est déjà connu comme celui de *meis1*, dont l'inactivation chez le poisson zèbre s'est traduite par une forte anémie. Avec cette étude transcriptomique et le phénotype observé, nous confirmons le rôle de HSF1 dans l'érythropoïèse dans un modèle *in vivo*, et dont le mécanisme reste encore à expliquer.

Bibliographie :

- Abravaya, K., Myers, M.P., Murphy, S.P., and Morimoto, R.I. (1992). The human heat shock protein hsp70 interacts with HSF, the transcription factor that regulates heat shock gene expression. *Genes Dev.* *6*, 1153–1164.
- Akerfelt, M., Trouillet, D., Mezger, V., and Sistonen, L. (2007). Heat shock factors at a crossroad between stress and development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1113*, 15–27.
- Akerfelt, M., Morimoto, R.I., and Sistonen, L. (2010). Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 545–555.
- Ali, A., Bharadwaj, S., O'Carroll, R., and Ovsenek, N. (1998). HSP90 interacts with and regulates the activity of heat shock factor 1 in *Xenopus* oocytes. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 4949–4960.
- Amatruda, J.F., Shepard, J.L., Stern, H.M., and Zon, L.I. (2002). Zebrafish as a cancer model system. *Cancer Cell* *1*, 229–231.
- Amores, A., Force, A., Yan, Y.L., Joly, L., Amemiya, C., Fritz, A., Ho, R.K., Langeland, J., Prince, V., Wang, Y.L., et al. (1998). Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. *Science* *282*, 1711–1714.
- Amsterdam, A. (2006). Insertional mutagenesis in zebrafish: genes for development, genes for disease. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* *5*, 19–23.
- Amsterdam, A., Lin, S., and Hopkins, N. (1995). The *Aequorea victoria* green fluorescent protein can be used as a reporter in live zebrafish embryos. *Dev. Biol.* *171*, 123–129.
- Amsterdam, A., Burgess, S., Golling, G., Chen, W., Sun, Z., Townsend, K., Farrington, S., Haldi, M., and Hopkins, N. (1999). A large-scale insertional mutagenesis screen in zebrafish. *Genes Dev.* *13*, 2713–2724.
- Arlet, J.-B., Ribeil, J.-A., Guillem, F., Negre, O., Hazoume, A., Marcion, G., Beuzard, Y., Dussiot, M., Moura, I.C., Demarest, S., et al. (2014). HSP70 sequestration by free α -globin promotes ineffective erythropoiesis in β -thalassaemia. *Nature* *514*, 242–246.
- Bahary, N., Davidson, A., Ransom, D., Shepard, J., Stern, H., Trede, N., Zhou, Y., Barut, B., and Zon, L.I. (2004). The Zon laboratory guide to positional cloning in zebrafish. *Methods Cell Biol.* *77*, 305–329.
- Balciunas, D., Davidson, A.E., Sivasubbu, S., Hermanson, S.B., Welle, Z., and Ekker, S.C. (2004). Enhancer trapping in zebrafish using the Sleeping Beauty transposon. *BMC Genomics* *5*, 62.
- Baler, R., Welch, W.J., and Voellmy, R. (1992). Heat shock gene regulation by nascent polypeptides and denatured proteins: hsp70 as a potential autoregulatory factor. *J. Cell Biol.* *117*, 1151–1159.
- Beckwith, L.G., Moore, J.L., Tsao-Wu, G.S., Harshbarger, J.C., and Cheng, K.C. (2000). Ethylnitrosourea induces neoplasia in zebrafish (*Danio rerio*). *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *80*, 379–385.
- Bedell, V.M., Wang, Y., Campbell, J.M., Poshusta, T.L., Starker, C.G., Krug, R.G., Tan, W., Penheiter, S.G., Ma, A.C., Leung, A.Y.H., et al. (2012). In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature* *491*, 114–118.

- Bennett, C.M., Kanki, J.P., Rhodes, J., Liu, T.X., Paw, B.H., Kieran, M.W., Langenau, D.M., Delahaye-Brown, A., Zon, L.I., Fleming, M.D., et al. (2001). Myelopoiesis in the zebrafish, *Danio rerio*. *Blood* *98*, 643–651.
- Berghmans, S., Jette, C., Langenau, D., Hsu, K., Stewart, R., Look, T., and Kanki, J.P. (2005). Making waves in cancer research: new models in the zebrafish. *BioTechniques* *39*, 227–237.
- Berman, J.N., Kanki, J.P., and Look, A.T. (2005). Zebrafish as a model for myelopoiesis during embryogenesis. *Exp. Hematol.* *33*, 997–1006.
- Bertrand, J.Y., Kim, A.D., Violette, E.P., Stachura, D.L., Cisson, J.L., and Traver, D. (2007). Definitive hematopoiesis initiates through a committed erythromyeloid progenitor in the zebrafish embryo. *Dev. Camb. Engl.* *134*, 4147–4156.
- Bertrand, J.Y., Kim, A.D., Teng, S., and Traver, D. (2008). CD41+ cmyb+ precursors colonize the zebrafish pronephros by a novel migration route to initiate adult hematopoiesis. *Dev. Camb. Engl.* *135*, 1853–1862.
- Bharadwaj, S., Ali, A., and Ovsenek, N. (1999). Multiple components of the HSP90 chaperone complex function in regulation of heat shock factor 1 *In vivo*. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 8033–8041.
- Bhaya, D., Davison, M., and Barrangou, R. (2011). CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu. Rev. Genet.* *45*, 273–297.
- Boch, J., and Bonas, U. (2010). Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annu. Rev. Phytopathol.* *48*, 419–436.
- Brownlie, A., Donovan, A., Pratt, S.J., Paw, B.H., Oates, A.C., Brugnara, C., Witkowska, H.E., Sassa, S., and Zon, L.I. (1998). Positional cloning of the zebrafish *sauternes* gene: a model for congenital sideroblastic anaemia. *Nat. Genet.* *20*, 244–250.
- Brownlie, A., Hersey, C., Oates, A.C., Paw, B.H., Falick, A.M., Witkowska, H.E., Flint, J., Higgs, D., Jessen, J., Bahary, N., et al. (2003). Characterization of embryonic globin genes of the zebrafish. *Dev. Biol.* *255*, 48–61.
- Bruce, J.M., Paul, C., Fromentin, A., Hilpert, S., Arrigo, A.P., Solary, E., and Garrido, C. (2000). Differential regulation of HSP27 oligomerization in tumor cells grown *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene* *19*, 4855–4863.
- Burel, C., Mezger, V., Pinto, M., Rallu, M., Trigon, S., and Morange, M. (1992). Mammalian heat shock protein families. Expression and functions. *Experientia* *48*, 629–634.
- Carradice, D., and Lieschke, G.J. (2008). Zebrafish in hematology: sushi or science? *Blood* *111*, 3331–3342.
- Chang, Y., Ostling, P., Akerfelt, M., Trouillet, D., Rallu, M., Gitton, Y., El Fatimy, R., Fardeau, V., Le Crom, S., Morange, M., et al. (2006). Role of heat-shock factor 2 in cerebral cortex formation and as a regulator of p35 expression. *Genes Dev.* *20*, 836–847.
- Chen, X., Easton, D., Oh, H.J., Lee-Yoon, D.S., Liu, X., and Subject, J. (1996). The 170 kDa glucose regulated stress protein is a large HSP70-, HSP110-like protein of the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* *380*, 68–72.

