



HAL
open science

L'étude des mécanismes moléculaires de l'épissage alternatif du gène NXNL1 et celle de l'origine de la signalisation métabolique de RdCVF

Najate Ait-Ali

► **To cite this version:**

Najate Ait-Ali. L'étude des mécanismes moléculaires de l'épissage alternatif du gène NXNL1 et celle de l'origine de la signalisation métabolique de RdCVF. Neurosciences [q-bio.NC]. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS030 . tel-02110903

HAL Id: tel-02110903

<https://theses.hal.science/tel-02110903>

Submitted on 25 Apr 2019

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.

Sorbonne Université

École doctorale

CERVEAU-COGNITION-COMPORTEMENT

INSTITUT DE LA VISION

THÈSE

DE DOCTORAT DE NEUROSCIENCE ET DE SCIENCES COGNITIVES

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE SORBONNE UNIVERSITÉ

PAR Mme Najate AIT-ALI MAAMRI

SUJET :

**L'étude des mécanismes moléculaires de
l'épissage alternatif du gène *NXNL1* et celle de
l'origine de la signalisation métabolique de
RdCVF**

Dirigée par Thierry LÉVEILLARD

SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 20 Avril 2018 DEVANT LES MEMBRES DU JURY COMPOSÉ DE:

Pr. Chahrazade EL AMRI	Présidente	Professeur à l'Université Paris Sud, Paris
Dr. Muriel PERRON	Rapporteur	Directrice de recherche à l'Université Paris Sud, Paris
Dr. Sylvie DUFOUR	Rapporteur	Directrice de recherche au Muséum National d'Histoire Naturelle
Pr. Alain VAN DORSSELAER	Examinateur	Professeur à l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien
Dr. Thierry LÉVEILLARD	Directeur de thèse	Directeur de recherche à l'Institut de la Vision, Paris

À mon père

et

À ma mère

“Science works on the frontier between knowledge and ignorance. We’re not afraid to admit what we don’t know. There’s no shame in that. The only shame is to pretend that we have all the answers.”

—Neil deGrasse Tyson, Cosmos: A Spacetime Odyssey

AVANT PROPOS

AVANT PROPOS

La conduite de mon projet de thèse ayant été réalisé dans un contexte particulier et non classique, Il me semblait intéressant de faire un bref résumé de mon parcours professionnel avant de débiter cette nouvelle aventure et des différentes activités et collaborations développées durant ses trois années de doctorat.

J'ai rejoint l'équipe de Thierry Léveillard en Mai 2004 pour un poste d'assistante ingénieur à l'unité de physiopathologie cellulaire et moléculaire de la rétine à l'INSERM.

En Novembre 2011, j'ai obtenu mon Diplôme d'EPHE (École Pratique des Hautes Études) en Sciences de la Vie et de la Terre qui m'a permis d'obtenir un titre d'Ingénieur d'étude de l'Université Pierre et Marie Curie.

En Octobre 2014, je me suis inscrite pour poursuivre une thèse à l'école doctorale ED3C (Cerveau-Cognition-Comportement) pour obtenir un titre de docteur de l'université Pierre et Marie Curie.

Le même mois d'Octobre 2014, je me suis rendu durant 10 jours dans le laboratoire of Medical Biochemistry and Biophysics d'Elias Arner au Karolinska Institut à Stockholm en Suède, pour identifier l'éventuelle expression d'une sélénoprotéine par le gène *NXNL1*.

En 2015, j'ai supervisée le travail en rapport avec mon projet de thèse de l'étudiante Julie Chassagne en Master 1 mention Sciences du Génome et des Organismes. Le projet développé avec Julie, consistait à étudier l'effet de la translecture du codon stop sur l'activité du facteur de survie des cônes RdCVF.

En 2016, j'ai validé un Diplôme Universitaire de Ecole doctorale Biosigne de recherche translationnelle et d'innovations thérapeutiques dans les maladies du système nerveux. Durant cette année, j'ai également supervisée les travaux de l'étudiante Morgane Lejault en Master 1 Biologie-Santé dont le projet consisté à étudier l'expression du gène *Nxnl* ancestral chez l'hydre.

En Janvier et juillet 2017, je me suis rendue durant 15 et 20 jours dans le laboratoire de Gordon Fain of Integrative Biology and Physiology à UCLA (University of California Los Angeles) à Los Angeles, pour récolter et pour étudier l'expression des messagers du gène *Nxn11* dans des cellules unique de cônes et bâtonnets de lamproie. J'ai aussi supervisé durant cette année 2017, les travaux de Kamila Remini, étudiante en 1 ère année BTS en BioAnalyses et Contrôles pour lesquels nous avons, pour le premier stage mis au point un test du rôle des thiorédoxines comme agents détoxifiant chez l'hydre et pour le deuxième étudié l'état redox de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase en présence de cuivre chez l'hydre.

REMERCIEMENTS

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Thierry Léveillard pour m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche en 2004, pour avoir été mon chef d'équipe depuis mais aussi, mon tuteur scientifique et mon directeur de thèse. En effet, je souhaite lui exprimer toute ma reconnaissance pour avoir cru en moi et en mes capacités. Pour m'avoir encouragé dans un premier temps à suivre ma formation de diplôme de l'EPHE que j'ai soutenu en 2011 et dans un deuxième temps pour m'avoir convaincu de poursuivre en thèse en me donnant l'opportunité de travailler sur des sujets tous aussi intéressants les uns que les autres. Je remercie aussi Thierry, pour m'avoir permis de mener une carrière scientifique de plus en plus enrichissante, notamment en me formant, en m'orientant et en m'éduquant à la recherche scientifique, mais aussi en me donnant de très nombreuses opportunités de présenter mes travaux lors de congrès ou meeting, en France, en Europe mais aussi aux USA et enfin en me permettant de suivre de nombreuses formations durant mon doctorat dont certaines diplômante. Merci pour tout !

Merci au professeur José-Alain Sahel pour m'avoir accueillie dans son laboratoire depuis toutes ces années.

Je remercie les membres de mon jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail. A Chahrazade EL AMRI, tout l'honneur de vous avoir en tant que présidente de mon jury est pour moi, à Muriel PERRON, merci pour votre disponibilité et votre temps, à Sylvie DUFOUR qui me fait la joie d'apporter toute ses connaissances sur l'évolution qui est un domaine complètement nouveau pour moi et enfin à Alain VAN DORSSELAER que je remercie infiniment pour toute l'aide apporté via le LSMBO dans ce travail de thèse.

Je souhaite adresser ma gratitude à mes examinateurs de suivi de thèse Alain Lescure et Bertrand Mollereau pour avoir conscienseusement joué leur rôle, pour avoir pris le temps

de suivre mon travail au cours de ces trois années de thèse mais aussi pour m'avoir soutenu, encouragé et parfaitement bien conseillé.

Je remercie tous les membres passés et actuels du mon équipe, en particulier Frédéric Blond pour son énorme contribution dans ce projet, aussi pour toute son aide dans la rédaction de mon mémoire mais surtout pour sa grande gentillesse et pour ses gourmandises du jeudi. Je remercie, Emma, Ying et les filles qui ont bien voulu accepté de jouer le rôle de hydra babysiter lors de mes absences. Les hydres sont immortelles, mais sans vous elles le seraient devenues. Je remercie Sacha pour son soutien, ses encouragements et sa bonne humeur constante. Merci beaucoup Manuela pour ta présence, pour les déjeuners ensemble mais aussi pour avoir toujours pris le temps de m'apporté ton aide constructive et plus que précieuse, merci infiniment.

A mon tour de te remercier Hawa pour ton soutien depuis le tout début et ensuite en continu, tu es l'une des premières, si ce n'est la première a y avoir cru. Merci d'être devenue une vraie amie.

Je voudrais remercier les membres de ma famille, mes sœurs et mes frères pour leur enthousiasme, leur curiosité mais aussi pour leur soutien et surtout et simplement pour leur présence.

Merci à mon Chakir, pour : 1- les vecteurs

2- Le soutien morale

3-d'être là.

J'adresse maintenant toute ma reconnaissance infinie à mes parents à qui je dédie cette thèse et ce travail.

AVERTISSEMENT

Au vu de la législation sur les droits d'auteur, ce travail de thèse demeure la propriété de son auteur, et toute reproduction partielle ou totale de cette œuvre doit faire l'objet d'une autorisation de l'auteur (Loi n° 92-597 du 01/07/1992, parue au Journal Officiel du 02/07/1992).

ABBREVIATIONS

ABREVIATIONS

EPR	Epithélium pigmentaire rétinien
MLE	Membrane limitante externe
CNE	Couche nucléaire externe
CPE	Couche plexiforme externe
CGM	Cellules gliales de Müller
CPI	Couche plexiforme interne
CG	Cellules ganglionnaires
FN	Fibres nerveuses
MLI	Membrane limitante interne
NRL	Neural Retina Leucine zipper
PNR	Photoreceptor-cell specific Nuclear Receptor
RP	Rétinopathie pigmentaire
ROS	Reactive oxygen species
RNS	Reactive nitrogen species
AAV	Adeno-associated virus
GFP	Green Fluorescent Protein en anglais
ARN	Acides ribonucléiques
ARNm	ARN messenger
snRNA	Small nuclear RNA
snRNP	Small nuclear ribonucleoprotein
U2AF	U2snRNP Auxiliary Factor
ESE	Exonic Splicing Enhancers
ISE	Intronic Splicing Enhancers
SR	Serin Arginin rich
RRM	RNA Recognition Motif
HNRNP	Heterogeneous nuclear ribonucléoprotéines
KH	K-homology
CELF	CUG-BP and ETR-3 Like Factors
MBN1	Muscleblind-like protein
NHP	Non human primate
CEA	Commissariat à l'énergie atomique
Rpm	Rotation par minute
SAB	Sérum Albumine Bovine
NBT	Nitrobleu tétrazolium

BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
SVF	Sérum de veau fœtal
PEG	Polyethylene glycol
NCBI	National Center for Biotechnology Information
MCS	Multiple cloning site
ADNg	ADN génomique
ADNc	ADN complémentaire
LSMBO	Laboratoire de spectrométrie de masse bioorganique
NMD	Nonsense mediated decay
CIP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
TAP	Tobacco Acid Pyrophosphatase
ORF	Open reading frame

SOMMAIRE

SOMMAIRE

AVANT PROPOS	7
REMERCIEMENTS	11
ABREVIATIONS.....	19
INTRODUCTION.....	31
1: La Vision.....	33
1.1: La rétine	33
1.2: La rétinopathie pigmentaire.....	45
2: Mise en contexte du travail.....	49
2.1: <i>NXNLI</i>, RdCVF et RdCVFL	49
2.2 : Mode d'action et signalisation de RdCVF.....	55
2.3 : Le rôle de <i>Nxn1l</i> dans les photorécepteurs à bâtonnet et a cônes	59
3: Présentation du projet de thèse.....	60
3.1: Problématique.....	60
3.2 : Quels sont les mécanismes moléculaires impliqués dans l'épissage alternatif des gènes?	61
3.2.1 : Définition de l'épissage alternatif	61
3.2.2 : Le spliceosome.....	63
3.2.3: Les éléments régulateurs de l'épissage alternatif	65
3.2.4: Les facteurs impliqués dans la régulation de l'épissage alternatif	65
3.3: Les modèles utilisés pour étudier l'évolution des mécanismes d'épissage de <i>NXNLI</i>	67
3.3.1: Les primates non humain.....	68
3.3.2: La souris.....	71
3.3.3: La lamproie.....	75
3.3.4: L'hydre	80
MATERIELS ET METHODES	85

1: Extraction de l'ARN	87
1.1: A l'aide d'un kit	87
1.2: Au chlorure de césium	87
2: Contrôle qualité des ARN	88
3 : Transcription reverse	89
4: polymerase chain reaction en temps reel ou PCR quantitative (q-PCR)	89
4.1: Etude de l'efficacité des oligonucléotides en PCR quantitative	89
4.2: Quantification relative des ARN messenger	92
5: Whole mount hybridation <i>in situ</i>	92
6 : Immunoempreinte (<i>Western blotting</i>)	93
7: Test de liaison par les protéines de fusion phosphatase alcaline	94
7.1: Production de surnageants enrichis en protéine de fusion	94
7.2: Test phosphatase alcaline	95
7.3: test de l'interaction entre les protéines de fusion et leurs récepteurs	95
8: implication d'un phénomène de translecture	96
8.1: Transfection des cellules HEK293	96
8.2 : Deglycolysation des protéines	97
8.3 : Effet de l'aminoglycoside PTC-124 ou Ataluren	97
8.4: Mis en place de mutations pour influencer la translecture	97
8.4.1: Clonage: Transformation, préculture, sélection des clones positifs et purification de l'ADN plasmidique	97
8.4.2: Séquençage	98
8.5: Modélisation du NRE	98
8.6: Radio-marquage au sélénium 75	99
8.7: Immunoprecipitation	99
9: Les mécanismes moléculaires de l'épissage du gène <i>NXNLI</i>	100

9.1: Dissection de la rétine de macaque	100
9.2 : Investigation des régions introniques impliquées dans l'épissage alternatif de <i>NXNLI</i>	100
9.2.1: PRODUCTION DE PARTICULES VIRALES AAV	100
9.2.2: Fond d'œil des souris sauvages C57BL/6J	101
9.3 : Les facteurs impliqués dans l'épissage alternatif de <i>NXNLI</i>	101
9.3.1 : Préparer la sonde ARN NRE ou NRE shuffle fluorescente.....	101
9.3.2: Test d'hybridation de la sonde ARN NRE et NRE shuffle fluorescente sur la puce HuProt™ Human Proteome Microarray	102
9.3.3: Immunomarquage.....	102
RESULTATS	105
PARTIE N°1.....	107
1: Etude de l'expression de <i>Nxn1l</i> chez l'hydre	108
1.1: Hydra vulgaris exprime deux gènes ancestraux de <i>NXNLI</i>	108
1.2: Hydra vulgaris exprime les messagers <i>short hydra Nxnla</i> et <i>b</i> et <i>long hydra Nxnla</i> et <i>b</i>	134
1.3: Les messagers codés par <i>hydra Nxnla</i> et par <i>hydra Nxnlb</i> sont-ils traduits en protéines?.....	147
1.4: Quelle est la fonction des protéines <i>hydraRdCVFLa</i> et <i>hydraRdCVFLb</i> ?	161
1.5: <i>Hydra vulgaris</i> n'exprime pas Basigin 1	174
1.6 : Test d'interaction protéique entre hydra BSG et <i>hydraRdCVFa</i> et <i>hydraRdCVFb</i> par un essai impliquant des protéines de fusion phosphatase alcaline	183
2: Etude de l'expression de <i>Nxn1l</i> chez la lamproie.....	192
2.1: La lamproie, <i>Petromyzon marinus</i> exprime le gène <i>Nxn1l</i>	192
2.2: La lamproie <i>Petromyzon marinus</i> exprime l'isoforme <i>short Nxn1l</i> dans les bâtonnets et l'isoforme <i>long Nxn1l</i> dans les bâtonnets et les cônes.....	201
2.3: Les messagers <i>short Nxn1l</i> et <i>long Nxn1l</i> sont-ils traduits en protéines?	210
2.4: La lamproie exprime le récepteur de RdCVF, Basigin 1	220

2.5 : Test d'interaction protéique entre BSG1 de lamproie et RdCVF de lamproie par un essai impliquant des protéines de fusion phosphatase alcaline	226
PARTIE N°2.....	231
1: Résultats préliminaires positionnant le problème	231
1.1: Expression d'une protéine de plus de 12 kDa	231
1.2: La protéine de plus de 12 kDa n'est pas glycosylée	234
1.3: Implication de la région 5' et 3' UTR de <i>NXNLI</i> dans l'expression de la protéine de plus de 12 kDa.....	237
1.4: Un phénomène de translecture induirait-il l'expression de la protéine de plus de 12 kDa	240
1.5: L'élément NRE induirait-il l'expression de la protéine de plus de 12 kDa.....	245
1.6: La protéine de plus de 12 kDa n'est pas une sélénoprotéine	249
2: Confirmation chez les primates que l'épissage alternatif de <i>NXNLI</i> n'a lieu que dans les bâtonnets	253
2.1: Dissection et isolement des différentes zones de la rétine	253
2.2: Etude de l'expression du messager <i>short Nxn11</i> et <i>long Nxn11</i>	261
3: Investigation des régions de <i>NXNLI</i> impliquées dans son épissage alternatif	267
3.1. La séquence <i>NXNLI Redefinition Element</i> (NRE)	267
3.2. Etude des différentes régions exoniques et introniques du gène susceptibles d'être impliquées dans l'épissage alternatif de <i>NXNLI</i>	270
3.3. Investigation des régions introniques impliquées dans l'épissage alternatif de <i>NXNLI</i>	280
4: Les facteurs impliqués dans l'épissage alternatif de <i>NXNLI</i>	294
4.1: Implication du facteur Nucléoline.....	294
4.2: Implication du facteur Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F.....	305
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	319
1: Quel est la fonction de RdCVF chez l'Hydre?.....	321
2: La signalisation de RdCVF était-elle déjà en place chez la lamproie ?	325

2.1: Le patron d'expression de <i>Nxn11</i> était-il déjà restreint à la rétine chez la lamproie?	325
2.2: Le gène <i>basigin</i> codait-il déjà pour deux isoformes chez la lamproie ?	326
3. <i>Nxn11</i> est-il spécifiquement exprimé par les photorécepteurs ciliaires?	328
3.1 : <i>Nxn11</i> est-il exprimé spécifiquement par la rétine distale des Saint-Jacques, rétine composée de photorécepteurs ciliaires ?	328
3.2: Existe-il une interaction entre RdCVF et le récepteur BSG 1 de la Saint-Jacques?	335
4. LE facteur d'épissage HNRNPF et NCL sont-ils impliqués dans l'épissage de <i>NXNLI</i>?	336
4.1 : Le facteur HNRNPF est-il implique dans l'épissage d'autres gènes ?	336
4.2 : HNRNPF se lie t-il à l'élément NRE ?	343
4.3 : L'interaction du facteur NCL avec le NRE a t-elle été confirmé ?	344
4.4: NCL est-elle lié a RdCVF 17 kDa ?	348
4.5: Identification du peptide en C-Ter de la protéine RdCVF 17 kDa	348
4.6 : NCL, la possible connexion entre <i>NXNLI</i> et le retinoblastome?	355
5. l'origine de <i>NXNLI</i>: Depuis l'hydre sans organe visuel jusqu'à l'œil parfait de l'Homme.	359
6. Model proposé des mécanismes d'épissage du gène <i>NXNLI</i>	365
CONCLUSION	367
BIBLIOGRAPHIE	377
ANNEXES	399
Tables	401
Articles publiés durant le doctorat en rapport avec le sujet de thèse	403

“...Organs of extreme perfection and complication.

...Yet reason tells me, that if numerous gradations from a perfect and complex eye to one very imperfect and simple, each grade being useful to its possessor, can be shown to exist; if further, the eye does vary ever so slightly, and the variations be inherited, which is certainly the case; and if any variation or modification in the organ be ever useful to an animal under changing conditions of life, then the difficulty of believing that a perfect and complex eye could be formed by natural selection, though insuperable by our imagination, can hardly be considered real...”

Charles Darwin, *On the Origin of Species* (Darwin, 1859).

[*Traduction*]

« ...Les organes d'extrême perfection et complications.

...Cependant, la raison me dit que si de nombreuses différences existent entre un œil parfait et complexe et un œil imparfait et simple, et où chaque différence a une utilité pour son propriétaire, alors elles peuvent exister, surtout si l'œil varie doucement et que ces variations soient d'origine héréditaires, ce qui est certainement le cas, et si chaque modification ou variation d'un organe doit être utile aux changements de conditions de vie des animaux, alors la difficulté de croire qu'un œil parfait et complexe puisse être formé par sélection naturelle, quoique difficilement envisageable par notre œil, peut difficilement être considérée comme réelle... »

Charles Darwin, *On the Origin of Species* (Darwin, 1859).

INTRODUCTION

La perception visuelle est élaborée par deux types de cellules neuronales, les bâtonnets et les cônes. Par une signalisation métabolique et redox les bâtonnets maintiennent les cônes en vie dans la rétine. Cette signalisation repose sur l'expression des deux produits du gène *NXNL1*, *rod-derived cone viability factor*, RdCVF qui résulte de la rétention de l'unique intron de ce gène et le produit RdCVFL issue de l'épissage de *NXNL1*. RdCVF qui stimule l'entrée du glucose dans les cônes favorise la production de métabolites impliqués dans le renouvellement de leurs segments externes, mais aussi l'activation de RdCVFL qui protège les cônes contre le stress oxydatif. La question abordée par mes travaux concerne donc le mécanisme d'épissage de *NXNL1* et de ce fait de la rétention de son intron et l'origine de ce mécanisme durant l'évolution.

1: LA VISION

1.1: LA RETINE

La rétine qui est, tout comme le cerveau, une partie intégrale du système nerveux central, tapisse le fond de l'œil de tous les vertébrés. Elle s'organise en trois couches neuronales et en un épithélium pigmentaire rétinien (EPR). La rétine neurale est constituée de six principaux types de neurones: les photorécepteurs (bâtonnets et cônes), les cellules horizontales, les cellules bipolaires, les cellules amacrines, les cellules interplexiformes et les cellules ganglionnaires. Les neurones sont soutenus par la glie radiaire qui est constituée des cellules gliales de Müller (CGM). D'autres cellules gliales, principalement des astrocytes, sont présentes dans la rétine, en particulier au niveau de l'interface avec le corps vitré appelé membrane limitante interne. La rétine peut être décrite selon un axe antéropostérieur où les cellules et leurs prolongements sont stratifiés en dix couches qui peuvent être identifiées histologiquement comme suit:

- L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR), formé d'une monocouche de cellules épithéliales séparant les segments externes des photorécepteurs de la choroïde, couche de la paroi du globe oculaire très vascularisée.

- La couche des segments externes et internes des photorécepteurs (bâtonnet et cônes) (SE).
- La membrane limitante externe (MLE), formée par de nombreuses *zonula adherens* entre les cellules gliales de Müller et les photorécepteurs.
- La couche nucléaire externe (CNE), composée par les noyaux des photorécepteurs.
- La couche plexiforme externe (CPE), formée des synapses des photorécepteurs avec les cellules bipolaires, les cellules horizontales et cellules interplexiformes.
- La couche nucléaire interne (CNI), composée par les noyaux des cellules bipolaires, horizontales, amacrines et interplexiformes ainsi que par ceux des cellules gliales de Müller (CGM).
- La couche plexiforme interne (CPI), formée des synapses entre les cellules bipolaires, amacrines et ganglionnaires.
- La couche des cellules ganglionnaires (CG), qui contient aussi des cellules amacrines déplacées.
- Les fibres nerveuses (FN), correspondant aux axones des cellules ganglionnaires dont le regroupement en faisceaux forme le nerf optique.
- La membrane limitante interne (MLI), constituée des pieds des cellules gliales de Müller (Ait-Ali, 2011) (**Fig. 1**).

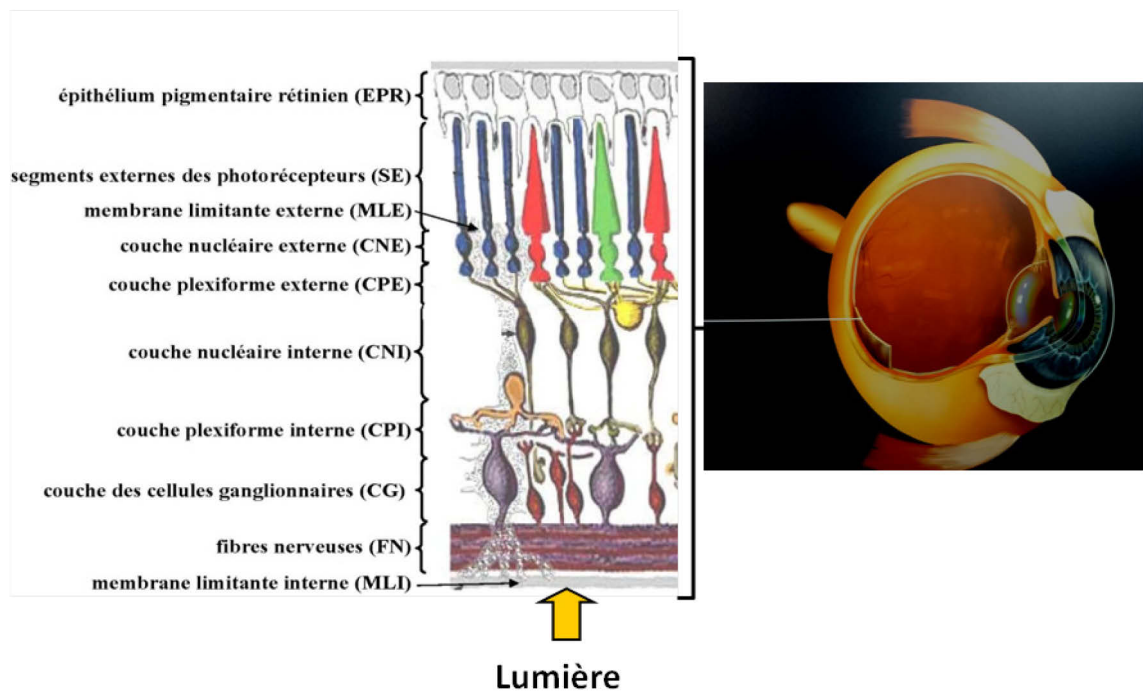


Figure 1: L'œil et l'organisation stratifiée de la rétine. La lumière traverse l'ensemble des couches de la rétine avant d'être captée par les segments externes des photorécepteurs.

Les cellules rétiniennes seraient issues des mêmes cellules progénitrices qui progresseraient à travers différents états de compétence au cours du développement. La cellule progénitrice est capable de répondre aux signaux extracellulaires et ne permettrait la génération que d'un nombre limité de types cellulaires différents, c'est ce qui définit l'état de compétence des cellules (Fig. 2).

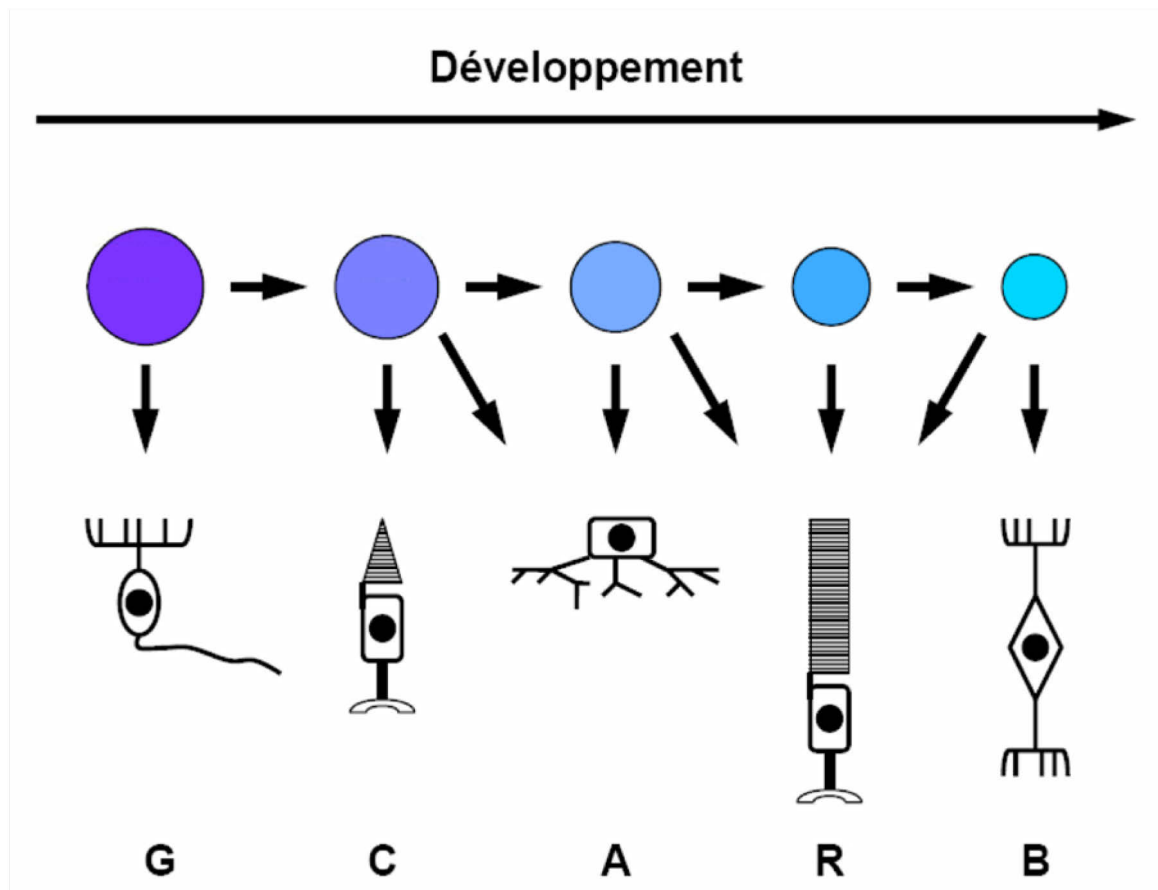


Figure 2: Modèle de différenciation des cellules de la rétine. Les cellules progénitrices passent par différents états de compétence au cours du développement. Chaque état de compétence permet la génération d'un nombre limité de types cellulaires. A: Cellules amacrines. B: Cellules bipolaires. C: Photorécepteurs à cône. G: Cellules ganglionnaires. R: Photorécepteurs à bâtonnet (liste non exhaustive). Adapté de la thèse de Mathias Fradot 2007.

Un précurseur post-mitotique devient fonctionnel à l'instant de sa sortie du cycle cellulaire et dépendrait d'une combinaison de facteurs extrinsèques, tels des facteurs de croissance et/ou d'interactions telles que celles des facteurs de transcription avec la séquence ADN de leur promoteur. Ce sont ces facteurs intrinsèques qui définissent l'état de compétence de la cellule progénitrice. Ainsi, la recherche des mécanismes contrôlant le choix bâtonnet/cône a été facilité par la découverte du facteur de transcription de type "leucine zipper" NRL (Neural Retina Leucine zipper) (Swain et al., 2001; Swaroop et al., 1992). Le facteur NRL est essentiel à la différenciation des bâtonnets. Chez la souris, seuls les photorécepteurs à bâtonnet matures ou en cours de développement expriment le facteur NRL à partir de *PN (Post natal) 0* (Akimoto et al., 2006; Swain et al., 2001). Toutefois, ce patron d'expression est spécifique de l'espèce

murine et diffère de celui observé chez l'Homme. Chez ce dernier, NRL est exprimé par les deux types de photorécepteurs, mais reste séquestré dans le cytoplasme des cônes et n'est transloqué que dans les noyaux des bâtonnets (Swain et al., 2001). Il semble donc que le choix entre bâtonnet et cône soit déterminé chez la souris par l'expression de NRL dans les bâtonnets ou chez l'Homme par l'accès de NRL au noyau des photorécepteurs à bâtonnets. Dans les deux cas, c'est l'activation de gènes par ce facteur qui est nécessaire au déterminisme bâtonnet. Le récepteur nucléaire NR2E3, aussi nommé PNR (Photoreceptor-cell specific Nuclear Receptor) est aussi impliqué dans le lignage des photorécepteurs à bâtonnets. Le récepteur aux hormones thyroïdiennes TR β (NR1A2), et le récepteur à l'acide rétinoïque RXR γ (NR2B3) sont deux autres récepteurs nucléaires impliqués dans la détermination du devenir cellulaire des photorécepteurs à cônes. Dans la rétine de souris, l'isoforme TR β 2 est exprimée spécifiquement par les cônes (Roberts et al., 2005). En 1866, Max Schultze a identifié deux types de photorécepteurs dans la rétine nommés *stäbchen* (bâtonnets) et *zapfen* (cônes) (Schultze Max, 1866) (**Fig. 3**).

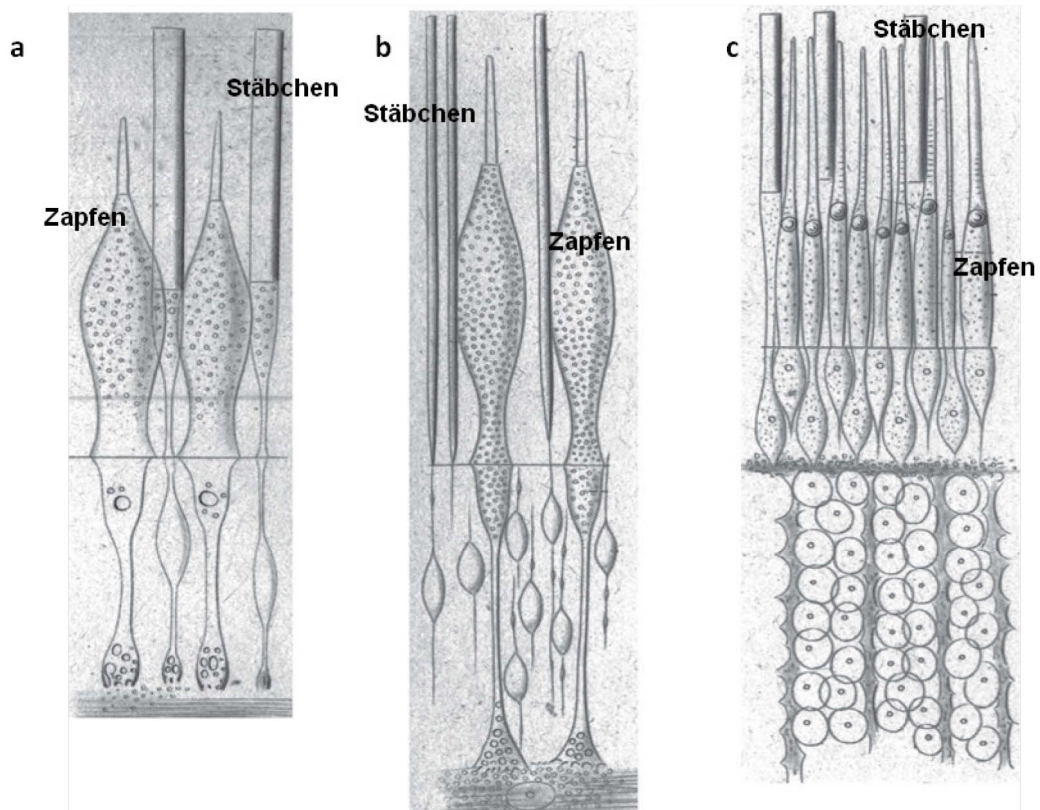


Figure 3: Dessin du papier original de Max Schultze (1866) représentant les photorécepteurs du a) brochet b) perche commune et c) pigeon. Zapfen signifie les cônes et Stäbchen les bâtonnets. Image issue de Anatomie und Physiology Der Retina (Max Schultze, 1866).

Ces cellules hautement spécialisées convertissent la lumière en information nerveuse par le phénomène de phototransduction qui existait déjà chez le poisson il y a 300 millions d'années (**Fig. 4**) (Tanaka et al., 2014).

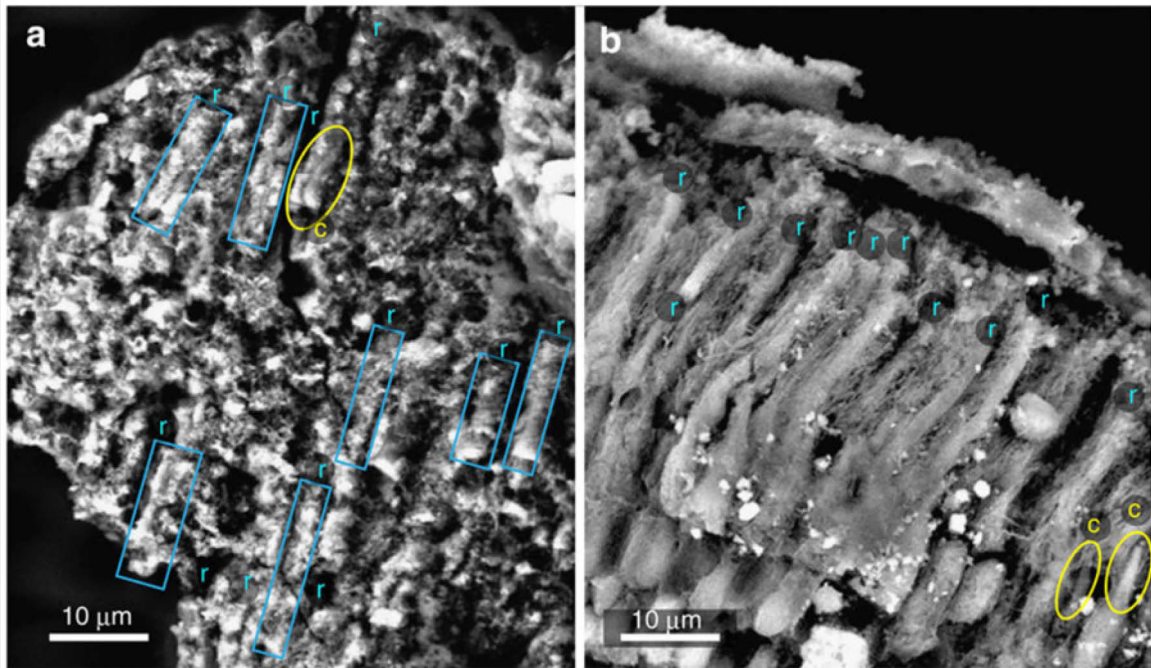


Figure 4: Image de microscope électronique à balayage par transmission des bâtonnets et cônes du a) poisson fossile *Acanthodes bridgei*, b) poisson vivant *Rhinogobius sp.* Les rectangles bleus annotés r représentent les bâtonnets et les cercles jaunes annotés c représentent les cônes. (Image issue de Tanaka *et al.* 2014).

Les photorécepteurs sont composés d'un corps basal appelé segment interne relié par un cil au segment externe formé d'invaginations. La principale différence morphologique entre les deux types de photorécepteurs est leur segment externe. Le segment externe du cône est caractérisé par une série d'invaginations connectées en continu à la membrane plasmique du segment interne alors que celui des bâtonnets est constitué d'un empilement de disques individualisés non reliés à la membrane plasmique du segment interne. Cette différence architecturale entre les bâtonnets et les cônes implique que les lipides nécessaires pour le renouvellement des segments externes sont directement transportés du segment interne vers le segment externe dans les cônes alors que dans le bâtonnet ce processus implique un transfert supplémentaire contrôlé par le complexe protéique SARA, PI3P, rhodopsine et SNAR (Chuang *et al.*, 2007). C'est dans les segments externes que sont enchâssées les molécules d'opsines capable de capturer les photons de la lumière (**Fig. 5**).