- Chiang, E.F., Yan, Y.L., Tong, S.K., Hsiao, P.H., Guiguen, Y., Postlethwait, J., and Chung, B.C. (2001). Characterization of duplicated zebrafish *cyp19* genes. *J. Exp. Zool.* *290*, 709–714.
- Childs, S., Weinstein, B.M., Mohideen, M.A., Donohue, S., Bonkovsky, H., and Fishman, M.C. (2000). Zebrafish *dracula* encodes ferrochelatase and its mutation provides a model for erythropoietic protoporphyria. *Curr. Biol.* *10*, 1001–1004.
- Coonrod, S.A., Bolling, L.C., Wright, P.W., Visconti, P.E., and Herr, J.C. (2001). A morpholino phenocopy of the mouse *mos* mutation. *Genes. N. Y. N* *2000* *30*, 198–200.
- Corkery, D.P., Dellaire, G., and Berman, J.N. (2011). Leukaemia xenotransplantation in zebrafish – chemotherapy response assay in vivo. *Br. J. Haematol.* *153*, 786–789.
- Crawford, K.C., Vega Flores, M., Oehlers, S.H., Hall, C.J., Crosier, K.E., and Crosier, P.S. (2011). Zebrafish heat shock protein $\alpha 4$ genes in the intestinal epithelium are up-regulated during inflammation. *Genes. N. Y. N* *2000* *49*, 905–911.
- Csermely, P., Schnaider, T., So"ti, C., Prohászka, Z., and Nardai, G. (1998). The 90-kDa Molecular Chaperone Family: Structure, Function, and Clinical Applications. A Comprehensive Review. *Pharmacol. Ther.* *79*, 129–168.
- Cvejic, A., Serbanovic-Canic, J., Stemple, D.L., and Ouwehand, W.H. (2011). The role of *meis1* in primitive and definitive hematopoiesis during zebrafish development. *Haematologica* *96*, 190–198.
- Davidson, A.J., and Zon, L.I. (2004). The “definitive” (and “primitive”) guide to zebrafish hematopoiesis. *Oncogene* *23*, 7233–7246.
- Davidson, A.E., Balciunas, D., Mohn, D., Shaffer, J., Hermanson, S., Sivasubbu, S., Cliff, M.P., Hackett, P.B., and Ekker, S.C. (2003a). Efficient gene delivery and gene expression in zebrafish using the Sleeping Beauty transposon. *Dev. Biol.* *263*, 191–202.
- Davidson, A.J., Ernst, P., Wang, Y., Dekens, M.P.S., Kingsley, P.D., Palis, J., Korsmeyer, S.J., Daley, G.Q., and Zon, L.I. (2003b). *cdx4* mutants fail to specify blood progenitors and can be rescued by multiple *hox* genes. *Nature* *425*, 300–306.
- Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., et al. (2002). Mutations of the *BRAF* gene in human cancer. *Nature* *417*, 949–954.
- Detrich, H.W., Kieran, M.W., Chan, F.Y., Barone, L.M., Yee, K., Rundstadler, J.A., Pratt, S., Ransom, D., and Zon, L.I. (1995). Intraembryonic hematopoietic cell migration during vertebrate development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 10713–10717.
- Didelot, C., Lanneau, D., Brunet, M., Bouchot, A., Cartier, J., Jacquelin, A., Ducoroy, P., Cathelin, S., Decolonne, N., Chiosis, G., et al. (2008). Interaction of heat-shock protein 90 beta isoform (HSP90 beta) with cellular inhibitor of apoptosis 1 (c-IAP1) is required for cell differentiation. *Cell Death Differ.* *15*, 859–866.
- Dodd, A., Chambers, S.P., and Love, D.R. (2004). Short interfering RNA-mediated gene targeting in the zebrafish. *FEBS Lett.* *561*, 89–93.

- Donovan, A., Brownlie, A., Zhou, Y., Shepard, J., Pratt, S.J., Moynihan, J., Paw, B.H., Drejer, A., Barut, B., Zapata, A., et al. (2000). Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* *403*, 776–781.
- Donovan, A., Brownlie, A., Dorschner, M.O., Zhou, Y., Pratt, S.J., Paw, B.H., Phillips, R.B., Thisse, C., Thisse, B., and Zon, L.I. (2002). The zebrafish mutant gene chardonnay (cdy) encodes divalent metal transporter 1 (DMT1). *Blood* *100*, 4655–4659.
- Dooley, K.A., Davidson, A.J., and Zon, L.I. (2005). Zebrafish scl functions independently in hematopoietic and endothelial development. *Dev. Biol.* *277*, 522–536.
- Draper, B.W., Morcos, P.A., and Kimmel, C.B. (2001). Inhibition of zebrafish fgf8 pre-mRNA splicing with morpholino oligos: a quantifiable method for gene knockdown. *Genes. N. Y. N* *2000* *30*, 154–156.
- Driever, W., Solnica-Krezel, L., Schier, A.F., Neuhaus, S.C., Malicki, J., Stemple, D.L., Stainier, D.Y., Zwartkruis, F., Abdelilah, S., Rangini, Z., et al. (1996). A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Dev. Camb. Engl.* *123*, 37–46.
- Duina, A.A., Kalton, H.M., and Gaber, R.F. (1998). Requirement for Hsp90 and a CyP-40-type cyclophilin in negative regulation of the heat shock response. *J. Biol. Chem.* *273*, 18974–18978.
- Evans, T.G., Yamamoto, Y., Jeffery, W.R., and Krone, P.H. (2005). Zebrafish Hsp70 is required for embryonic lens formation. *Cell Stress Chaperones* *10*, 66–78.
- Evans, T.G., Belak, Z., Ovsenek, N., and Krone, P.H. (2007). Heat shock factor 1 is required for constitutive Hsp70 expression and normal lens development in embryonic zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* *146*, 131–140.
- Eyler, C.E., Wu, Q., Yan, K., MacSwords, J.M., Chandler-Militello, D., Misuraca, K.L., Lathia, J.D., Forrester, M.T., Lee, J., Stamler, J.S., et al. (2011). Glioma stem cell proliferation and tumor growth are promoted by nitric oxide synthase-2. *Cell* *146*, 53–66.
- Feng, H., Langenau, D.M., Madge, J.A., Quinkertz, A., Gutierrez, A., Neubergh, D.S., Kanki, J.P., and Look, A.T. (2007). Heat-shock induction of T-cell lymphoma/leukaemia in conditional Cre/lox-regulated transgenic zebrafish. *Br. J. Haematol.* *138*, 169–175.
- Fraenkel, P.G., Traver, D., Donovan, A., Zahrieh, D., and Zon, L.I. (2005). Ferroportin1 is required for normal iron cycling in zebrafish. *J. Clin. Invest.* *115*, 1532–1541.
- Friend, S.H. (1993). Genetic models for studying cancer susceptibility. *Science* *259*, 774–775.
- Frisan, E., Vandekerckhove, J., de Thonel, A., Pierre-Eugène, C., Sternberg, A., Arlet, J.-B., Floquet, C., Gyan, E., Kosmider, O., Dreyfus, F., et al. (2012). Defective nuclear localization of Hsp70 is associated with dyserythropoiesis and GATA-1 cleavage in myelodysplastic syndromes. *Blood* *119*, 1532–1542.
- Fujimoto, M., Izu, H., Seki, K., Fukuda, K., Nishida, T., Yamada, S.-I., Kato, K., Yonemura, S., Inouye, S., and Nakai, A. (2004). HSF4 is required for normal cell growth and differentiation during mouse lens development. *EMBO J.* *23*, 4297–4306.
- Fujimoto, M., Hayashida, N., Katoh, T., Oshima, K., Shinkawa, T., Prakasam, R., Tan, K., Inouye, S., Takii, R., and Nakai, A. (2010). A novel mouse HSF3 has the potential to activate nonclassical heat-shock genes during heat shock. *Mol. Biol. Cell* *21*, 106–116.