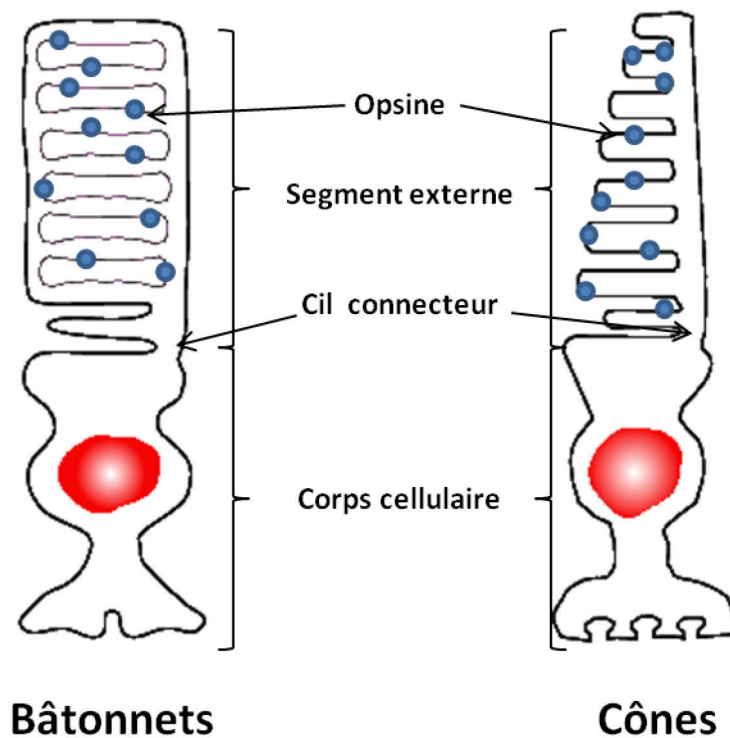


Figure 5: Segments externes de photorécepteurs à bâtonnets et à cônes. Adapté de Magie J. Fain.

La sensibilité des photorécepteurs dépend des propriétés de leurs segments externes et principalement de leur composition en opsine. L'opsine est une protéine à sept domaines transmembranaires responsable de l'absorption des photons et initie ainsi la cascade de phototransduction. Le segment externe se renouvelle à partir du segment interne du photorécepteur et les extrémités du segment externe sont phagocytées par l'EPR adjacent. Ce processus est régulé par le cycle circadien et chaque jour, environ 10% de la longueur de chaque segment externe est éliminé par l'EPR. Dans la rétine adulte, les photorécepteurs maintiennent une longueur de segment externe constante en équilibrant la perte de disques dans la région distale du segment externe et l'assemblage de nouveaux disques à la base du segment externe (Young, 1967). Les cônes représentent seulement 3 à 5% des cellules photoréceptrices chez la plupart des mammifères. Cependant, ce sont les cellules responsables de la vision de jour, de la vision des couleurs et de l'acuité visuelle, ces cellules sont dit responsables de la vision photopique et présentent la plus large sensibilité spectrale observée (**Fig. 6**).

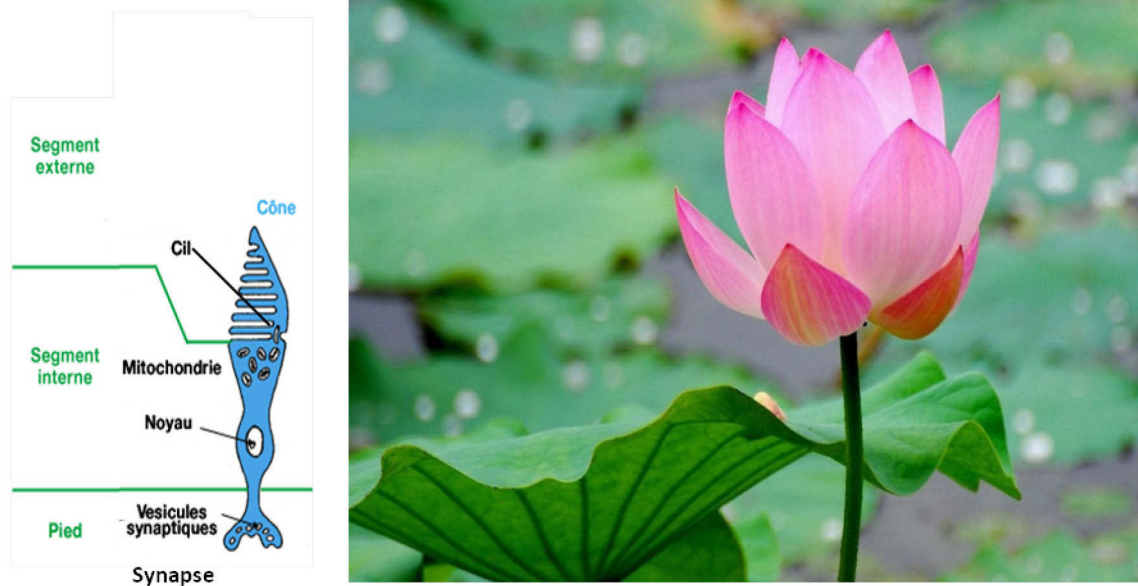


Figure 6: Les Photorécepteurs à cônes.

Chez les primates, les cônes sont divisés en trois catégories distinctes: bleu, vert et rouge, en fonction du type de pigment visuel qu'ils expriment et qui leur confèrent une sensibilité différente dans le spectre lumineux (**Fig. 7**).

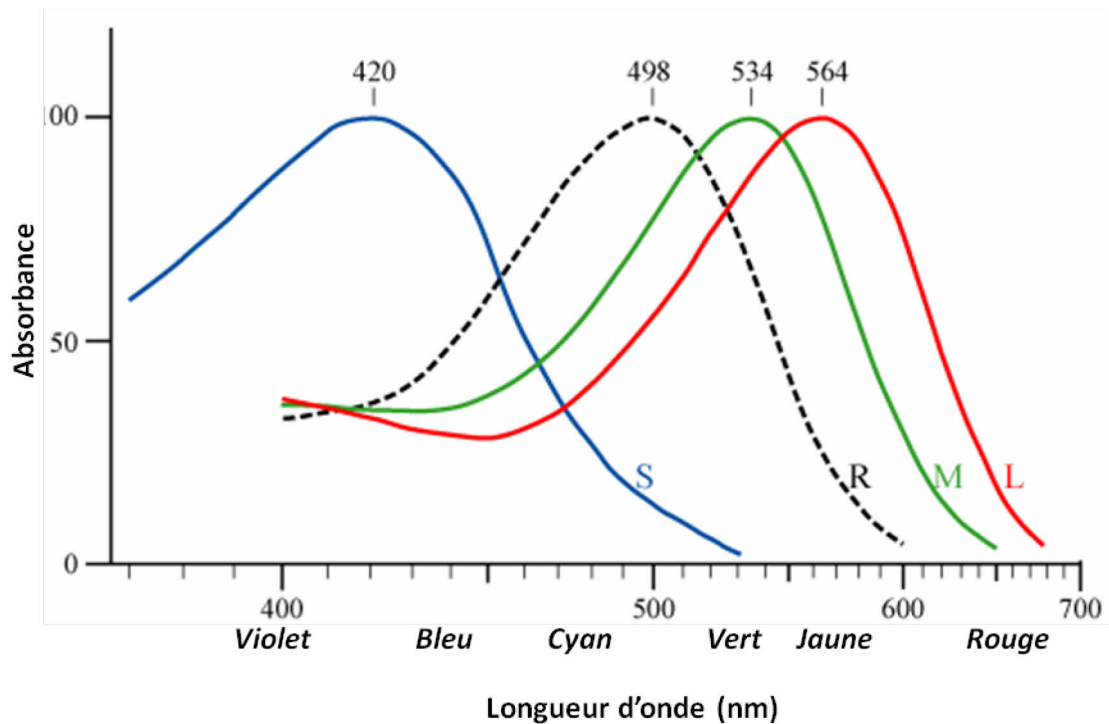


Figure 7: Sensibilités spectrales des différentes opsines de primate. S: Spectre d'absorption de l'opsine bleue. R: Spectre d'absorption de la rhodopsine. M: Spectre d'absorption de l'opsine verte. S: Spectre d'absorption de l'opsine rouge. Adapté de la thèse de Mathias Fradot, 2007.

Chez l'Homme, les cônes verts et rouges sont largement majoritaires. Les cônes se distinguent par un noyau plus volumineux que celui des bâtonnets, par un segment externe plus court, plus large et conique. A contrario, les bâtonnets représentent la majorité des cellules photoréceptrices chez les mammifères (près de 95% chez l'Homme) et sont responsables de la vision en faible luminosité dite scotopique ou nocturne (**Fig. 8 et 9**).

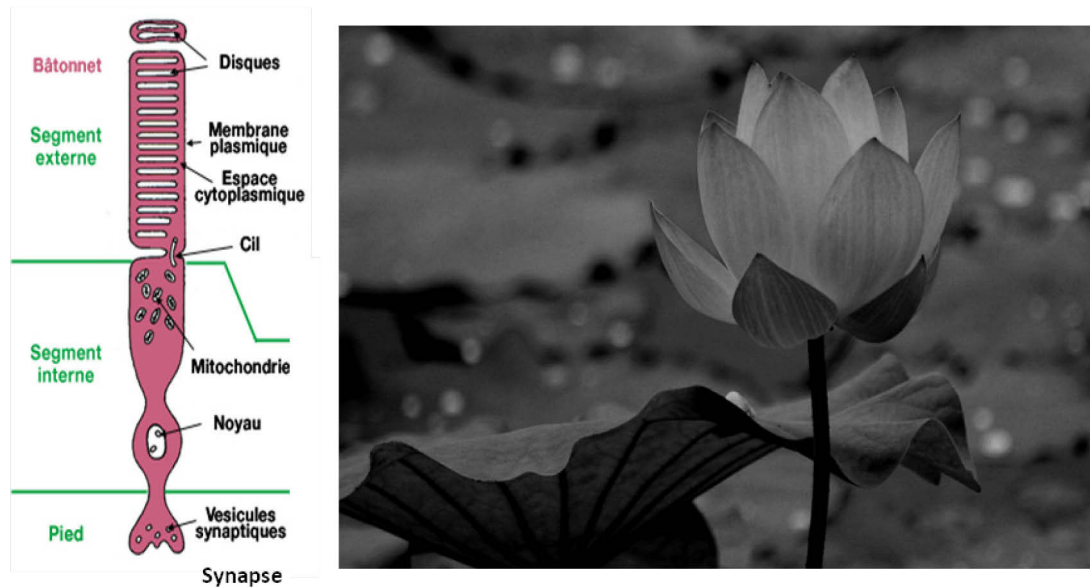


Figure 8: Les bâtonnets

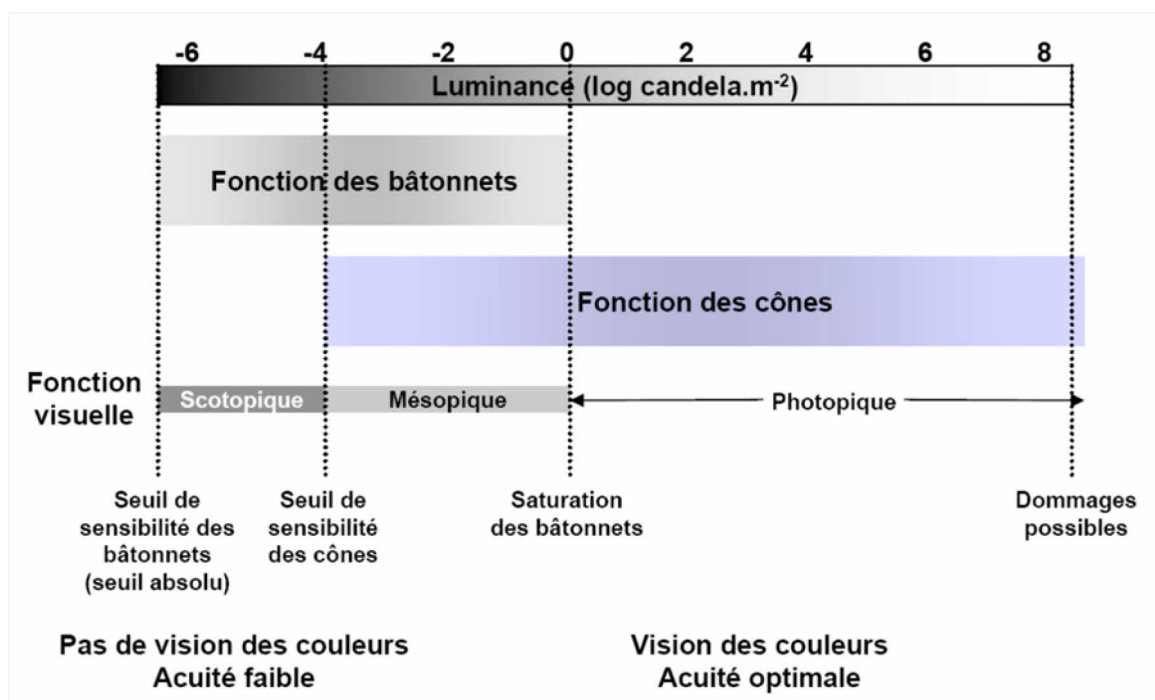


Figure 9: Photosensibilités respectives des bâtonnets et des cônes. La luminance correspond au quotient de l'intensité lumineuse émise par une source dans une direction donnée et s'exprime en candela par mètre carré. Un candela équivaut à l'énergie émise par une bougie. Adapté de la thèse de Mathias Fradot, 2007.

Ces cellules captent la lumière par le pigment rhodopsine. Elles sont uniformément situées dans la rétine, à l'exclusion de son centre chez l'Homme, et sont caractérisées

morphologiquement par un long segment extérieur cylindrique. Le nombre et la localisation des bâtonnets et des cônes dans la rétine varient considérablement selon les espèces de mammifères. Par exemple, la proportion des cônes est corrélée au mode de vie de l'animal, elle va de 0,5% chez certaines espèces exclusivement nocturnes à 10%, voir plus chez des espèces diurnes. La lignée des mammifères a été confrontée il y a 70 millions d'années à un goulot d'étranglement appelé aussi la catastrophe évolutive, ayant conduit à l'extinction des dinosaures alors qu'ils dominaient l'écosystème (Gerkema et al., 2013). Les dinosaures sont les ancêtres des oiseaux qui ont une rétine dominée par les cônes. À cette époque, la seule façon pour les mammifères de persister était de vivre la nuit ce qui explique pourquoi les premiers mammifères étaient nocturnes. C'est plus tard au cours l'évolution et après l'extinction des dinosaures, que ces mammifères ont pu coloniser les niches écologiques diurnes libérées, ils sont alors devenus diurnes. Pourtant, les espèces nocturnes telles que la souris présentent une rétine dominante en bâtonnets avec une distribution en mosaïque des bâtonnets et des cônes présentant un rapport de 98/2. L'écureuil à l'inverse présente une rétine majoritairement constituée de cônes (Kryger et al., 1998). L'Homme, qui est une espèce diurne, mais avec une rétine dominée par les bâtonnets, présente une rétine constituée de 92 millions de bâtonnets et 4,6 millions de cônes avec une distribution particulière. Les cônes sont concentrés au centre de la rétine humaine, dans la fovéa qui est localisée au centre de la macula et qui ne représentent que 4 à 5% de la surface de la rétine (Osterberg, 1935) (**Fig. 10**).

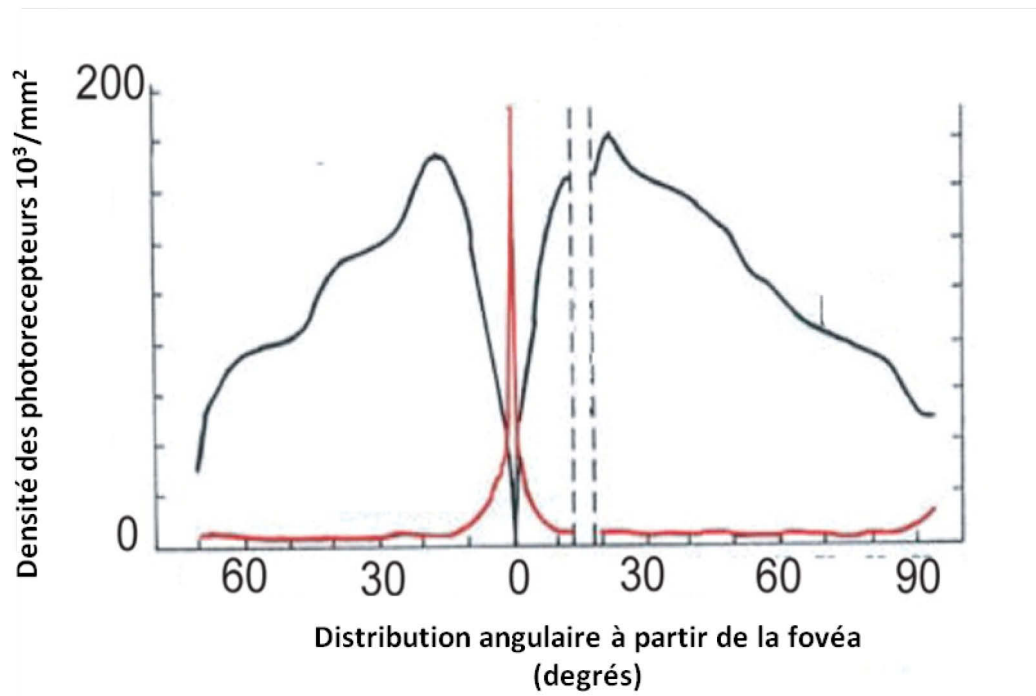


Figure 10: Distribution des cônes (ligne rouge) et des bâtonnets (ligne noire) dans la rétine humaine de la fovéa centrale vers la rétine périphérique. (Graphe issu de Topography of the layer of rods and cones in the human retina, Osterberg, 1935).

1.2: LA RETINOPATHIE PIGMENTAIRE

« *La couleur est la douleur de la lumière.* »

Goethe cité par Michel Le Bris (Le Bris, 2002)

La première description et l'utilisation du terme rétinopathie pigmentaire (RP) sont attribuées à Donders en 1855 et 1857 (Donders FC, 1855, 1857). Le diagnostic de la RP existe depuis au moins des centaines voire des milliers d'années. Déjà en 1744, Ovelgun avait observé chez certaines familles, des complications liées à la vision nocturne qui semblaient être liées provoquées par la RP (Ovelgün, 1744). C'est plus tard en 1853 et 1854, que van Trig et Ruete ont clairement identifié des cas de RP grâce à la découverte de l'ophtalmoscope en 1851 (Ruete, 1860; van Trig, 1853). Avec une prévalence de 1/5000, la RP est la forme la plus courante de dégénérescence rétinienne,

héréditaire touchant environ 2 millions de personnes dans le monde. La RP est génétiquement hétérogène, cette maladie peut être à transmission autosomique dominante, autosomique récessive, liée au X ou à transmission digénique (Phelan and Bok, 2000). La première mutation identifiée chez l'Homme concerne le gène qui code pour la rhodopsine qui est le pigment visuel exprimé par les bâtonnets. Ce gène est localisé sur le long bras du chromosome n°3 (Applebury, 1990; Daiger SP1, 1989; Dryja, 1996). Cette maladie peut être causée par la mutation d'un ou plusieurs gènes parmi 63 gènes différents, dont certains exprimés spécifiquement par les bâtonnets mais qui peuvent aussi coder pour d'autres protéines exprimées par les bâtonnets et les cônes (**Table 1**). Souvent, ces gènes codent pour des protéines impliquées dans la cascade de photo-transduction telle que la rhodopsine ou la cGMP-dépendent phosphodiesterase qui sont exprimées spécifiquement dans le segment externe des photorécepteurs ou pour des protéines jouant un rôle structural telle que la peripherin ou ROM1 (Dryja, 1996; Kajiwara et al., 1991; McLaughlin et al., 1993; Rosenfeld et al., 1995). Les patients atteints de cette dystrophie rétinienne présentent un handicap visuel d'intensité variable et une perte de la vision qui se développe en deux étapes successives. Le premier signe clinique de cette maladie est la cécité nocturne qui est la conséquence de la dégénérescence primaire des photorécepteurs à bâtonnets. Ce premier symptôme est accompagné d'un rétrécissement du champ visuel en périphérie. La mort des bâtonnets, qui résulte d'un mécanisme apoptotique, se traduit par une altération de la vision scotopique. Ceci est ressenti comme un handicap mineur et ces personnes conservent un mode de vie presque normal. C'est pourquoi les personnes vivant dans un environnement très éclairé tel qu'en ville, ne se rendent compte des premiers symptômes de la RP que lorsque celle-ci a déjà progressée. Par la suite, ce sont les photorécepteurs à cône au centre de la rétine qui perdent leur fonction et dégèrent, ce qui réduit la vision jusqu'à ce que le patient devienne aveugle (**Fig. 11**).

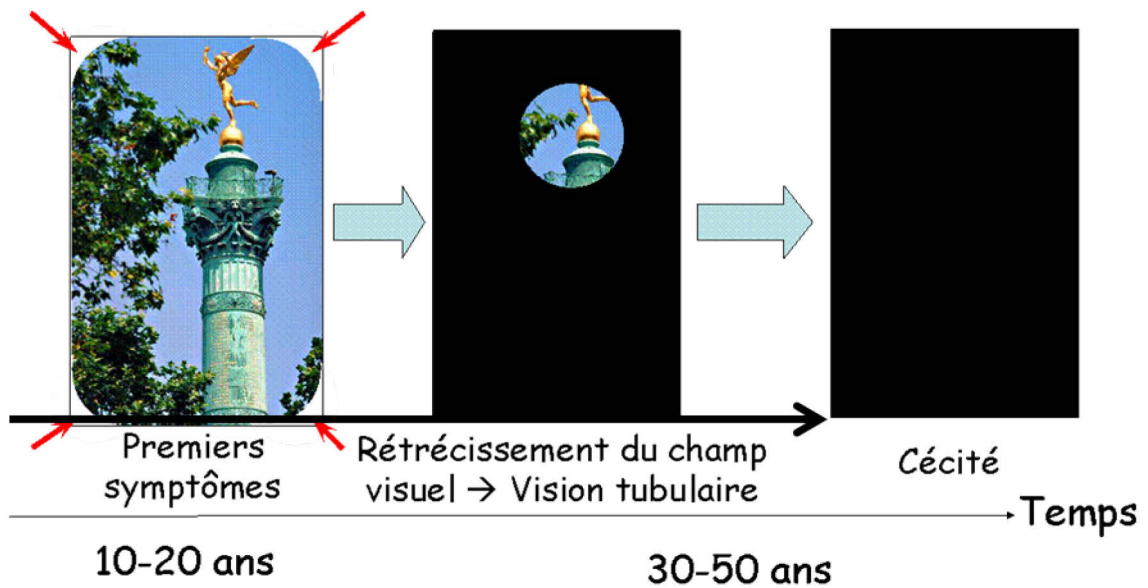


Figure 11 : Évolution de la vision chez les patients atteints de rétinopathie pigmentaire au cours du temps.

Le fond d'œil d'un patient RP est caractérisé par la présence de vaisseaux sanguins de taille plus réduite que la normale et par la présence de dépôts pigmentés caractéristiques et visibles par examen ophtalmoscopique (**Fig. 12**).

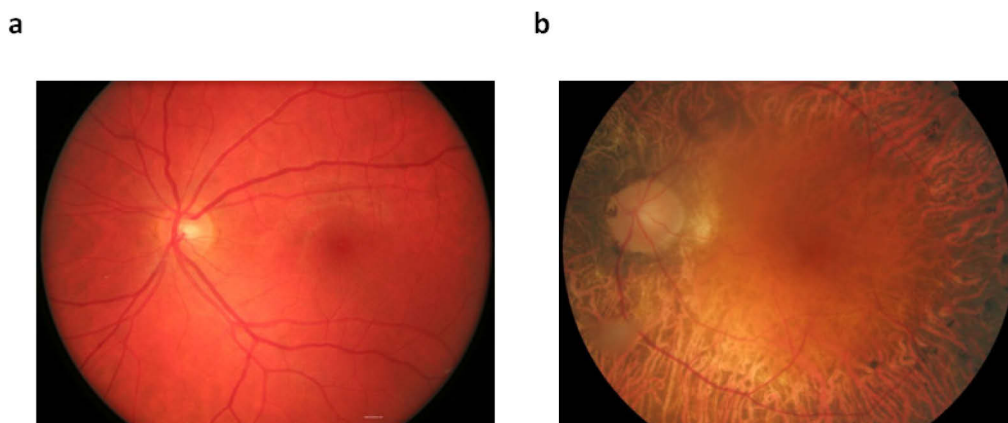


Figure 12: Fond d'œil a) d'un individu sain et b) d'un patient atteint de rétinopathie pigmentaire. (Images fournies par Isabelle Audo).

Contrairement à d'autres pathologies de la rétine comme la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) qui touche des patients plutôt âgés (60-75 ans), la RP concerne plutôt les adolescents et leurs premiers signes se font ressentir vers 10 ans pour les

formes autosomale récessives et vers 20 ans pour les formes autosomale dominantes (Tanino, 1976). La maladie peut progresser entre 15 et 30 ans avant que le patient devienne totalement aveugle (**Fig. 11**). À l'heure actuelle, alors que nous vivons dans une société où la communication visuelle joue un rôle primordial, la cécité représente, avec les affections touchant le pronostic vital, une des menaces les plus redoutées pour la santé. Cependant, la RP qui appartient à une catégorie d'affections génétiques orphelines et rares, reste encore aujourd'hui incurable. En effet, au jour d'aujourd'hui, il n'existe aucun traitement pour cette pathologie mais des avancées en recherche médicale ont permis le développement de thérapies géniques chez l'Homme (Dias et al., 2017). Ces thérapies consistent à remplacer le gène défectueux par le gène sain à l'aide de vecteurs capables de pénétrer dans les cellules de la rétine. L'équipe de Jean Bennett a mis au point l'utilisation de vecteurs viraux, permettant de traiter l'amaurose congénitale de Leber (ACL), une dégénérescence rétinienne chez le chien puis chez l'Homme en 2008 (Cideciyan et al., 2008). Ces résultats ont redonné un espoir de traitement des maladies dégénératives notamment au vu des nombreux essais cliniques en cours et rapportant des résultats prometteurs (Kaiser, 2011; Russell et al., 2017). Cependant, restons tout de même prudents avec ces thérapies qui présentent encore des limites. Par exemple, les thérapies visant des gènes exprimés par les bâtonnets ne seraient efficaces que lors du dépistage précoce de la RP (avant que tous les bâtonnets n'aient dégénéré). De plus, au vu du grand nombre de gènes responsables de la RP (63 à ce jour), les thérapies géniques n'ont aujourd'hui qu'un champ d'application restreint. Il existe d'autres stratégies thérapeutiques développées telles que les thérapies cellulaires ou les greffes de rétines. En parallèle, d'autres voies alternatives à ces thérapies géniques et cellulaires sont envisagées, comme celle de la neuroprotection. Ces études se concentrent sur la découverte de facteurs trophiques efficaces pour lutter contre la dégénérescence des photorécepteurs à bâtonnets, à cônes ou les deux. En 1990, le facteur de croissance FGF2 (*Basic Fibroblast Growth Factor*) a montré des effets neuroprotecteurs très encourageant (Faktorovich et al., 1990). Plus tard en 2002, des essais impliquant le facteur CNTF (*Ciliary Neurotrophic Factor*) ont suscité un énorme enthousiasme pour le traitement de la RP (Sieving et al., 2012; Tao et al., 2002). Cependant, suite aux effets secondaires entraînés par leur utilisation, ces facteurs ont par la suite montré des limites quant à leur réelle efficacité dans le traitement de la RP (Beltran et al., 2007; Birch et al., 2013). D'autres travaux ont été menés dans le but de

comprendre le lien qui existe entre les photorécepteurs à bâtonnets et à cônes dans la rétine. Plus spécifiquement, l'enjeu était de déterminer pourquoi dans la RP, les cônes dégénèrent secondairement aux bâtonnets. Les premières études dans ce sens portent sur l'identification d'agents toxiques qui seraient libérés par les bâtonnets après leur dégénérescence et qui entraîneraient secondairement la mort des cônes (Gupta et al., 2003; Ripps, 2002). Plus tard en 2009, Claudio Punzo *et al.* ont montré que c'est la stimulation de la voie insulín/mTOR qui active le phénomène d'autophagie lors de la mort des cônes dans la RP (Punzo et al., 2009). En parallèle, une autre hypothèse a été étudiée par notre laboratoire reposant sur l'identification d'un ou d'éventuels facteurs secrétés par les bâtonnets et qui maintiendraient les cônes en vie. La dégénérescence des bâtonnets chez les patients souffrant de RP aboutirait à la raréfaction de ce ou ces facteurs de viabilité menant progressivement à la perte des cônes. L'identification de ces facteurs trophiques représentait un intérêt médical évident.

2: MISE EN CONTEXTE DU TRAVAIL

2.1: *NXNL1*, RdCVF ET RdCVFL

Retraçons brièvement ici l'historique de l'identification de RdCVF qui est l'acronyme de Rod-derived cone viability factor, un facteur de survie des photorécepteurs de type cône, produit par les bâtonnets et essentiel à l'acuité visuelle. Cette découverte représente aujourd'hui un espoir important pour traiter les dégénérescences rétiniennes et ouvre de nombreuses autres perspectives. En 1997, 1998 et 2000, à la suite de transplantations de photorécepteurs à bâtonnets sains dans l'œil de la souris mutant *rd1*, un modèle murin récessif de RP, il a été observé que les cônes de cet animal sont maintenus en vie. Cet effet de survie est observé sur des cônes localisés à distance du transplant, suggérant l'existence d'un facteur diffusé depuis les cellules greffées (Mohand-Said et al., 1997, 1998, 2000). En 2003, des analyses complémentaires ont permis d'établir la nature protéique de ce facteur (Fintz et al., 2003). En 2004, ce facteur trophique nommé RdCVF a été identifié par notre équipe (Léveillard et al., 2004). Cette identification repose sur une approche basée sur un test de viabilité des cônes impliquant une procédure de clonage par expression d'une banque

d'ADN de rétine de souris. Les expériences réalisées à cette époque et impliquant des anticorps polyclonaux indique que RdCVF est une protéine de 12 kDa. RdCVF est homologue aux protéines de la famille des thiorédoxines (Arner and Holmgren, 2000) et est exprimé par le gène qui fut d'abord nommé *Txn16* (thioredoxin-like 6) puis *Nxn11* (Nucleoredoxin-like 1) (Chalmel et al., 2007; Funato and Miki, 2007). *Nxn11* est largement conservé et est composé d'un intron encadré par deux exons codants (**Fig. 13**).

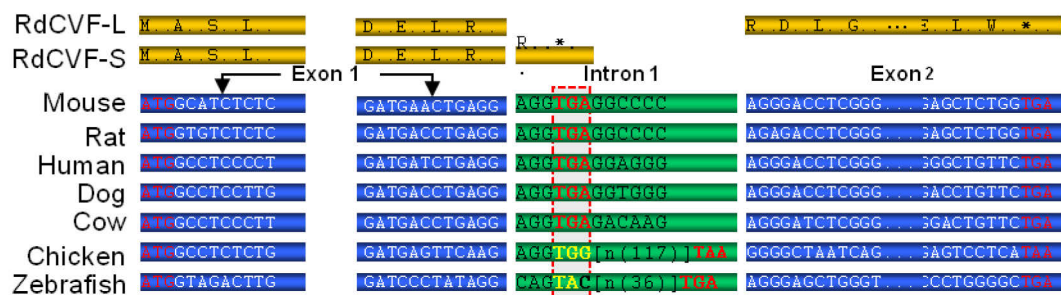


Figure 13: Schéma de la conservation du gène *NXNL1*. En jaune sont représentées les deux isoformes protéiques RdCVF et RdCVFL codées par *NXNL1*. Les rectangle bleus représentent l'exon 1 et 2 de *NXNL1*. Le rectangle vert représente l'intron de *NXNL1*. La position du codon stop en phase dans l'intron est indiqué.

RdCVF possède un site catalytique (CPQC) qui peut être oxydé ou bien réduit. D'un autre coté, cette protéine ne possède pas d'activité thiol-oxydoréductase et ne peut être réduite par la thiorédoxine réductase (**Fig. 14**).

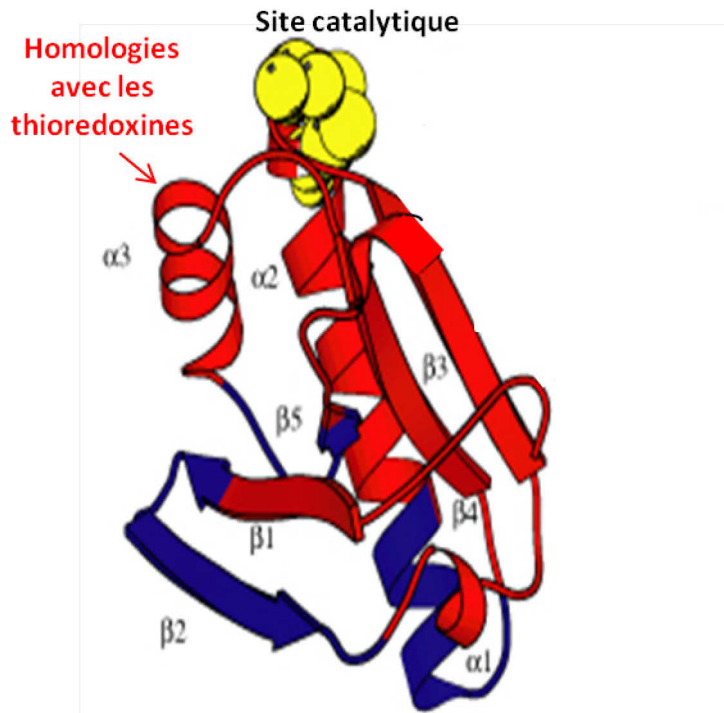


Figure 14: Modèle structural de RdCVF. En rouge la région homologe aux thiorédoxines, en bleu est représentée la région spécifique de l'isoforme courte du gène *Nxn11*. Les cystéines du site catalytique CXXC sont indiquées en jaune.

Cela a pour conséquence de la maintenir dans un état systématiquement oxydé la rendant pro-oxydante et toxique pour les cellules. C'est probablement, en raison de cette caractéristique nocive que RdCVF est «rejeté» et sécrété par les bâtonnets. À la suite d'un défaut d'épissage, l'intron du gène *Nxn11* est retenu et de par la présence d'un codon stop en phase de lecture dans cet intron, *Nxn11* code pour le messenger: *short Nxn11*. Ce messenger n'est constitué que de l'exon numéro 1 du gène, d'un codon supplémentaire présent dans l'intron, d'un codon stop TGA et d'une région non codante 3'UTR (*untranslated region*) (**Fig. 15**).

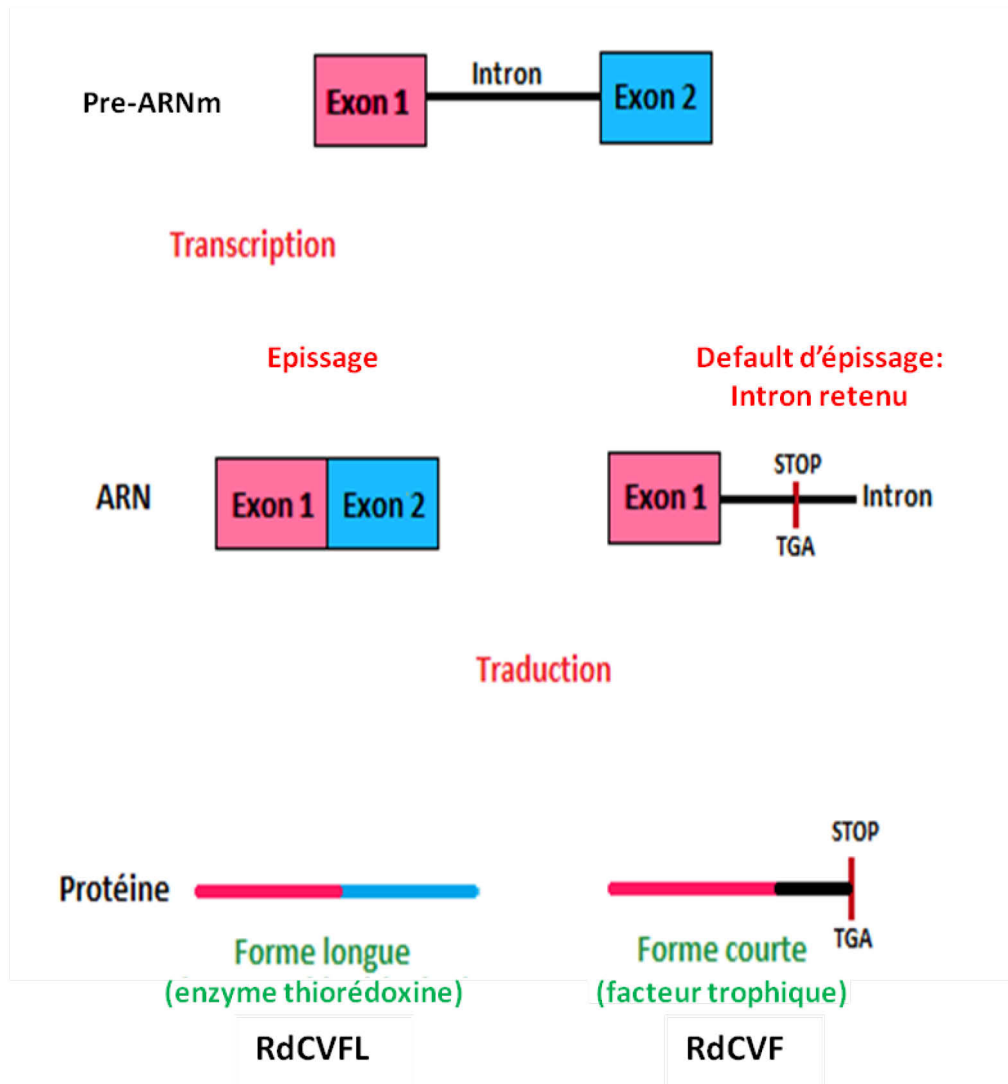


Figure 15: Epissage alternatif du gène *Nxn1*.

C'est ce messager qui code pour le facteur trophique RdCVF. Des injections sous-rétiniennes de RdCVF synthétique chez le rat P23H, modèle animal de RP autosomique dominante, préviennent la perte de fonction visuelle et la dégénérescence secondaire des cônes (Yang et al., 2009). RdCVF est donc un facteur trophique issu des bâtonnets qui maintient les cônes en vie et dont la sécrétion est indépendante des anomalies génétiques induisant la RP. L'administration de RdCVF pour traiter la RP pourrait donc à l'avenir ouvrir un large potentiel d'application et être bénéfique pour environ 2 millions de personnes dans le monde (Cepko and Punzo, 2015; Wright, 1997). Sachant qu'il suffit de 50% de cônes fonctionnels pour maintenir l'acuité visuelle et que 5% de cônes suffisent pour maintenir une vision ambulatoire, l'administration de RdCVF serait

également envisageable et bénéfique pour les cas de stade avancé de la maladie. Le gène *Nxn11*, qui code pour RdCVF, a un patron d'expression spécifique à la rétine, il est localisé chez l'Homme sur le chromosome 19 et chez la souris sur le chromosome 8. Ce gène est dit bi-fonctionnel parce qu'il code par un épissage alternatif pour deux protéines. Chez la souris, lorsque ce gène est épissé, le messenger exprimé: *long Nxn11* code pour RdCVFL une protéine de 34 kDa composé de 217 acides aminés. Cette protéine appartient à la famille des protéines thioredoxin-like avec un domaine thioredoxine complet en C-terminal et un site catalytique (CPQC) (**Fig. 16**).

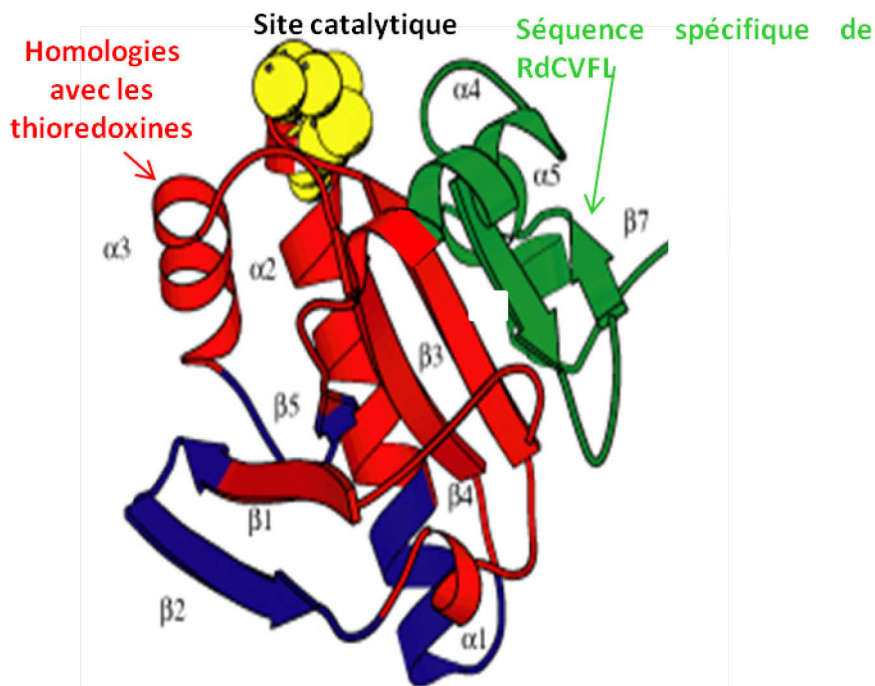


Figure 16: Modèle structural de RdCVFL. En rouge est représenté la région homologue aux thiorédoxines, en bleu est représentée le domaine spécifique de RdCVF par rapport aux autres thiorédoxines, en vert est représentée la région spécifique de RdCVFL. Les cystéines du site catalytique CXXC sont indiquées en jaune.

Cette protéine est conservée chez la souris, le rat, le chien, la vache, le singe, le xenope, le poulet, le poisson zèbre mais pas la drosophile (Chalmel et al., 2007; Funato and Miki, 2007). Les radicaux libres, tels que les ROS (*reactive oxygen species*) ou les RNS (*reactive nitrogen species*) qui entraînent des dommages oxydatifs, sont produits en continu et s'accumulent dans les cellules au cours du vieillissement. En faible

concentration, les radicaux libres n'ont pas d'effets nocifs pour l'organisme, mais le deviennent à plus forte concentration. Les organismes aérobie, particulièrement susceptibles aux ROS, ont développé des systèmes de défense antioxydant. En effet, chez ces organismes il existe des molécules antioxydantes telles que la glutathionne (GSH), la vitamine C et la vitamine E, les glutarédoxines (GLRX1-3 and 5), les sulfirédoxines (SRXN1), mais aussi les thiorédoxines (TXN1 and 2) (Tonissen and Trapani, 2009) (**Fig. 17**).

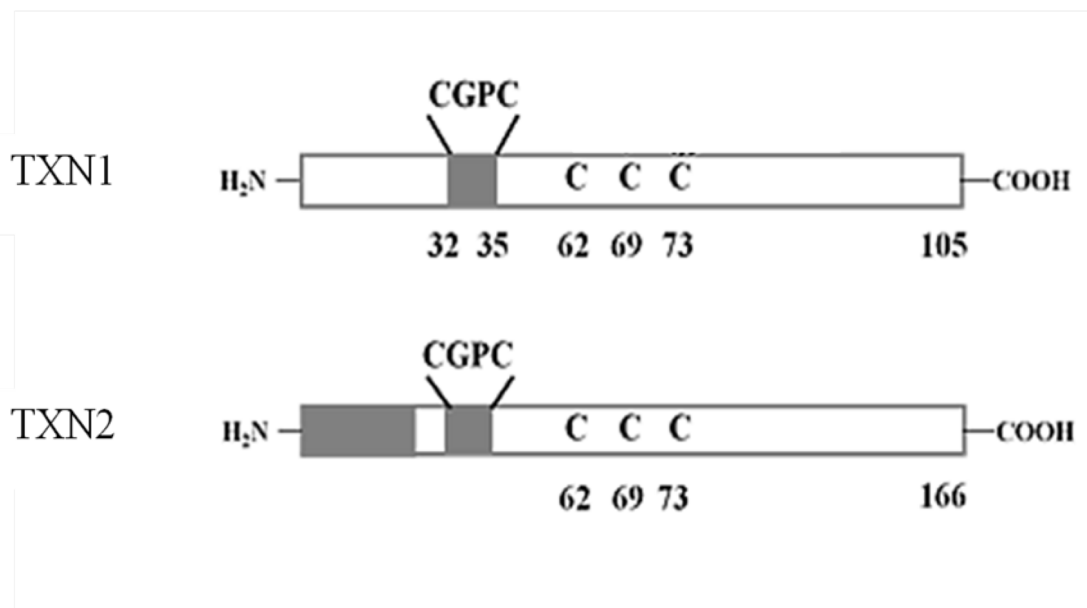


Figure 17: Les thiorédoxines TXN1 et TXN2. Le site consensus CGPC représente le site actif de ces protéines. (Figure issue de Tonissen and Di Trapani, 2009).

Ces enzymes réduisent les groupes cystéines oxydés des macromolécules mais intéressons-nous plus précisément au groupe des thiorédoxines (TXN). Elles sont ubiquitaires, possèdent un site actif (CXXC) qui constitue le siège de leur activité. Ces résidus cystéines sont initialement sous forme réduite et capables de former des ponts disulfures lors de la réduction de leur substrat protéique. Plus précisément, le résidu cystéine en position 32 effectue d'abord une attaque nucléophile lors de la réaction d'oxydation entre une TXN et son substrat (protéine X) et ensuite le résidu cystéine en position 35 va réduire le pont disulfure avec la protéine X et ainsi libérer le substrat réduit (**Fig. 18**).

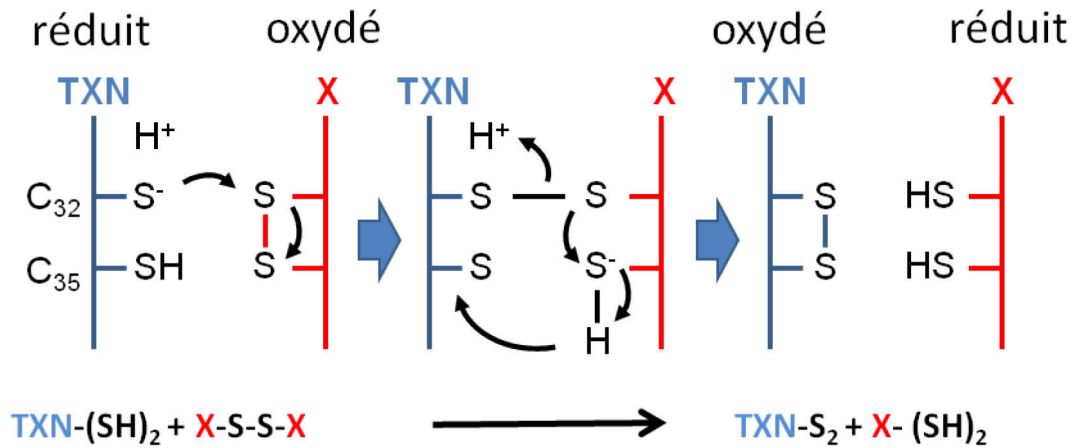


Figure 18: La réaction d'oxydoréduction. Le résidu cystéine C32 effectue une attaque nucléophile sur le disulfure d'un substrat oxydé, pour former un disulfure intermoléculaire. La cystéine résolutive C35 va ensuite réduire ce disulfure intermoléculaire pour aboutir à la libération du substrat sous forme réduite. En fin de réaction TXN est oxydé.

RdCVFL tout comme les TXN peut donc en présence de NADPH, catalyser une réaction de réduction d'une autre protéine, se retrouvant à l'issue la réaction sous forme oxydée. Le gène *Nxn12* qui est le paralogue de *Nxn11* code également pour deux isoformes protéiques RdCVF2 et RdCVF2L. Alors que la souris *Nxn12*^{-/-}, comme la souris *Nxn11*^{-/-}, présente une perte progressive de la vision (bâtonnets et cônes), elle présente également une perte de l'olfaction qui s'accroît avec l'âge (Cronin et al., 2010; Jaillard et al., 2012). En effet, l'expression du gène *Nxn12* n'est pas restreinte à la rétine mais englobe aussi l'épithélium olfactif et le cortex cérébral (Chalmel et al., 2007). De plus, la différence qui existe entre la souris *Nxn12*^{-/-} de la souris *Nxn11*^{-/-}, concerne le comportement de la souris *Nxn12*^{-/-} qui présente une hyperactivité. Des travaux actuellement en cours dans l'équipe tendent à démontrer l'implication de ce gène dans la maladie d'Alzheimer.

2.2 : MODE D'ACTION ET SIGNALISATION DE RdCVF

Des travaux que j'ai initié dans le but d'obtenir mon diplôme de l'école pratique des hautes études (EPHE) ont abouti à l'identification du récepteur de RdCVF, à la mise

en évidence de son mode d'action et de sa signalisation. Ces travaux ont donné suite à la publication d'un article dans la revue *Cell* en 2015 (Ait-Ali et al., 2015). Cet article décrit comment, à l'aide d'un *far-western* blot, des protéines exprimées à la surface des cônes interagissent avec RdCVF. Des analyses de spectrométrie de masse couplées à des analyses de bioinformatiques ont permis d'identifier deux candidats potentiels. Une autre expérience de *far-western* a confirmé l'existence d'une interaction spécifique entre RdCVF et son récepteur basigin-1 (BSG1), une protéine transmembranaire avec trois domaines immunoglobuline extracellulaires qui est exprimée spécifiquement par les photorécepteurs (Ochrietor et al., 2003). Par une approche alternative impliquant des protéines de fusion phosphatase alcaline-RdCVF, ces résultats ont été confirmés. Par immunohistochimie, nous avons révélé que BSG1 est exprimée à la surface cellulaire des photorécepteurs à cônes et que l'inhibition de l'expression de cette protéine réduisait les effets de survie de RdCVF sur les cônes, soulignant l'implication de BSG1 dans les effets de RdCVF. L'existence d'une interaction entre BSG1 et le transporteur du glucose GLUT1 a ensuite été démontrée par co-immunoprécipitation et par spectrométrie de masse. RdCVF stimule l'entrée du glucose dans les cônes via son interaction avec le complexe BSG1-GLUT1, et maintient ainsi la survie des cônes (Ait-Ali et al., 2015; Krol and Roska, 2015). Fait original, l'absorption du glucose par les cônes via RdCVF conduit à la glycolyse aérobie. Lors de cette utilisation alternative du glucose, le pyruvate produit par la glycolyse n'est pas transporté vers les mitochondries, mais métabolisé en lactate par la lactate déshydrogénase (**Fig. 19**).

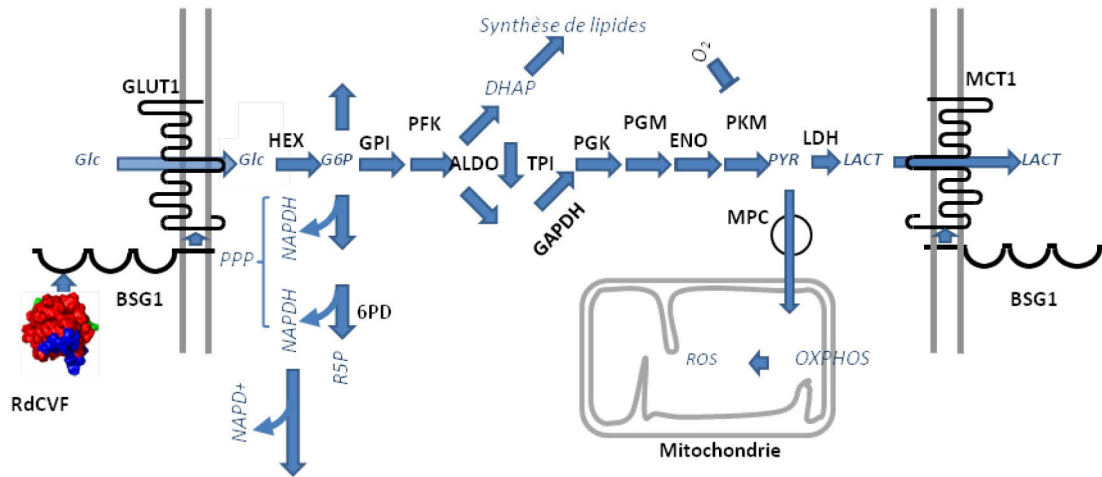


Figure 19: Le mode d'action et la signalisation RdCVF. RdCVF, rod-derived cone viability factor; BSG1 basigin 1; GLUT1, transporteur du glucose 1; HEX, hexokinase, GPI; glucose phosphate isomérase; PFK, phosphofructokinase; ALDO, aldolase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogenase; TPI, triose phosphate isomérase; PGK phosphoglycerate kinase; PGM, phosphoglycerate mutase; ENO, énéolase; PKM; pyruvate kinase; LACT, lactate déshydrogenase; MCT1, Transporteur du lactate 1; MPC, Transporteur mitochondrial du pyruvate; TXNR, thiorédoxine réductase; TXN, thiorédoxine; *Glc*, glucose; *G6P*, glucose-6-phosphate; *NADPH*, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; *DHAP*, dihydroxyacetone phosphate; *PYR*, pyruvate; *LACT*, lactate; 6PD, 6-phosphogluconate dehydrogenase *PPP*, voie des pentoses phosphates; *OXPHOS*, Phosphorylation oxydative; *ROS*, Espèces réactives de l'oxygène; Ox, oxydé; red, réduit.

Les cônes utilisent ce métabolisme particulier du glucose habituellement limité aux cellules cancéreuses et nommé effet Warburg (Léveillard, 2015) (**Fig. 20**).

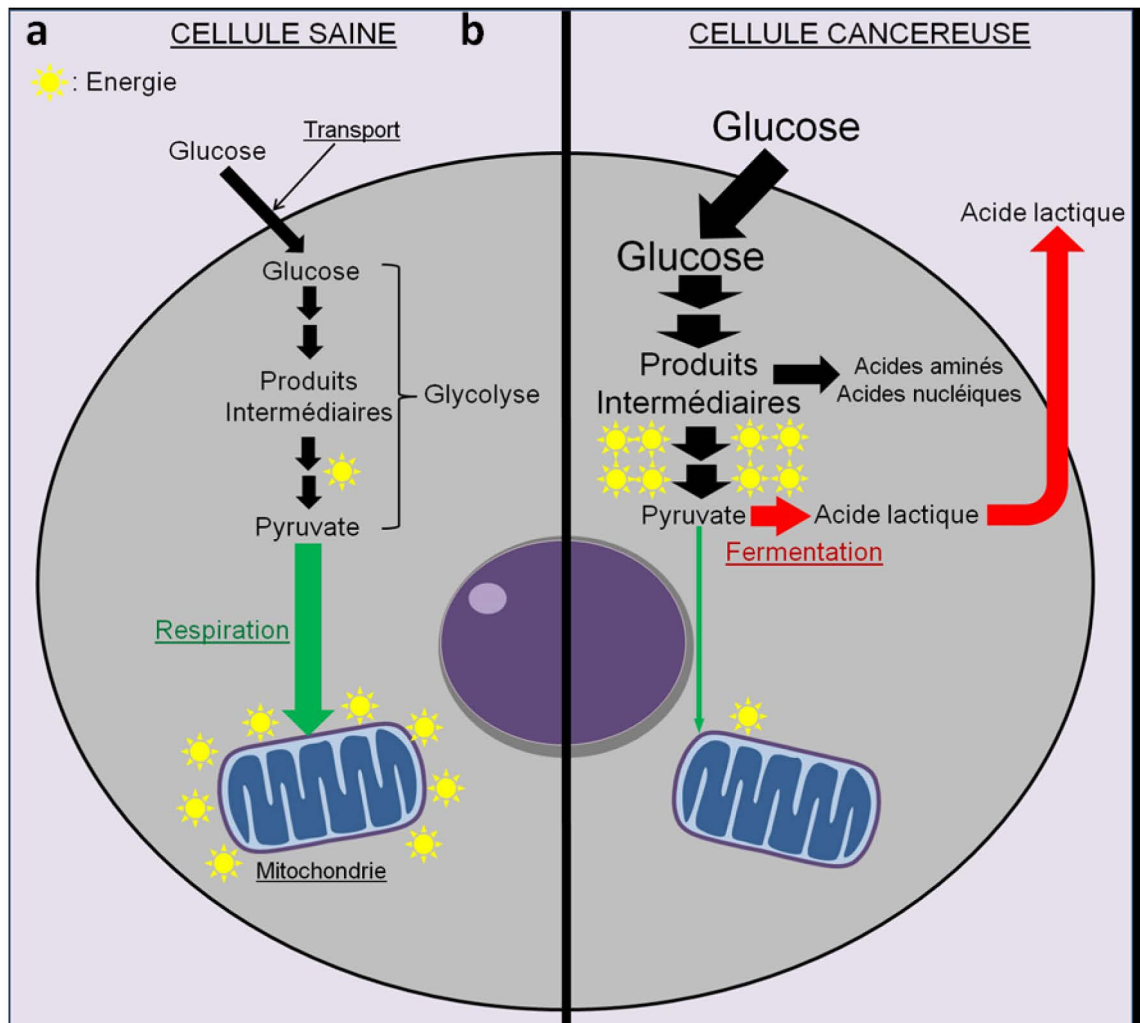


Figure 20: La glycolyse aérobie correspond à une dérégulation du métabolisme énergétique dans les cellules cancéreuses. **a)** Une cellule saine, oriente son métabolisme énergétique vers la respiration mitochondriale. **b)** Une cellule cancéreuse, oriente son métabolisme énergétique vers la fermentation pour accélérer la production de nouvelles molécules qui permettent la multiplication des cellules cancéreuses.

En 1924, Otto Warburg, (**Fig. 21**) ayant mis en évidence pour la première fois ce métabolisme spécifique dans des cellules cancéreuses, a également observé celui-ci dans des rétines de poulet et de pigeon, connues pour être enrichies en photorécepteurs à cônes. Néanmoins, convaincu que ce phénomène n'était lié qu'aux cellules cancéreuses, il pensait à cette époque que cette observation dans la rétine de ces oiseaux était un artéfact (Krebs HA., 1972).



Figure 21: Otto Heinrich Warburg. Lauréat du Prix Nobel en 1931 pour sa découverte du métabolisme spécifique des cellules cancéreuses, l'effet Warburg.

Il reçut un prix Nobel en 1931 pour cette découverte. La glycolyse aérobie encourage la production de métabolites nécessaires pour le renouvellement des segments externes des cônes.

2.3 : LE ROLE DE *Nxnl1* DANS LES PHOTORECEPTEURS A BATONNET ET A CONES

Les photorécepteurs à cône sont connus pour être particulièrement sensibles au stress oxydatif (Komeima et al., 2006). Xin Mei, une ancienne post-doctorante de l'équipe s'est intéressée au rôle du gène *Nxnl1* et des produits pour lesquels il code, RdCVF et RdCVFL, dans les photorécepteurs à bâtonnets mais plus spécifiquement dans les cônes de la rétine de souris (Mei et al., 2016). Afin de discriminer les cônes des bâtonnets d'une rétine de souris, elle a injecté des virus adéno-associé ou *adeno-associated virus* (AAV) qui expriment un reporter de la protéine fluorescente verte ou *Green Fluorescent Protein* en anglais (GFP) sous un promoteur spécifique des photorécepteurs à cône dans les yeux d'une souris sauvage. Par la suite et après avoir vérifié que seuls les photorécepteurs à cône exprimaient la GFP, elle a individuellement

collectées les cellules positives dans le but de réaliser des analyses de *single-cell reverse transcriptase polymorphism chain reaction* (Single-Cell RT-PCR). Les résultats de ces expériences indiquent que les photorécepteurs à cône expriment uniquement le messager *long Nxn11* qui code pour l'enzyme RdCVFL. En comparaison, elle a montré que les photorécepteurs à bâtonnets expriment les deux messagers du gène *Nxn11*, *short Nxn11* et *long Nxn11*. Ces résultats indiquent que l'épissage alternatif du gène *Nxn11*, ou plus précisément que la rétention de l'intron de ce gène permettant l'expression du facteur trophique RdCVF en plus de la thiorédoxine RdCVFL, a lieu uniquement dans les bâtonnets alors que dans les cônes, *Nxn11* est systématiquement épissé.

3: PRESENTATION DU PROJET DE THESE

3.1: PROBLEMATIQUE

La théorie de l'évolution moléculaire du gène *NXNLI* stipule que l'isoforme trophique RdCVF dérive par un mécanisme d'inhibition de l'épissage de l'isoforme enzymatique RdCVFL. Les bâtonnets, ne fonctionnant que de jour, sont plus économes et moins énergivores que les cônes (Morshedian and Fain, 2015; Okawa et al., 2008). Les bâtonnets sont majoritaires dans la rétine chez la grande majorité des mammifères. Le mécanisme d'action du facteur trophique RdCVF sur les cônes à travers son récepteur de surface montre que les bâtonnets stimulent la consommation du glucose par les cônes. Il semblerait donc que le phénomène d'inhibition de l'épissage du gène *NXNL ancestral*, conservé depuis lors, soit à l'origine d'un transfert d'énergie des bâtonnets vers les cônes. De plus, de manière intéressante, les cônes de souris expriment un seul des produits du gène *Nxn11*, la thiorédoxine RdCVFL. Ceci peut s'expliquer par le fait que dans la rétine des mammifères, chaque cône est entouré de plus de 20 bâtonnets qui exercent un effet trophique par sécrétion de RdCVF expliquant que les cônes ne nécessiteraient pas de recours à une signalisation autocrine. La comparaison des bâtonnets et des cônes permettrait d'appréhender les mécanismes d'inhibition de l'épissage du gène *NXNLI*. La question qui se pose dès lors est: quels sont les mécanismes moléculaires conduisant à l'épissage alternatif du gène *NXNLI* à l'origine de la signalisation métabolique de RdCVF ? Les études de l'évolution des

photorécepteurs indiquent que l'apparition des photorécepteurs à bâtonnets il y a 450 millions d'années à partir des cônes entraînaient une économie énergétique (Warrant, 2009) permettant la diversification de l'utilisation du glucose dans le processus de céphalisation de la lignée des chordés (Okawa et al., 2008). Une deuxième question se pose alors: est-ce que les mécanismes moléculaires qui régulent l'épissage alternatif du gène *NXNLI* sont apparus au cours de l'évolution avec les bâtonnets ou est ce que la rétention de l'intron de ce gène a précédé cet événement ? Une partie de mon projet, que je développerai que partiellement ici mais qui sera poursuivie, au delà de ma thèse, consiste à identifier les protéines et les mécanismes responsables de l'inhibition de l'épissage du gène *NXNLI*. L'autre partie de mon travail de thèse, sur laquelle je me focaliserai, consiste à déterminer si le facteur trophique RdCVF a co-évolué avec les photorécepteurs à bâtonnets ou si au contraire il existait précédemment.

3.2 : QUELS SONT LES MECANISMES MOLECULAIRES IMPLIQUES DANS L'EPISSAGE ALTERNATIF DES GENES?

3.2.1 : DEFINITION DE L'EPISSAGE ALTERNATIF

Pour qu'un acide ribonucléique (ARN) puisse être transporté en dehors du noyau afin d'être traduit, il doit présenter au niveau de son extrémité 5' une coiffe, être débarrassé de ses introns et être modifié au niveau de son extrémité 3' par un clivage et par l'ajout d'une queue polyadenosine (PolyA). Chez les eucaryotes, l'épissage fait partie des processus de maturation de l'ARN codé par les gènes qui sont constitués d'exons et d'introns. Il correspond à l'excision des introns du transcrit primaire puis à la jonction des exons (**Fig. 22**).

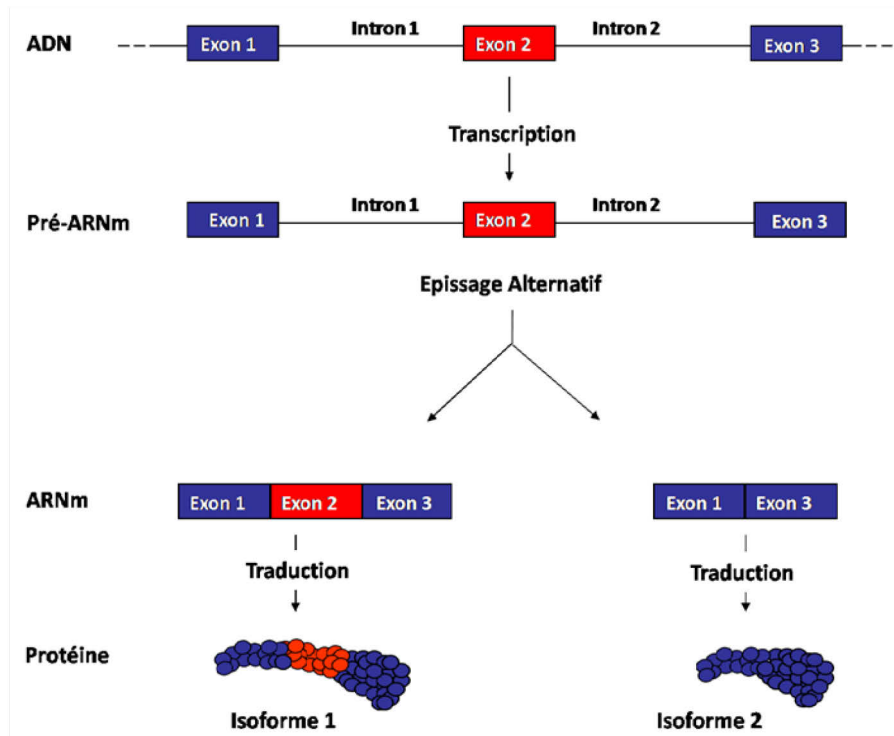


Figure 22: Epissage d'un transcrit primaire contenant un exon alternatif. Les rectangles représentent les exons et les traits les introns. L'exon alternatif est en rouge. Il est entouré par deux exons constitutifs en bleu. L'ARN messager est obtenu après excision des introns du transcrit primaire (pré-ARNm). Le processus d'épissage alternatif permet d'obtenir des isoformes protéiques différentes grâce à l'inclusion ou l'exclusion de l'exon alternatif.

L'épissage alternatif est un mode de régulation de l'expression des gènes et environ 60% des transcrits chez l'Homme sont concernés. Lorsqu'un exon est systématiquement inséré dans le transcrit mature, l'épissage est dit constitutif. Lorsque un exon est soit inclus soit exclu de l'ARN mature, on parle d'épissage alternatif. L'épissage est assuré par le spliceosome, l'une des machineries moléculaires les plus complexes de la cellule (Vosseberg and Snel, 2017). Ce processus contribue à la diversité du protéome et explique la différence qui existe entre le nombre de gènes et celui beaucoup plus important des protéines. L'épissage alternatif peut donc à partir d'un seul gène, produire plusieurs ARN messager (ARNm) qui peuvent être traduits en diverses protéines avec des fonctions et des propriétés différentes. L'épissage alternatif est impliqué dans de nombreux processus cellulaires fondamentaux tels que la réponse au stress, le cycle

cellulaire, l'apoptose, la différenciation lors du développement, ou encore la détermination du sexe chez certaines espèces (Biamonti and Caceres, 2009; Salz, 2011).

3.2.2 : LE SPLICEOSOME

La machinerie d'épissage appelée spliceosome est une machinerie d'une grande complexité, composée de cinq petits ARN nucléaires (*small nuclear RNA* ou snRNA) associés à des protéines pour former des particules ribonucléoprotéiques appelées snRNP (*small nuclear ribonucleoprotein*) et d'une centaine de protéines additionnelles qui sont des facteurs d'épissage non-snRNP. Il existe deux types de spliceosomes, le spliceosome majeur et le spliceosome mineur (Verma et al., 2017). Puisque le spliceosome majeur est responsable de l'épissage de la majorité des introns chez les métazoaires, nous allons donc préférentiellement nous intéresser à lui. La réaction d'épissage repose sur l'assemblage des complexes du spliceosome sur l'ARN pré-messager qui s'opère grâce à des interactions ARN/ARN, protéine/ARN et protéine/protéine. Cet assemblage se fait en plusieurs étapes successives et repose également sur la reconnaissance d'une séquence spécifique présente dans la région 3' de l'intron, appelée point de branchement et localisé dans une région riche en pyrimidine (Wahl et al., 2009). La réaction d'épissage nécessite également de sélectionner le site 5' d'épissage sur l'exon en amont de l'intron à exciser et le site 3' d'épissage sur l'exon en aval de l'intron à exciser (**Fig. 23**).

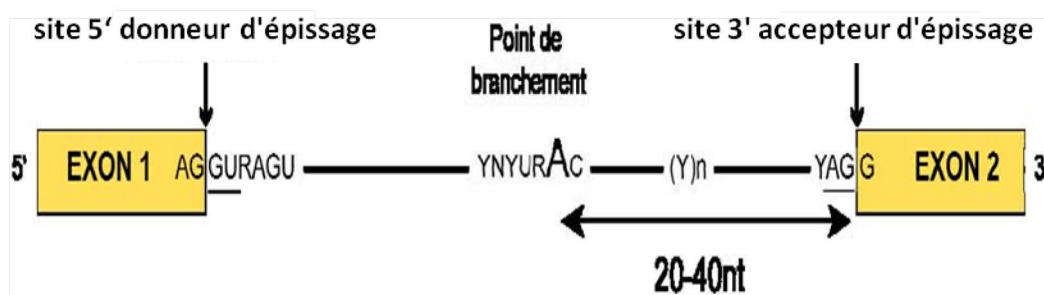


Figure 23: Séquences d'épissage exoniques et introniques consensuelles présentes au niveau d'un pré-ARNm chez les vertébrés. Les dinucléotides introniques invariants GU et AG sont indiqués. Le A au centre correspond au point de branchement. La distance optimale entre celui-ci et le site 3' d'épissage est indiquée. Y, pyrimidines C ou U. R, purine A, G. N, A, C, G ou U.

Ces deux sites sont constitués de courtes séquences conservées aux jonctions exon/intron. Il existe dans le spliceosome majeur 5 snRNP : U1, U2, U4, U6 et U5. U1snRNP reconnaît d'abord le site 5' donneur d'épissage, puis le point de branchement est reconnu par le facteur protéique SF1 et enfin le site 3' accepteur d'épissage est reconnu par le facteur U2AF (*U2snRNP Auxiliary Factor*). Par la suite le spliceosome forme une liaison covalente entre le site 5' donneur d'épissage et le point de branchement après avoir coupé au site 5' formant ainsi une structure en lasso. Finalement, une seconde coupure est réalisée, sur le site 3' accepteur d'épissage, libérant l'intron tandis que les exons sont raboutés (**Fig. 24**).

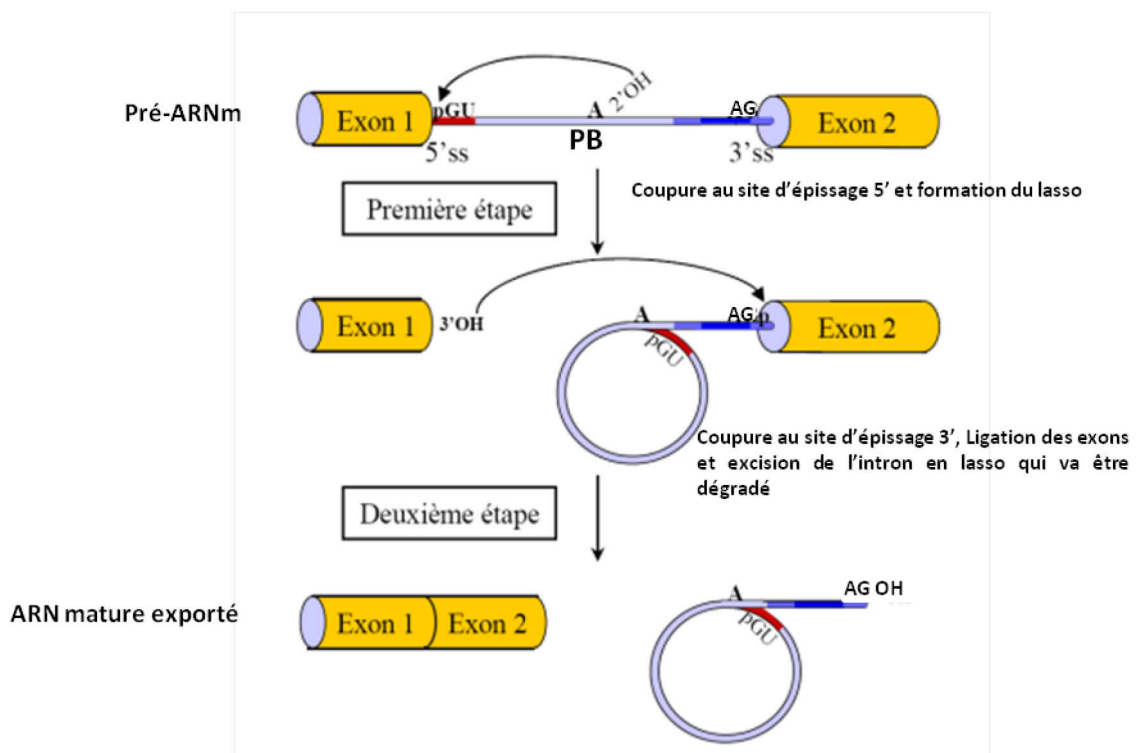


Figure 24: Les étapes catalytiques de l'épissage des pré-ARNm. Les exons sont représentés en jaune et les introns par des traits bleus. PB, point de branchement. 5'ss, site 5' d'épissage. 3'ss, site 3' d'épissage. Les flèches représentent les attaques nucléophiles des phosphates des sites d'épissage par les groupements hydroxyles.

3.2.3: LES ELEMENTS REGULATEURS DE L'ÉPISSAGE ALTERNATIF

Ces éléments, appelés *cis* régulateurs, partagent des caractéristiques communes. Ils peuvent être exoniques ou introniques, sont généralement courts, de séquences variables mais très conservés entre les différentes espèces. Ils peuvent jouer un rôle activateur ou inhibiteur, car ils sont capables de recruter des facteurs régulateurs favorisant l'activation du complexe du spliceosome ou au contraire empêcher leur recrutement. Lorsqu'ils sont qualifiés d'activateurs d'épissage, on les appelle les *enhancers* mais lorsqu'ils sont qualifiés de répresseurs d'épissage on les appelle les *silencers*. Il existe deux types d'enhancers, les *Exonic Splicing Enhancers* (ESE) qui sont localisés dans les exons alors que ceux localisés dans les introns sont appelés *intronic Splicing Enhancers* (ISE).

3.2.4: LES FACTEURS IMPLIQUES DANS LA REGULATION DE L'ÉPISSAGE ALTERNATIF

Il existe d'ores et déjà un très grand nombre de facteurs d'épissage catalogués mais avec le développement actuel de la recherche sur l'épissage alternatif et sa régulation, de nouveaux facteurs ne cessent d'émerger. Il nous est donc impossible de tous les citer et les décrire. Cependant, nous allons tout de même nous attarder sur les plus importants et les plus connus d'entre eux. Il existe deux types de facteurs, les facteurs répresseurs et les activateurs qui respectivement empêchent ou promeuvent l'inclusion d'exons. Ces facteurs d'épissage peuvent être ubiquitaires ou alors spécifiques à un tissu donné et peuvent également être régulés au cours du développement de l'organisme. Les protéines SR (*Serin Arginin rich*) sont un exemple de facteurs ubiquitaires dont les plus connues sont SRP20, SRP30c, 9G8, SRP40, SRP55, SRP75, ASF/SF2 et SC35 (Cowper et al., 2001). Le mode d'action des protéines SR sur l'épissage est essentiellement basé sur leur capacité à interagir avec les protéines du spliceosome, mais elles peuvent également interagir avec l'ARN ou alors entre elles pour réguler l'épissage. Ces protéines sont composées d'un ou de deux domaines de liaison à l'ARN de type RRM (*RNA Recognition Motif*) qui est suivi par un

domaine RS riche en dipeptides répétés Arginine/Sérine qui permet d'activer l'épissage. Ces protéines sont connues pour être aussi impliquées dans de nombreux autres événements tels que la transcription, la traduction, le transport, la dégradation des ARN et peuvent également être impliquées dans certains cancers (Long and Caceres, 2009). Le deuxième exemple de facteurs ubiquitaires sont les protéines HNRNP (*heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*) qui forment une famille de protéines très abondantes dans la cellule et qui sont structurellement variées. Il en existe au moins une vingtaine telle que HNRNPA1, B, C, F, G, H, K, ou HNRNPI. Les HNRNP possèdent des domaines de liaison à l'ARN de type RRM ou KH (*K-homology*) ainsi que des domaines auxiliaires particulièrement riches en certains acides aminés. Généralement, les protéines HNRNPs entrent en compétition avec les protéines du spliceosome en masquant leur site d'action et sont donc considérées comme des facteurs répresseurs d'épissage. Les protéines de la famille CELF (*CUG-BP and ETR-3 Like Factors*) sont dites à profil d'expression tissu-spécifique et peuvent agir en tant que facteurs activateurs ou répresseurs d'épissage. La famille CELF comprend 6 membres qui présentent de fortes homologues de séquence et des propriétés fonctionnelles similaires. L'expression des CELF peut aussi varier en fonction du stade du développement. Les protéines de la famille des MBN1 (*Muscleblind-like protein*) sont un autre exemple de protéines d'expression tissu-spécifique. Même si leur rôle dans le développement des cellules de la rétine des vertébrés n'est pas encore établi, il est connu que certaines protéines de cette famille jouent un rôle dans la différenciation terminale des photorécepteurs chez la drosophile (Begemann et al., 1997; Xu et al., 2017). Il est également connu que l'expression de certaines de ces protéines est régulée durant le développement de la rétine chez le poulet (Artero et al., 1998). Les facteurs MBN1 très largement conservés sont capables d'agir en tant qu'activateurs ou répresseurs (Ho et al., 2004; Pascual et al., 2006), ils sont parfois impliqués dans des fonctions autres que la régulation de l'épissage alternatif. Certaines protéines membres de cette famille tout comme certains membres de la famille des CELF sont connus pour lier l'ARN double brin qui forme une structure en tige-boucle ou *hairpin* en anglais, présentant un mésappariement au niveau de la tige (Yuan et al., 2007).