- Fukumura, D., Gohongi, T., Kadambi, A., Izumi, Y., Ang, J., Yun, C.O., Buerk, D.G., Huang, P.L., and Jain, R.K. (2001). Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 2604–2609.
- Gaiano, N., Allende, M., Amsterdam, A., Kawakami, K., and Hopkins, N. (1996). Highly efficient germ-line transmission of proviral insertions in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 7777–7782.
- Galloway, J.L., Wingert, R.A., Thisse, C., Thisse, B., and Zon, L.I. (2005). Loss of *gata1* but not *gata2* converts erythropoiesis to myelopoiesis in zebrafish embryos. *Dev. Cell* *8*, 109–116.
- Garrido, C. (2002). Size matters: of the small HSP27 and its large oligomers. *Cell Death Differ.* *9*, 483–485.
- Garrido, C., Paul, C., Seigneuric, R., and Kampinga, H.H. (2012). The small heat shock proteins family: The long forgotten chaperones. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *44*, 1588–1592.
- Glickman, N.S., and Yelon, D. (2002). Cardiac development in zebrafish: coordination of form and function. *Semin. Cell Dev. Biol.* *13*, 507–513.
- Goessling, W., North, T.E., and Zon, L.I. (2007). New waves of discovery: modeling cancer in zebrafish. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *25*, 2473–2479.
- Golling, G., Amsterdam, A., Sun, Z., Antonelli, M., Maldonado, E., Chen, W., Burgess, S., Haldi, M., Artzt, K., Farrington, S., et al. (2002). Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes essential for early vertebrate development. *Nat. Genet.* *31*, 135–140.
- Gong, Z., Wan, H., Tay, T.L., Wang, H., Chen, M., and Yan, T. (2003). Development of transgenic fish for ornamental and bioreactor by strong expression of fluorescent proteins in the skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *308*, 58–63.
- Goodrich, E.S. *Studies on the structure & development of vertebrates.* -- (London : Macmillan,).
- Grabher, C., Joly, J.-S., and Wittbrodt, J. (2004). Highly efficient zebrafish transgenesis mediated by the meganuclease I-SceI. *Methods Cell Biol.* *77*, 381–401.
- Grimes, A.C., Stadt, H.A., Shepherd, I.T., and Kirby, M.L. (2006). Solving an enigma: arterial pole development in the zebrafish heart. *Dev. Biol.* *290*, 265–276.
- Grunwald, D.J., and Streisinger, G. (1992). Induction of recessive lethal and specific locus mutations in the zebrafish with ethyl nitrosourea. *Genet. Res.* *59*, 103–116.
- Guettouche, T., Boellmann, F., Lane, W.S., and Voellmy, R. (2005). Analysis of phosphorylation of human heat shock factor 1 in cells experiencing a stress. *BMC Biochem.* *6*, 4.
- Guo, Y., Guettouche, T., Fenna, M., Boellmann, F., Pratt, W.B., Toft, D.O., Smith, D.F., and Voellmy, R. (2001). Evidence for a mechanism of repression of heat shock factor 1 transcriptional activity by a multichaperone complex. *J. Biol. Chem.* *276*, 45791–45799.
- Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M.C., Hammerschmidt, M., Kane, D.A., Odenthal, J., van Eeden, F.J., Jiang, Y.J., Heisenberg, C.P., et al. (1996). The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Dev. Camb. Engl.* *123*, 1–36.

- Hall, C., Flores, M.V., Storm, T., Crosier, K., and Crosier, P. (2007). The zebrafish lysozyme C promoter drives myeloid-specific expression in transgenic fish. *BMC Dev. Biol.* 7, 42.
- Harrison, C.J., Bohm, A.A., and Nelson, H.C. (1994). Crystal structure of the DNA binding domain of the heat shock transcription factor. *Science* 263, 224–227.
- Heasman, J. (2002). Morpholino oligos: making sense of antisense? *Dev. Biol.* 243, 209–214.
- Heasman, J., Kofron, M., and Wylie, C. (2000). Beta-catenin signaling activity dissected in the early *Xenopus* embryo: a novel antisense approach. *Dev. Biol.* 222, 124–134.
- Heimpel, H. (2004). Congenital dyserythropoietic anemias: epidemiology, clinical significance, and progress in understanding their pathogenesis. *Ann. Hematol.* 83, 613–621.
- Heimpel, H., Anselstetter, V., Chrobak, L., Denecke, J., Einsiedler, B., Gallmeier, K., Griesshammer, A., Marquardt, T., Janka-Schaub, G., Kron, M., et al. (2003). Congenital dyserythropoietic anemia type II: epidemiology, clinical appearance, and prognosis based on long-term observation. *Blood* 102, 4576–4581.
- Hietakangas, V., Ahlskog, J.K., Jakobsson, A.M., Hellesuo, M., Sahlberg, N.M., Holmberg, C.I., Mikhailov, A., Palvimo, J.J., Pirkkala, L., and Sistonen, L. (2003). Phosphorylation of serine 303 is a prerequisite for the stress-inducible SUMO modification of heat shock factor 1. *Mol. Cell. Biol.* 23, 2953–2968.
- Hietakangas, V., Anckar, J., Blomster, H.A., Fujimoto, M., Palvimo, J.J., Nakai, A., and Sistonen, L. (2006). PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 45–50.
- Hokamp, K., McLysaght, A., and Wolfe, K.H. (2003). The 2R hypothesis and the human genome sequence. *J. Struct. Funct. Genomics* 3, 95–110.
- Holland, P.W., Garcia-Fernández, J., Williams, N.A., and Sidow, A. (1994). Gene duplications and the origins of vertebrate development. *Dev. Camb. Engl. Suppl.* 125–133.
- Holmberg, C.I., Hietakangas, V., Mikhailov, A., Rantanen, J.O., Kallio, M., Meinander, A., Hellman, J., Morrice, N., MacKintosh, C., Morimoto, R.I., et al. (2001). Phosphorylation of serine 230 promotes inducible transcriptional activity of heat shock factor 1. *EMBO J.* 20, 3800–3810.
- Holmqvist, B., Ellingsen, B., Alm, P., Forsell, J., Oyan, A.M., Goksøyr, A., Fjose, A., and Seo, H.C. (2000). Identification and distribution of nitric oxide synthase in the brain of adult zebrafish. *Neurosci. Lett.* 292, 119–122.
- Howard, E.W., Newman, L.A., Oleksyn, D.W., Angerer, R.C., and Angerer, L.M. (2001). SpKrl: a direct target of beta-catenin regulation required for endoderm differentiation in sea urchin embryos. *Dev. Camb. Engl.* 128, 365–375.
- Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J.E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., et al. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498–503.
- Hruscha, A., Krawitz, P., Rechenberg, A., Heinrich, V., Hecht, J., Haass, C., and Schmid, B. (2013). Efficient CRISPR/Cas9 genome editing with low off-target effects in zebrafish. *Development* 140, 4982–4987.