3.3: LES MODELES UTILISES POUR ETUDIER L'EVOLUTION DES MECANISMES D'EPISSAGE DE *NXNLI*

Le système nerveux étant complexe, il est difficile d'en reproduire les fonctions pour l'étudier dans un tube à essai ou de s'appuyer uniquement sur des modèles informatiques. Pour développer de nouveaux traitements des maladies neurologiques, il est donc indispensable d'utiliser des animaux. Les recherches en neurosciences ont permis de fournir des informations importantes sur le fonctionnement du système nerveux humain et les maladies associées par l'utilisation de modèles animaux. Bien que certains aspects de l'intelligence soient propres à l'Homme, il existe de nombreuses similitudes structurelles, fonctionnelles, comportementales et neurobiologiques qui sont partagées par l'ensemble des espèces. L'étude et l'identification des mécanismes moléculaires de l'épissage alternatif du gène *NXNLI* dans les bâtonnets, entraînant l'expression de RdCVF et de RdCVFL, permettront de reproduire artificiellement ces mécanismes dans les photorécepteurs à cônes. Les cônes exprimeront alors de manière autocrine RdCVF et le secréteront. Ce dernier stimulera l'absorption de glucose après interaction avec son récepteur BSG1. À l'aide de cette stratégie, les cônes s'auto-maintiendraient en vie, même en l'absence des photorécepteurs à bâtonnets suite à leur perte dans la RP. La mise au point de ce traitement alternatif de la RP présenterait un nouvel espoir pour la guérison de cette maladie. Il pourrait également venir en complément de la stratégie actuellement développée dans notre équipe qui consiste à administrer les protéines RdCVF et RdCVFL chez les patients atteints de RP. Cette stratégie thérapeutique justifie l'utilisation du primate non humain comme modèle d'étude pour valider les résultats d'une partie de mon travail de thèse obtenus chez la souris. Pour aborder l'aspect évolutif des mécanismes moléculaires de l'épissage du gène *NXNLI*, deux autres modèles seront utilisés dans mon projet. Le premier est la lamproie qui est l'un des premiers vertébrés à posséder une rétine duale présentant des photorécepteurs qui font office de bâtonnets. L'autre modèle que j'utiliserai pour comparer les résultats obtenus chez la lamproie est l'hydre, qui a la particularité d'être sensible à la lumière sans posséder d'organe visuel organisé tel que l'œil.

3.3.1: LES PRIMATES NON HUMAIN

Les primates qui arborent un fort degré de conservation génomique, anatomique et physiologique avec l'Homme, représentent aujourd'hui le meilleur modèle pour comprendre les processus physiologiques humains. Ils représentent 0,28% des animaux utilisés en laboratoire de recherche. Même si le chimpanzé dispose de plus de 98% de leur patrimoine génétique en commun avec l'Homme et qu'il est le primate génétiquement le plus proche de l'Homme, la majorité des études de recherche biomédicale utilisent le macaque. L'interdiction de sacrifier le chimpanzé qui peut vivre comme l'Homme jusqu'à 70 ans pour la recherche, complique son utilisation pour les études scientifiques (Kahn, 2014). L'ordre des primates peut être divisé en plusieurs familles. L'Homme appartient à la famille des Hominidés (*Hominidae*), qui se divise en quatre genres: Pongo (orang-outan), Pan (chimpanzé et bonobo), Gorilla et Homo. Les membres des autres familles des primates peuvent se diviser en deux groupes, les prosimiens (les lémuriniens) et les singes. Ce dernier groupe est divisé en deux sous groupe, les singes de l'ancien monde (babouins, macaques), aussi appelés vrais singes qui sont génétiquement plus proches de l'Homme et les singes du nouveau monde (marmousets ou ouistitis, capucins) (**Fig. 25**).

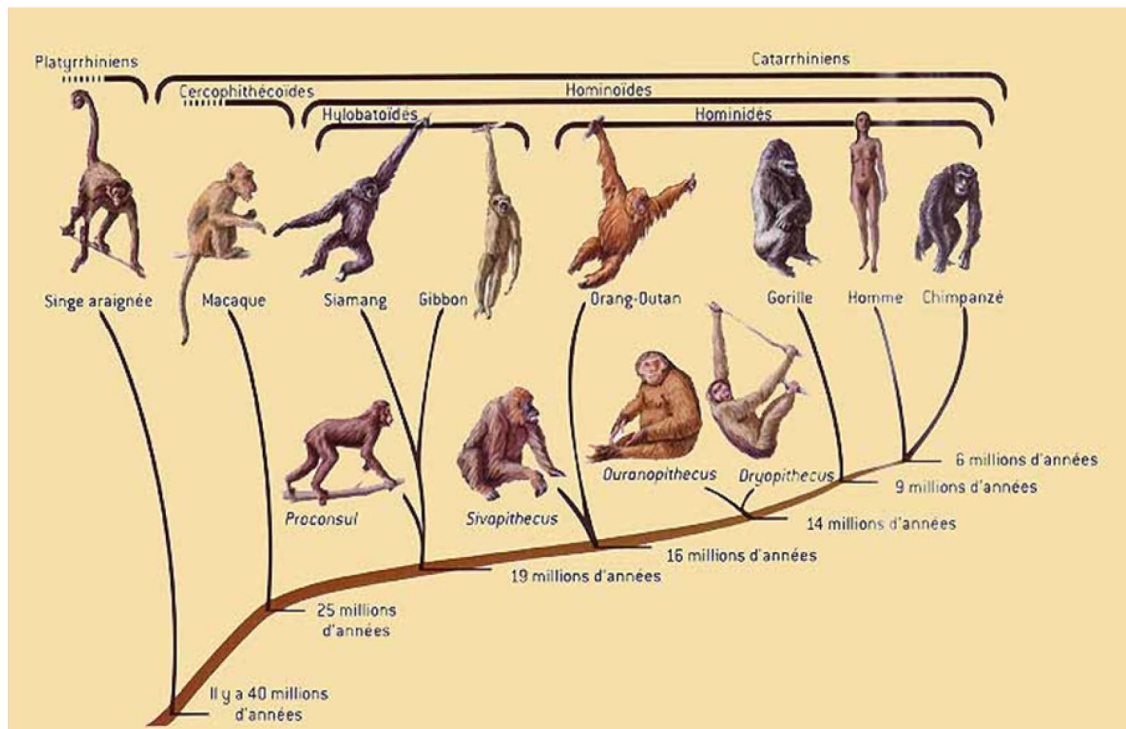


Figure 25: Arbre phylogénétique des hominidés.

En biologie, les primates sont maintenant utilisés depuis un siècle. Ils présentent des voies biochimiques ou métaboliques communes avec l'Homme et permettent d'en étudier les fonctions normales ou anormales. Parce qu'ils partagent de nombreuses pathologies avec l'Homme, ils peuvent être utilisés pour la mise au point de médicaments, et aussi pour déterminer l'efficacité de traitements de thérapie génique pour l'Homme (Phillips et al., 2015). Les considérations éthiques sont bien évidemment posées lors de l'utilisation des primates non humains ou *non human primate* (NHPs) pour la recherche biomédicale. Il est très important de conduire les recherches en essayant de minimiser au maximum les effets négatifs sur ces animaux, de réduire leur stress au minimum ainsi que les souffrances subies. Dans notre cas, les animaux sont logés par paire ou en groupe social en cages individuelles conformes aux lignes directrices de l'annexe A révisée de la convention européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques (STE 123). Ils disposent d'eau *ad libitum* et d'un accès au sol avec de la litière ainsi qu'à de la nourriture distribuée deux fois par jour. Celle-ci est certifiée standard pour les primates (Altromin, Genestil, Royaucourt, France) telles les croquettes expansées certifiées standard pour les primates ainsi qu'à des fruits frais et sec. La pièce dans

laquelle ils sont logés est maintenue à une température ambiante entre 20 et 24°C, avec un pourcentage d'humidité de 55 +/- 10% où des cycles alternatif de 12 h/12 h jour-nuit sont respectés. Les primates sont régulièrement surveillés et suivis par les expérimentateurs afin d'identifier les moindres changements comportementaux pour en informer l'équipe de vétérinaires. Outre la socialisation, un enrichissement est assuré par des dispositifs de recherche d'aliment et des jouets selon un programme de bien-être animal établi au sein du centre de recherche du CEA (Commissariat à l'énergie atomique) de Fontenay-aux-Roses. Tout comme l'Homme, les singes du vieux monde possèdent une vision trichromatique. Celle-ci est le résultat de la duplication de l'opsine du groupe L située sur le chromosome X, respectivement exprimées par les cônes verts et rouges. Par commodité, ces opsines sont nommées opsine verte et opsine rouge et présentent respectivement une absorption maximale respectivement à 530 et 560 nm (**Fig. 7**) (Sharpe et al., 1999). Cette vision trichromatique facilite la détection des fruits mûrs dispersés au sein d'un feuillage abondant facilitant leur cueillette car la grande majorité des primates est essentiellement frugivore. Ces singes constituent les principaux consommateurs de fruits tropicaux dont ils sont par ailleurs les principaux vecteurs de dispersion. En effet, l'hypothèse d'une co-évolution entre ces primates frugivores et les arbres dont ils consomment les fruits a été émise tout comme celle proposée entre les abeilles et les fleurs dont elles assurent la pollinisation (Chittka and Raine, 2006). En 1957, Stephen Polyak, un neuroanatomiste et neurologue, a décrit et établi une similitude de la densité et répartition des cônes dans la fovéa chez le macaque (*Macaca mulatta*) et chez l'Homme (Roofe, 1958). Plus tard, V. Hugh Perry a démontré que la distribution des cônes chez le macaque sur l'ensemble de la rétine était similaire à celle de l'Homme. Les cônes sont majoritairement localisés en région centrale et leur quantité diminue en direction de la périphérie de la rétine tout comme chez l'Homme (Committee on Vision, 1990). Le macaque est donc un modèle particulièrement approprié pour l'étude des pathologies liées à la vision. Une récente étude sur le génome des colugos reliés autrefois aux chauves-souris mais en réalité apparentés aux primates, montre que cette espèce exprime le gène *NXNLI* (Mason et al., 2016). Très récemment, afin de transférer en clinique des essais de thérapie génique impliquant des AAV ciblant des maladies de la rétine, une étude de l'université de Pennsylvanie a utilisé le macaque. Les premiers essais précliniques de cette thérapie avaient été validés chez la souris mais compte tenu de la différence qu'il existe entre la rétine de cet animal qui ne présente pas

de macula et celle de l'Homme, il a été nécessaire de valider ces essais chez un modèle plus proche de l'Homme (Ramachandran et al., 2017).

3.3.2: LA SOURIS

Malgré leur proche parenté avec l'Homme, les recherches sur les primates ne sont pas généralisées et sont réalisées uniquement lorsque l'utilisation d'autres mammifères est de toute évidence inappropriée. La similitude génétique qui existe avec l'Homme est élevée chez les primates non humains, mais elle l'est également chez les espèces plus distantes. Nous avons par exemple 96% de notre ADN en commun avec la souris. Le fait d'avoir des gènes en commun peut faciliter la comparaison et la compréhension de certains processus biologiques chez l'Homme d'autant que le génome de la souris est séquencé depuis 2002 et parfaitement annoté. La souris est le modèle le plus utilisé dans la recherche médicale car il est relativement facile de manipuler son génome (Rosenthal and Brown, 2007). Ce modèle fournit un outil puissant pour la modélisation des maladies humaines, il est peu coûteux et facile à entretenir. Un autre avantage dans l'utilisation de la souris en recherche est que les souris adultes se multiplient rapidement, le temps entre la naissance d'une souris et sa maturation sexuelle est de moins de 10 semaines. Ce modèle présente de très nombreux autres avantages, mais l'un des plus intéressants est sa courte durée de vie permettant d'analyser rapidement les effets d'un traitement à long terme mais aussi sur le vieillissement. Une année de vie chez la souris représente 30 ans chez l'Homme. Le suivi rigoureux de certaines règles et normes lors de l'utilisation de ce modèle pour l'étude de maladies améliorerait drastiquement la fiabilité des résultats. De plus en plus d'études cherchent à identifier les clés nécessaires pour perfectionner la robustesse des résultats obtenus à partir de ce modèle afin d'envisager le transfert vers la clinique (Justice and Dhillon, 2016). La souris est après la drosophile le second modèle dont le développement de l'oeil a été étudié le plus en détail. Le développement de sa rétine ou rétino-genèse s'étale sur plus de vingt jours. Les premiers précurseurs post-mitotiques apparaissent dès le 10^{ème} jour de développement embryonnaire (E10). Après la naissance, qui a lieu environ après 20 jours de gestations, la prolifération cellulaire continue jusqu'à 3 jours après la naissance (PN3) dans la rétine centrale et persiste

encore jusqu'à *PN9* dans les régions les plus périphériques. La formation des segments externes qui correspond à la phase tardive de la différenciation des photorécepteurs, se déroule entre *PN5* et au delà de *PN9*. Plus précisément, il a été démontré qu'il existait une corrélation entre l'ultra-structure et l'expression de gènes spécifiques durant le développement postmitotique des cônes. Une inversion majeure dans l'expression des gènes impliqués dans la morphologie des cônes et celle des gènes impliqués dans le développement neuronal en générale est retrouvée à *PN6*, qui correspond à la formation des segments externes des cônes (Daum et al., 2017) (**Fig. 26**).

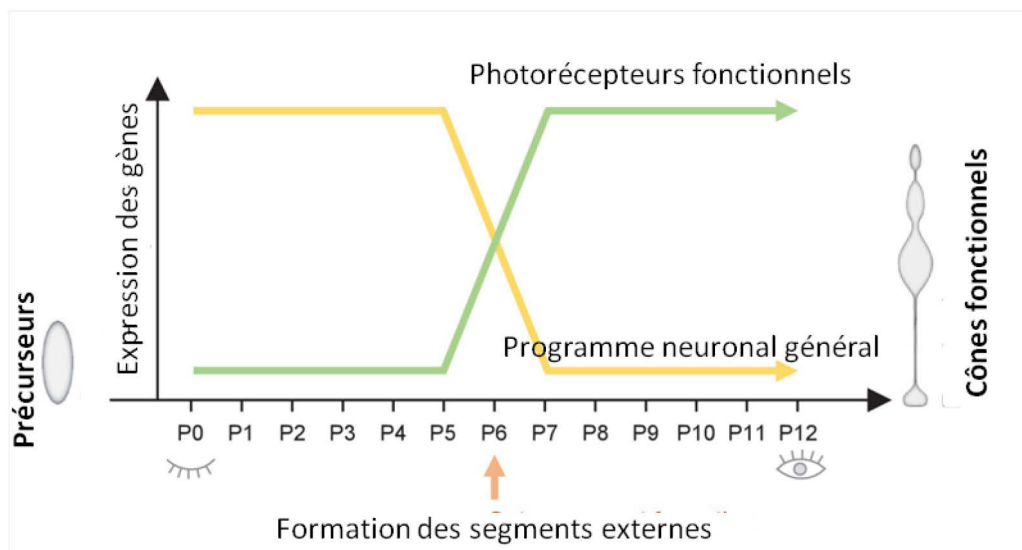


Figure 26: Schéma récapitulatif de l'inversion qui a lieu durant la maturation d'un précurseur de cônes en un cône fonctionnel.

Des techniques de marquages à l'aide de rétrovirus intégrant le génome ont permis de déterminer la chronologie de la différenciation des photorécepteurs (Livesey and Cepko, 2001; Young, 1985) (**Fig. 27**).

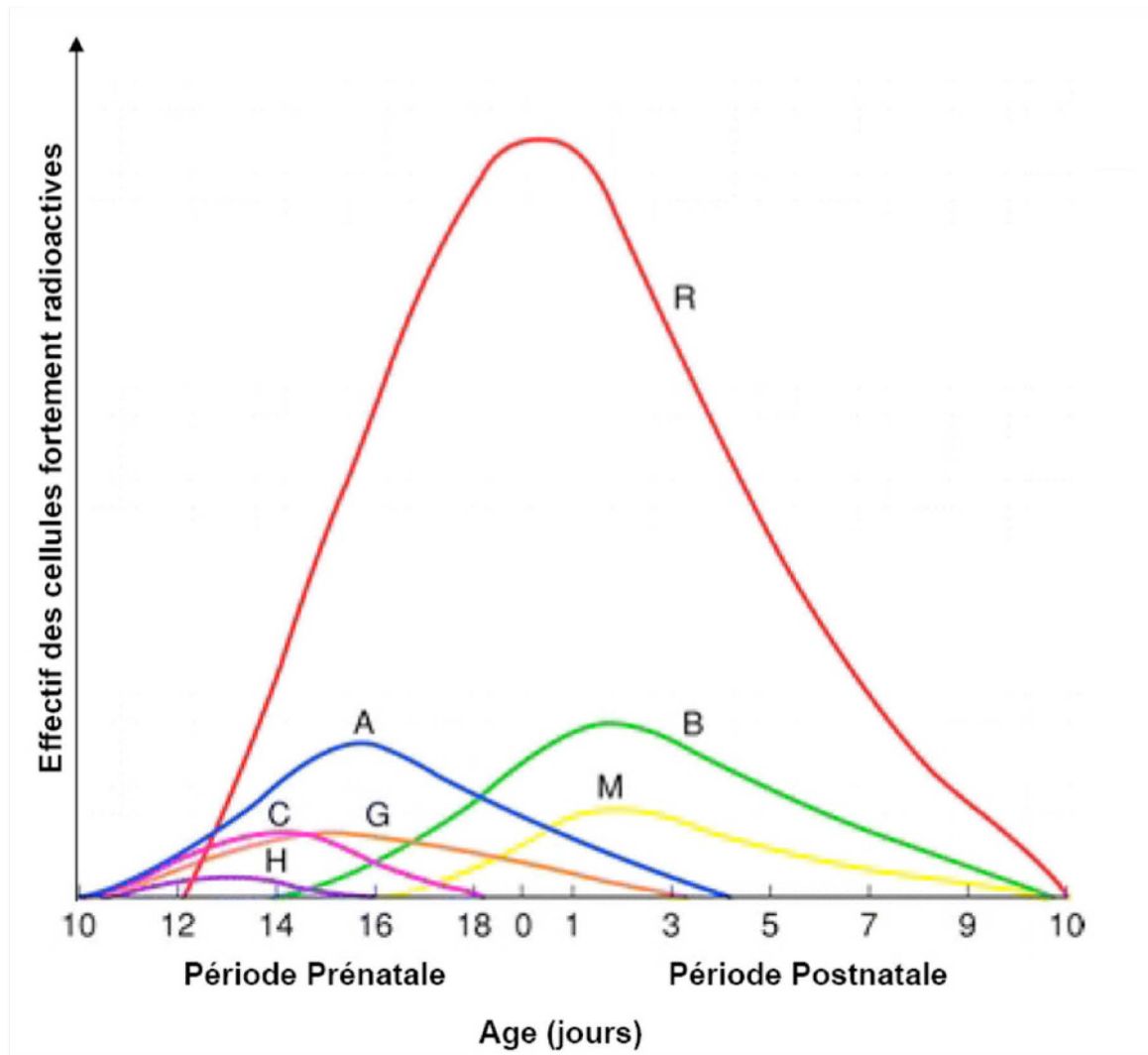


Figure 27: Chronologie de la rétino-genèse chez la souris. A: Cellules amacrines. B: Cellules bipolaires. C: Photorécepteurs à cône. G: Cellules ganglionnaires. H: Cellules horizontales. M: Cellules gliales de Müller. R: Photorécepteurs à bâtonnet. Adapté de la thèse de Mathias Fradot 2007, d'après Young 1985.

Ce développement relativement long a permis de faire certaines observations telles que la mise en évidence du caractère multipotent des cellules progénitrices de la rétine (Young, 1985). La première étude traitant de dégénérescences héréditaires rétinienne à partir de souris date de 1924 (Keeler, 1924). Cependant, la rétine de souris étant dépourvue de macula, l'utilisation de ce modèle pour l'étude de maladies liées à la rétine et plus précisément celles concernant la macula telle que les DMLA pose problème. En 2015, l'équipe de Davis William a comparé les caractéristiques organisationnelles du centre de la rétine d'une souris avec celles de la macula de

l'Homme. Cette étude indique que le centre de la rétine des deux organismes est plus dense en photorécepteurs mais que le pic de densité des cônes au niveau de la fovéa de l'Homme est bel et bien absent chez la souris (Volland et al., 2015). Cette différence souligne et illustre la grande diversité évolutive qu'il existe chez les yeux de vertébrés. Cependant il existe de nombreux modèles efficaces de RP utilisés en recherche. La souris *rd1*, qui porte une mutation sur le gène codant pour la phosphodiesterase (*Pde6b*) des bâtonnets en est un exemple (L. D. Carter-Dawson et al., 1978). Il s'agit d'une forme récessive de dégénérescence séquentielle des bâtonnets puis des cônes comme retrouvée pour la RP chez l'homme. Dans ce modèle qui présente une dégénérescence rapide des bâtonnets et plus lente des cônes ne possède plus que 2% de bâtonnets à *PN17* et plus aucun bout de 5 semaines alors que la plupart des cônes sont encore présents. Un autre modèle de RP utilisé est la souris *rd10* qui porte une mutation dans l'exon 13 de la sous-unité bêta du gène *Pde6b* des bâtonnets présente l'avantage de débiter sa dégénérescence rétinienne au stade post natal 18 jours, soit après la mise en place des différentes couches rétinienne. Tout comme chez la souris *rd1*, cette mutation provoque une forme autosomale récessive de RP chez l'Homme. Elle présente une dégénérescence progressive de la couche nucléaire externe de la rétine (ONL) autour à *PN16*. En comparaison avec le modèle *rd1*, le phénotype de la souris *rd10* présente un ralentissement de l'apparition et du développement de la dégénérescence rétinienne fournissant un meilleur modèle de RP pour tester les pharmacothérapies (Chang et al., 2007). La souris *rd7* est dépourvue du récepteur nucléaire NR2E3 qui favorise l'expression des gènes des photorécepteurs en bâtonnets tout en réprimant ceux des cônes. Il s'agit d'un modèle de syndrome de S-cone, une maladie associée à une augmentation de la sensibilité à la lumière bleue et à la cécité nocturne (Haider et al., 2000). La souris *Rd9* est un excellent modèle d'étude de la dégénérescence rétinienne causée par la mutation du gène qui code pour la *retinitis pigmentosa GTPase regulator* (RPGR) qui constitue la plus grande catégorie de RP liée au chromosome X qui représente 20% des dystrophies rétinienne (Thompson et al., 2012). Notons qu'avec l'utilisation de tous ces modèles murins, de nombreux progrès sont réalisés constamment afin de découvrir des thérapies efficaces. De nombreuses stratégies qui ont pour but de limiter la dégénérescence de photorécepteurs sont en cours d'expérimentation par notre équipe (**Table 2**).

3.3.3: LA LAMPROIE

Les cnidaires, tels que les coraux, les anémones de mer ou les méduses, sont les tout premiers métazoaires avec des yeux. Plus tard au cours de l'évolution et lors de la division du groupe des cnidaires et des bilatériens, les photorécepteurs rhabdomériques sont apparus (**Fig. 28**).

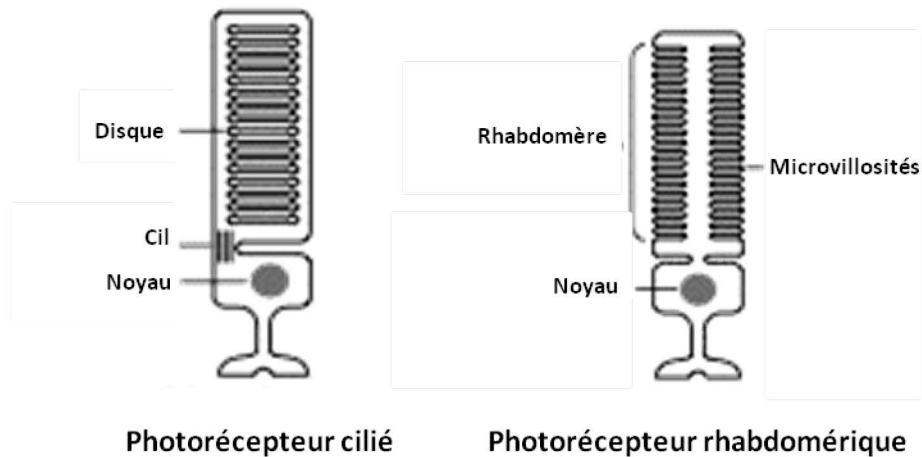


Figure 28: Photorécepteur cilié et rhabdomérique.

Il existe deux types de photorécepteurs, les ciliés et ceux avec des villosités dits rhabdomériques. La principale différence entre ces deux types de photorécepteurs se trouve dans la forme des replis cellulaires de leurs segments externes ainsi que dans la nature biochimique des opsines qui y sont localisées (**Fig. 29**).

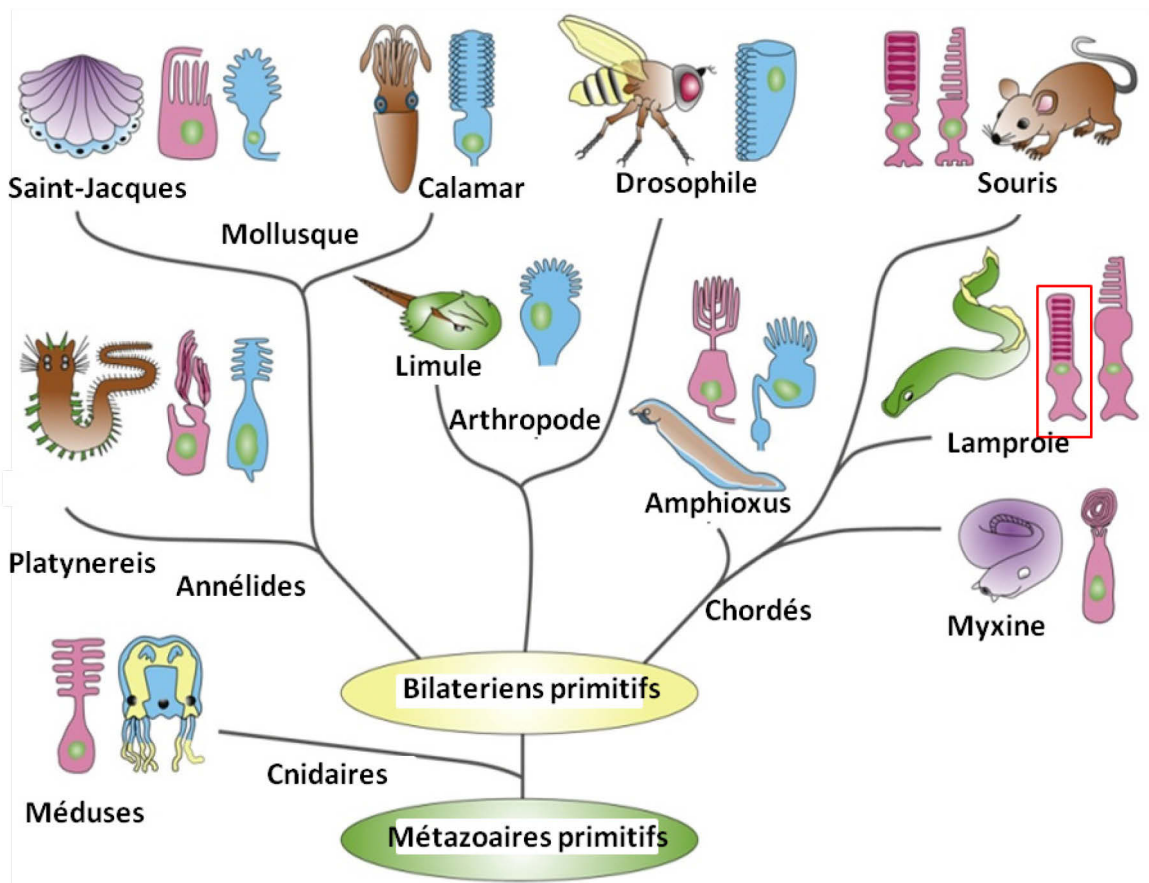


Figure 29: Arbre phylogénique des métazoaires. En rose sont représentés les photorécepteurs ciliés et en bleu les photorécepteurs rhabdomériques. Adapté de Fain et *al.* 2010.

Il existe certains organismes comme le planaire, un type de ver plat ou la coquille Saint Jacques (*Pecten maximus*), qui possèdent les deux types de photorécepteurs, ciliés et rhabdomériques, possédant des fonctions différentes au sein du même œil (McReynolds and Gorman, 1970). Chez les chordés, dont font partie les vertébrés, les yeux sont majoritairement composés de photorécepteurs ciliés (Fain et al., 2010). Cependant, chez les chordés primitifs tels que l'amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*) qui a la caractéristique originale de posséder quatre types d'yeux frontaux, les deux types de photorécepteurs, ciliés et rhabdomériques sont retrouvés (Lacalli, 2004). Après l'amphioxus, les plus anciens vertébrés appartenant à la famille des chordés sont les agnathes tels que les myxines (*Myxinidae*) et les lamproies (*Petromyzontida*). Les yeux des myxines, petits, simples et uniquement constitués de photorécepteurs ciliés sont localisés sous une fine pellicule de peau. Cet organisme vit sous les roches entre 25 et 1

000 mètres de profondeur, leurs photorécepteurs sont donc adaptés à des environnements de faible luminosité et sont vraisemblablement des photorécepteurs à bâtonnets. La lamproie, qui est plus étudiée que la myxine, est un vertébré aquatique sans mâchoire, comme la myxine mais possédant des yeux bien développés et une bouche circulaire sans machoire (**Fig. 30**).



Figure 30: La lamproie. *Petromyzon marinus*

Cet organisme qui est apparu il y a 550 millions d'années à une taille qui peut varier de 60 à 120 cm et un poids qui varie entre 0,7 et 2,6 kg. Les lamproies comprennent environ 38 espèces, forment un groupe monophylétique et sont regroupées en trois sous-familles : les geotriinés (telle que *Geotria australis*, présente dans l'hémisphère sud), les mordaciinés et les petromyzontidés (dont les *Lampetra fluviatilis*, *Lethenteron japonicum*, ainsi que *Petromyzon marinus*). C'est l'espèce *Petromyzon marinus* qui est le plus souvent utilisée comme modèle de référence en recherche, car elle est retrouvée en abondance en Amérique du Nord mais aussi en Europe. De plus, il est relativement simple d'obtenir des embryons de cette espèce en quantité importante. La lamproie *P. marinus* est une espèce migratrice avec un cycle de vie de plusieurs années, qui se reproduit en eau douce mais qui vit en mer.

Le développement de la lamproie comprend plusieurs phases :

- une phase embryonnaire durant laquelle l'organogenèse a lieu et qui dure environ 2 semaines,
- une phase prolarvaire d'environ 3 semaines,

• une phase où la larve est enfouie dans les sédiments et qui dure environ 5 ans. Suite à cette phase a lieu la métamorphose au cours de laquelle des changements majeurs chez cet animal apparaissent comme l'apparition du disque buccal et la différenciation des structures olfactives et de l'œil. Après cette phase, la lamproie marine migre en mer, où elle grandit pendant un à deux ans (Rocancourt, 2011) (**Fig. 31**).

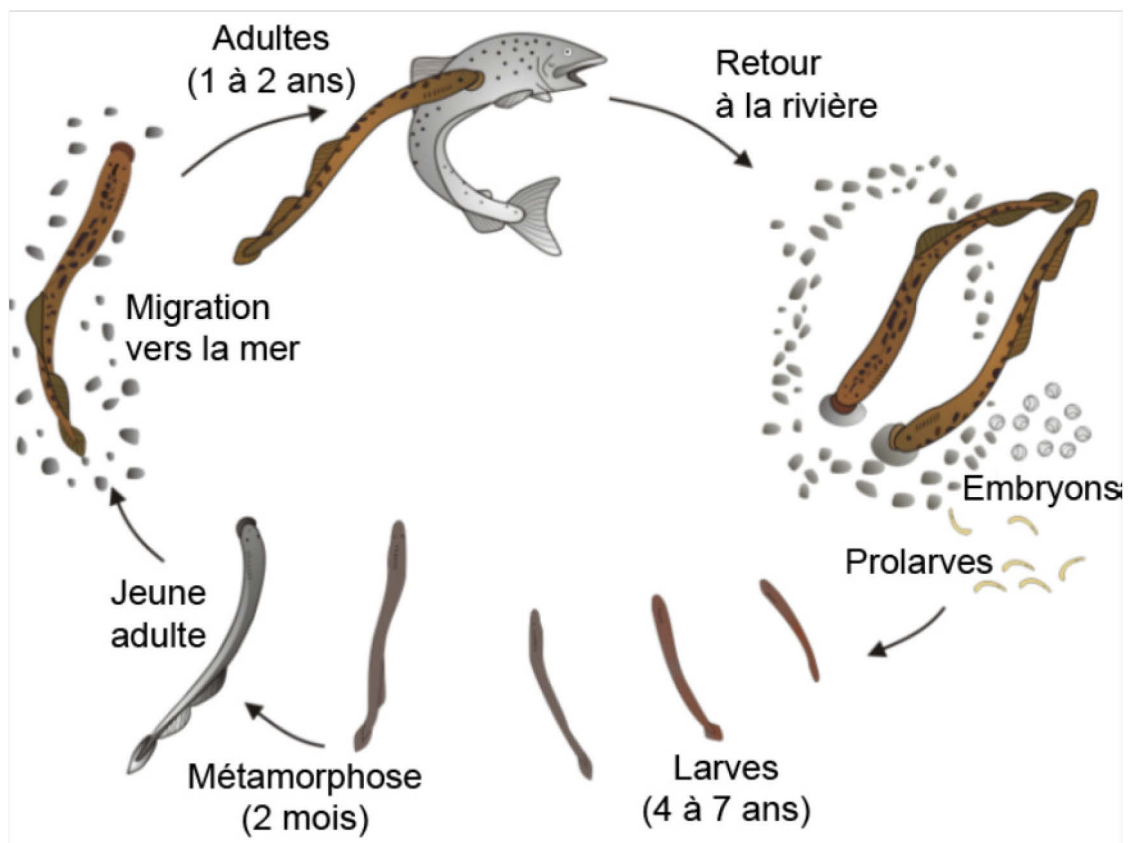


Figure 31: Cycle de vie de la lamproie *Petromyzon marinus*. Adapté de la thèse de Claire Rocancourt, 2011

Ce modèle est particulièrement prisé pour les études génétiques révélant des mécanismes à l'origine de la biodiversité tels que ceux impliqués dans le système immunitaire (Ehrhardt et al., 2004; Pancer et al., 2004). La lamproie possède deux types de photorécepteurs ciliés, nommés «long» et «court» qui correspondent respectivement aux cônes et aux bâtonnets (**Fig. 32**).

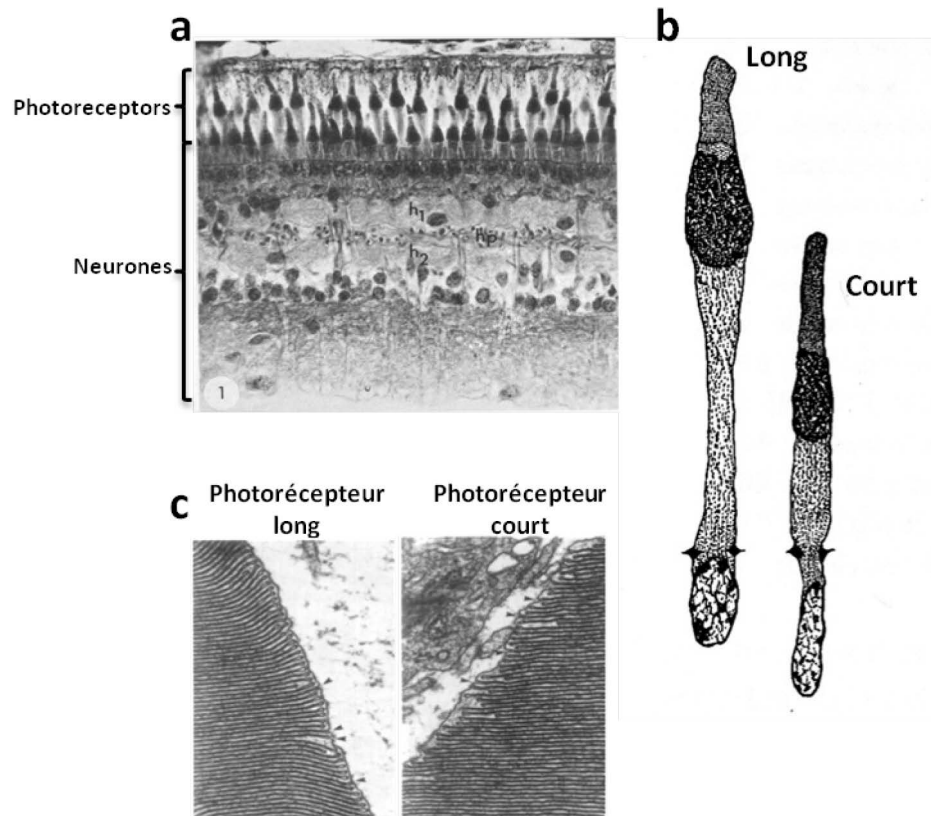


Figure 32: Rétine et photorécepteurs de la lamproie. a) Image de microscopie électronique d'une rétine de lamproie où sont localisés les photorécepteurs et les neurones associés. (Image issue de Öhman *et al.*, 1976). b) Photorécepteurs long et court de lamproie. (Image issue de Walls G *et al.*, 1942). c) Segments externes des photorécepteurs long et court de lamproie qui présentent tout les deux des invaginations de la membrane. (Image issue de Dickson & Graves, 1979).

Les photorécepteurs «court» de la lamproie sont tout comme les photorécepteurs à bâtonnets de souris très sensibles et capables de répondre à la stimulation d'un seul photon (Ingram *et al.*, 2016; Morshedjian and Fain, 2015; 2017) (**Fig. 33**).

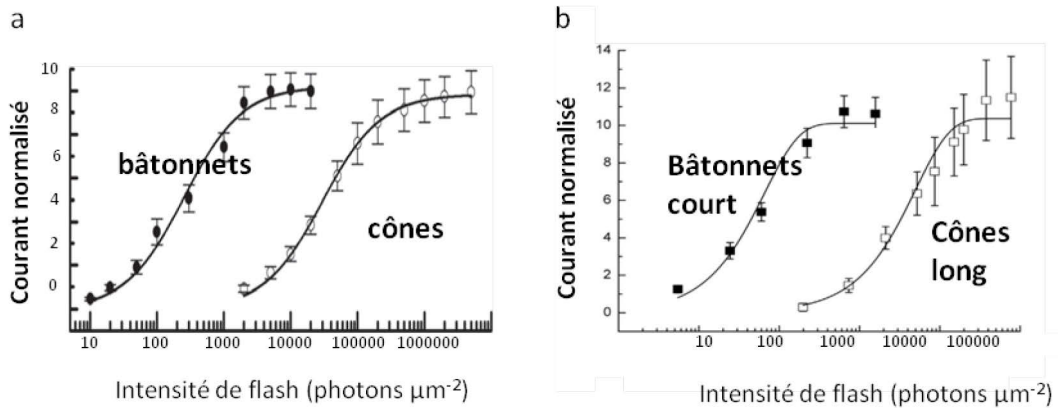


Figure 33. Sensibilité des photorécepteurs de souris comparée à celle des photorécepteurs de lamproie. a) Réponses des bâtonnets (•) et des cônes (◻) de souris à des flashes d'intensités variables. **b)** réponses des bâtonnets (■) et des cônes (◻) de lamproie à des flashes d'intensités variables.

Récemment, il a été mis en évidence que les photorécepteurs «court» de la lamproie sont capables de saturer en condition de forte luminosité. Il s'agit d'une caractéristique spécifique retrouvée pour les bâtonnets chez l'ensemble des vertébrés (Morshedian and Fain, 2017).

3.3.4: L'HYDRE

Afin de comprendre l'origine et la fonction ancestrale de la signalisation de RdCVF, il serait intéressant d'étudier l'expression du gène *Nxn11* chez des modèles sélectionnés pour représenter les étapes clés de l'évolution de l'œil. Pour cela, nous avons décidé de nous concentrer sur les taxons tels que les cnidaires (qui vient du mot *knidè* qui veut dire ortie) qui représentent un groupe évolutif parallèle aux bilatériens. En effet de nombreux traits présents chez les animaux sont également présents chez ces deux groupes, impliquant des origines ancestrales. La logique basée sur un arbre phylogénique permet de comprendre l'histoire évolutive de l'expression d'un trait ou d'un gène. L'hydre (*Hydra*) appartient à la famille des cnidaires, mais contrairement aux coraux, aux anémones de mer ou aux méduses, ne possède pas d'œil. Cependant, Edmund Wilson écrit dans son livre «The Heliotropism of Hydra» en 1891 que le chercheur Trembley avait observé un siècle plus tôt, en 1791, que l'hydre était semble t-

il attirée par la lumière. En effet, il remarqua que des hydres placées dans un aquarium avaient tendance à se regrouper du côté de l'aquarium exposé à la lumière du jour (Wilson et al., 2017). Après avoir déplacé l'aquarium de manière à ce que la lumière illumine l'autre côté de l'aquarium, il observa que les hydres s'étaient déplacées vers le côté exposé. Observations particulièrement curieuses à cette époque d'autant que Wilson avait déjà souligné que l'hydre ne possède aucun appareil visuel différencié. Plus précisément, l'espèce *Hydra vulgaris* que nous utiliseront pour notre étude montre une photo-sensibilité spécifique et développée malgré une organisation anatomique relativement simple et l'absence de toute structure ressemblant à des photorécepteurs (Guertin and Kass-simon, 2015). Bien plus tard, les travaux de Passano et McCullough ont montré que la lumière blanche entraîne une relaxation du corps *Hydra vulgaris* qui avait été préalablement adaptée à l'obscurité (Passano and McCullough, 1962). Certaines hydres peuvent même avoir des comportements qui varient en fonction des différentes longueurs d'ondes de lumière à laquelle elles sont exposées (Taddei-Ferretti and Cotugno, 1991). C'est en 2006 qu'ont été décrites les premières caractéristiques moléculaires et fonctionnelles des sous-familles de protéines opsine exprimées chez l'hydre (Santillo et al., 2006). L'hydre qui présenterait une photosensibilité dermique exprime plusieurs opsine dont HmOps2 (Musio et al., 2001a; Plachetzki et al., 2012) D'autres études montrent que les mécanismes de phototransduction des photorécepteurs ciliés existaient déjà chez l'ancêtre commun des cnidaires (Koyanagi et al., 2008). De nombreuses opsines sont retrouvées dans les génomes séquencés de *Hydra magnipapillata* et *Nematostella vectensis*. L'utilisation de l'hydre comme modèle de recherche a conduit à de nombreuses avancées scientifiques. C'est par l'utilisation de l'hydre que la fonction ancestrale de neuroprotection du facteur VEGF a été confirmée (Krishnapati and Ghaskadbi, 2013). L'équipe de Claudia Tortiglione a également démontré que le proto-oncogène *c-myc* connu pour jouer un rôle dans la régulation de l'homéostasie des cellules souches chez les vertébrés avait la même fonction chez l'hydre. Elle a montré que l'inhibition du gène ancestral *Hymyc1* chez l'hydre entravait l'équilibre entre auto-renouvellement et différenciation des cellules souches chez cet organisme. Cette équipe a mis en évidence la capacité des hydres à intégrer des ARN interférents double brin et à déclencher une réponse ARN interférence (Ambrosone et al., 2012). *Hydra vulgaris*, qui vit en eau douce et se nourrit d'artémies, est constituée d'un corps allongé terminé par un pied capable de s'ancrer au sol et d'une « tête »

appelée hypostome apical constitué d'une bouche entourée de cinq à huit tentacules (Fig. 34).



Figure 34: L'Hydre. *Hydra vulgaris*

L'hydre peut se reproduire asexuellement en bourgeonnant et en donnant naissance à un second organisme (Fig. 35).



Figure 35: Mode de reproduction asexuée de l'hydre par bourgeonnement.

Le corps d'*Hydra vulgaris* possède une organisation tubulaire très simple avec deux feuillets cellulaires, l'endoderme et l'ectoderme séparés par une couche intermédiaire acellulaire. Des études histologiques montrent qu'*Hydra vulgaris* est le premier

métazoaire connu qui possède un système nerveux complet constitué de deux anneaux nerveux localisés au niveau de l'hypostome qui semblent être responsables des contractions des tentacules et du corps de l'hydre (Koizumi, 2007). L'hydre a la particularité d'être un organisme ayant suscité beaucoup de curiosités de part ses facultés phénoménales de régénération. En raison de l'activité incessante de trois lignées de cellules souches, les polypes de l'hydre possèdent une capacité inégalée pour régénérer les parties du corps amputées dans une fenêtre temporelle bien définie. Cette caractéristique spécifique de l'hydre avait déjà été observé par Trembley, Abraham, dans le volume 1 son livre intitulé «Mémoires pour servir à l'histoire d'un genre de polypes d'eau douce, à bras en forme de cornes » et publié en 1744. En effet, il avait observé qu'à partir de morceaux coupés d'un polype, il a pu obtenir autant de nouveaux organismes identiques au premier coupé (Trembley, 1744). Plus tard ces observations ont été confirmée dans une étude qui montre qu'au bout de 20 minutes, une nouvelle tête peut se reformer à partir d'un pied d'hydre auquel la tête a été découpée et un pied peut se régénérer à partir d'une tête à laquelle le pied a été retiré (**Fig. 36**) (Wenger and Galliot, 2013).

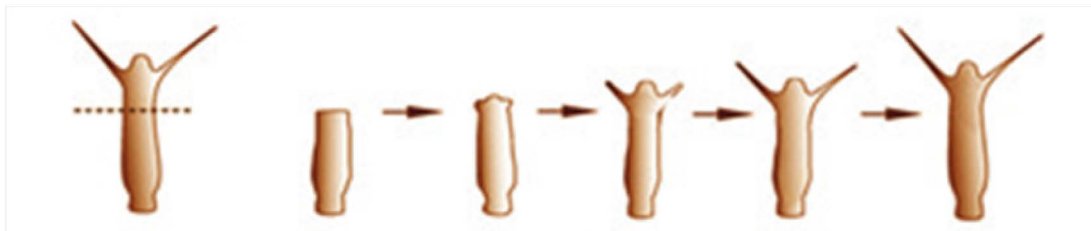


Figure 36: Capacité de régénération de l'hydre au cours du temps. Si la tête de l'hydre est coupée, une nouvelle commence à se reformer au bout de 20 minutes.

De plus, si les propriétés du tissu de l'hydre sont reconstituées, à savoir si un mélange de 70 à 80% de cellules interstitielles et 20 à 30% de cellules épithéliales d'hydre sont incubées en suspension, une réagrégation spontanée de ces cellules va avoir lieu pour donner un nouvel animal (Gierer et al., 1972). Fait intéressant, l'hydre est l'espèce utilisée en laboratoire qui présente le record de longévité. La combinaison de la présence de ses trois lignées de cellules souches auto-renouvelables et de l'expression du gène *FoxO* impliqué dans la protection contre le stress oxydatif, lui permet dans des

conditions optimum de pouvoir vivre théoriquement jusqu'à 1 400 ans. C'est le biologiste Daniel Martínez du Pomona College en Californie qui en a fait la découverte lors d'une étude publiée en 1998 (Martinez, 1998). Pour cette étude, il a tenté d'étudier des phénomènes de vieillissement en utilisant sans le savoir un modèle qui peut mourir de maladie ou de malnutrition mais qui ne vieillit jamais.

MATERIELS ET METHODES

1: EXTRACTION DE L'ARN

1.1: A L'AIDE D'UN KIT

L'ARN total est extrait à partir d'hydras entières, des têtes et des pieds d'hydre ainsi qu'à partir de chaque partie de la rétine de macaque ou humaine. L'extraction des ARN est réalisée à l'aide du kit *RNAeasy Plus micro* (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. 300 µl de tampon de lyse RLT est ajouté à chaque tube eppendorf dans lequel ont été collectées les différentes parties de la rétine lors de la dissection. Les tissus sont homogénéisés à l'aide du polytron Kimemática PT2100. Une centrifugation est réalisée durant 2 min à 13 000 rotations par minute (rpm). Le lysat est récupéré et filtré à travers une colonne gDNA eliminator par centrifugation de 2 min à 13 000 rpm avant d'être chargé sur une colonne *RNAeasy* mini. Ensuite, trois rinçages sont réalisés, puis les ARN sont élués dans 50 µl de TE (Tris-HCl pH7.5 ; 0.1 mM EDTA). Leurs concentrations sont mesurées à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop® ND-1000 (Labtech).

1.2: AU CHLORURE DE CESIUM

La méthode de purification des ARN repose sur la différence de densité de l'ARN et de l'ADN lors de centrifugation dans un gradient de chlorure de césium. Les ARNs totaux issus de rétines entières de lamproie sont purifiés par gradient de chlorure de césium (Delyfer et al., 2013; Glišin et al., 1974). Chaque rétine est dissociée dans 1,6 ml de guanidine-HCl 6 M et homogénéisée avec le polytron Kimemática PT2100. Après addition de 270 µl d'acétate de potassium 2 M, les rétines sont centrifugées 10 minutes à 5 000 rpm à température ambiante. Au surnageant, 5,3 ml de trishydroxyméthylaminométhane (Tris)-HCl 100 mM pH 8,0; N-lauryl sarcosine 1% et 3,2 g de chlorure de césium (CsCl₂) sont ajoutés. Il est transféré dans un tube adapté au

rotor SW41 Ti (Beckman Coulter) contenant 1,8 ml de CsCl₂/ acide éthylène diamine tétracétique (EDTA). Une ultracentrifugation Optima LE80k, (Beckman Coulter) à 32 000 rpm, 24 h à 20°C est réalisée et le culot est dissout dans Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; EDTA 1 mM; sodium dodécyl sulfate (SDS) 0,1% et Tris-HCl 10 mM pH 7,5; EDTA 1 mM. L'ARN est précipité par de l'éthanol et le culot est repris dans de l'eau traitée au diethylpyrocarbonate (DEPC). L'intégrité de l'ARN est contrôlée par gel d'électrophorèse dénaturant.

2: CONTROLE QUALITE DES ARN

L'intégrité des ARN est contrôlée à l'aide d'un Bioanalyzer (Bioanalyzer 2100, Agilent). Ce système de puce permet de visualiser, quantifier et vérifier l'intégrité des ARN totaux. Les ARN subissent une première étape de dénaturation à 70°C pendant 2 min et sont immédiatement placés dans de la glace. La puce est composée de 13 puits, 12 pour les échantillons et 1 pour le marqueur de poids moléculaire. Le gel filtré, mélangé à un intercalant fluorescent et spécifique de l'ARN (dye) est chargé dans la puce. Celui-ci diffuse de façon homogène dans chaque puits et remplit les micro réseaux des différents puits de manière uniforme. Ensuite, chaque puits de la puce est chargé d'un marqueur (lui sert de référence pour aligner chaque électrophorégramme produit) et des échantillons ARN à analyser. À ce stade, la puce est vortexée à 2 400 rpm au Bioanalyzer Chip Vortexer (IKA MS 3) et placée dans le Bioanalyzer pour lecture. Les puits sont analysés 1 par 1 en commençant par le puits des marqueurs de poids moléculaire. Les ARN vont migrer à travers un gel en fonction de leur taille. Lors de leur passage dans le gel, les molécules d'ARN vont se lier spécifiquement aux particules du colorant. En fin de migration, les molécules d'ARN excitées émettent un rayonnement qui permet à l'appareil de mesurer, en temps réel, l'intensité de la fluorescence émise en fonction du temps de rétention de l'échantillon, au sein du micro-réseau. Un profil électrophorétique est ainsi créé. L'ARN est considéré comme intact quand 2 bandes nettes correspondantes aux sous-unités ribosomales 28 Svedberg (S) et 18S sont visualisables lorsque le coefficient d'intégrité de l'ARN ou *RNA integrity number* (RIN) est proche de 10.

3 : TRANSCRIPTION REVERSE

La synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) est réalisée à l'aide d'une reverse transcriptase (ADN polymérase-ARN dépendante) *Superscript™ II RNase H Reverse Transcriptase* (Invitrogen) et d'un hexamère de séquence aléatoire *Random Primers* (Promega), et à partir de 1 µg d'ARN. L'ADNc est purifié par du phénol-chloroforme (25:24:1, v/v), précipité à l'éthanol et dissout dans 50 µl Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM. Un contrôle négatif de reverse transcription est réalisé avec de l'eau en place de l'ARN et un autre sans reverse transcriptase.

4: POLYMERASE CHAIN REACTION EN TEMPS REEL OU PCR QUANTITATIVE (Q-PCR)

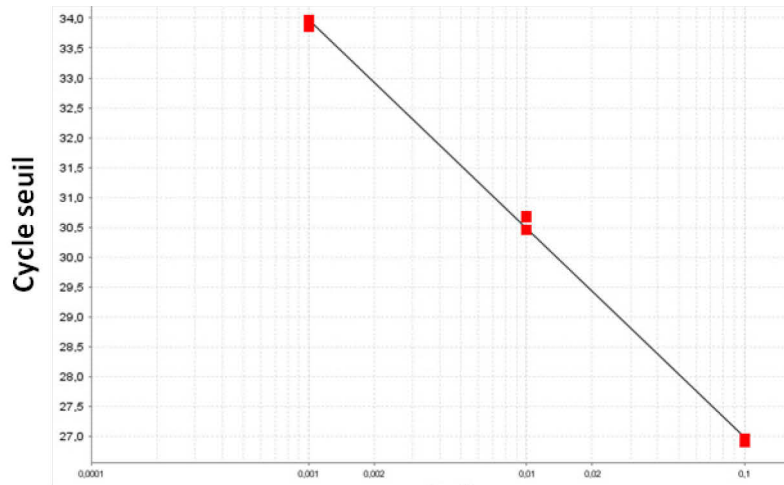
4.1: ETUDE DE L'EFFICACITE DES OLIGONUCLEOTIDES EN PCR QUANTITATIVE

Les séquences des amorces oligonucléotidiques spécifiques (**Table 3**) ont été conçues grâce au logiciel Primer3-Input (<http://primer3.ut.ee/>) et synthétisées chez le fournisseur commercial Life Technologies. Trois dilutions séquentielles d'ADNc de de tissu à analyser ont été réalisées et déposées en triplicat sur une plaque 96 puits (qPCR 96-well plate, Roche), ainsi qu'un contrôle négatif (sans ADNc). Dix µl du réactif (qPCR MasterMix) contenant l'ADN polymérase (Taq DNA polymerase, Roche) et le fluorophore SYBR Green (un intercalant de l'ADN), ainsi que 4 µM d'amorce sens et 4 µM d'amorce antisens sont déposés dans une plaque 96 puits. Huit µl de l'échantillon ADNc dilué sont ajoutés à cette solution. La plaque est recouverte d'un film transparent et centrifugée durant 1 min à 900 rpm. L'amplification et la lecture de la fluorescence sont réalisées sur un thermocycleur (*7500 real time PCR System*, Applied Biosystems). Les cycles de PCR consistent en une première dénaturation de l'ADN polymérase pendant 5 min à 95°C. Puis 40 cycles de : dénaturation de l'ADN

pendant 15 sec à 95°C suivie de l'appariement des amorces 20 sec à 60°C et enfin de la synthèse du brin complémentaire 40 sec à 72°C. Cette réaction se termine alors par une dénaturation de l'ADN 1 min à 95°C, suivie d'une renaturation de l'ADN 30 sec à 55°C et une autre dénaturation de l'ADN 30 sec à 95°C. La lecture de la fluorescence s'effectue à la fin de chaque étape d'appariement. L'efficacité des amorces est déterminée par le logiciel 7500 system associée au thermocycleur. L'efficacité d'un couple mesurée expérimentalement doit être comprise entre 95 et 105% pour valider (Fig. 37).

a

Cible: short *Nxn1* de lamproie; R^2 : 0.998 efficacité: 93.1%



b

Cible: long *Nxn1* de lamproie; R^2 : 0.984 efficacité: 104.7%

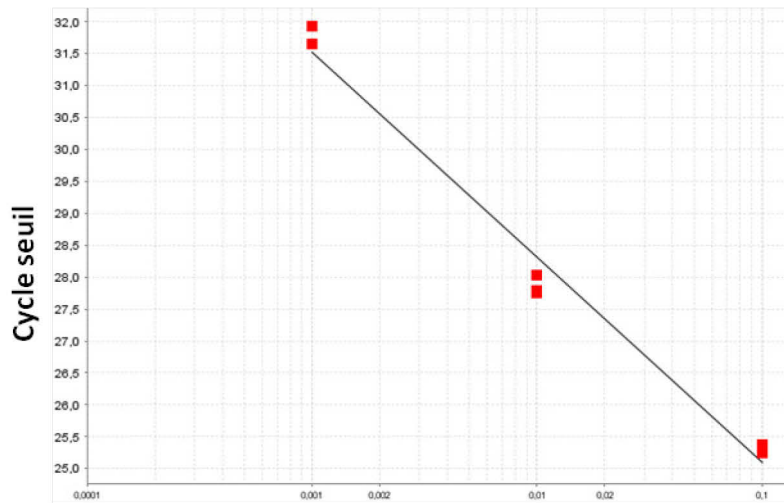


Figure 37: Exemple de courbe d'efficacité de primers validées. a) Des amorces qui amplifient l'isoforme short *Nxn1* de lamproie. **b)** Des amorces qui amplifient l'isoforme long *Nxn1* de lamproie.

4.2: QUANTIFICATION RELATIVE DES ARN MESSAGER

La mesure de l'expression de gènes par RT-PCR quantitative (qPCR) nécessite l'utilisation d'un gène dont l'expression ne varie pas ou très peu. Pour cela, le gène codant pour l'actine, protéine du cytosquelette quasi ubiquitaire et très conservée au cours de l'évolution, ou le gène qui code pour la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), qui est une enzyme ubiquitaire catalysant la sixième étape de la glycolyse, seront utilisés dans mes travaux.

5: WHOLE MOUNT HYBRIDATION *IN SITU*

Dix hydres non nourries depuis au moins 48 h sont utilisées pour chaque condition (sens, antisens et sans sonde) et sont rincées plusieurs fois avec du hydra medium (HM) composé d'eau ultra pure et d'un mélange de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, de MgCl_2 , de KNO_3 , de NaHCO_3 et de MgSO_4 à 1M chacun. Les hydres sont relaxées dans de l'uréthane 2% puis fixées avec du paraformaldehyde (PAF) 4% toute la nuit à 4°C. Le PAF est remplacé par de l'éthanol (100%) pendant 10 min. Les hydres sont perméabilisées à l'aide de la protéinase K à 10 µg/ml à température ambiante pendant 2 min. Arrêter l'activité de la protéinase K en rinçant les hydres avec de la glycine à 4 mg/ml dans du PBS (Phosphate Buffer Saline)-Tween-20 0,1% (PBT) pendant 10 min. Laver les hydres avec du triethanolamine 0,1 M pendant 5 min pour réduire le bruit de fond en les rinçant deux fois avec du PBT pendant 5 min. Transférer les hydres dans un tube de 1,5 ml et les chauffer à 80°C pendant 30 minutes. Laver les hydres dans un mélange 1/1 PBT: tampon d'hybridation (formamide 50%, SSC 5X, yeast tRNA 0.02%, CHAPS 0.1%, Denhardt's solution 1X, Tween-20 0.1%, heparin-100 mg/ml et yeast tRNA-200 mg/ml) pendant 10 min, puis les rincer dans le tampon d'hybridation pendant 10 min et incuber 2 heures. Remplacer le tampon d'hybridation par 100 µl de tampon d'hybridation qui contient 5 µl des sondes à tester et incuber 3 jours. Toutes les 5 minutes, rincer avec 100% de tampon d'hybridation, puis 75% de tampon d'hybridation et 25% 2X SSC, puis 50% de tampon d'hybridation et 50% 2X SSC, puis 25% de

tampon d'hybridation et 75% 2X SSC. Rincer avec SSC 2X; CHAPS 0,1% pendant 30 minutes puis deux fois avec tampon d'acide maléique (MAB) pendant 10 minutes à température ambiante. Rincer les hydres avec du MAB; SAB (Sérum Albumine Bovine) 1% (MAB-B) pendant 1 heure à température ambiante. Changer cette solution par la solution de blocking MAB-B auquel est ajouté du sérum de mouton 20% et incubé pendant 2 h à 4°C. Remplacer la solution de blocking par l'anticorps anti-digoxigenin couplé à l'alcaline phosphatase et incubé les hydres toute la nuit à 4°C. Rincer 8 fois avec du MAB pendant 1 h à température ambiante puis incubé les hydres dans cette solution toute la nuit à 4°C. Rincer les hydres 2 fois pendant 5 min à température ambiante avec du NTMT (NaCl 100 mM; Tris-HCl 100 mM, pH 9,5, MgCl₂ 50 mM ; Tween-20 0,1%) puis les rincer pendant 5 minutes avec du NTMT; levamisole 1 M, puis les incubé avec 0,5 ml NBT (Nitrobleu tétrazolium) (18,75 mg/ml) +3,5µl BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) (9,4 mg/ml) par ml de NTMT; levamisole 1 mM dans le noir sous agitation. Surveiller la montée du signal et arrêter la réaction avec du NTMT pendant 10 minutes à température ambiante.

6 : IMMUNOEMPREINTE (*WESTERN BLOTTING*)

La technique d'immunoempreinte, plus communément appelée *western blotting* permet de mettre en évidence l'expression d'une protéine dans un extrait cellulaire après migration grâce à l'utilisation d'anticorps. Pour chaque extrait cellulaire sont ajoutés 200 µl de tampon de lyse [Tris-HCl 50 mM; EDTA 10 mM; dithiothreitol (DTT) 1 µM], puis 15 µl d'inhibiteurs de protéases 100 X, 150 µl de Triton X-100 10% et 75 µl de tosyl Lys chloromethyl ketone (TLCK) 1 mg/µl. Les échantillons sont homogénéisés et centrifugés 5 minutes à 14 000 rpm. La concentration en masse de protéine est évaluée par la méthode de Bradford. Quarante µg de protéines sont séparés sur gel de polyacrylamide NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris (Invitrogen), dans un tampon NuPAGE® MES SDS *Running Buffer* (Invitrogen) à 180 V, puis transférés sur une membrane de nitrocellulose 0,2 µm (GE Healthcare) à l'aide d'un tampon Tris-base 25 mM; Glycine 200 mM; éthanol 20%, 2 h à 60 V. Les sites non spécifiques sont saturés dans une solution de tampon phosphate salin (PBS)-*Blocker* 5%; Tween-20

0,05%, 1 h, puis la membrane est incubée en présence des anticorps primaires dans une solution PBS-Blocker 3% Tween-20 0,05%, pendant 3 heures à température ambiante (ou toute la nuit à +4°C). Après 3 lavages d'une durée de 15 minutes avec une solution PBS-Tween-20 0,05%, la membrane est de nouveau incubée 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire dans une solution PBS-Blocker 3%; Tween-20 0,05%. La révélation est réalisée par le kit *ECL Plus™ Western Blotting Detection Systems* (GE Healthcare). Les poids moléculaires des protéines sont estimés à l'aide du standard de poids moléculaire *Kaleidoscope Polypeptide Standards* (Bio-rad).

7: TEST DE LIAISON PAR LES PROTEINES DE FUSION PHOSPHATASE ALCALINE

7.1: PRODUCTION DE SURNAGEANTS ENRICHIS EN PROTEINE DE FUSION

Les protéines utilisées pour les tests de liaison reposant sur les fusions avec la phosphatase alcaline ont été produites par transfection transitoire. Des cellules *Human Embryonic Kidney 293* (HEK, Grip Tite™ 293 MSR, Invitrogen) sont ensemencées dans des boîtes de Petri de 10 cm de diamètre en milieu complet *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM)-gentamicine 10 µg/ml de sérum de veau fœtal (SVF) 10%, de manière à ce que les cellules soient entre 90-95% de confluence le lendemain. Le milieu est remplacé par du milieu DMEM-SVF 10%. Vingt-quatre µg d'ADN plasmidique sont mélangés à du milieu Opti-MEM® (Invitrogen) dans un volume final de 750 µl. Soixante µl de Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) sont mélangés à du milieu Opti-MEM® dans un volume final de 750 µl et incubés 5 minutes à température ambiante. L'ADN plasmidique et la Lipofectamine™ 2000 sont mélangés et incubés 20 minutes à température ambiante. Le volume réactionnel final de 1,5 ml est ajouté goutte à goutte aux cellules qui sont par la suite incubées 48 h à 37°C sous 5% de CO₂. Dix µl d'héparine à 10 µl/ml sont ajoutés au milieu de culture cellulaire, puis les cellules sont

incubées 30 minutes à 37°C. Les surnageants sont récoltés, concentrés 10 fois à l'aide du dispositif d'ultrafiltration Amicon Ultra-15, 5 kD, par des centrifugations successives de 15 minutes à 5 100 rpm.

7.2: TEST PHOSPHATASE ALCALINE

L'activité des protéines de fusion phosphatase alcaline a été mesurée par un test enzymatique. Cent µl de chaque surnageant concentré à tester sont incubés 20 minutes à 65°C (inactivation des phosphatases alcalines endogènes). 500 µl de substrat AP 1X [diéthanolamine 1 M; MgCl₂ 0,5 mM; L-Homoarginine 10 mM; SAB 0,5 mg/ml; p-nitrophenyl phosphate (PNPP) 12 mM] sont ensuite ajoutés. La réaction est incubée à température ambiante ou à 37°C pendant 1 à 2 h. L'activité phosphatase alcaline est quantifiée par colorimétrie au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 405 nm.

7.3: TEST DE L'INTERACTION ENTRE LES PROTEINES DE FUSION ET LEURS RECEPTEURS

Le test de liaison repose sur l'immobilisation de la protéine de fusion phosphatase alcaline à la surface des cellules présentant un site de liaison. Des cellules COS-1 (cellules de rein de singe vert) sontensemencées dans des plaques de 12 puits à raison de $1,5 \times 10^5$ cellules par ml dans du milieu DMEM-SVF 10%. Pour chaque puits, une quantité d'ADN plasmidique de 1,6 µg est mélangée à du milieu Opti-MEM® (Invitrogen) dans un volume final de 100 µl. Deux µl de Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) sont mélangés à du milieu Opti-MEM® dans un volume final de 50 µl et incubés 5 minutes à température ambiante. Le tube d'ADN plasmidique et celui de la Lipofectamine™ 2000 sont mélangés et incubés 20 minutes à température ambiante. Le volume réactionnel final de 150 µl est ajouté goutte à goutte aux cellules qui sont par la suite incubées à 37°C sous 5% de CO₂. Le milieu est remplacé au bout de 5 heures par du milieu DMEM-SVF 10%, et les cellules sont incubées à 37°C sous 5% de CO₂, 48 h.

Les cellules sont lavées avec du *Hanks' Balanced Salt Solution* (HBSS) (avec rouge de phénol, sans MgCl₂ et sans CaCl₂); SAB 0,5 mg/ml; 20 mM [4-2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), pH 7,0]. Elles sont incubées 90 minutes à température ambiante avec les surnageants dilués au 1/20^{ème} et HEPES 20 mM (pH 7,0). Les cellules sont lavées délicatement 5 fois avec du HBSS-SAB 0,5 mg/ml; HEPES 20 mM (pH 7,0), 10 minutes, puis elles sont fixées 30 secondes puits par puits, à l'aide d'acétone 60%; paraformaldehyde (PFA) 3%; HEPES 20 mM (pH 7,0). Les cellules sont lavées avec HBSS-NaCl 150 mM; HEPES 20 mM (pH 7,0), 2 fois, 5 à 10 minutes. Afin d'inactiver les phosphatases endogènes, les cellules sont chauffées 20 minutes à 65°C dans le tampon précédent. Les cellules sont rincées avec du HBSS-Tris-HCl 100 mM (pH 9,5); NaCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM. La révélation se fait à l'aide du milieu HBSS-NaCl 150 mM; HEPES 20 mM (pH 7,0); L-homoarginine 10 mM; BCIP 0,17 mg/ml; NBT 0,33 mg/ml, à l'abri de la lumière. La réaction est stoppée avec du PBS 1 X ; EDTA 500 mM.

8: IMPLICATION D'UN PHENOMENE DE TRANSLECTURE

8.1: TRANSFECTION DES CELLULES HEK293

Les cellules HEK293 sont maintenues en culture dans le milieu DMEM supplémenté avec 4 mM L-Glutamine, 10 % de sérum de veau foetal (SVF, Life Technologies) et 500 µg/ml de Geneticin (antibiotique) à 37°C avec 5% CO₂. Un jour avant la transfection, les cellules sont trypsinées etensemencées à 6,25 x 10⁵ cm². Le milieu de culture est remplacé une heure avant la transfection, réalisée à l'aide de la Lipofectamine 2000 (Life Technologies) selon les indications du fournisseur. Lors de chaque transfection, l'ADN est mélangé au milieu OptiMEM (Life Technologies) et à la Lipofectamine préalablement incubée 30 min à température ambiante. Le mélange réactionnel de transfection est ajouté aux cellules qui sont incubées à 37°C avec 5% CO₂. Le milieu est changé 24 h plus tard et les cellules sont récupérées 48 h plus tard.

8.2 : DEGLYCOLYSATION DES PROTEINES

Le kit Protein Deglycosylation Mix (Biolabs) est utilisé. Cent µg de protéine sont dilués dans l'eau pour obtenir un volume final de 18 µl. Deux µl de Buffer *Glycoprotéine Denaturing* sont ajoutés puis les protéines sont dénaturées 10 minutes à 100°C. Cinq µl de 10X *GlycoBuffer 2* avec 5 µl NP40 (Nonidet-P 40) 10% et 15 µl d'eau. Cinq µl de *déglycosylation Enzyme Cocktail* sont ajoutés. La solution protéique est incubée 4 heures à 37°C.

8.3 : EFFET DE L'AMINOGLYCOSIDE PTC-124 OU ATALUREN

Après la transfection des cellules HEK293, lorsque le milieu est changé 24 h plus tard, différentes concentrations de PTC-124 (Cellagen Technology) sont ajoutées. Cette expérience est inspirée des travaux de Lentini *et al* publiés en 2014. (Lentini et al., 2014)

8.4: MIS EN PLACE DE MUTATIONS POUR INFLUENCER LA TRANSLECTURE

8.4.1: CLONAGE: TRANSFORMATION, PRECULTURE, SELECTION DES CLONES POSITIFS ET PURIFICATION DE L'ADN PLASMIDIQUE

Les clonages ont été effectués afin d'introduire une séquence d'ADN étudiée en vue de sa production via un vecteur plasmidique. Les différents plasmides construits sont transformés dans des bactéries XL10-Gold[®] *ultracompetent cells* (Stratagene, génotype: Tetr Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1

gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr) par choc thermique. Elles sont incubées à 37°C entre 1 et 2 heures puis sont étalées sur des boîtes Luria-Bertani (LB) agar contenant l'antibiotique de résistance du plasmide et incubées toute la nuit à 37°C. Les précultures plasmidiques sont réalisées dans des plaques 48 puits QiaWell (Qiagen) et les plasmides sont extraits automatiquement par le Biorobot 8 000 (Qiagen) à l'aide du QIAprep 96 *Turbo Miniprep Kit* (Qiagen). Les clones positifs issus des clonages sont sélectionnés à l'aide d'enzymes de restriction (Promega ou New England Biolabs). Pour extraire les plasmides, une purification de l'ADN plasmidique est réalisée à l'aide du *HiSpeed Plasmid Maxi Kit* (Qiagen). Le titre des solutions plasmidiques est déterminé à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop® ND-1000 (Labtech).

8.4.2: SEQUENÇAGE

Le séquençage de l'ADN repose sur la méthode des terminateurs d'élongation développée par Sanger. Les réactions de séquençage sont réalisées par la plateforme de séquençage de l'Institut de la vision. En fonction des séquences à analyser, différentes amorces sont sélectionnées (Sanger et al., 1977).

8.5: MODELISATION DU NRE

Le logiciel RNAfold web server est utilisé afin de prédire les structures secondaires des brins simples d'ARN. <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>. Le logiciel The mfold Web Server est utilisé pour établir la force et la stabilité des structures secondaires des brins simples d'ARN <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>

8.6: RADIO-MARQUAGE AU SELENIUM 75

Après la transfection des cellules HEK293, 24 h plus tard le milieu est changé et est remplacé par un nouveau milieu contenant du sélénium 75 radioactif à une concentration final de 1 $\mu\text{Ci/ml}$.

8.7: IMMUNOPRECIPITATION

Pour équilibrer les billes Dynabeads® M-280 *Sheep Anti-Rabbit IgG* (ThermoFisher), 125 μl de chaque échantillon sont ajoutés à 20 μl de bille. Le volume est complété jusque 500 μl avec du PBS et incubé pendant 1 heure sous rotation à température ambiante. Le surnageant est retiré après l'avoir séparé des billes à l'aide d'un aimant. Pour fixer l'anticorps sur les billes, 3 μl d'anticorps dilué au 3/10^{ème} sont ajoutés aux billes préalablement équilibrées qui sont incubées pendant 30 minutes sous rotation à température ambiante. Le surnageant est retiré après l'avoir séparé des billes ayant fixées l'anticorps à l'aide d'un aimant et les billes sont rincées 3 fois avec 500 μl de PBS. Ajouter 300 μl de chaque lysat protéique aux billes et incuber tout la nuit sous rotation à température ambiante. Le surnageant est retiré après l'avoir séparé des billes ayant fixées l'anticorps et l'antigène à l'aide d'un aimant et les billes sont rincées 3 fois avec 500 μl de PBS. Ajouter directement sur les billes 20 μl de tampon de charge et chauffer 10 minutes à 95°C avant de charger les échantillons sur le gel d'électrophorèse.

9: LES MECANISMES MOLECULAIRES DE L'ÉPISSAGE DU GENE *NXNL1*

9.1: DISSECTION DE LA RETINE DE MACAQUE

Il est préférable d'utiliser une loupe binoculaire. Les globes oculaires de macaque sont placés dans une boîte de Petri avec du PBS pour que la rétine ne sèche pas. Ils sont ensuite lavés deux fois dans une solution de lavage et une fois dans du milieu CO₂ indépendant (ThermoFisher). Un des globes est percé à l'aide d'une aiguille pour découper et retirer la cornée à l'aide d'une paire de ciseaux et de pinces. La choroïde est alors retirée et la sclère délicatement détachée du nerf optique à l'aide d'une paire de ciseaux. L' EPR et le vitré sont détachés progressivement de la rétine par petites coupures pour ne pas l'endommager ou la déchirer. À ce stade, la rétine a conservé sa forme incurvée et doit être mise à plat. Mais avant cela, l'humeur vitrée, qui a la consistance d'une gelée, doit être retirée en une pièce. Pour mettre à plat la rétine, plusieurs coupures radiales sont réalisées à l'aide d'une lame de scalpel.

9.2 : INVESTIGATION DES REGIONS INTRONIQUES IMPLIQUEES DANS L'ÉPISSAGE ALTERNATIF DE *NXNL1*

9.2.1: PRODUCTION DE PARTICULES VIRALES AAV

Des cellules humaines HEK293 adhérentes sont mises en culture dans des boîtes de 15 cm jusqu'à atteindre 90% de confluence. À ce stade, elles sont co-transfectées par 30 µg du plasmide vecteur AAV qui code pour le transgene, 50 µg du plasmide AAV/2 et 60 µg de plasmide pHelper à l'aide de la polyéthylèneimine (PEI) (Polysciences). Deux boîtes sont produites par virus. 4 à 6 h plus tard le milieu de culture est remplacé par du DMEM supplémenté avec 10% de SVF. 72 h plus tard, les cellules et le surnageant sont récupérés. Les cellules sont lysées et subissent 3 cycles

de congélation/décongélation à l'aide d'éthanol placé dans de la carboglace et un bain marie à 37°C en vortexant avant chaque étape de congélation. Ajouter 20 mg/ml de DNaseI (Roche), and 1 M de MgCl₂, mélanger et incubé à 37°C pendant 30 min. Précipiter le culot cellulaire à 3 700 g pendant 20 minutes à 4°C. Récupérer le lysat. Ajouter une solution de PEG (polyethylene glycol) 1X au surnageant et incubé 2 heures à 4°C. Précipiter le culot cellulaire à 3 700 g pendant 20 minutes à 4°C. Récupérer le lysat. Regrouper les lysats et purifier les virus sur des gradients de 15%, 25%, 40% et 60 % d'iodixanol par ultracentrifugation 1h30 à 59 000 rpm et à 20°C. Les virus sont concentrés à l'aide Amicon Ultra-15, 5 kDa (Millipore) par des centrifugations successives de 15 minutes à 5 100 rpm.

9.2.2: FOND D'ŒIL DES SOURIS SAUVAGES C57BL/6J

De manière à vérifier l'expression de la GFP présente dans nos constructions plasmidiques utilisées pour produire les particules virales injectées à *PN30*, nous utilisons le microscope Phoenix micron III retinal imaging.

9.3 : LES FACTEURS IMPLIQUES DANS L'ÉPISSAGE ALTERNATIF DE *NXNL1*

9.3.1 : PRÉPARER LA SONDE ARN NRE OU NRE *SHUFFLE* FLUORESCENTE

Chaque sonde fluorescente est préparée à 250 nM dans 200 µl de tampon ARN: 2 mM MgCl₂; 2 mg/ml SAB; 10 µg/ml ssDNA (sperme de hareng) dans 1X PBS.

9.3.2: TEST D'HYBRIDATION DE LA SONDE ARN NRE ET NRE SHUFFLE FLUORESCENTE SUR LA PUCE HUProt™ HUMAN PROTEOME MICROARRAY

Pour l'essai impliquant la puce HuProt™ Human Proteome Microarray, toutes les réactions ont lieu dans un environnement très froid et sec, la puce est conservée à -80°C et ensuite placée sur glace le temps de l'expérience. Chaque puce est placée dans un puits d'une plaque de 4 puits Nunc™ Rectangular Dishes (ThermoFisher). 3 ml de solution de blocking 2% SAB/TBS-T (Tris pH 7.5 and 0,1% Tween-20) est ajouté par puits. Les puces sont incubées dans cette solution à température ambiante pendant 2 heures sous agitation douce. Les puces sont ensuite retirées des puits, tapotées sur du papier absorbant afin de retirer l'excédant de la solution de blocking et placées dans une chambre humide afin d'éviter tout évaporation. Les sondes NRE et NRE *Shuffle* sont déposées sur la surface des puces, puis ces dernières sont recouvertes d'une lame en verre et la chambre humide est recouverte d'un papier d'aluminium afin de limiter l'exposition à la lumière. Le tout est mis sous agitation 1 h à température ambiante. Changer la solution d'incubation par 4 ml de PBS-Tween-20 1/1000 et répéter cette étape de rinçage 3 fois. Ajouter 4 ml de cette solution de rinçage et incuber 10 minutes. Cette dernière étape de rinçage est répétée une deuxième fois. Rincer 4 fois la puce avec de l'eau déminéralisée. Retirer l'eau et sécher la puce en la tapotant sur du papier absorbant puis en la centrifugeant 3 minutes à 800 rpm. La puce est scannée et analysée par The GenePix® 4000B Microarray Scanner.