- Hsia, N., and Zon, L.I. (2005). Transcriptional regulation of hematopoietic stem cell development in zebrafish. *Exp. Hematol.* *33*, 1007–1014.
- Inman, K.E., and Downs, K.M. (2007). The murine allantois: emerging paradigms in development of the mammalian umbilical cord and its relation to the fetus. *Genes. N. Y. N* *2000* *45*, 237–258.
- Ishikawa, T.-O., Griffin, K.J.P., Banerjee, U., and Herschman, H.R. (2007). The zebrafish genome contains two inducible, functional cyclooxygenase-2 genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *352*, 181–187.
- Jäättelä, M., Wissing, D., Kokholm, K., Kallunki, T., and Egeblad, M. (1998). Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *EMBO J.* *17*, 6124–6134.
- Jaillon, O., Aury, J.-M., Brunet, F., Petit, J.-L., Stange-Thomann, N., Mauceli, E., Bouneau, L., Fischer, C., Ozouf-Costaz, C., Bernot, A., et al. (2004). Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature* *431*, 946–957.
- Jakobsen, B.K., and Pelham, H.R. (1988). Constitutive binding of yeast heat shock factor to DNA in vivo. *Mol. Cell. Biol.* *8*, 5040–5042.
- Jeannin, J.-F., Leon, L., Cortier, M., Sassi, N., Paul, C., and Bettaieb, A. (2008). Nitric oxide-induced resistance or sensitization to death in tumor cells. *Nitric Oxide Biol. Chem. Off. J. Nitric Oxide Soc.* *19*, 158–163.
- Jego, G., Lanneau, D., De Thonel, A., Berthenet, K., Hazoumé, A., Droin, N., Hamman, A., Girodon, F., Bellaye, P.-S., Wettstein, G., et al. (2014). Dual regulation of SPI1/PU.1 transcription factor by heat shock factor 1 (HSF1) during macrophage differentiation of monocytes. *Leukemia* *28*, 1676–1686.
- Jin, H., Sood, R., Xu, J., Zhen, F., English, M.A., Liu, P.P., and Wen, Z. (2009). Definitive hematopoietic stem/progenitor cells manifest distinct differentiation output in the zebrafish VDA and PBI. *Dev. Camb. Engl.* *136*, 647–654.
- De Jong, J.L.O., and Zon, L.I. (2005). Use of the zebrafish system to study primitive and definitive hematopoiesis. *Annu. Rev. Genet.* *39*, 481–501.
- Jurivich, D.A., Sistonen, L., Kroes, R.A., and Morimoto, R.I. (1992). Effect of sodium salicylate on the human heat shock response. *Science* *255*, 1243–1245.
- Kampinga, H.H., Hageman, J., Vos, M.J., Kubota, H., Tanguay, R.M., Bruford, E.A., Cheetham, M.E., Chen, B., and Hightower, L.E. (2009). Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones* *14*, 105–111.
- Kawakami, K. (2000). [Insertional mutagenesis in zebrafish and a proviral insertional mutation hagoromo]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso.* *45*, 2810–2819.
- Kawakami, K. (2005). Transposon tools and methods in zebrafish. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *234*, 244–254.
- Kawakami, K., and Shima, A. (1999). Identification of the Tol2 transposase of the medaka fish *Oryzias latipes* that catalyzes excision of a nonautonomous Tol2 element in zebrafish *Danio rerio*. *Gene* *240*, 239–244.

- Kawakami, K., Koga, A., Hori, H., and Shima, A. (1998). Excision of the *tol2* transposable element of the medaka fish, *Oryzias latipes*, in zebrafish, *Danio rerio*. *Gene* 225, 17–22.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., and Schilling, T.F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 203, 253–310.
- Kissa, K., Murayama, E., Zapata, A., Cortés, A., Perret, E., Machu, C., and Herbomel, P. (2008). Live imaging of emerging hematopoietic stem cells and early thymus colonization. *Blood* 111, 1147–1156.
- Klose, J., Wolf, U., Hitzeroth, H., Ritter, H., and Ohno, S. (1969). Polyploidization in the fish family Cyprinidae, order Cypriniformes. II. Duplication of the gene loci coding for lactate dehydrogenase (E.C.: 1.1.1.27) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (E.C.: 1.1.1.44) in various species of Cyprinidae. *Humangenetik* 7, 245–250.
- Knowlton, A.A., Grenier, M., Kirchoff, S.R., and Salfity, M. (2000). Phosphorylation at tyrosine-524 influences nuclear accumulation of HSP72 with heat stress. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 278, H2143–H2149.
- Koizumi, S., Ohama, N., Mizoi, J., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2014). Functional analysis of the Hikeshi-like protein and its interaction with HSP70 in *Arabidopsis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 450, 396–400.
- Kos, R., Reedy, M.V., Johnson, R.L., and Erickson, C.A. (2001). The winged-helix transcription factor FoxD3 is important for establishing the neural crest lineage and repressing melanogenesis in avian embryos. *Dev. Camb. Engl.* 128, 1467–1479.
- Kose, S., Furuta, M., and Imamoto, N. (2012). Hikeshi, a nuclear import carrier for Hsp70s, protects cells from heat shock-induced nuclear damage. *Cell* 149, 578–589.
- Kröncke, K.D., Fehsel, K., and Kolb-Bachofen, V. (1997). Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection—how, why, when, and where? *Nitric Oxide Biol. Chem. Off. J. Nitric Oxide Soc.* 1, 107–120.
- Krone, P.H., Evans, T.G., and Blechinger, S.R. (2003). Heat shock gene expression and function during zebrafish embryogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 14, 267–274.
- Lam, P., Harvie, E.A., and Huttenlocher, A. (2013). Heat shock modulates neutrophil motility in zebrafish. *PLoS One* 8, e84436.
- Lam, S.H., Chua, H.L., Gong, Z., Lam, T.J., and Sin, Y.M. (2004). Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: a gene expression profiling, in situ hybridization and immunological study. *Dev. Comp. Immunol.* 28, 9–28.
- Lam, S.H., Wu, Y.L., Vega, V.B., Miller, L.D., Spitsbergen, J., Tong, Y., Zhan, H., Govindarajan, K.R., Lee, S., Mathavan, S., et al. (2006). Conservation of gene expression signatures between zebrafish and human liver tumors and tumor progression. *Nat. Biotechnol.* 24, 73–75.
- Landry, J., Chrétien, P., Bernier, D., Nicole, L.M., Marceau, N., and Tanguay, R.M. (1982). Thermotolerance and heat shock proteins induced by hyperthermia in rat liver cells. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 8, 59–62.
- Langenau, D.M., and Zon, L.I. (2005). The zebrafish: a new model of T-cell and thymic development. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 307–317.