9.3.3: IMMUNOMARQUAGE

Les coupes de rétine sont perméabilisées à l'aide d'un tampon PBS 1X ; TritonX-100 0,1%, pendant 5 minutes. Les coupes sont lavées une fois avec du PBS 1X. Les sites non spécifiques sont saturés à l'aide du tampon PBS1X ; SAB 1% ; Tween-20 0,1% pendant 15 minutes. Les coupes sont incubées en présence de l'anticorps primaire dans le tampon de saturation pendant 2 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière, puis lavées 3 fois avec du PBS 1X et incubées avec les anticorps secondaires

dans le tampon de saturation 1 heure à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les coupes sont lavées 3 fois avec PBS 1X puis sont incubée en présence du DAPI 5 à 10 minutes. Elles sont lavées 3 fois avec PBS 1X. La lame est montée avec du Fluoromount-G (CliniSciences).

RESULTATS

PARTIE N°1

Les animaux capturent l'information lumineuse via le pigment opsine qui est un récepteur couplée à une protéine G. Parce que les pigments des cônes sont apparus plus tôt que ceux des bâtonnets, la communauté scientifique s'accorde à ce que les photorécepteurs à cônes soient les ancêtres des photorécepteurs à bâtonnets. De plus, il n'existe aucune preuve de la présence des bâtonnets avant l'apparition de la famille des agnathes. Chez les vertébrés, y compris les mammifères, les bâtonnets utilisent 5 fois moins d'ATP pour leur fonctionnement que les cônes suggérant que l'apparition des bâtonnets au cours de l'évolution et donc l'apparition de rétine duplexe a permis une réduction considérable de la consommation d'énergie par la rétine (Fain et al., 2010). Est-ce que l'épissage alternatif du gène *Nxn11* qui chez la souris a lieu uniquement dans les bâtonnets est apparu avec ces derniers, permettant ainsi au gène *Nxn11* d'acquérir une nouvelle fonction par l'expression du facteur trophique RdCVF? Ou est-ce que la rétention de l'intron de *Nxn11* a précédé cet événement ? Afin d'amener un élément de réponse à cette question, nous avons étudié l'expression de *Nxn11* chez deux modèles animaux informatifs. Le premier choisi est *Hydra vulgaris* qui un animal ancien d'environ 600 millions d'années appartenant à la famille des cnidaires et qui a la particularité de ne pas posséder d'organe visuel de type œil mais d'être tout de même sensible à la lumière. Le deuxième modèle que nous avons sélectionné pour cette étude est la lamproie qui est un vertébré sans mâchoire apparu il y a environ 450 millions d'années. La lamproie appartient à la famille des agnathes et est connue pour être la première famille animale encore existant avec une rétine possédant des photorécepteurs de type bâtonnets en plus des cônes.

1: ÉTUDE DE L'EXPRESSION DE *NXNLI* CHEZ L'HYDRE

1.1: HYDRA VULGARIS EXPRIME DEUX GENES ANCESTRAUX DE *NXNLI*

Le cnidaire *Hydra vulgaris* est le premier métazoaire à posséder un système nerveux. Cette caractéristique rend très intéressant l'utilisation d'*Hydra vulgaris* comme outil d'investigation de mécanismes physiologiques appartenant à d'autres espèces. Il s'agit d'un modèle d'étude favorisé notamment par sa remarquable capacité de régénération, par la simple architecture de son corps et le peu de cellules qu'il possède. La plupart des métazoaires possède un système de photorécepteur extra-oculaire avec des photo-pigments sensibles à la lumière mais non localisés dans une rétine. Chez l'hydre, seul un système de photoréception qui n'est ni lié aux cônes, ni aux bâtonnets, mais localisé dans son système nerveux est présent. En effet, elle possède des cellules photosensibles extraoculaires qui n'ont pas de fonction de formation d'images visuelles mais qui peuvent être impliquées dans le comportement de l'animal tel que la locomotion, le déplacement ou la reproduction. Seize espèces d'hydre sont répertoriées dans la base de données le NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=6083>) (**Fig. 38**) dont *Hydra vulgaris* que l'on appelle également *Hydra attenuata* ou *Hydra magnipapillata*.

Hydra canadensis
Hydra carnea
Hydra circumcincta
Hydra hymanae
Hydra japonica
Hydra littoralis
Hydra oilgactis
Hydra oxycnida
Hydra polymorphus
Hydra robusta
Hydra shenzhensis
Hydra sinensis
Hydra utahensis
Hydra viridissima
Hydra vulgaris
Hydra zhujiangensis

Figure 38: Les différentes espèces d'hydre recensées dans NCBI.

C'est en se basant sur la littérature scientifique que le NCBI a établi la classification et la nomenclature des taxons des espèces répertoriés. Le corps de l'hydre est composé d'un long tube communément appelé polype formé d'un pied qui lui permet de s'ancrer à une surface avec à l'extrémité opposée une seule ouverture qui forme la bouche entourée de tentacules (**Fig. 39**).



Figure 39: Photographie représentant *Hydra vulgaris*

Le polype de l'hydre est composé de deux couches épithéliales, une couche ectoderme externe et une couche endoderme interne (**Fig. 40**).

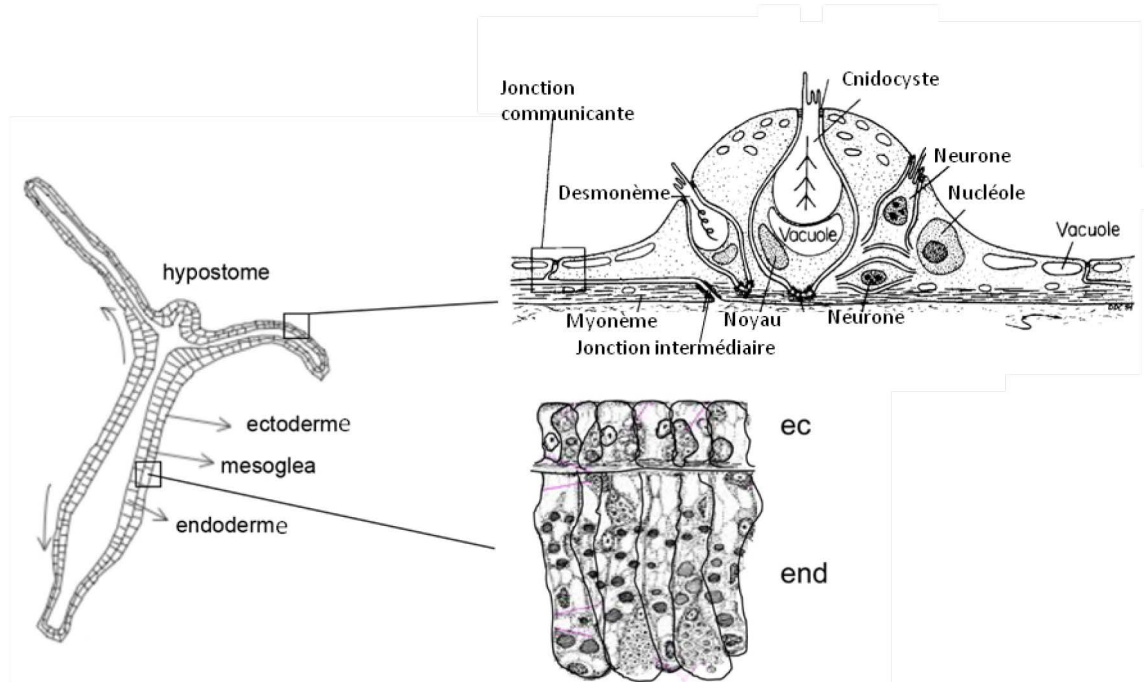


Figure 40: Représentation schématique du corps de l'hydre. ec: ectoderme; end: endoderme .

C'est à l'aide de son desmonème et d'un cnidocyste que l'hydre peut capturer ses proies et se nourrir. Le desmonème est muni d'un filament collant sans épines capable de s'accrocher à une proie, alors que le cnidocyste dont le filament est équipé de stylets perforants peut injecter un venin pour paralyser ou tuer une proie. L'hydre possède également une fibrille contractile contenue dans le cytoplasme de ces cellules appelées le myonème lui permettant de se contracter. L'hydre est un organisme qui fait l'objet de plus en plus d'études et est utilisé en biologie depuis 300 ans. En effet, 2 057 publications sont recensées aujourd'hui sur PubMed dont 933 se rapportent à *Hydra vulgaris* (**Fig. 41**).

*Hydra vulgaris*Synonyme: *Hydra attenuata* ou *hydra magnipapillata*

Entrez records	
Database name	Direct links
Nucleotide	172,028
Nucleotide EST	184,731
Protein	29,293
Structure	15
Genome	1
Popset	16
GEO Datasets	28
UniGene	-
PubMed Central	933
Gene	34,703
SRA Experiments	95
Protein Clusters	-
Bio Project	15
Bio Sample	93
Bio Systems	230
Assembly	2
Taxonomy	1

Figure 41: Informations concernant *Hydra vulgaris* issues de NCBI.

Le génome de l'hydre n'est séquencé que depuis 2010 mais reste incomplètement annoté (Chapman et al., 2010). Même si l'interprétation des données transcriptomiques en l'absence de génome parfaitement annoté reste difficile, le transcriptome est étudié depuis 2013 (Wenger and Galliot, 2013). Le transcriptome de l'hydre est très utile pour comprendre de nombreux phénomènes physiologiques, tels que la régulation de la chromatine, les mécanismes de transcription ou la mort cellulaire de cet organisme. L'équipe de Daniela Evangelista a développé en 2016 un atlas du transcriptome d'*Hydra vulgaris* où sont compilés tous les transcrits de l'hydre accompagnés de

nombreuses informations telles que leurs descriptions fonctionnelles et la description des différents domaines des protéines pour lesquelles ils codent (Evangelista et al., 2016). Nous avons identifié deux gènes *Nxn1* ancestraux chez l'hydre décrits dans le NCBI. Contrairement à *Nxn1* et 2 chez la souris ou l'Homme qui sont localisés sur deux chromosomes différents, ces deux gènes chez l'hydre sont localisés côte à côte en tandem sur l'ADN à la position 150 557 pour le premier et à la position 182 533 pour le deuxième. Ils sont donc localisés sur le même chromosome non numéroté car seuls deux chromosomes ont pour le moment été identifiés chez *Hydra vulgaris*. Le premier gène est annoté « *PREDICTED: Hydra vulgaris probable nucleoredoxin 1* » ou « *probable nucleoredoxin 1* ». Cependant, ce gène code pour une protéine présentant des caractéristiques plus proche d'une *nucleoredoxin-like* (d'environ 100 acides aminés) que d'une *nucleoredoxin* (d'environ 200 acides aminés) et devrait donc être annoté *probable nucleoredoxin-like 1*. Le deuxième gène est annoté « *PREDICTED: Hydra vulgaris nucleoredoxin-like protein 2* » ou « *nucleoredoxin-like 2* » (**Fig. 42**).

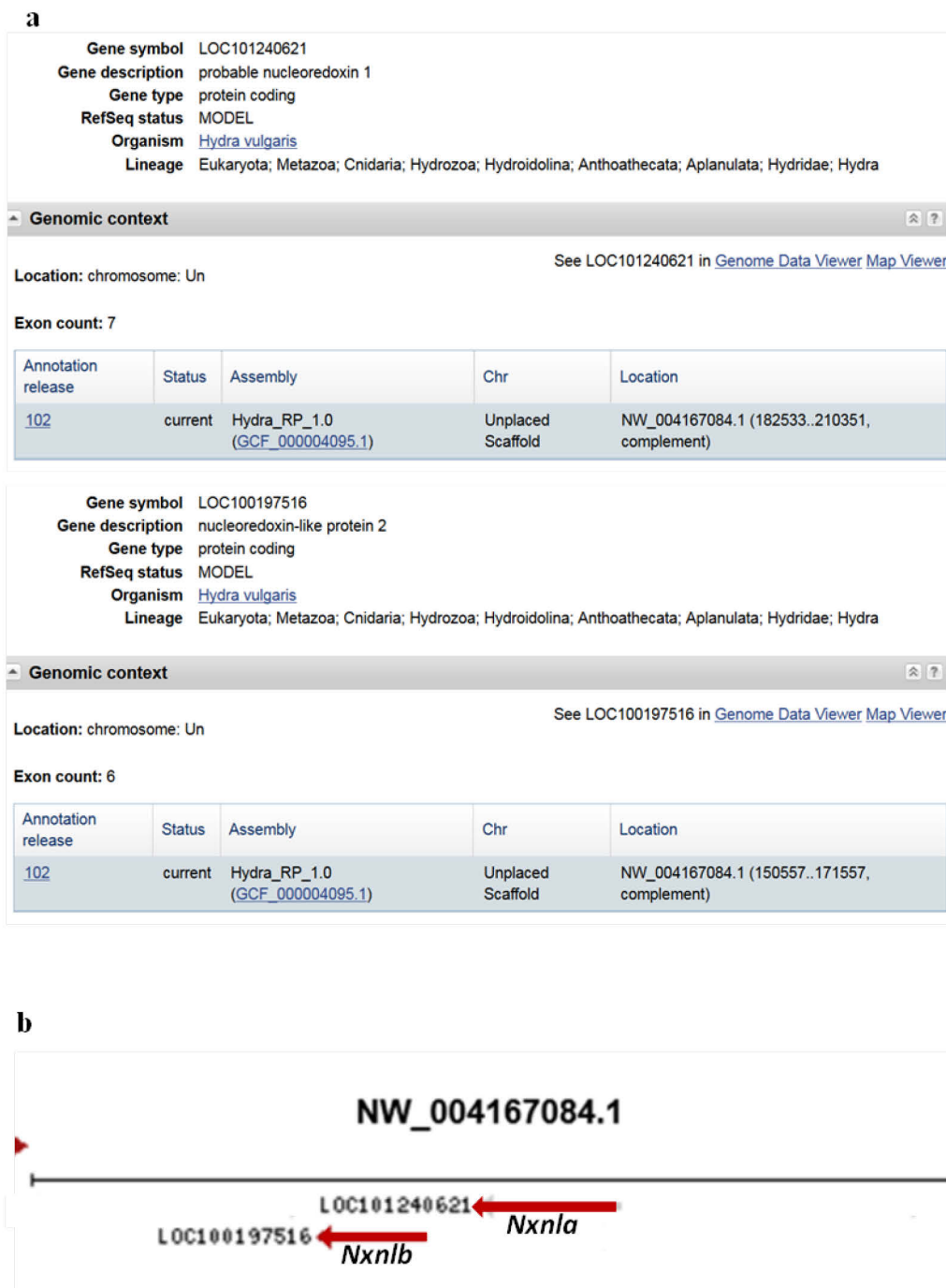


Figure 42: Description des gènes *hydra Nxnla* et *hydra Nxnlb*. a) Informations issues de NCBI. b) Localisation des deux gènes sur le chromosome distant l'un de l'autre d'environ 11 kb.

Afin d'éviter toute confusion entre ces gènes ancestraux de l'hydre et *Nxn1* et son paralogue *Nxn2* présents chez les mammifères, nous avons arbitrairement décidé de

nommer *probable nucleoredoxin-like 1*, *hydra Nxnla* et *nucleoredoxin-like 2*, *hydra Nxnlb*. C'est à l'aide de son outil de prédiction des gènes eucaryotes qui repose sur une combinaison de recherche d'homologie que le NCBI a identifié ces deux gènes dans le génome d'*Hydra vulgaris*. Pour cela, les transcrits et les protéines identifiées qui ont été chargées dans la base de données le 3 juin 2015 ont été alignés. L'alignement des deux séquences *hydra Nxnla* et *hydra Nxnlb* avec les gènes *NXNL1* et *NXNL2* de l'Homme réalisé à l'aide du logiciel jalview (<http://www.jalview.org/>), qui est un logiciel permettant entre autres d'aligner des séquences d'ADN, d'ARN ou de protéines, indique que *hydra Nxnla* et *hydra Nxnlb* sont phylogénétiquement plus proche de *NXNL2* que de *NXNL1* humain (**Fig. 43**).

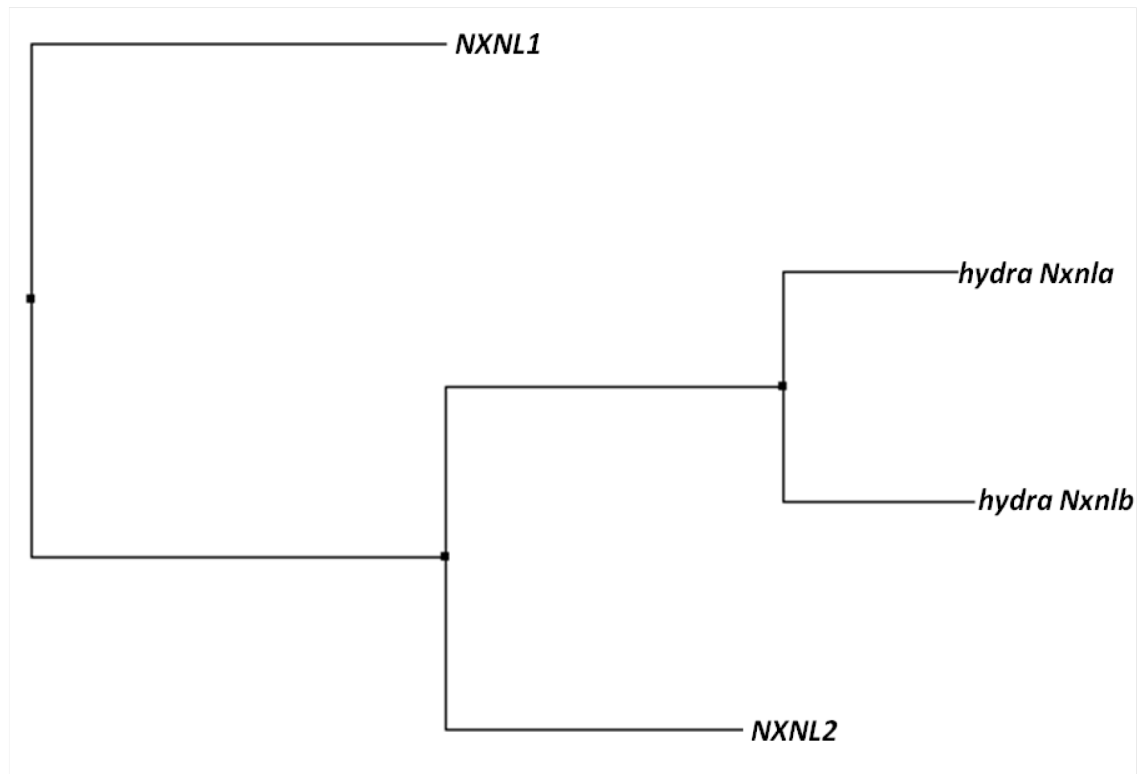


Figure 43: Arbre phylogénétique des gènes *hydra Nxnla*, *hydra Nxnlb*, *NXNL1* et *NXNL2*.

Avec la collaboration de ma stagiaire en master 1 Morgane Lejault, une culture d'hydre a été mise en place au laboratoire afin d'obtenir le matériel biologique nécessaire aux futures expérimentations. Les 120 hydres que nous a envoyées Angela Tino, chercheuse au CNR (*Consiglio Nazionale delle Ricerche*) de Naples, ont été placées immédiatement après leur réception dans un aquarium contenant du milieu hydra medium (HM)

composé d'eau ultra pure et d'un mélange de sels. En parallèle, une culture d'artémies (*Artemia salina*) a été mise en place. *Artemia salina* est un petit invertébré de couleur rose mesurant à l'âge adulte de 8 à 15 mm. Il possède un corps allongé et 10 paires de pattes lui permettant de nager à un rythme soutenu et régulier (**Fig. 44**).

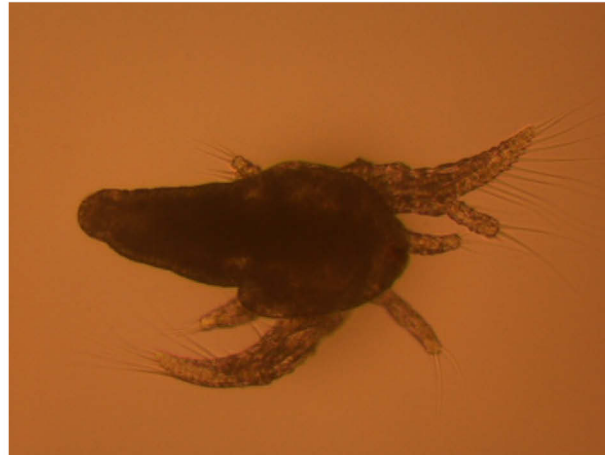


Figure 43: Artémie (*Artemia salina*).

Cette culture consiste à placer dans un éclosoir à température ambiante et à l'abri de la lumière des œufs d'artémies qui peuvent se conserver longtemps. Dans le centre de l'éclosoir un tamis exposé à la lumière est placé. Les artémies matures libérées après éclosion des œufs vont nager vers la lumière et se retrouver au niveau du tamis que l'on récupère avec les artémies adultes piégées à l'intérieur. Le cycle de vie des artémies (naissance, croissance et reproduction) étant très rapide, la culture de ces dernières est relativement simple. La récolte d'artémies est réalisée tous les deux jours, elles sont ensuite rincées une fois avec de l'eau ultra pure et une deuxième fois avec du milieu HM avant d'être données aux hydres pour les nourrir (**Fig. 45**).

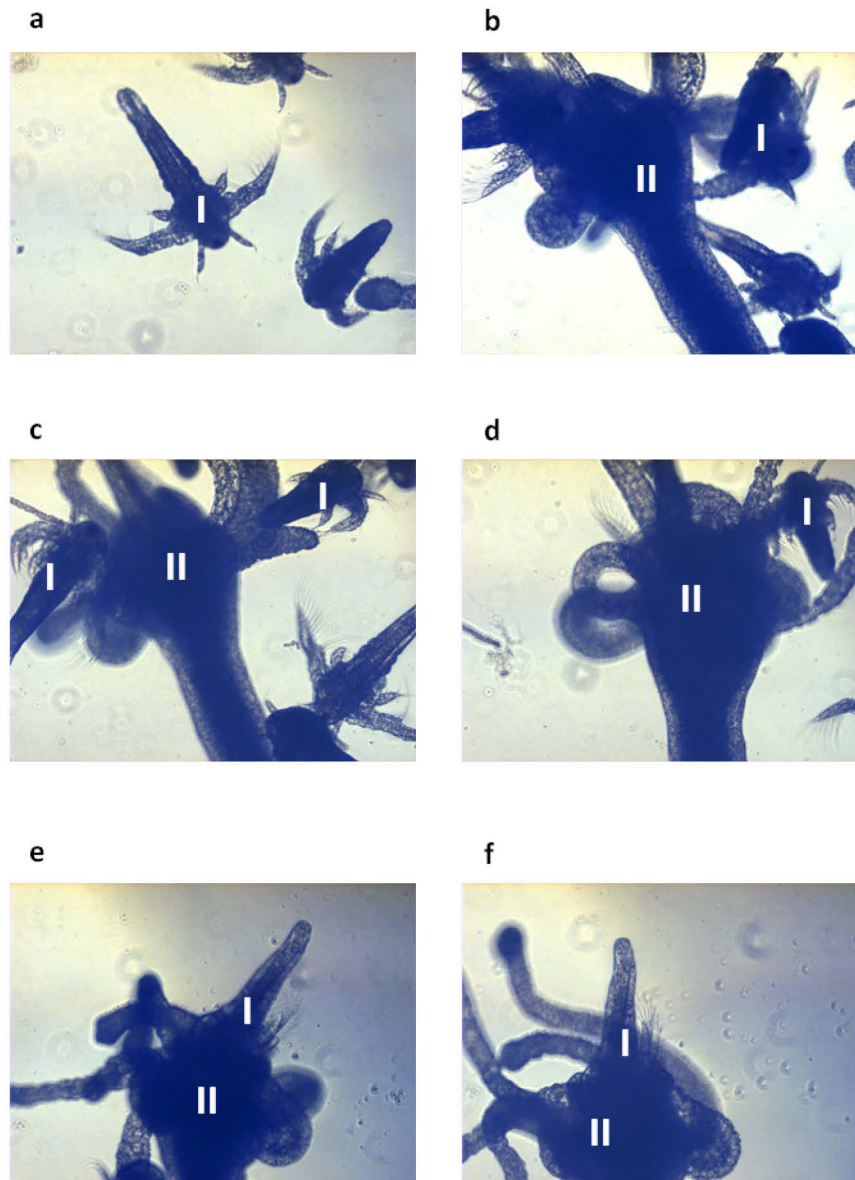


Figure 45: Nourrissage des hydres avec des artémies. a) Les artémies sont placées près des hydres. b) Les artémies proches des hydres sont immobilisées. c) L'hydre attrape avec ses tentacules les artémies, d) elle en rapproche une de sa bouche, e) l'introduit dans sa bouche, f) l'ingère. I: artémie; II: hydre.

La mise en place de la culture d'hydre est un succès, aucune perte n'a été à déplorer et en l'espace d'une semaine, leur quantité avait déjà doublée. À partir d'hydre entière, nous avons réalisé une extraction d'ARN dont l'intégrité a ensuite été contrôlée à l'aide du Bioanalyzer 2100. La distinction des deux pics correspondant aux ARNs ribosomaux 18S et 26S valident le contrôle qualité de ces ARN et indiquent qu'ils sont non dégradés (Fig. 46a).

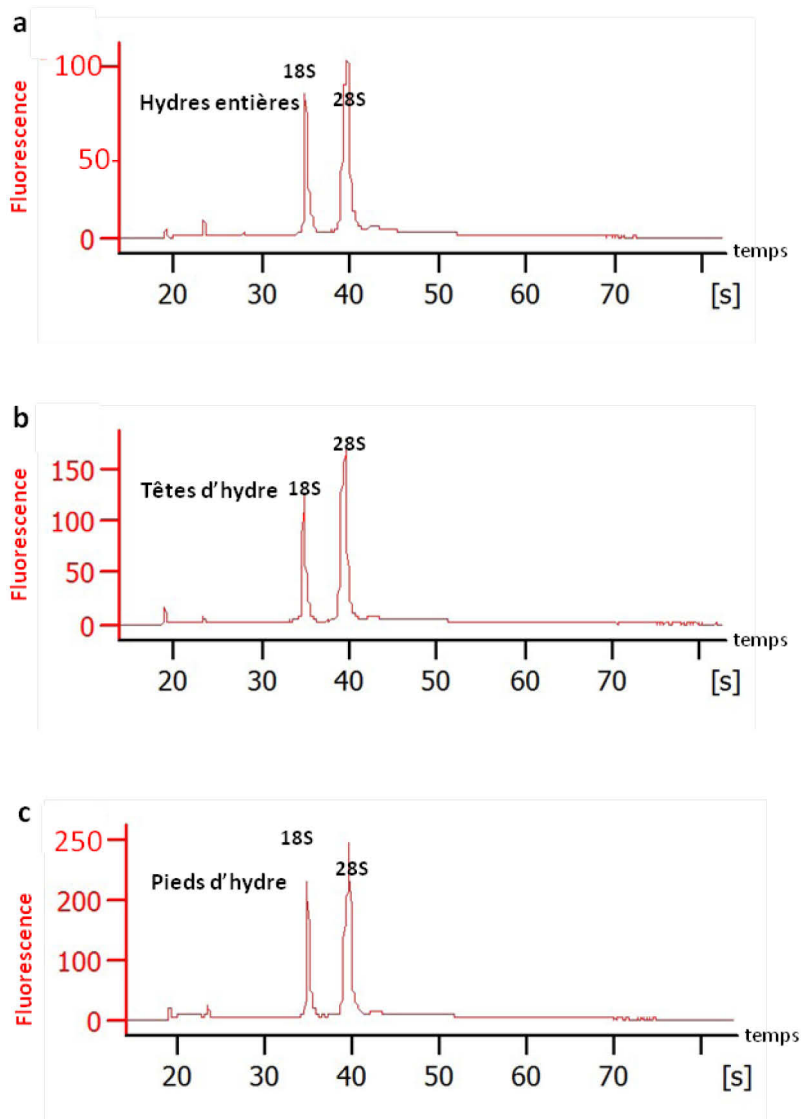


Figure 46: Analyse des échantillons d'ARN extraits à partir a) d'hydre totale, b) de têtes d'hydre et c) de pieds d'hydre au Bioanalyzer 2100 (Agilent).

Alors que le gène *Nxn1l* chez les mammifères est composé de deux exons codants et d'un intron (**Fig. 13**), *hydra Nxn1a* et *hydra Nxn1b* sont chacun composés de 6 exons codants et de 5 introns (**Fig. 47a et 48a**).

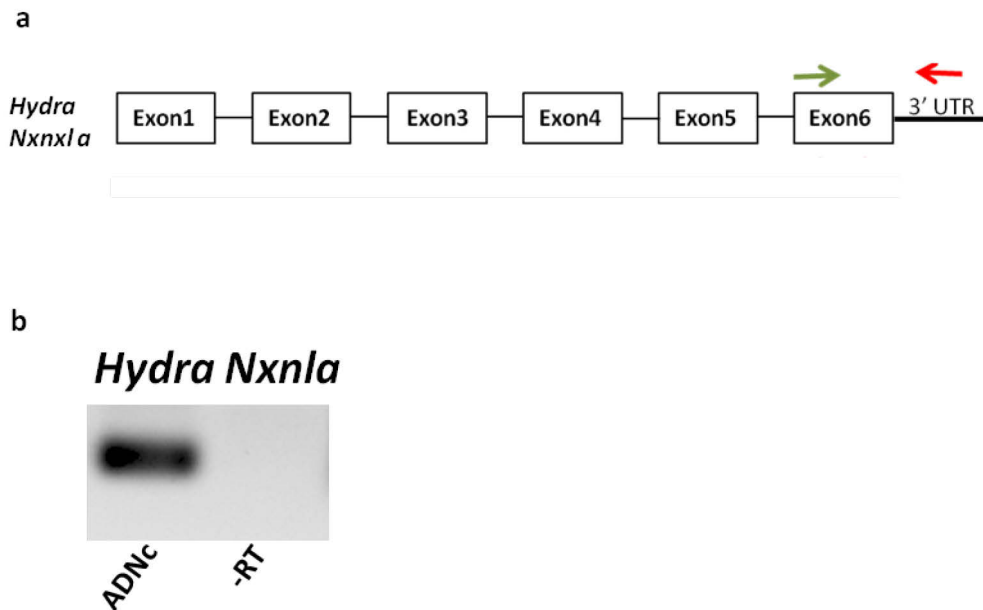


Figure 47: Expression du gène *Hydra Nxn1a* dans l'hydre entière. **a)** Représentation schématique du gène *Hydra Nxn1a*. Les rectangles représentent les exons, la flèche verte représente l'amorce sens et la flèche rouge, l'amorce antisens. **b)** Expression par RT-PCR de *Hydra Nxn1a* à partir de l'ADN complémentaire. Le témoin -RT représente l'expérience où la reverse transcriptase n'a pas été ajoutée lors de la reverse transcription.

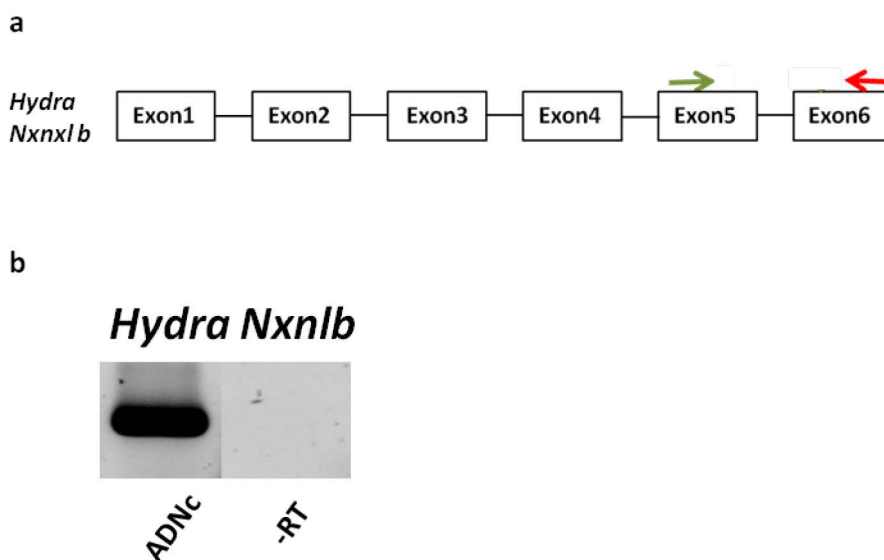


Figure 48: Expression du gène *Hydra Nxn1b* dans l'hydre entière. **a)** Représentation schématique du gène *Hydra Nxn1b*. Les rectangles représentent les exons, la flèches verte représente l'amorce sens et les flèches rouge, l'amorce antisens. **b)** Expression par RT-PCR de *Hydra Nxn1b* à partir de l'ADN complémentaire. Le témoin -RT représente l'expérience où la reverse transcriptase n'a pas été ajoutée lors de la reverse transcription.

Une RT-PCR à l'aide d'amorces qui amplifient spécifiquement le messenger *hydra Nxnla* montre une amplification spécifique à la taille attendue de 150 pb (**Fig. 47**). Précisons que la grande majorité des amorces utilisées dans cette partie du projet sont dessinées dans le but d'amplifier des fragments d'environ 150 pb. De nombreuses expériences présentées ici consistent à étudier l'expression de différents gènes et d'en comparer leur expression par RT-PCR en temps réel. La technologie utilisée à l'Institut de la Vision pour ces expériences est celle développée par Applied Biosystems®, la 7500 Real-Time PCR qui préconise et recommande l'amplification de fragments d'une taille approximative de 150 pb. Pour les rares expériences où cette règle ne sera pas appliquée, la taille du fragment amplifiée sera précisée. De plus, la spécificité et l'efficacité de toutes les amorces utilisées pour ce projet ont été testées et validées sur de l'ADN complémentaire. Chaque couple d'amorces utilisé présente une efficacité comprise entre 86 et 100% (**Fig. 37**). Les séquences des gènes *hydra Nxnla* et *hydra Nxnlb* ne sont pas complètement annotées. De très larges parties introniques sont manquantes dans les bases de données mais fort heureusement nous retrouvons toutes les parties exoniques des deux gènes et ainsi toute la séquence des deux messagers *hydra Nxnla* et *hydra Nxnlb* (**Fig 49**).

a**>hydra-Nxnla**

atggaatttctatctggggtgactttatacaaaagctgatggctctagtggttagcagatagcatacttagtgaaggattt
 tgtgctttattacttctcagctcattgggtgctcctcatgcagacagtttacacctgtattaaaagattttatgaagttgtaaaa
 gattctggtttagaattatattatgtcttctgatgaaagccaggaagatatgataaactatatgaaggaatctcatggtga
 ttggtattgtggaatatggttctgcttagtgatgaactgaagcaaaaattgaagtcaacggaatacctacattagttg
 tttgtagaaaggatgggtctgttattaatgccgatgctaataatgatgatgtttgtgataaagaaccgtcagccctcttctgctgaat
 ggaaaaatcaaaaatga

b

MEFVSGVTLYKADGSSGLADSILSEKDFVLYYFSAHWCPPCRQFTPVLKDFYEVVKDSGLEIIFMSS
 DESQEDMINYMKESHGDWYCVEYGSALVDELKQKFEVNGIPTLVVCRKDGSVINADANDDVCD
 KEPSALFAEWKNQK

c**>hydra-Nxnlb**

atggatttttatctggagtgactttgttcaaagctgatggctctagtggttagcagacaacatacttagtgaaggatttt
 gtgctttattttctcagctcattgggtgctcctcatgcagacagtttacacctgtgttaaaagaattttatgaagttgtaaaag
 attctggtgtagaagttattttatattctctgatagaagccatgaagatatgataagctacatgaaggaagctcatggtgat
 tggattgtctagaatatggctctgcttagtgactaaattgaaggaaaaattggcattagaggaatacctacattaattgtt
 tgcagaaaggatgggtctctagttacgtccagtggtcgtaatacagtttctgaaaaagaaccatcagcagccgttctgctgatt
 ggagaaagtag

d

MDFLSGVTLFKADGSSGLADNLSKDFVLYYFSAHWCPPCRQFTPVLKEFYEVVKDSGVEVIFISS
 DRSHEDMISYMKEAHGDWYCLEYGSALVTKLKEKFGIRGIPTLIVCRKDGSLVTSSGRNHVSEKEP
 SAAVADWRK

Figure 49 : Séquence, **a**) nucléotidique du gène *Nxnla* de l'hydre, **b**) peptidique de la protéine codée par le gène *Nxnla* de l'hydre, **c**) nucléotidique du gène *Nxnlb* de l'hydre, **d**) peptidique de la protéine codée par le gène *Nxnlb* de l'hydre.

Cependant, les séquences des exons codants de ces gènes sont tellement proches et similaires, que pour les distinguer l'une de l'autre et pour amplifier spécifiquement le gène *hydra Nxnla*, il a fallu sélectionner l'amorce sens dans l'exon n°6 et l'amorce antisens dans la région 3'UTR (**Fig. 47a**). Une autre RT-PCR est réalisée avec des amorces localisées dans l'exon n°5 et dans l'exon n°6 qui amplifient spécifiquement *hydra Nxnlb* (**Fig. 48a**). Précisons toutefois que ces amorces utilisées pour amplifier *hydra Nxnla* et *hydra Nxnlb* ont été dessinées pour amplifier uniquement les messagers *long hydra Nxnla* et *long hydra Nxnlb* qui coderaient pour des thiorédoxines. Le résultat de cette expérience indique qu'un fragment est amplifié à partir de l'ADNc d'hydre à la

taille attendue (**Fig. 48b**). *Hydra vulgaris* exprime aussi une thiorédoxine mitochondriale. Le gène qui code pour cette protéine est composé de 3 exons et est annotée *PREDICTED: Hydra vulgaris thioredoxin, mitochondrial-like* dans le NCBI. Parce que cette protéine correspond à la protéine thioredoxin 2 (TXN2) chez l'Homme qui est une protéine mitochondriale, l'expression du gène qui code pour cette protéine doit certainement être ubiquitaire. Nous l'annoterons pour la suite de nos expériences *hydra Txn2*. À partir de l'ADN complémentaire d'hydre totale et à l'aide d'amorces dessinées dans l'exon 2 et dans l'exon 3 de ce gène (**Fig. 50a**), une amplification a été réalisée et montre bien la présence et l'expression du messenger qui code pour cette thiorédoxine mitochondriale chez *Hydra vulgaris* (**Fig. 50b**).

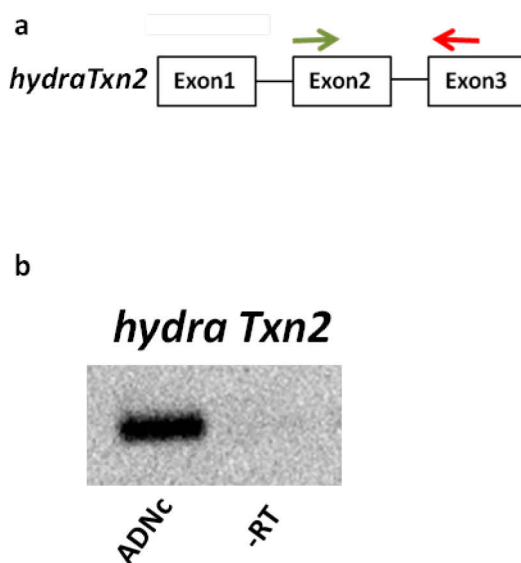


Figure 50: Expression du gène *Hydra Txn2* dans l'hydre entière. a) Représentation schématique du gène *Hydra Txn2*. Les rectangles représentent les exons, la flèche verte représente l'amorce sens et la flèche rouge, l'amorce antisens. b) Expression par RT-PCR de *Hydra Txn2* à partir de l'ADN complémentaire. Le témoin -RT représente l'expérience où la reverse transcriptase n'a pas été ajoutée lors de la reverse transcription.

HmOps2, pour *Hydra magnipapillata* Opsine 2, est une opsine bleue impliquée dans la cascade de phototransduction chez les cnidaires. Chez *Hydra vulgaris*, elle est exprimée dans les neurones qui sont assimilés à des photorécepteurs et est particulièrement concentrée au niveau de l'orifice de l'hypostome qui fait office de bouche (Plachetzki et al., 2012). Le gène qui code pour cette protéine est annoté sur le NCBI *PREDICTED: Hydra vulgaris blue-sensitive opsin-like* et est défini comme ne possédant qu'un seul

exon comme la moitié des gènes des récepteurs couplés aux protéine G. Pour des raisons de simplification nous l'appellerons *HmOps2*. Afin d'étudier l'expression de ce gène chez l'hydre et comme seul un exon est défini pour ce gène, les amorces sens et antisens sont sélectionnées sur cet unique exon qui correspond au message de *HmOps2* (**Fig. 51a**). *Hydra vulgaris* exprime *HmOps2* (**Fig. 51b**).



Figure 51: Expression du gène *HmOps2* dans l'hydre entière. a) Représentation schématique du gène *HmOps2*. Le rectangle représente le seul exon connu, la flèche verte représente l'amorce sens et la flèche rouge, l'amorce antisens. b) Expression par RT-PCR de *HmOps2* à partir de l'ADN complémentaire. Le témoin -RT représente l'expérience où la reverse transcriptase n'a pas été ajoutée lors de la reverse transcription.

Le génome de l'hydre n'étant séquencé que depuis 2010 et son annotation étant basée sur des prédictions, nous avons alors décidé de vérifier toutes ces séquences amplifiées. Pour cela les fragments amplifiés pour chaque RT-PCR sont purifiés et séquencés. Les séquences obtenues sont chargées dans le logiciel Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) du NCBI pour lequel le programme compare des séquences nucléotidiques ou protéiques à des bases de données de séquences et calcule la signification statistique des alignements obtenus pour identifier des séquences inconnues. Les résultats de ces alignements indiquent que chacun des fragments amplifiés, *Hydra Nxnla*, *hydra Nxnlb*, *HmOps2* et *hydra Txn2* s'alignent avec le message correspondant (**Fig. 52**).

a

PREDICTED: Hydra vulgaris nucleoredoxin 1, mRNA

Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
128	128	91%	2e-26	91%	XM_002165483.3

b

PREDICTED: Hydra vulgaris nucleoredoxin 2, mRNA

Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
130	130	95%	6e-27	91%	XM_002165483.3

c

PREDICTED: Hydra vulgaris blue-sensitive opsin-like , mRNA

Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
89.8	89.8	71%	8e-15	87%	NM_001287786.1

d

PREDICTED: Hydra vulgaris thioredoxin, mitochondrial-like , mRNA

Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
152	152	94%	1e-33	88%	XM_002165216.3

Figure 52: BLAST des fragments amplifiés à partir de l'hydre puis séquencés de a) *Hydra Nxn1a*, b) *hydra Nxn1b*, c) *HmOps2* et d) *hydra Txn*.

Le *Max score* des ces analyses indique le score de la séquence unique la mieux alignée et le *Total score* correspond à la somme de toutes les séquences correctement alignées. Le *Query coverage* correspond au pourcentage de la séquence analysée couverte et la

valeur de la *E Value* détermine la significativité de la correspondance de l'alignement où *E* doit être inférieure à 0,05. L'identité calculée suite au BLAST correspond au pourcentage de correspondance entre la séquence analysée et la séquence identifiée. Enfin, le numéro d'accèsion indique l'identifiant attribué par le NCBI au gène correspondant à la séquence identifiée. Chez les mammifères, *Nxn1* qui est impliqué dans la vision a un patron d'expression restreint à la rétine. Nous cherchons donc maintenant à savoir si les gènes *hydra Nxnla* et *hydra Nxnlb* ont le même patron d'expression ou pas. Est-ce que ces gènes sont co-exprimés avec ceux des opsines de l'hydre connus pour être exprimés au niveau de son hypostome et de ses cellules nerveuses ? Pour cela une hybridation sur tout le corps d'*Hydra vulgaris* est réalisée à l'aide de sondes d'acides ribonucléiques (ARN). Cette technique permet de localiser précisément une séquence d'acide nucléique à l'intérieur d'un échantillon à l'aide d'une sonde d'acide nucléique (ADN ou ARN) marquée. Le principe de cette technique repose sur la complémentarité entre les bases azotées qui effectuent des liaisons hydrogènes entre elles. Dans notre cas, nous souhaitons établir le patron d'expression des gènes *hydra Nxnla* et *hydra Nxnlb* chez l'hydre. Les résultats de cette analyse seront comparés à ceux des analyses de patron d'expression des gènes *hydra Txn2* et *HmOps2*. Cette hybridation appelée *whole mount* nécessite que l'hydre, qui a tendance à se rétracter à la moindre perturbation de son environnement, soit complètement relaxée à l'aide d'uréthane avant d'être perméabilisée pour faciliter la pénétration des sondes. Ces sondes ARN sont produites à partir du vecteur pBluescript II KS qui est un phagémide dérivés de pUC19. Ce vecteur présente donc les caractéristiques d'un plasmide classique combinées avec les caractéristiques de répllication d'un phage. Ce vecteur possède les promoteurs T7 et T3 flanquant respectivement le site multiple de clonage ou *multiple cloning site* (MCS) qui est composé de 21 sites de restriction uniques. Les lettres K et S désignent les deux sites de restriction KpnI et SacI qui délimitent le MCS (**Fig. 53**).

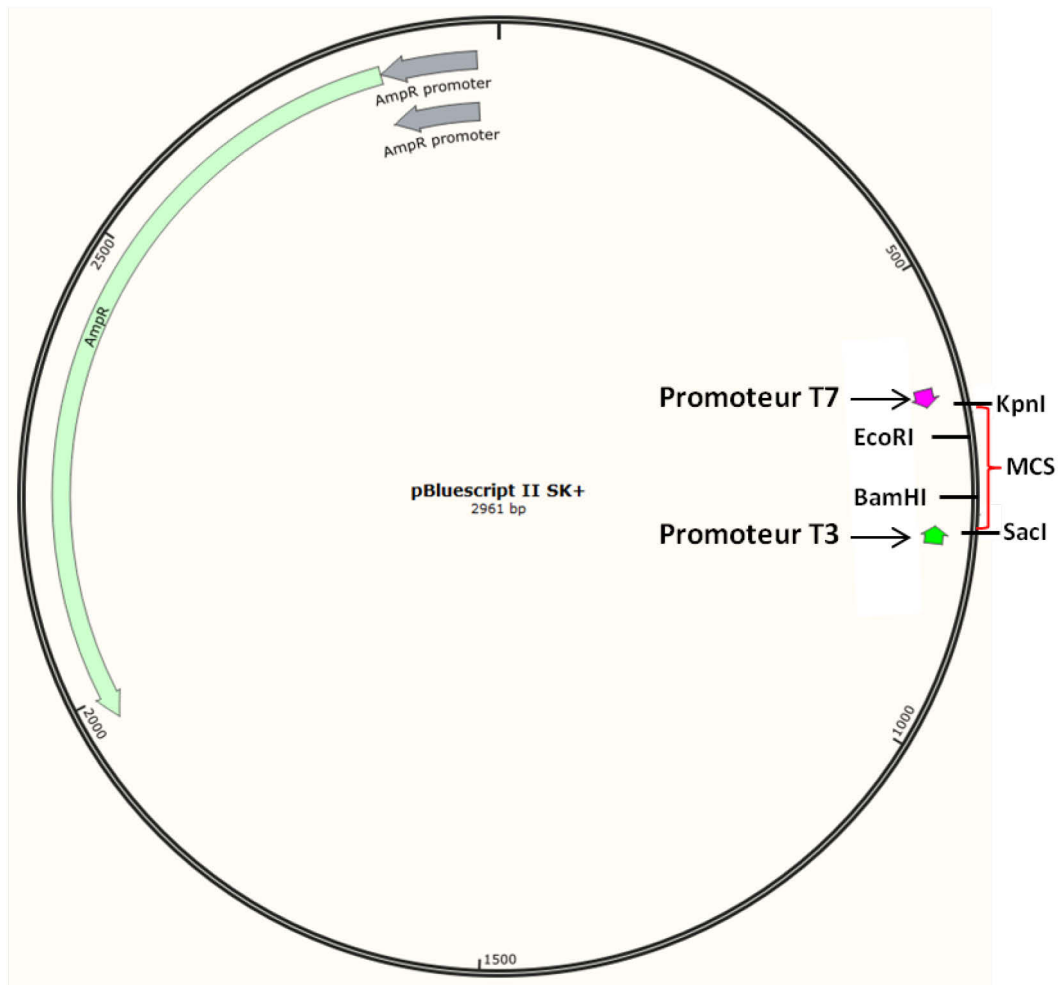


Figure 53: Vecteur pBluescript II KS.

C'est dans le MCS que les séquences d'ADN qui codent pour les sondes d'intérêt sont clonées. Les séquences des gènes *hydra Nxnla* et *hydra Nxnlb* sont tellement proches que nous avons décidé de synthétiser uniquement la sonde qui correspond à *hydra Nxnla* qui pourra alors s'hybrider et identifier les deux messagers codés par les gènes *hydra Nxnla* et *hydra Nxnlb*. Les amorces utilisées pour produire cette sonde amplifient uniquement les messagers qui codent pour les thiorédoxines. Les séquences d'ADN qui codent pour ces sondes (**Fig. 49**) ainsi que celles qui vont être utilisées pour localiser l'expression de *hydra Txn2* (**Fig. 54a**) et de *HmOps2* (**Fig. 54c**) ont toutes été clonées dans le MCS du vecteur pBluescript II KS.

a

>*hydra-Txn*

Atgttatcagttatccgctcgaattgttgtaatagttagttacaagtatactccgaggttgcaaagattactatctttgatataa
agactccagaagatttcaatgataaagtagttcaatcaaaagttcctgttctgttgacttccatgctagttggtgtggacctt
gcaaacagcttgaccagttcttgcatcagttgtggatagtttgaaggaaaattaaattggcaaaagttgatgttgatcaa
catgaagatttagctatggaatatgaggttactgctgttccagctgtatttgcgataaaaaacggatgaagtcatagacaagt
ttacaggatacaaaagacaacaagaagcttttatttgcaaaaagcttactgaataa

b

MLSVFRIRIVNSSYKTPRLQRLSFDIKTPEDFNDKVVQSKVPVLVDFHASWCGPCKQLAPVLA
SVVDSFEGKLNLAQVDVDQHEDLAMEYEVTAVPAVFAIKNGEVIDKFTGYKDKKQVLLFAKKLTE

c

>*hmOps2*

Atggtcctggtagctttatacacaacttatattgttctaatcgctttatcaacgtctttaaactgatcatatgctacgtaat
catccgcaaaataaaagcaattgaaataccacacctattttttgagcatttcaatatacagatatagtacacaccgtagtt
ggacttgttctgaaagtttgcgtgtgcacaaagtgacgtcattaaaaaatagctatataagtggtggagcttctttttaaca
tactctatttctgttcaaatattatgcaaattgtatgatatcggtataaggggtgttgcgttgaaacgtccaatgttttactt
taaaaactgtgacaaagtttaagtacaaaatggcatcactttgttgttacttctatggaatactttgggctgctttcctta
cttgatggtcaaaatagaagaagatttagataaaaagcgatgttcttttagattggaatttaactaaatcaatacatttc
ttatctaagtttgcatttatatttgcataaaactgccaacaactttattgatttgggacttagagtaaaacatcaaaactgtg
gatgaacaccgcaggttagagaaaatcgccgaatcaacaatgaaatattagaaaaagcttatctaaaagtattattg
tgttctgcaattgcttactttattgttggacccttattctgtggtcagtttacttcaatttttaaaagtaaaaattccgagatt
atatttacatttgtgcattatttcaaaaactgtcagcggattataaatgcgttggttaactgttacattaacaagtcattcaag
ctcatcttcagatttaaggatatttcaatgttttctaaaaggaaaaaggatagagcataaaaatatttcatgggctgaaga
aacgcaggttgcagaaacaggcttcaactaa

d

MVLVALYTTYIVVLIALLSTSLNLIICYVIIRKIKAIIEIPLHILSISISDIVHTVVGLVSEVCVLHKVTSKNS
YISVGASFLTYSISVSNIMQIVMISAIRVVALKRPMFYFKNC DKVKYKMASLCCCFY GILWASFP LL
GWSKYEEDLDKKRCSLDWNLTKSNTFSYLMFAFICYKLPTLLI WALRVKHQTVDEHRRFR ENR
PNQQIEILEKAYLKVLLCSAIAYFIVWTPYSVVSLLSIFKVKIPSIIFTFCALFAKLSAVLNALVNCYINKS
FQAHLHLDRIFQCFLKGKRIEHKNISWAEETQVAETGFT

Figure 54 : Séquence, a) nucléotidique du gène *Txn2* de l'hydre, **b)** peptidique de la protéine codée par le gène *Txn2* de l'hydre, **c)** nucléotidique du gène *HmOps2* de l'hydre, **d)** peptidique de la protéine codée par le gène *HmOps2* de l'hydre.

Arbitrairement, les inserts qui codent pour *hydra Nxnla* et *HmOps2* sont clonés en 3' du promoteur d'ARN polymérase T7 et c'est à partir de ce promoteur que seront synthétisées les sondes sens tandis que les sondes antisens seront synthétisées à partir du

promoteur T3. L'insert qui code pour *hydra Txn2* est cloné sous le promoteur d'ARN polymérase T3. Les sondes sens correspondantes seront obtenues à partir du promoteur T3 alors que les sondes antisens seront synthétisées à partir du promoteur T7. Pour la synthèse des sondes sens les plasmides qui codent pour *hydra Nxn1a* et *HmOps2* doivent dans un premier temps être linéarisés par l'enzyme de restriction unique BamHI alors que ces plasmides doivent être linéarisés par l'enzyme de restriction unique EcoRI pour la synthèse de la sonde antisens. Inversement, le plasmide qui code pour *hydra Txn2* doit être linéarisé par EcoRI pour la synthèse de la sonde sens et par BamHI pour la synthèse de la sonde antisens (Fig. 55).

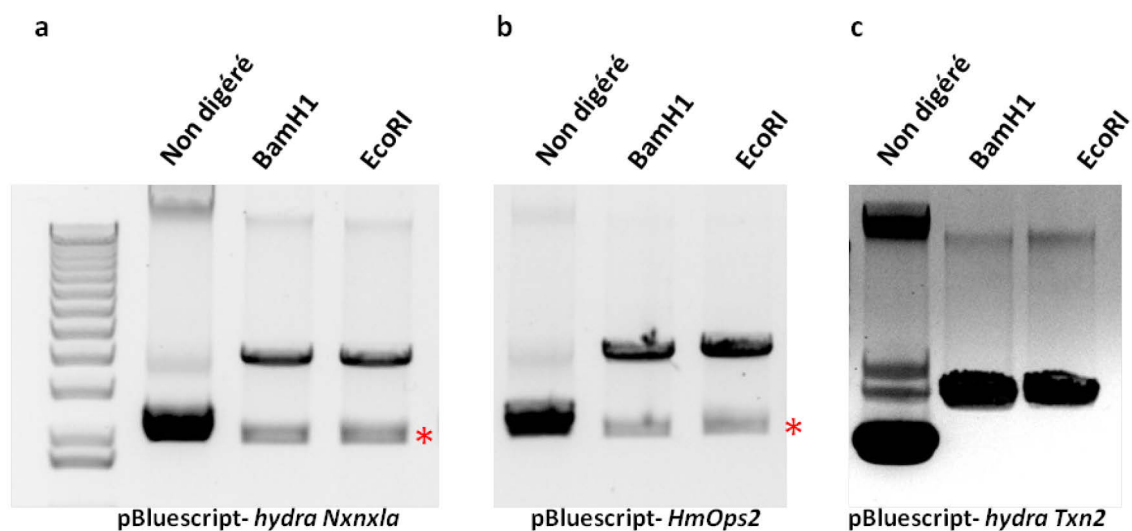


Figure 55: Linéarisation par BamHI ou EcoRI des plasmides pBluescript II KS qui codent pour a) *hydra Nxn1a*, pour b) *HmOps2* et pour, c) *hydra Txn2*. * Représente les digestions partielles.

Les résultats de ces digestions indiquent que les plasmides qui codent pour *hydra Nxn1a* et pour *HmOps2* ne sont pas totalement digérés alors que celui qui code pour *hydra Txn2* est totalement linéarisé avec l'enzyme EcoRI comme avec l'enzyme BamHI. Après leur linéarisation, les plasmides sont purifiés et les sondes sens et antisens sont synthétisées à l'aide d'une ARN polymérase T7 ou T3. Un mélange de dNTP, ATP, GTP et CTP et d'UTP marqué à la digoxigénine qui est un stéroïde naturellement présent dans les feuilles de certaines digitales telles que *Digitalis purpurea* ou *Digitalis lanata* est intégré pour la synthèse des sondes. La digoxigénine

servira de *tag* reconnu par la suite de l'expérience par un anticorps couplé à la phosphatase alcaline. Les sondes sont ensuite précipitées et utilisées pour l'hybridation *in situ whole mount*. Après avoir été introduites dans le corps des hydres, ces sondes s'hybrident de manière complémentaire et spécifique avec la séquence du messenger ciblé. L'hybridation de ces sondes est révélée par un marquage spécifique représenté par l'apparition d'une coloration (bleu/violet), obtenue après l'ajout du substrat de la phosphatase alcaline. Comme escompté, les résultats de l'hybridation *in situ whole mount* de *hydra Txn2* indiquent un marquage localisé tout le long du corps d'*Hydra vulgaris*. Ce marquage qui correspond au marquage du messenger d'un gène d'une protéine dans les mitochondries de l'hydre qui sont uniformément réparties dans tout son corps. L'expression de *HmOps2* est connue pour être préférentiellement localisée au niveau de l'hypostome, au niveau des tentacules et des anneaux qui entourent la bouche (Plachetzki et al., 2012). Les résultats de notre expérience coïncident parfaitement avec ces données et nous retrouvons une coloration spécifiquement localisée au niveau de l'hypostome de l'hydre et au niveau des jonctions de ses tentacules avec son corps où sont localisées ses cellules photosensibles épidermiques. Les résultats de l'hybridation *in situ whole mount* de *hydra Nxnla* et *b* sont plus surprenants. En effet le patron d'expression de ces gènes ressemble plus à celui de *hydra Txn2* et montre une expression tout le long du corps de l'hydre plutôt qu'une expression localisée au niveau de la bouche et l'hypostome de l'hydre tel que celui de la protéine photosensible *HmOps2* (**Fig. 56**).

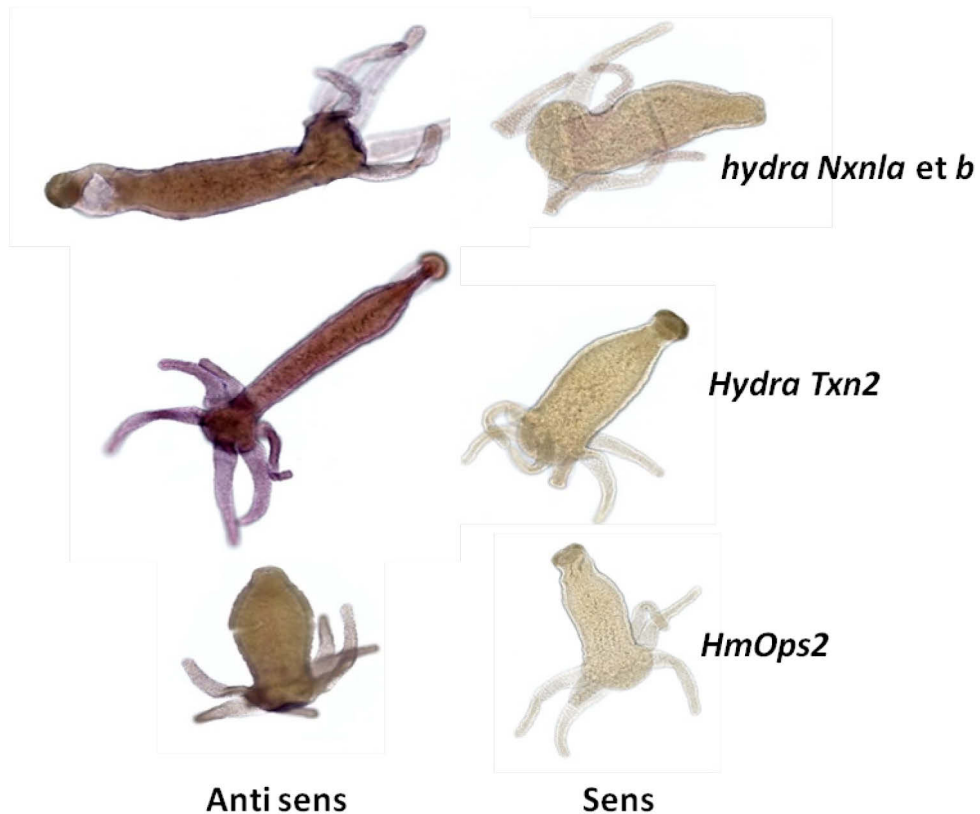


Figure 56: Expression par hybridation *in situ* sur corps entier d'hydre, a) des gènes *hydra Nxnla* et *b*, b) du gène *hydra Txn2* et c) du gène *HmOps2*.

Pour valider ces résultats, une autre expérience d'analyse de patron d'expression de ces gènes a été réalisée. Pour cela nous avons séparé le haut du bas du corps de l'hydre et étudié l'expression de ces gènes dans chacun des compartiments par RT-PCR et par RT-PCR en temps réel. Dans un premier temps, les polypes adultes d'hydres sont amputés dans la région sous-hypostomique, c'est-à-dire à 80% de la longueur de leur corps pour clairement séparer la tête du pied (**Fig. 57**).

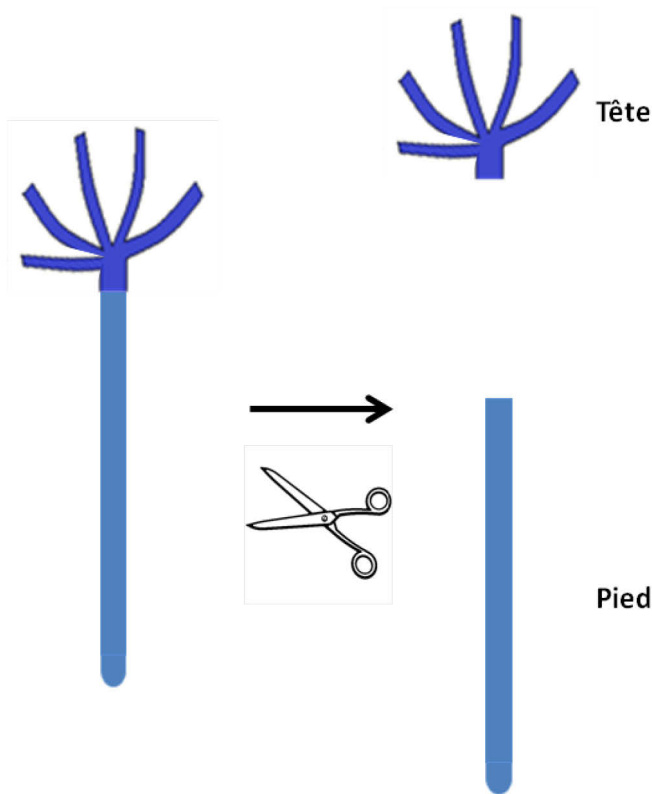


Figure 57: Schéma représentatif de la bissection à 80% des hydres pour séparer la tête du pied.

Du fait de la grande et rapide capacité de régénération d'*Hydra vulgaris*, chaque partie du corps est immédiatement utilisée après la bissection pour réaliser une extraction d'ARN. Ces ARNs ont été contrôlés à l'aide du Bioanalyzer 2100 et leur qualité validée (**Fig. 46b et c**). À partir de ces ARNs, des réactions de RT-PCR à l'aide des amorces décrites précédemment pour amplifier les gènes *hydra Nxnla*, *hydra Nxnlb*, *HmOps2* et *hydra Txn2* sont réalisées. Les résultats de ces RT-PCR confirment ceux obtenus par l'hybridation *in situ whole mount*. Les messagers *hydra Nxnla* et *hydra Nxnlb* sont exprimés dans la tête et le pied de l'hydre selon un patron d'expression ubiquitaire. L'expression de la thiorédoxine mitochondriale est attendue selon la repartition des mitochondries qui sont uniformément présentes dans le corps de l'hydre. Concernant ce gène, les résultats de la RT-PCR confirment ceux de l'hybridation *in situ whole mount* et montrent une expression du messager de cette thiorédoxine mitochondriale dans la tête et le pied de l'hydre. *HmOps2* est une opsine impliquée dans la phototransduction et est localisée dans les neurones présents au niveau de

l'hypostome et des tentacules de *H. magnipapillata* (Musio et al., 2001). Cependant, des études montrent que son expression est également retrouvée mais de manière plus diffuse et moins importante dans le reste du corps de l'hydre (Plachetzki et al., 2012). Les résultats de la RT-PCR confirment ces données, *HmOps2* est exprimée dans la tête et dans le pied d'*Hydra vulgaris* (Fig. 58).

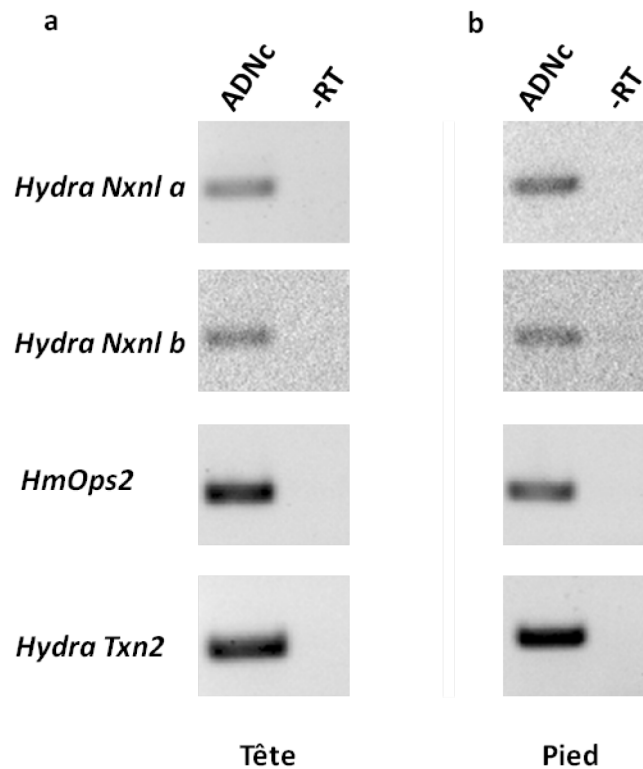


Figure 58: Expression des gènes *hydra Nxn1a*, *hydra Nxn1b*, *HmOps2* et *hydra Txn2* dans a) la tête de l'hydre et b) le pied de l'hydre. Le témoin -RT représente l'expérience où la reverse transcriptase n'a pas été ajoutée lors de la reverse transcription.

Même si les RT-PCR réalisées ne sont pas quantitatives, l'expression de *HmOps2* dans le pied de l'hydre semble moins importante que dans la tête. De plus, sachant que l'hybridation *in situ whole mount* n'est pas une technologie très sensible c'est certainement la raison pour laquelle nous n'avons pas retrouvé ces résultats dans les expériences précédentes d'hybridation (Fig. 56). Toutefois, pour confirmer ces résultats, des expériences de RT-PCR en temps réel ont été réalisées pour quantifier la différence d'expression de ces gènes entre la tête et le pied de l'hydre. Ces expériences confirment

que *hydra Nxnla* et *hydra Nxnlb* sont identiquement exprimés par la tête et par le pied de l'hydre (Fig. 59), tout comme le messager de la thiorédoxine mitochondriale (Fig. 60).

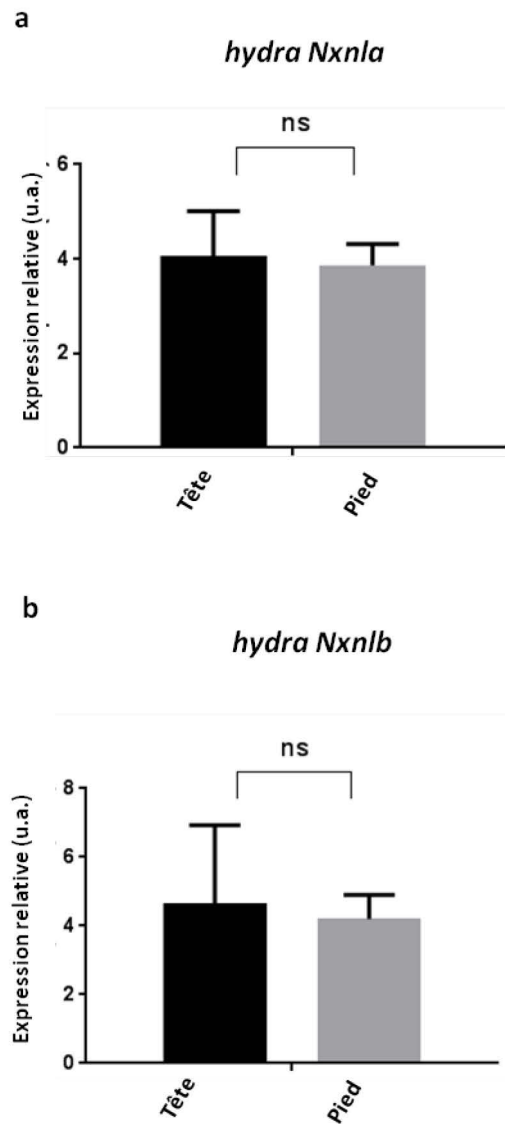


Figure 59: Expression du gène a) *hydra Nxnla* et b) *hydra Nxnlb*, dans la tête et le pied de l'hydre. u.a: unité arbitraire.

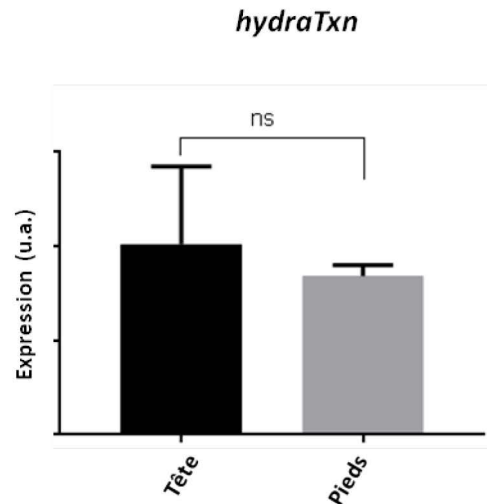


Figure 60: Expression de *hydra Txn2* dans la tête et le pied d'*Hydra vulgaris*. u.a: unité arbitraire.

TXN2 est une protéine ubiquitaire dont l'expression du messager est uniforme, c'est pourquoi les expressions relatives de tous les gènes étudiés chez l'hydre sont normalisées par le gène qui code pour cette protéine afin de nous permettre d'établir une garantie concernant la quantité d'ADNc utilisée dans les réactions. Ces expériences confirment également que l'expression de *HmOps2* est plus importante dans la tête de l'hydre que dans le pied (**Fig. 61**).

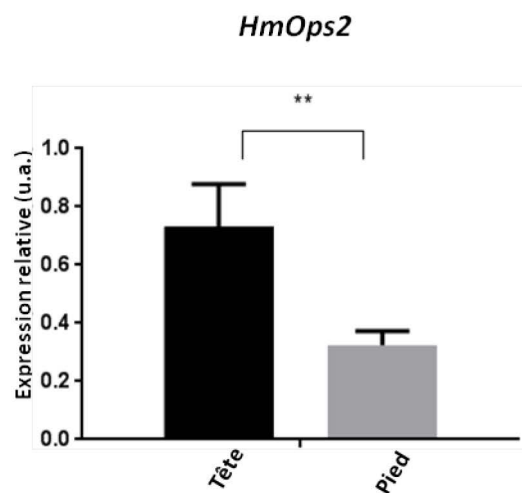


Figure 61: Expression de *HmOps2* dans la tête et dans le pied de l'hydre. u.a: unité arbitraire.

Ces résultats confirment que même si cette opsine est majoritairement exprimée au niveau de la tête de l'hydre qui est composée de la bouche et des tentacules et où sont retrouvées les cellules du système nerveux, son messenger est tout de même retrouvé dans le pied d'*Hydra vulgaris*.

L'hydre ne possédant pas de système visuel et pas de rétine, nous pensions qu'elle n'exprimerait pas le gène ancestral NXNL1. Or c'est avec surprise qu'on nous avons démontré que l'hydre exprime deux gènes ancestraux, hydra Nxnla et hydra Nxnlb dont les messagers long hydra Nxnla et long hydra Nxnlb ont un patron d'expression qui ressemble à un gène ubiquitaire. Les protéines codées par ces messagers pourraient être impliquée dans la défense de l'organisme contre le stress oxydatif et non dans la vision telle que HmOps2 et RdCVFL.

1.2: HYDRA VULGARIS EXPRIME LES MESSAGERS *SHORT HYDRA NXNLA ET B ET LONG HYDRA NXNLA ET B*

Puisque les messagers *long hydra Nxnla et long hydra Nxnlb* sont exprimés dans tout le corps de l'hydre, nous nous posons la question de savoir si les gènes *hydra Nxnla et b* codent aussi pour les messagers *short hydra Nxnla et short hydra Nxnlb*. Pour rappel, les gènes *hydra Nxnla et hydra Nxnlb* possèdent 6 exons et 5 introns. L'examen de la séquence de chaque intron indique la présence d'un codon stop en phase de lecture localisé non loin de l'exon qui le précède en 5'. Notre stratégie repose alors sur l'analyse de la possible rétention de chacun des introns des deux gènes. Pour cela des amorces ont été conçues afin de placer l'amorce sens dans l'exon et l'amorce antisens dans l'intron juste après le premier codon stop en phase de lecture rencontré en 3'. Pour l'investigation de la rétention de l'intron n°1 du gène *hydra Nxnla*, les amorces conçues amplifient un fragment de 322 pb. Cette expérience indique que seul un fragment est amplifié à partir d'ADN génomique (ADNg) qui présente les exons et les introns. Il n'y a pas d'amplification spécifique à partir de l'ADNc d'hydre suggérant que l'intron n°1 du gène *hydra Nxnla* est systématiquement excisé lors de l'épissage (**Fig. 62**).

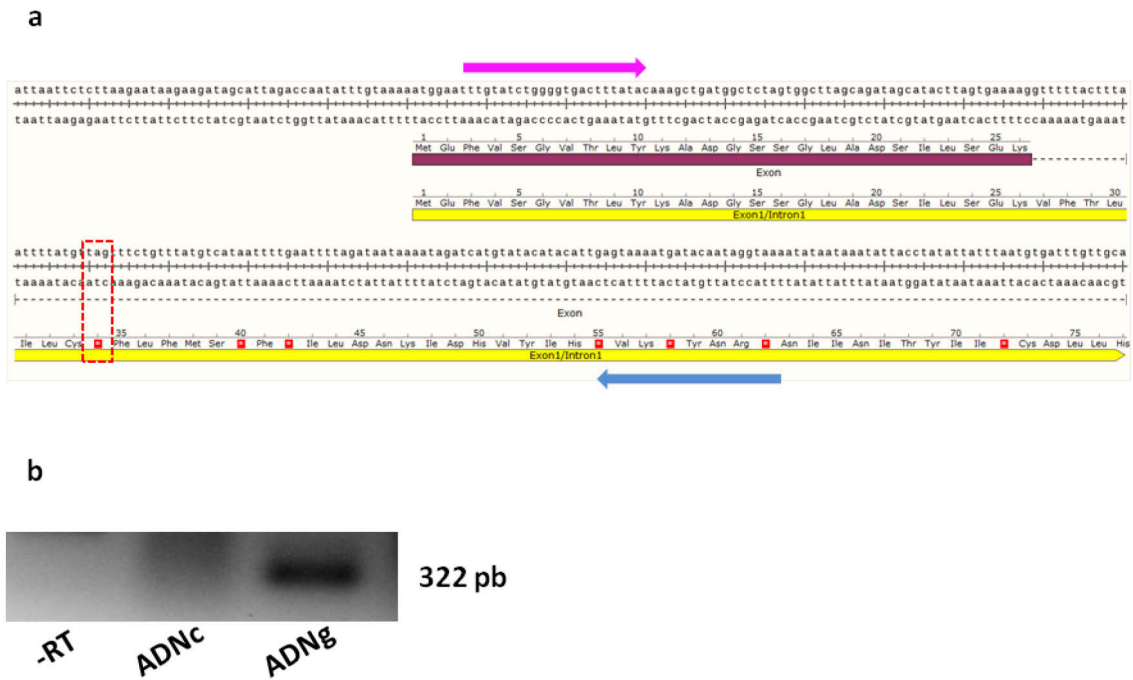


Figure 62: Analyse de la rétention de l'intron n°1 du gène *hydra Nxnla*. **a)** Séquence nucléotidique de l'exon 1 et le début de l'intron n°1 de *hydra Nxnla*. La flèche rose symbolise la localisation de l'amorce sens et la flèche bleue symbolise la localisation de l'amorce antisens utilisées pour tester la rétention de l'intron n°1. Le rectangle en pointillés rouges représente le premier codon stop en phase de lecture retrouvé dans l'intron n°1. **b)** Amplification par RT-PCR du fragment sélectionné à partir d'ADN complémentaire et d'ADN génomique d'hydre. Le témoin -RT représente l'expérience où la transcriptase reverse n'a pas été ajoutée lors de la reverse transcription.

La même expérience est réalisée pour tester la rétention de l'intron n°2 de ce même gène. Tout comme pour l'intron n°1, des amorces sont dessinées pour placer l'amorce sens dans l'exon et l'amorce antisens dans l'intron juste après le premier codon stop rencontré en phase de lecture. Ces amorces amplifient un fragment d'une taille de 415 pb uniquement à partir d'ADNg. Cette expérience indique que l'intron n°2 de *hydra Nxnla* n'est pas retenu (**Fig. 63**).