- Langenau, D.M., Traver, D., Ferrando, A.A., Kutok, J.L., Aster, J.C., Kanki, J.P., Lin, S., Prochownik, E., Trede, N.S., Zon, L.I., et al. (2003). Myc-induced T cell leukemia in transgenic zebrafish. *Science* *299*, 887–890.
- Langenau, D.M., Ferrando, A.A., Traver, D., Kutok, J.L., Hezel, J.-P.D., Kanki, J.P., Zon, L.I., Look, A.T., and Trede, N.S. (2004). In vivo tracking of T cell development, ablation, and engraftment in transgenic zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 7369–7374.
- Langenau, D.M., Keefe, M.D., Storer, N.Y., Guyon, J.R., Kutok, J.L., Le, X., Goessling, W., Neubergh, D.S., Kunkel, L.M., and Zon, L.I. (2007). Effects of RAS on the genesis of embryonal rhabdomyosarcoma. *Genes Dev.* *21*, 1382–1395.
- Lawson, N.D., and Weinstein, B.M. (2002). In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Dev. Biol.* *248*, 307–318.
- Lee, L.M.J., Seftor, E.A., Bonde, G., Cornell, R.A., and Hendrix, M.J.C. (2005). The fate of human malignant melanoma cells transplanted into zebrafish embryos: Assessment of migration and cell division in the absence of tumor formation. *Dev. Dyn.* *233*, 1560–1570.
- Lele, Z., Engel, S., and Krone, P.H. (1997). hsp47 and hsp70 gene expression is differentially regulated in a stress- and tissue-specific manner in zebrafish embryos. *Dev. Genet.* *21*, 123–133.
- Lele, Z., Hartson, S.D., Martin, C.C., Whitesell, L., Matts, R.L., and Krone, P.H. (1999). Disruption of zebrafish somite development by pharmacologic inhibition of Hsp90. *Dev. Biol.* *210*, 56–70.
- Lepiller, S., Laurens, V., Bouchot, A., Herbomel, P., Solary, E., and Chluba, J. (2007). Imaging of nitric oxide in a living vertebrate using a diamino-fluorescein probe. *Free Radic. Biol. Med.* *43*, 619–627.
- Lepiller, S., Franche, N., Solary, E., Chluba, J., and Laurens, V. (2009). Comparative analysis of zebrafish nos2a and nos2b genes. *Gene* *445*, 58–65.
- Liao, E.C., Paw, B.H., Peters, L.L., Zapata, A., Pratt, S.J., Do, C.P., Lieschke, G., and Zon, L.I. (2000). Hereditary spherocytosis in zebrafish riesling illustrates evolution of erythroid beta-spectrin structure, and function in red cell morphogenesis and membrane stability. *Dev. Camb. Engl.* *127*, 5123–5132.
- Liao, E.C., Trede, N.S., Ransom, D., Zapata, A., Kieran, M., and Zon, L.I. (2002). Non-cell autonomous requirement for the bloodless gene in primitive hematopoiesis of zebrafish. *Dev. Camb. Engl.* *129*, 649–659.
- Lin, S., Yang, S., and Hopkins, N. (1994). lacZ expression in germline transgenic zebrafish can be detected in living embryos. *Dev. Biol.* *161*, 77–83.
- Lirk, P., Hoffmann, G., and Rieder, J. (2002). Inducible nitric oxide synthase--time for reappraisal. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* *1*, 89–108.
- Liu, W.-Y., Wang, Y., Sun, Y.-H., Wang, Y., Wang, Y.-P., Chen, S.-P., and Zhu, Z.-Y. (2005). Efficient RNA interference in zebrafish embryos using siRNA synthesized with SP6 RNA polymerase. *Dev. Growth Differ.* *47*, 323–331.
- Long, Q., Meng, A., Wang, H., Jessen, J.R., Farrell, M.J., and Lin, S. (1997). GATA-1 expression pattern can be recapitulated in living transgenic zebrafish using GFP reporter gene. *Dev. Camb. Engl.* *124*, 4105–4111.

- Lynch, M., and Conery, J.S. (2000). The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* 290, 1151–1155.
- Lyons, S.E., Lawson, N.D., Lei, L., Bennett, P.E., Weinstein, B.M., and Liu, P.P. (2002). A nonsense mutation in zebrafish *gata1* causes the bloodless phenotype in vlad tepes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 5454–5459.
- Martin, C.C., Tsang, C.H., Beiko, R.G., and Krone, P.H. (2002). Expression and genomic organization of the zebrafish chaperonin gene complex. *Genome Natl. Res. Counc. Can. Génome Cons. Natl. Rech. Can.* 45, 804–811.
- McCallum, C.M., Comai, L., Greene, E.A., and Henikoff, S. (2000). Targeted screening for induced mutations. *Nat. Biotechnol.* 18, 455–457.
- McMillan, D.R., Xiao, X., Shao, L., Graves, K., and Benjamin, I.J. (1998). Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273, 7523–7528.
- Middleton, R.C., and Shelden, E.A. (2013). Small heat shock protein HSPB1 regulates growth of embryonic zebrafish craniofacial muscles. *Exp. Cell Res.* 319, 860–874.
- Milner, C.M., and Campbell, R.D. (1990). Structure and expression of the three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics* 32, 242–251.
- Mizgireuv, I.V., and Revskoy, S.Y. (2006). Transplantable tumor lines generated in clonal zebrafish. *Cancer Res.* 66, 3120–3125.
- Montosi, G., Donovan, A., Totaro, A., Garuti, C., Pignatti, E., Cassanelli, S., Trenor, C.C., Gasparini, P., Andrews, N.C., and Pietrangelo, A. (2001). Autosomal-dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the ferroportin (SLC11A3) gene. *J. Clin. Invest.* 108, 619–623.
- Morcos, P.A., Li, Y., and Jiang, S. (2008). Vivo-Morpholinos: a non-peptide transporter delivers Morpholinos into a wide array of mouse tissues. *BioTechniques* 45, 613–614, 616, 618 *passim*.
- Mungrue, I.N., Gros, R., You, X., Pirani, A., Azad, A., Csont, T., Schulz, R., Butany, J., Stewart, D.J., and Husain, M. (2002). Cardiomyocyte overexpression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation, heart block, and sudden death. *J. Clin. Invest.* 109, 735–743.
- Murayama, E., Kissa, K., Zapata, A., Mordelet, E., Briolat, V., Lin, H.-F., Handin, R.I., and Herbomel, P. (2006). Tracing hematopoietic precursor migration to successive hematopoietic organs during zebrafish development. *Immunity* 25, 963–975.
- Nakai, A. (1999). New aspects in the vertebrate heat shock factor system: Hsf3 and Hsf4. *Cell Stress Chaperones* 4, 86–93.
- Nasevicius, A., and Ekker, S.C. (2000). Effective targeted gene “knockdown” in zebrafish. *Nat. Genet.* 26, 216–220.
- Nieto-Sotelo, J., Wiederrecht, G., Okuda, A., and Parker, C.S. (1990). The yeast heat shock transcription factor contains a transcriptional activation domain whose activity is repressed under nonshock conditions. *Cell* 62, 807–817.

- Njajou, O.T., Vaessen, N., Joosse, M., Berghuis, B., van Dongen, J.W., Breuning, M.H., Snijders, P.J., Rutten, W.P., Sandkuijl, L.A., Oostra, B.A., et al. (2001). A mutation in SLC11A3 is associated with autosomal dominant hemochromatosis. *Nat. Genet.* *28*, 213–214.
- Nornes, S., Clarkson, M., Mikkola, I., Pedersen, M., Bardsley, A., Martinez, J.P., Krauss, S., and Johansen, T. (1998). Zebrafish contains two pax6 genes involved in eye development. *Mech. Dev.* *77*, 185–196.
- Nover, L., Scharf, K.D., Gagliardi, D., Vergne, P., Czarnecka-Verner, E., and Gurley, W.B. (1996). The Hsf world: classification and properties of plant heat stress transcription factors. *Cell Stress Chaperones* *1*, 215–223.
- Nutt, S.L., Bronchain, O.J., Hartley, K.O., and Amaya, E. (2001). Comparison of morpholino based translational inhibition during the development of *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*. *Genes. N. Y. N* *2000* *30*, 110–113.
- Oda, Y., Kimura, M., Kose, S., Fasken, M.B., Corbett, A.H., and Imamoto, N. (2014). The *Schizosaccharomyces pombe* Hikeshi/Opi10 protein has similar biochemical functions to its human homolog but acts in different physiological contexts. *FEBS Lett.* *588*, 1899–1905.
- Okihiro, M.S., and Hinton, D.E. (1999). Progression of hepatic neoplasia in medaka (*Oryzias latipes*) exposed to diethylnitrosamine. *Carcinogenesis* *20*, 933–940.
- Orkin, S.H. (1995). Regulation of globin gene expression in erythroid cells. *Eur. J. Biochem. FEBS* *231*, 271–281.
- Ostling, P., Björk, J.K., Roos-Mattjus, P., Mezger, V., and Sistonen, L. (2007). Heat shock factor 2 (HSF2) contributes to inducible expression of hsp genes through interplay with HSF1. *J. Biol. Chem.* *282*, 7077–7086.
- Panopoulou, G., and Poustka, A.J. (2005). Timing and mechanism of ancient vertebrate genome duplications -- the adventure of a hypothesis. *Trends Genet. TIG* *21*, 559–567.
- Parcellier, A., Gurbuxani, S., Schmitt, E., Solary, E., and Garrido, C. (2003). Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *304*, 505–512.
- Pardanaud, L., Yassine, F., and Dieterlen-Lievre, F. (1989). Relationship between vasculogenesis, angiogenesis and haemopoiesis during avian ontogeny. *Dev. Camb. Engl.* *105*, 473–485.
- Park, S.W., Davison, J.M., Rhee, J., Hruban, R.H., Maitra, A., and Leach, S.D. (2008). Oncogenic KRAS induces progenitor cell expansion and malignant transformation in zebrafish exocrine pancreas. *Gastroenterology* *134*, 2080–2090.
- Patton, E.E., and Zon, L.I. (2005). Taking human cancer genes to the fish: a transgenic model of melanoma in zebrafish. *Zebrafish* *1*, 363–368.
- Paw, B.H. (2001). Cloning of the zebrafish retsina blood mutation: a genetic model for dyserythropoiesis and erythroid cytokinesis. *Blood Cells. Mol. Dis.* *27*, 62–64.
- Paw, B.H., Davidson, A.J., Zhou, Y., Li, R., Pratt, S.J., Lee, C., Trede, N.S., Brownlie, A., Donovan, A., Liao, E.C., et al. (2003a). Cell-specific mitotic defect and dyserythropoiesis associated with erythroid band 3 deficiency. *Nat. Genet.* *34*, 59–64.

- Paw, B.H., Davidson, A.J., Zhou, Y., Li, R., Pratt, S.J., Lee, C., Trede, N.S., Brownlie, A., Donovan, A., Liao, E.C., et al. (2003b). Cell-specific mitotic defect and dyserythropoiesis associated with erythroid band 3 deficiency. *Nat. Genet.* *34*, 59–64.
- Picard, D., Khursheed, B., Garabedian, M.J., Fortin, M.G., Lindquist, S., and Yamamoto, K.R. (1990). Reduced levels of hsp90 compromise steroid receptor action in vivo. *Nature* *348*, 166–168.
- Pliss, G.B., Zabezhinski, M.A., Petrov, A.S., and Khudoley, V.V. (1982). Peculiarities of N-nitramines carcinogenic action. *Arch. Für Geschwulstforsch.* *52*, 629–634.
- Pollock, P.M., Harper, U.L., Hansen, K.S., Yudt, L.M., Stark, M., Robbins, C.M., Moses, T.Y., Hostetter, G., Wagner, U., Kakareka, J., et al. (2003). High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat. Genet.* *33*, 19–20.
- Poon, K.-L., Richardson, M., and Korzh, V. (2008). Expression of zebrafish nos2b surrounds oral cavity. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *237*, 1662–1667.
- Postlethwait, J.H., Woods, I.G., Ngo-Hazelett, P., Yan, Y.L., Kelly, P.D., Chu, F., Huang, H., Hill-Force, A., and Talbot, W.S. (2000). Zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate chromosomes. *Genome Res.* *10*, 1890–1902.
- Pratt, W.B., and Toft, D.O. (1997). Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.* *18*, 306–360.
- Pruvot, B., Jacquet, A., Droin, N., Auberger, P., Bouscary, D., Tamburini, J., Muller, M., Fontenay, M., Chluba, J., and Solary, E. (2011). Leukemic cell xenograft in zebrafish embryo for investigating drug efficacy. *Haematologica* *96*, 612–616.
- Qian, F., Zhen, F., Xu, J., Huang, M., Li, W., and Wen, Z. (2007). Distinct Functions for Different scl Isoforms in Zebrafish Primitive and Definitive Hematopoiesis. *PLoS Biol* *5*, e132.
- Rabergh, C.M., Airaksinen, S., Soitamo, A., Bjorklund, H.V., Johansson, T., Nikinmaa, M., and Sistonen, L. (2000). Tissue-specific expression of zebrafish (*Danio rerio*) heat shock factor 1 mRNAs in response to heat stress. *J. Exp. Biol.* *203*, 1817–1824.
- Rabindran, S.K., Haroun, R.I., Clos, J., Wisniewski, J., and Wu, C. (1993). Regulation of heat shock factor trimer formation: role of a conserved leucine zipper. *Science* *259*, 230–234.
- Ransom, D.G., Haffter, P., Odenthal, J., Brownlie, A., Vogelsang, E., Kelsh, R.N., Brand, M., van Eeden, F.J., Furutani-Seiki, M., Granato, M., et al. (1996). Characterization of zebrafish mutants with defects in embryonic hematopoiesis. *Dev. Camb. Engl.* *123*, 311–319.
- Ransom, D.G., Bahary, N., Niss, K., Traver, D., Burns, C., Trede, N.S., Paffett-Lugassy, N., Saganic, W.J., Lim, C.A., Hersey, C., et al. (2004). The zebrafish moonshine gene encodes transcriptional intermediary factor 1gamma, an essential regulator of hematopoiesis. *PLoS Biol.* *2*, E237.
- Raz, E., van Luenen, H.G., Schaerringer, B., Plasterk, R.H., and Driever, W. (1998). Transposition of the nematode *Caenorhabditis elegans* Tc3 element in the zebrafish *Danio rerio*. *Curr. Biol. CB* *8*, 82–88.
- Ribeil, J.-A., Zermati, Y., Vandekerckhove, J., Cathelin, S., Kersual, J., Dussiot, M., Coulon, S., Moura, I.C., Zeuner, A., Kirkegaard-Sørensen, T., et al. (2007). Hsp70 regulates erythropoiesis by preventing caspase-3-mediated cleavage of GATA-1. *Nature* *445*, 102–105.

- Ritossa, F. (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Experientia* 18, 571–573.
- Robb, L. (1997). Hematopoiesis: origin pinned down at last? *Curr. Biol.* CB 7, R10–R12.
- Robinson-Rechavi, M., and Laudet, V. (2001). Evolutionary rates of duplicate genes in fish and mammals. *Mol. Biol. Evol.* 18, 681–683.
- Robinson-Rechavi, M., Boussau, B., and Laudet, V. (2004). Phylogenetic dating and characterization of gene duplications in vertebrates: the cartilaginous fish reference. *Mol. Biol. Evol.* 21, 580–586.
- Santoriello, C., Anelli, V., Alghisi, E., and Mione, M. (2012). Highly penetrant melanoma in a zebrafish model is independent of ErbB3b signaling. *Pigment Cell Melanoma Res.* 25, 287–289.
- Satou, Y., Imai, K.S., and Satoh, N. (2001). Action of morpholinos in *Ciona* embryos. *Genes.* N. Y. N 2000 30, 103–106.
- Schmitt, E., Parcellier, A., Gurbuxani, S., Cande, C., Hammann, A., Morales, M.C., Hunt, C.R., Dix, D.J., Kroemer, R.T., Giordanetto, F., et al. (2003). Chemosensitization by a non-apoptogenic heat shock protein 70-binding apoptosis-inducing factor mutant. *Cancer Res.* 63, 8233–8240.
- Shafizadeh, E., Paw, B.H., Foott, H., Liao, E.C., Barut, B.A., Cope, J.J., Zon, L.I., and Lin, S. (2002). Characterization of zebrafish merlot/chablis as non-mammalian vertebrate models for severe congenital anemia due to protein 4.1 deficiency. *Dev. Camb. Engl.* 129, 4359–4370.
- Shi, Y., and Thomas, J.O. (1992). The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate. *Mol. Cell. Biol.* 12, 2186–2192.
- Shi, Y., Mosser, D.D., and Morimoto, R.I. (1998). Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes Dev.* 12, 654–666.
- Sistonen, L., Sarge, K.D., Phillips, B., Abravaya, K., and Morimoto, R.I. (1992). Activation of heat shock factor 2 during hemin-induced differentiation of human erythroleukemia cells. *Mol. Cell. Biol.* 12, 4104–4111.
- Snyder, S.H., and Bredt, D.S. (1992). Biological roles of nitric oxide. *Sci. Am.* 266, 68–71, 74–77.
- Sorger, P.K. (1990). Yeast heat shock factor contains separable transient and sustained response transcriptional activators. *Cell* 62, 793–805.
- Sorger, P.K., and Nelson, H.C. (1989). Trimerization of a yeast transcriptional activator via a coiled-coil motif. *Cell* 59, 807–813.
- Sorger, P.K., and Pelham, H.R. (1987). Purification and characterization of a heat-shock element binding protein from yeast. *EMBO J.* 6, 3035–3041.
- Sorger, P.K., and Pelham, H.R. (1988). Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation. *Cell* 54, 855–864.
- Soukup, S.W. (1974). Evolution by gene duplication. S. Ohno. Springer-Verlag, New York. 1970. 160 pp. *Teratology* 9, 250–251.

- Spitsbergen, J.M., Tsai, H.W., Reddy, A., Miller, T., Arbogast, D., Hendricks, J.D., and Bailey, G.S. (2000a). Neoplasia in zebrafish (*Danio rerio*) treated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene by two exposure routes at different developmental stages. *Toxicol. Pathol.* **28**, 705–715.
- Spitsbergen, J.M., Tsai, H.W., Reddy, A., Miller, T., Arbogast, D., Hendricks, J.D., and Bailey, G.S. (2000b). Neoplasia in zebrafish (*Danio rerio*) treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine by three exposure routes at different developmental stages. *Toxicol. Pathol.* **28**, 716–725.
- Stemple, D.L. (2004). TILLING--a high-throughput harvest for functional genomics. *Nat. Rev. Genet.* **5**, 145–150.
- Stoletov, K., and Klemke, R. (2008). Catch of the day: zebrafish as a human cancer model. *Oncogene* **27**, 4509–4520.
- Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Knauber, D., and Singer, F. (1981). Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature* **291**, 293–296.
- Stuart, G.W., McMurray, J.V., and Westerfield, M. (1988). Replication, integration and stable germ-line transmission of foreign sequences injected into early zebrafish embryos. *Dev. Camb. Engl.* **103**, 403–412.
- Subjeck, J.R., Sciandra, J.J., Chao, C.F., and Johnson, R.J. (1982). Heat shock proteins and biological response to hyperthermia. *Br. J. Cancer. Suppl.* **5**, 127.
- Summerton, J., and Weller, D. (1997). Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **7**, 187–195.
- Suster, M.L., Kikuta, H., Urasaki, A., Asakawa, K., and Kawakami, K. (2009). Transgenesis in zebrafish with the tol2 transposon system. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **561**, 41–63.
- Swan, C.L., Evans, T.G., Sylvain, N., and Krone, P.H. (2012). Zebrafish HSF4: a novel protein that shares features of both HSF1 and HSF4 of mammals. *Cell Stress Chaperones* **17**, 623–637.
- Takaki, E., Fujimoto, M., Sugahara, K., Nakahari, T., Yonemura, S., Tanaka, Y., Hayashida, N., Inouye, S., Takemoto, T., Yamashita, H., et al. (2006). Maintenance of olfactory neurogenesis requires HSF1, a major heat shock transcription factor in mice. *J. Biol. Chem.* **281**, 4931–4937.
- Takaki, E., Fujimoto, M., Nakahari, T., Yonemura, S., Miyata, Y., Hayashida, N., Yamamoto, K., Vallee, R.B., Mikuriya, T., Sugahara, K., et al. (2007). Heat shock transcription factor 1 is required for maintenance of ciliary beating in mice. *J. Biol. Chem.* **282**, 37285–37292.
- Takemori, Y., Enoki, Y., Yamamoto, N., Fukai, Y., Adachi, K., and Sakurai, H. (2009). Mutational analysis of human heat-shock transcription factor 1 reveals a regulatory role for oligomerization in DNA-binding specificity. *Biochem. J.* **424**, 253–261.
- Talbot, W.S., and Schier, A.F. (1999). Positional cloning of mutated zebrafish genes. *Methods Cell Biol.* **60**, 259–286.
- Tanabe, M., Sasai, N., Nagata, K., Liu, X.D., Liu, P.C., Thiele, D.J., and Nakai, A. (1999). The mammalian HSF4 gene generates both an activator and a repressor of heat shock genes by alternative splicing. *J. Biol. Chem.* **274**, 27845–27856.

- Tavaria, M., Gabriele, T., Kola, I., and Anderson, R.L. (1996). A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress Chaperones* *1*, 23–28.
- Taylor, J.S., Van de Peer, Y., Braasch, I., and Meyer, A. (2001). Comparative genomics provides evidence for an ancient genome duplication event in fish. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *356*, 1661–1679.
- Thériault, J.R., Lambert, H., Chávez-Zobel, A.T., Charest, G., Lavigne, P., and Landry, J. (2004). Essential role of the NH₂-terminal WD/EPF motif in the phosphorylation-activated protective function of mammalian Hsp27. *J. Biol. Chem.* *279*, 23463–23471.
- Thompson, M.A., Ransom, D.G., Pratt, S.J., MacLennan, H., Kieran, M.W., Detrich, H.W., Vail, B., Huber, T.L., Paw, B., Brownlie, A.J., et al. (1998). The cloche and spadetail genes differentially affect hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev. Biol.* *197*, 248–269.
- De Thonel, A., Vandekerckhove, J., Lanneau, D., Selvakumar, S., Courtois, G., Hazoume, A., Brunet, M., Maurel, S., Hammann, A., Ribeil, J.A., et al. (2010). HSP27 controls GATA-1 protein level during erythroid cell differentiation. *Blood* *116*, 85–96.
- Tse, W.T., and Lux, S.E. (1999). Red blood cell membrane disorders. *Br. J. Haematol.* *104*, 2–13.
- Tucker, N.R., Middleton, R.C., Le, Q.P., and Shelden, E.A. (2011). HSF1 Is Essential for the Resistance of Zebrafish Eye and Brain Tissues to Hypoxia/Reperfusion Injury. *PLoS ONE* *6*.
- Tuteja, N., Chandra, M., Tuteja, R., and Misra, M.K. (2004). Nitric Oxide as a Unique Bioactive Signaling Messenger in Physiology and Pathophysiology. *J. Biomed. Biotechnol.* *2004*, 227–237.
- Vandekerckhove, J., Ribeil, J.-A., Zermati, Y., Garrido, C., Courtois, G., Solary, E., and Hermine, O. (2008). [Hsp 70, guardian angel of GATA-1 during erythroid differentiation]. *Médecine Sci. MS* *24*, 37–40.
- Vertii, A., Hakim, C., Kotlyarov, A., and Gaestel, M. (2006). Analysis of properties of small heat shock protein Hsp25 in MAPK-activated protein kinase 2 (MK2)-deficient cells: MK2-dependent insolubilization of Hsp25 oligomers correlates with susceptibility to stress. *J. Biol. Chem.* *281*, 26966–26975.
- Vuister, G.W., Kim, S.J., Orosz, A., Marquardt, J., Wu, C., and Bax, A. (1994). Solution structure of the DNA-binding domain of *Drosophila* heat shock transcription factor. *Nat. Struct. Biol.* *1*, 605–614.
- Wang, G., Huang, H., Dai, R., Lee, K.-Y., Lin, S., and Mivechi, N.F. (2001). Suppression of heat shock transcription factor HSF1 in zebrafish causes heat-induced apoptosis. *Genesis* *30*, 195–197.
- Wang, G., Ying, Z., Jin, X., Tu, N., Zhang, Y., Phillips, M., Moskophidis, D., and Mivechi, N.F. (2004). Essential requirement for both hsf1 and hsf2 transcriptional activity in spermatogenesis and male fertility. *Genes. N. Y. N* *2000* *38*, 66–80.
- Wang, H., Long, Q., Marty, S.D., Sassa, S., and Lin, S. (1998). A zebrafish model for hepatoerythropoietic porphyria. *Nat. Genet.* *20*, 239–243.
- Weinstein, B.M., Schier, A.F., Abdelilah, S., Malicki, J., Solnica-Krezel, L., Stemple, D.L., Stainier, D.Y., Zwartkuis, F., Driever, W., and Fishman, M.C. (1996). Hematopoietic mutations in the zebrafish. *Dev. Camb. Engl.* *123*, 303–309.

- Westerheide, S.D., Anckar, J., Stevens, S.M., Jr, Sistonen, L., and Morimoto, R.I. (2009). Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. *Science* 323, 1063–1066.
- Wiedenheft, B., Sternberg, S.H., and Doudna, J.A. (2012). RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* 482, 331–338.
- Wiederrecht, G., Seto, D., and Parker, C.S. (1988). Isolation of the gene encoding the *S. cerevisiae* heat shock transcription factor. *Cell* 54, 841–853.
- Wienholds, E., Schulte-Merker, S., Walderich, B., and Plasterk, R.H.A. (2002). Target-selected inactivation of the zebrafish *rag1* gene. *Science* 297, 99–102.
- Wienholds, E., van Eeden, F., Kusters, M., Mudde, J., Plasterk, R.H.A., and Cuppen, E. (2003). Efficient target-selected mutagenesis in zebrafish. *Genome Res.* 13, 2700–2707.
- Wingert, R.A., Brownlie, A., Galloway, J.L., Dooley, K., Fraenkel, P., Axe, J.L., Davidson, A.J., Barut, B., Noriega, L., Sheng, X., et al. (2004). The chianti zebrafish mutant provides a model for erythroid-specific disruption of transferrin receptor 1. *Dev. Camb. Engl.* 131, 6225–6235.
- Winning, R.S., and Browder, L.W. (1988). Changes in heat shock protein synthesis and hsp70 gene transcription during erythropoiesis of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 128, 111–120.
- Wolf, U., Ritter, H., Atkin, N.B., and Ohno, S. (1969). Polyploidization in the fish family Cyprinidae, order Cypriniformes. I. DNA-content and chromosome sets in various species of Cyprinidae. *Humangenetik* 7, 240–244.
- Wu, C. (1995). Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 441–469.
- Xiao, X., Zuo, X., Davis, A.A., McMillan, D.R., Curry, B.B., Richardson, J.A., and Benjamin, I.J. (1999). HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice. *EMBO J.* 18, 5943–5952.
- Yamamoto, N., Takemori, Y., Sakurai, M., Sugiyama, K., and Sakurai, H. (2009). Differential recognition of heat shock elements by members of the heat shock transcription factor family. *FEBS J.* 276, 1962–1974.
- Yang, H.W., Kutok, J.L., Lee, N.H., Piao, H.Y., Fletcher, C.D.M., Kanki, J.P., and Look, A.T. (2004). Targeted expression of human MYCN selectively causes pancreatic neuroendocrine tumors in transgenic zebrafish. *Cancer Res.* 64, 7256–7262.
- Yeh, F.-L., Hsu, L.-Y., Lin, B.-A., Chen, C.-F., Li, I.-C., Tsai, S.-H., and Hsu, T. (2006). Cloning of zebrafish (*Danio rerio*) heat shock factor 2 (HSF2) and similar patterns of HSF2 and HSF1 mRNA expression in brain tissues. *Biochimie* 88, 1983–1988.
- Lee-Yoon, D., Easton, D., Murawski, M., Burd, R., and Subject, J.R. (1995). Identification of a Major Subfamily of Large hsp70-like Proteins through the Cloning of the Mammalian 110-kDa Heat Shock Protein. *J. Biol. Chem.* 270, 15725–15733.
- Zermati, Y., Garrido, C., Amsellem, S., Fishelson, S., Bouscary, D., Valensi, F., Varet, B., Solary, E., and Hermine, O. (2001). Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J. Exp. Med.* 193, 247–254.

Zhang, X.Y., and Rodaway, A.R.F. (2007). SCL-GFP transgenic zebrafish: in vivo imaging of blood and endothelial development and identification of the initial site of definitive hematopoiesis. *Dev. Biol.* *307*, 179–194.

Zou, J., Guo, Y., Guettouche, T., Smith, D.F., and Voellmy, R. (1998a). Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell* *94*, 471–480.

Zou, J., Salminen, W.F., Roberts, S.M., and Voellmy, R. (1998b). Correlation between glutathione oxidation and trimerization of heat shock factor 1, an early step in stress induction of the Hsp response. *Cell Stress Chaperones* *3*, 130–141.

Résumé :

L'utilisation de modèles animaux a permis la découverte de mécanismes importants du développement en général, et du développement tumoral en particulier afin d'établir et mettre au point de nouveaux traitements. Le poisson zèbre (*Danio rerio*), est de plus en plus utilisé dans le cadre de ces recherches du fait de ses nombreux avantages comme par exemple la transparence de ses larves ou une forte homologie avec l'homme. Plusieurs approches ont été développées chez ce poisson comme l'inactivation transitoire d'un gène afin d'identifier le rôle d'une protéine dans le développement, ou alors la transplantation de cellules tumorales de mammifères et étudier les réponses aux traitements anti-tumoraux.

C'est dans l'un de ces deux contextes que nous avons étudié le rôle du monoxyde d'azote dans le développement tumoral. Pour cela nous avons utilisé une sonde fluorescente et avons pu détecter *in vivo* une production de monoxyde d'azote associée aux cellules tumorales xénogreffées, dont l'utilisation d'un capteur du NO, le cPTIO s'est traduit par une perte de cellules tumorales et une baisse de l'expression d'un facteur angiogénique le VEGF, démontrant une utilisation potentielle dans du cPTIO comme molécule anti-tumorale.

L'autre volet d'étude a été l'identification du rôle de HSF1 dans le développement et la différenciation des globules rouges chez le poisson zèbre comme modèle expérimental, dans des conditions de non stress thermique. Pour cela, nous avons inactivé transitoirement le gène *hsf1* grâce aux morpholinos, et avons constaté des défauts dans le développement, mais aussi une altération de la différenciation des érythrocytes.

Mots clés :

Poisson zèbre, développement, Monoxyde d'azote, cPTIO, VEGF, Cancer, HSF1, Transcritome, HSP70.