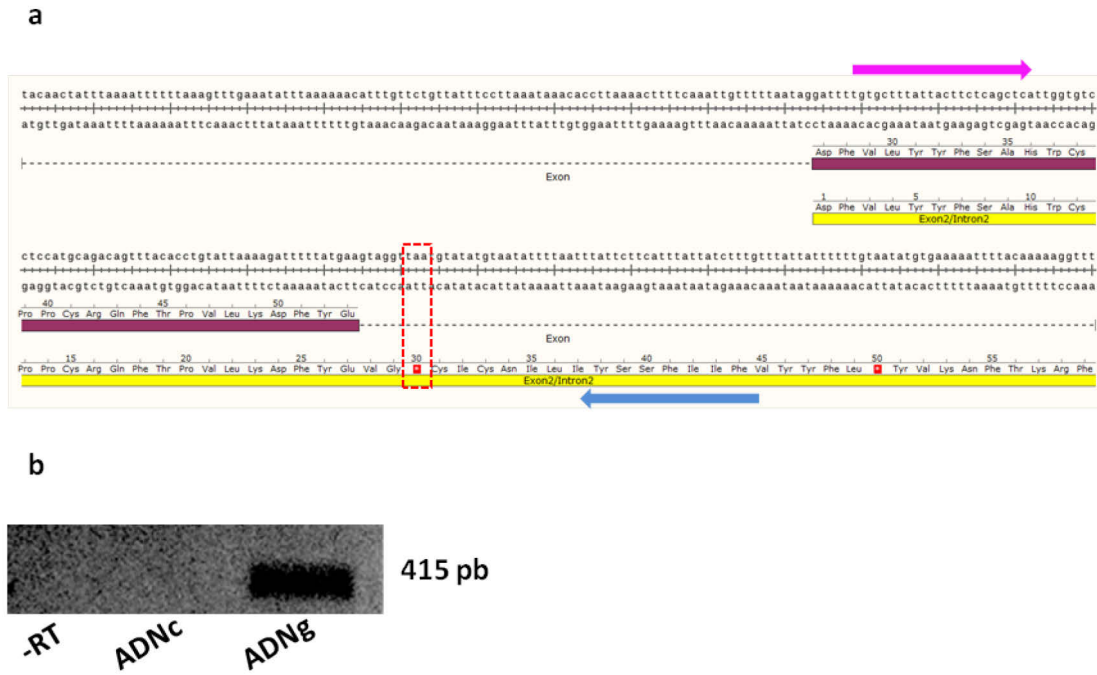


Figure 63: Analyse de la rétention de l'intron n°2 du gène *hydra Nxnla*. **a)** Séquence nucléotidique de l'exon 2 et le début de l'intron n°2 de *hydra Nxnla*. La flèche rose symbolise la localisation de l'amorce sens et la flèche bleue symbolise la localisation de l'amorce antisens utilisées pour tester la rétention de l'intron n°2. Le rectangle en pointillés rouges représente le premier codon stop en phase de lecture retrouvé dans l'intron n°1. **b)** Amplification par RT-PCR du fragment sélectionné à partir d'ADN complémentaire et d'ADN génomique d'hydre. Le témoin -RT représente l'expérience où la transcriptase reverse n'a pas été ajoutée lors de la reverse transcription.

De la même manière, la rétention de l'intron n°3 est étudiée et nous observons que le fragment de 390 pb est amplifié uniquement à partir de l'ADNg, suggérant que cet intron aussi n'est pas retenu (**Fig. 64**).

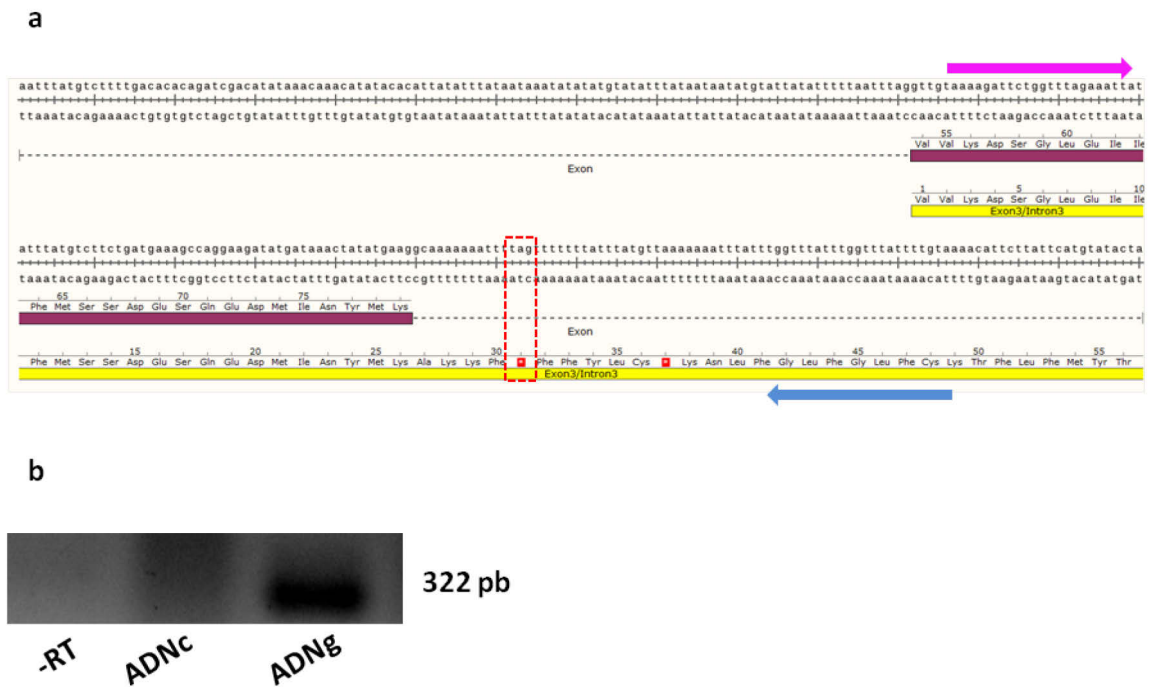


Figure 64: Analyse de la rétention de l'intron n°3 du gène *hydra NxnlA*. **a)** Séquence nucléotidique de l'exon 1 et le début de l'intron n°3 de *hydra NxnlA*. La flèche rose symbolise la localisation de l'amorce sens et la flèche bleue symbolise la localisation de l'amorce antisens utilisées pour tester la rétention de l'intron n°3. Le rectangle en pointillés rouges représente le premier codon-stop en phase de lecture retrouvé dans l'intron n°3. **b)** Amplification par RT-PCR du fragment sélectionné à partir d'ADN complémentaire et d'ADN génomique d'hydre. Le témoin -RT représente l'expérience où la transcriptase reverse n'a pas été ajoutée lors de la reverse transcription.

L'étude de la rétention de l'intron n°4, basée sur le même principe que les 3 expériences précédentes, démontre que le fragment attendu de 790 pb est amplifié à partir de l'ADNg mais aussi à partir de l'ADNc. Aucune amplification n'est observée pour le témoin négatif qui représente l'expérience pour laquelle la reverse transcriptase n'est pas ajoutée lors de l'expression de cet ADNc. Cette amplification à partir de l'ADNc d'hydre est bien spécifique et pas issue d'une éventuelle contamination par de l'ADN génomique (**Fig. 65**).

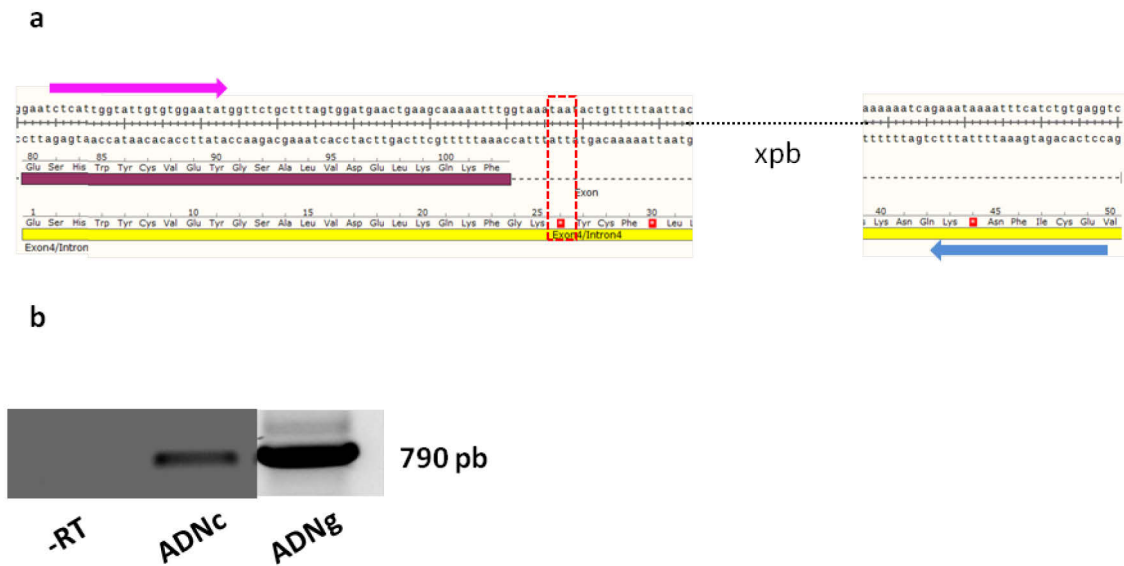


Figure 65: Analyse de la rétention de l'intron n°4 du gène *hydra NxnlA*. **a)** Séquence nucléotidique de l'exon 4 et le début de l'intron n°4 de *hydra NxnlA*. La flèche rose symbolise la localisation de l'amorce sens et la flèche bleue symbolise la localisation de l'amorce antisens utilisées pour tester la rétention de l'intron n°4. Le rectangle en pointillés rouges représente le premier codon-stop en phase de lecture retrouvé dans l'intron n°4. **b)** Amplification par RT-PCR du fragment sélectionné à partir d'ADN complémentaire et d'ADN génomique d'hydre. Le témoin -RT représente l'expérience où la transcriptase reverse n'a pas été ajoutée lors de la reverse transcription.

Le gène *hydra NxnlA* est alternativement épissé, l'intron n°4 de ce gène est retenu alors que l'intron n°5, tout comme le n°1, 2 et 3 n'est pas retenu (**Fig. 66**).

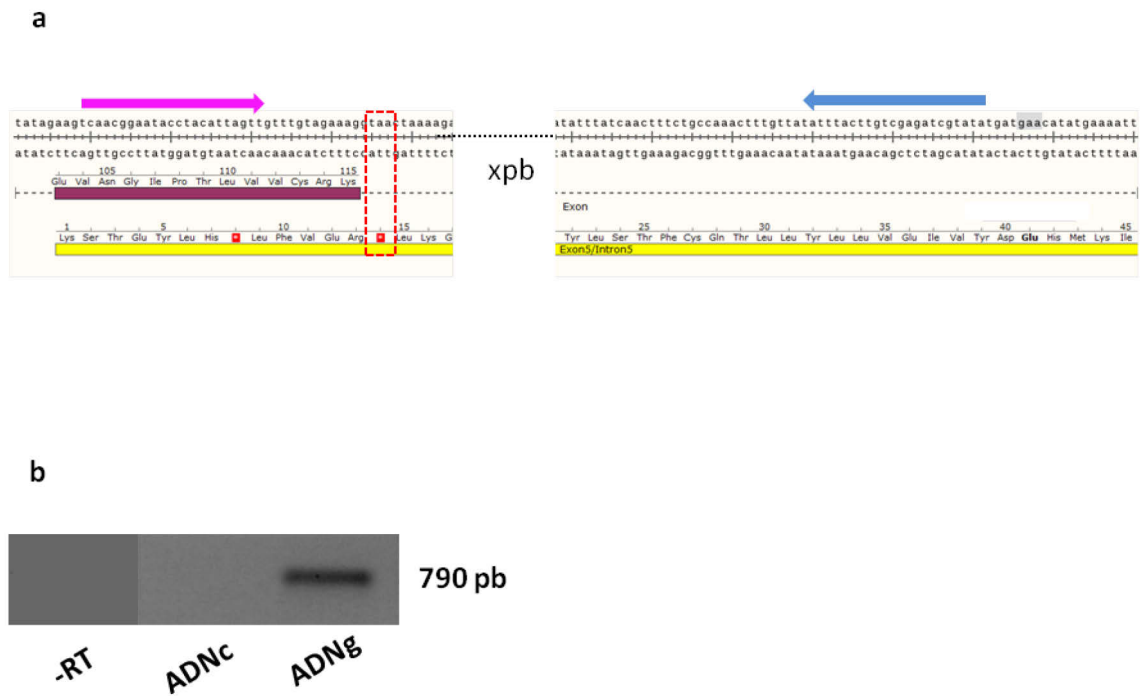


Figure 66: Analyse de la rétention de l'intron n°5 du gène *hydra Nxnla*. **a)** Séquence nucléotidique de l'exon 5 et le début de l'intron n°5 de *hydra Nxnla*. La flèche rose symbolise la localisation de l'amorce sens et la flèche bleue symbolise la localisation de l'amorce antisens utilisées pour tester la rétention de l'intron n°5. Le rectangle en pointillés rouges représente le premier codon-stop en phase de lecture retrouvé dans l'intron n°5. **b)** Amplification par PCR du fragment sélectionné à partir d'ADN complémentaire et d'ADN génomique d'hydre. Le témoin -RT représente l'expérience où la reverse transcriptase n'a pas été ajoutée lors de la reverse transcription.

De la même manière, nous décidons d'investiguer la rétention des 5 introns du gène *hydra Nxnlb* afin d'identifier si l'un d'entre eux serait retenu lors de l'épissage alternatif de ce gène. Tout comme pour le gène *hydra Nxnla*, hormis l'intron n°4 tous les autres introns de *hydra Nxnlb* ne sont pas retenus (**Fig. 67, 68, 69, 70 et 71**).

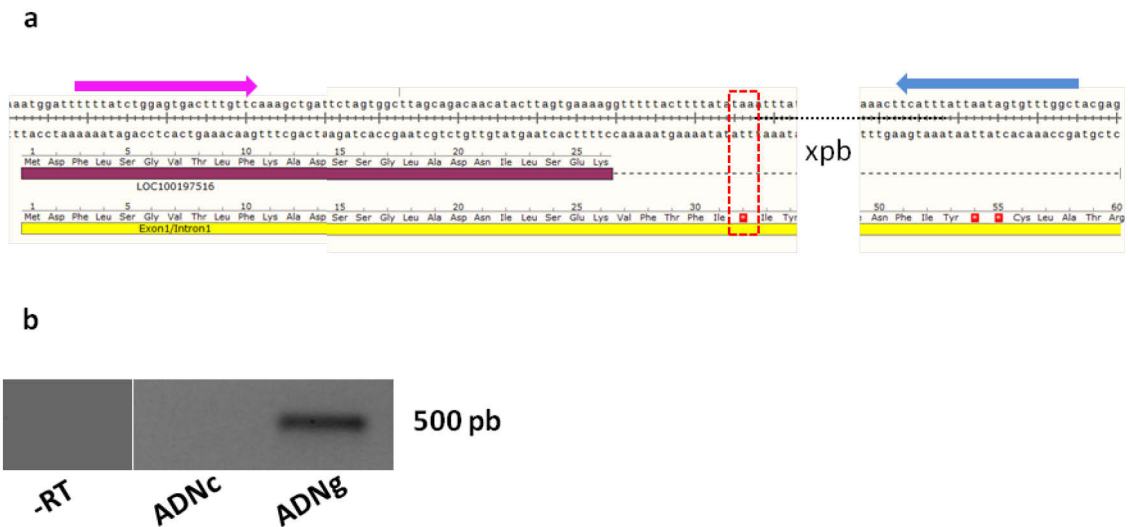


Figure 67: Analyse de la rétention de l'intron n°1 du gène *hydra Nxn1b*. a) Séquence nucléotidique de l'exon 1 et le début de l'intron n°1 de *hydra Nxn1b*. La flèche rose symbolise la localisation de l'amorce sens et la flèche bleue symbolise la localisation de l'amorce antisens utilisées pour tester la rétention de l'intron n°1. Le rectangle en pointillés rouges représente le premier codon-stop en phase de lecture retrouvé dans l'intron n°1. b) Amplification par PCR du fragment sélectionné à partir d'ADN complémentaire et d'ADN génomique d'hydre. Le témoin -RT représente l'expérience où la reverse transcriptase n'a pas été ajoutée lors de la reverse transcription.

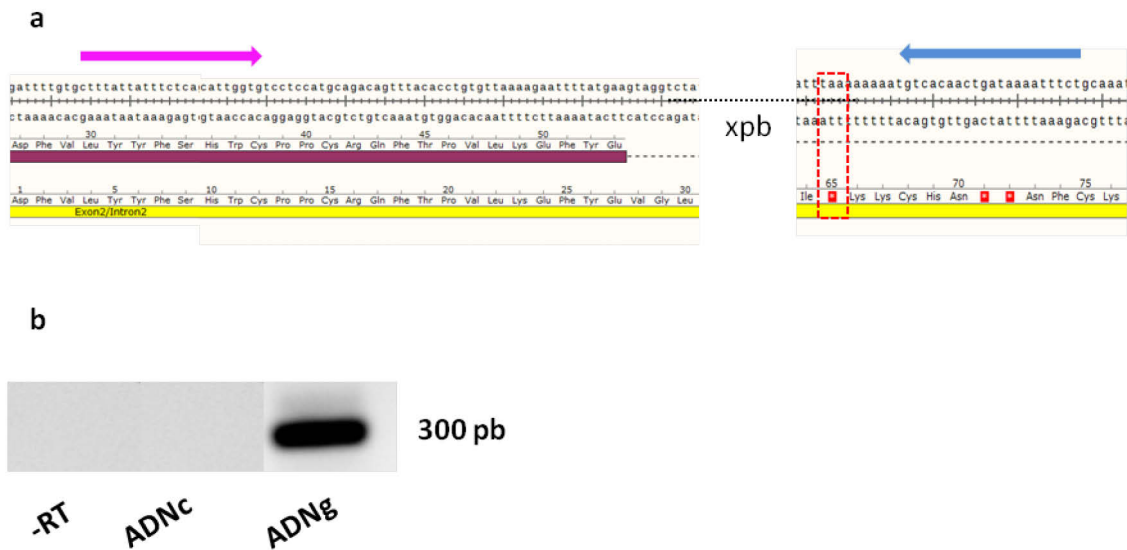


Figure 68: Analyse de la rétention de l'intron n°2 du gène *hydra Nxn1b*. a) Séquence nucléotidique de l'exon 2 et le début de l'intron n°2 de *hydra Nxn1b*. La flèche rose symbolise la localisation de l'amorce sens et la flèche bleue symbolise la localisation de l'amorce antisens utilisées pour tester la rétention de l'intron n°2. Le rectangle en pointillés rouges représente le premier codon-stop en phase de lecture retrouvé dans l'intron n°2. **b)** Amplification par RT-PCR du fragment sélectionné à partir d'ADN complémentaire et d'ADN génomique d'hydre. Le témoin -RT représente l'expérience où la transcriptase reverse n'a pas été ajoutée lors de la reverse transcription.

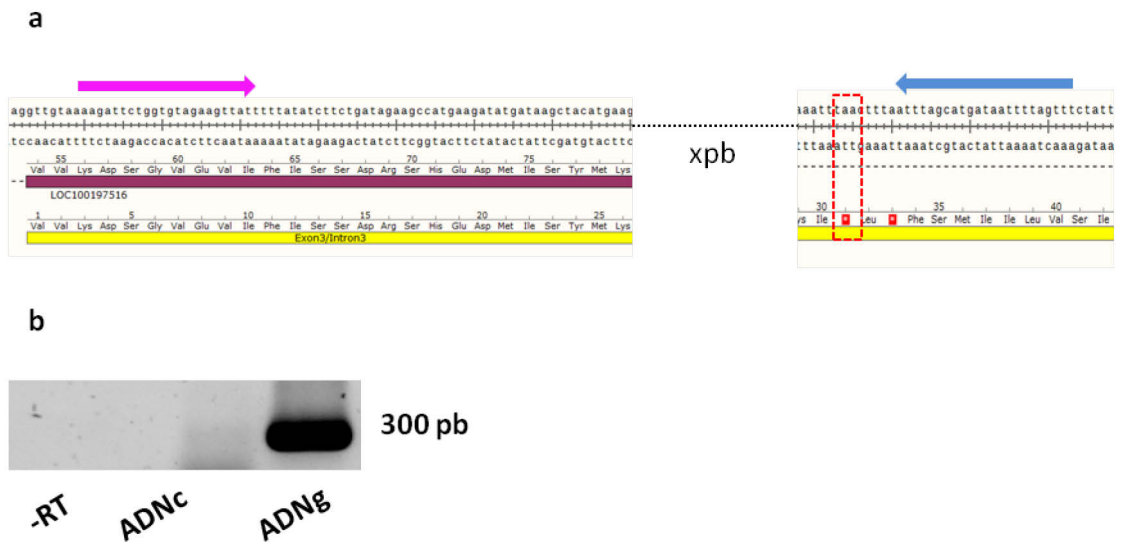


Figure 69: Analyse de la rétention de l'intron n°3 du gène *hydra Nxn1b*. **a)** Séquence nucléotidique de l'exon 3 et le début de l'intron n°3 de *hydra Nxn1b*. La flèche rose symbolise la localisation de l'amorce sens et la flèche bleue symbolise la localisation de l'amorce antisens utilisées pour tester la rétention de l'intron n°3. Le rectangle en pointillés rouges représente le premier codon-stop en phase de lecture retrouvé dans l'intron n°3. **b)** Amplification par RT-PCR du fragment sélectionné à partir d'ADN complémentaire et d'ADN génomique d'hydre. Le témoin -RT représente l'expérience où la transcriptase reverse n'a pas été ajoutée lors de la reverse transcription.

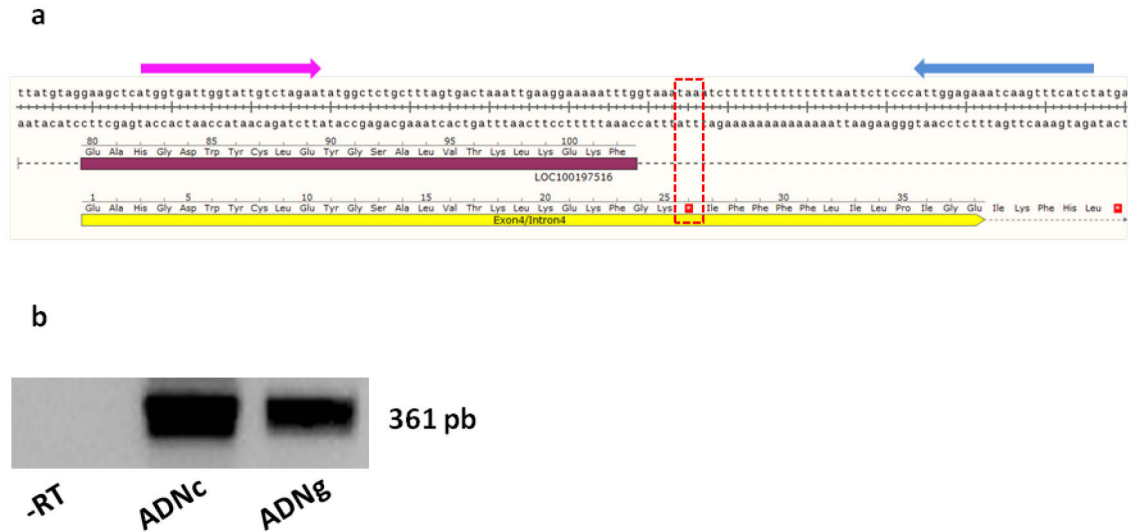


Figure 70: Analyse de la rétention de l'intron n°4 du gène *hydra Nxnlb*. **a)** Séquence nucléotidique de l'exon 4 et le début de l'intron n°4 de *hydra Nxnlb*. La flèche rose symbolise la localisation de l'amorce sens et la flèche bleue symbolise la localisation de l'amorce antisens utilisées pour tester la rétention de l'intron n°4. Le rectangle en pointillés rouges représente le premier codon-stop en phase de lecture retrouvé dans l'intron n°4. **b)** Amplification par RT-PCR du fragment sélectionné à partir d'ADN complémentaire et d'ADN génomique d'hydre. Le témoin -RT représente l'expérience où la transcriptase reverse n'a pas été ajoutée lors de la reverse transcription.



Figure 71: Analyse de la rétention de l'intron n°5 du gène *hydra Nxnlb*. **a)** Séquence nucléotidique de l'exon 5 et le début de l'intron n°5 de *hydra Nxnlb*. La flèche rose symbolise la localisation de l'amorce sens et la flèche bleue symbolise la localisation de l'amorce antisens utilisées pour tester la rétention de l'intron n°5. Le rectangle en pointillés rouges représente le premier codon-stop en phase de lecture retrouvé dans l'intron n°5. **b)** Amplification par RT-PCR du fragment sélectionné à partir d'ADN complémentaire et d'ADN génomique d'hydre. Le témoin -RT représente l'expérience où la transcriptase reverse n'a pas été ajoutée lors de la reverse transcription.

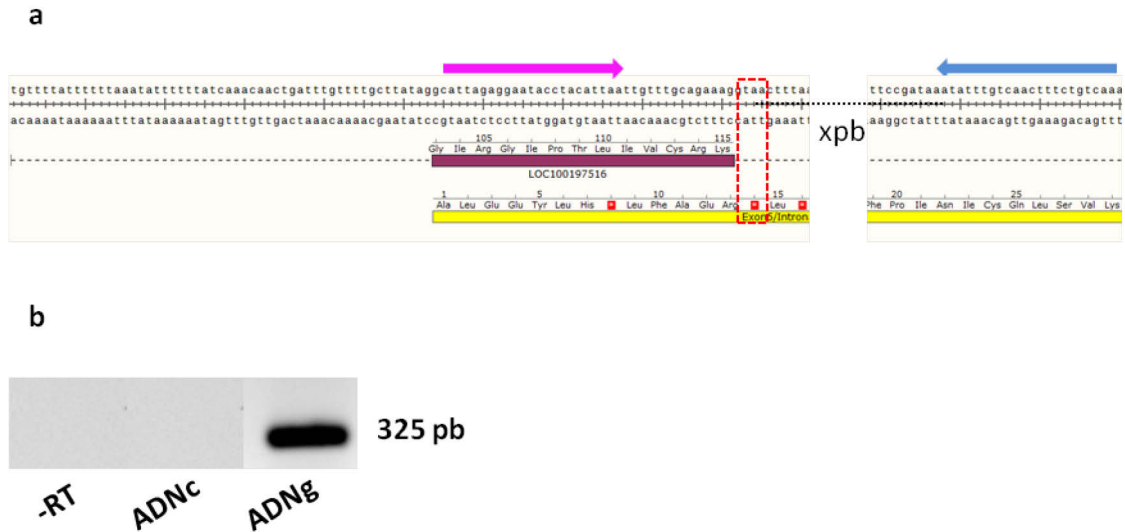


Figure 71: Analyse de la rétention de l'intron n°5 du gène *hydra Nxn1b*. **a)** Séquence nucléotidique de l'exon 5 et le début de l'intron n°5 de *hydra Nxn1b*. La flèche rose symbolise la localisation de l'amorce sens et la flèche bleue symbolise la localisation de l'amorce anti sens utilisées pour tester la rétention de l'intron n°5. Le rectangle en pointillés rouges représente le premier codon-stop en phase de lecture retrouvé dans l'intron n°5. **b)** Amplification par RT-PCR du fragment sélectionné à partir d'ADN complémentaire et d'ADN génomique d'hydre. Le témoin -RT représente l'expérience où la transcriptase reverse n'a pas été ajoutée lors de la reverse transcription.

De manière intéressante, la séquence protéique codée par les exons n°1, n°2, n°3 et n°4 de *hydra Nxn1a* et *hydra Nxn1b* s'élève à 102 acides aminés, or RdCVF chez l'humain est une protéine composée de 109 acides aminées. Alors que l'hydre ne possède pas de rétine, ni de cellules neuronales de type photorécepteurs à bâtonnets, un épissage alternatif des deux gènes ancestraux *hydra Nxn1a* et *hydra Nxn1b* a lieu. Cet épissage alternatif qui est en réalité un défaut d'épissage et qui entraîne la rétention de l'intron, identifié jusqu'à présent uniquement chez les organismes possédant une rétine existe aussi chez l'hydre. Tout comme chez la souris ou l'Homme, deux messagers codés par chacun des gènes ancestraux *hydra Nxn1a* et *hydra Nxn1b* chez l'hydre sont exprimés. Est-ce que l'un exprimerait une protéine courte de type facteur trophique et le deuxième une protéine plus longue qui serait impliquée dans la défense contre le stress oxydatif ? Est-ce que le messager qui code pour le facteur trophique est plus exprimé dans la tête de l'hydre où se trouvent les cellules photosensibles ? Pour répondre à cette dernière question, nous réalisons des études d'expression de ce messager dans la tête et dans le

pied de l'hydre à partir des ARN utilisés pour les expériences décrites précédemment. Les résultats de cette analyse indiquent que les messagers qui codent pour *short hydra Nxnla* et *short hydra Nxnlb* sont environ 2 fois plus exprimés dans la tête de l'hydre que dans le pied de celle-ci (**Fig. 72 et 73**). Ce messager chez l'hydre coderait-il pour un facteur trophique avec un mode d'action et une signalisation identique à RdCVF chez les mammifères ?

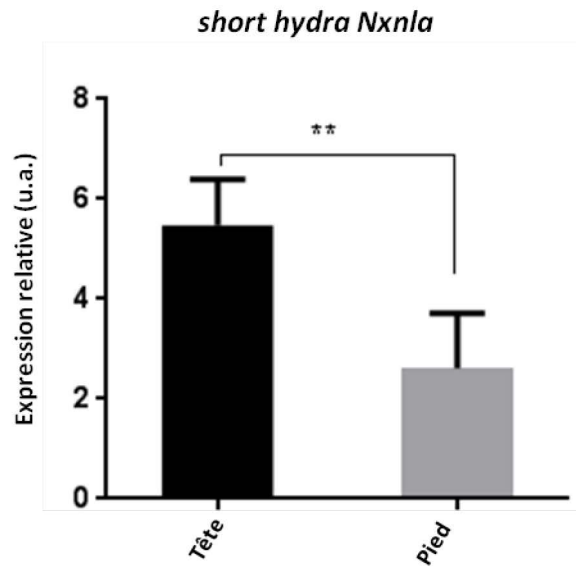


Figure 72: Expression *short hydra Nxnla* dans la tête et dans le pied de l'hydre. u.a: unité arbitraire.

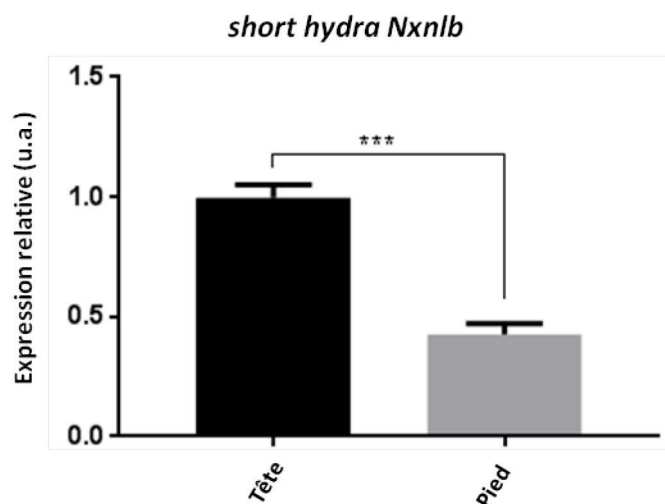


Figure 73: Expression *short hydra Nxnlb* dans la tête et dans le pied de l'hydre. u.a: unité arbitraire.

Alors qu'Hydra vulgaris ne possède pas d'œil mais est connue pour posséder une photosensibilité dermique, elle exprime l'ancêtre du gène NXNL1 connu pour jouer un rôle dans la vision. Jusqu'ici, ce gène était connu pour être exprimé dans la rétine des mammifères, avec 2 messagers, codant soit pour une thiorédoxine dans les photorécepteurs et soit pour un facteur trophique uniquement dans les bâtonnets. Quelle est la fonction à l'origine de ce gène ?

1.3: LES MESSAGERS CODES PAR *HYDRA NXNLA* ET PAR *HYDRA NXNLB* SONT-ILS TRADUITS EN PROTEINES?

Les résultats qui indiquent que l'hydre exprime les messagers *long hydra NxnlA* et *long hydra NxnlB* et *short hydra NxnlA* et *short hydra NxnlB*, sont surprenants. C'est pourquoi nous souhaitons maintenant vérifier si ces messagers sont traduits en protéine. Pour cela des lysats protéiques sont extraits d'hydres totales. Avec l'aide de la plateforme du laboratoire de spectrométrie de masse bioorganique (LSMBO) localisée à Strasbourg, des analyses de spectrométrie de masse sont réalisées à partir de ces extraits pour identifier les éventuels peptides correspondant à RdCVFa et b ou RdCVFLa et b de l'hydre que nous nommerons *hydraRdCVFa*, *hydraRdCVFb*, *hydraRdCVFLa* et *hydraRdCVFLb*. La spectrométrie de masse est une technique qui permet de retrouver la composition élémentaire d'une séquence peptidique après avoir déterminé la masse des molécules qui la composent. Les extraits protéiques sont déposés sur un gel d'acrylamide concentré à 15%, après leur migration, 17 bandes entre 10 et 100 kDa sont découpées sur toute la hauteur du gel (**Fig. 74**).

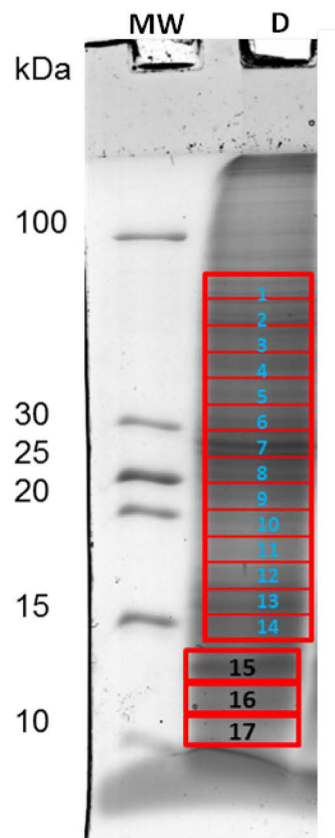


Figure 74: Dépôt sur gel des protéines d'hydre analysées par MS/MS. Le puits noté MW est le puits dans lequel le marqueur de taille est déposé et le puits D est le puits où le lysat protéique des hydres est déposé.

Sachant que les protéines *hydraRdCVFa* et *hydraRdCVFb* possèdent un poids moléculaire théorique de 11,8 kDa et que les protéines longues ou *hydraRdCVFLa* et *hydraRdCVFLb*, un poids moléculaire théorique de 15,9 kDa, c'est l'analyse de la bande n°15 localisée entre 10 et 15 kDa qui a permis d'obtenir le meilleur recouvrement peptidique des protéines ciblées. Même si les séquences peptidiques de ces quatre protéines sont très proches et que seuls quelques acides aminés diffèrent pour chacune des protéines (**Fig. 75a**), des peptides spécifiques de *hydraRdCVFLa* et *hydraRdCVFLb* ont clairement été identifiés. De plus, les peptides identifiés recouvrent la protéine *hydraRdCVFLa* de 62% et la protéine *hydraRdCVFLb* de 81%. Ces excellents résultats ne laissent aucun doute quant à l'expression de ces protéines par l'hydre. Quatre peptides de *hRdCVFa* ont été identifiés (**Fig. 75b**).

a

hRdCVFa long: N-ter-MEFVSGVTLYKADGSSGLAD**S**ILSEKDFVLYYFSAHWCPPCRQFTPVLKDFYEVV...
hRdCVFa court: N-ter-MEFVSGVTLYKADGSSGLAD**S**ILSEKDFVLYYFSAHWCPPCRQFTPVLKDFYEVV...
hRdCVFb long: N-ter-MDFLSGVTL**F**KADGSSGLAD**N**ILSEKDFVLYYFSAHWCPPCRQFTPVLKEFYEVV...
hRdCVFb court: N-ter-MDFLSGVTL**F**KADGSSGLAD**N**ILSEKDFVLYYFSAHWCPPCRQFTPVLKEFYEVV...

hRdCVFa long: ...KDSGLEIIFMSSDESQEDMINYMKE**SH**GDWYCVVEYGSALV**DELKQKFEV**NGIPTLVV...
hRdCVFa court: ...KDSGLEIIFMSSDESQEDMINYMKE**SH**GDWYCVVEYGSALV**DELKQKF**-C-ter
hRdCVFb long: ...KDSG**VEVIFISSDR**SHEDMISYMKE**AH**GDWYCLEYGSALV**TKLKEKFGIR**GIPTLIV...
hRdCVFb court: ...KDSG**VEVIFISSDR**SHEDMISYMKE**AH**GDWYCLEYGSALV**TKLKEKF**-C-ter

hRdCVFa long: ...CRKDG**SVINADANDDVCD**KEPSAL**FAEWKNQK**-C-ter
hRdCVFa court
hRdCVFb long: ...CRKDGSLVT**SSGRNHVSE**KEPSA**AVADWRK**-C-ter
hRdCVFb court

b

hRdCVFa long: N-ter-MEFVSGVTLYK**ADGSSGLAD**SILSEKDFVLYYFSAHWCPPCRQFTPVLKDFYEVV...
hRdCVFa court: N-ter-MEFVSGVTLYKADGSSGLAD**S**ILSEKDFVLYYFSAHWCPPCRQFTPVLKDFYEVV...
hRdCVFb long: N-ter-MDFLSGVTL**F**KADGSSGLAD**N**ILSEKDFVLYYFSAHWCPPCRQFTPVLKEFYEVV...
hRdCVFb court: N-ter-MDFLSGVTL**F**KADGSSGLAD**N**ILSEKDFVLYYFSAHWCPPCRQFTPVLKEFYEVV

hRdCVFa long: ...KDSGLEIIFMSSDESQEDMINYMKE**ESH**GDWYCVVEYGSALV**DELKQKFEV**NGIPTLVV...
hRdCVFa court: ...KDSGLEIIFMSSDESQEDMINYMKE**ESH**GDWYCVVEYGSALV**DELKQKF**-C-ter
hRdCVFb long: ...KDSG**VEVIFISSDR**SHEDMISYMKE**AH**GDWYCLEYGSALV**TKLKEKFGIR**GIPTLIV...
hRdCVFb court: ...KDSG**VEVIFISSDR**SHEDMISYMKE**AH**GDWYCLEYGSALV**TKLKEKF**-C-ter

hRdCVFa long: ...CRKDG**SVINADANDDVCD**KEPSAL**FAEWKNQK**-C-ter
hRdCVFa court
hRdCVFb long: ...CRKDGSLVT**SSGRNHVSE**KEPSA**AVADWRK**-C-ter
hRdCVFb court

Figure 75: Séquences peptidiques des protéines hydra RdCVFa et b. a) Les acides aminés différents de hydra RdCVFa et hydra RdCVFb sont indiqués en rouge. **b)** Les peptides colorés représentent les peptides identifiés.

Parmi ces 4 peptides, 2 sont communs aux deux protéines *hydra*RdCVFa et *hydra*RdCVFLa et sont représentés en rouge dans la figure 74b. Le peptide représenté en vert est spécifique de la forme longue. Le peptide « ESHGDWYCVVEYGSALVDELKQKFEVNGIPTLVVCR » qui comprend la jonction de la forme courte et longue de *hydra*RdCVFLa et qui est codé par la fin de de l'exon n°4 et le début de l'exon n°5 de *hydra* *Nxnla* a également été identifié (**Fig. 76**).

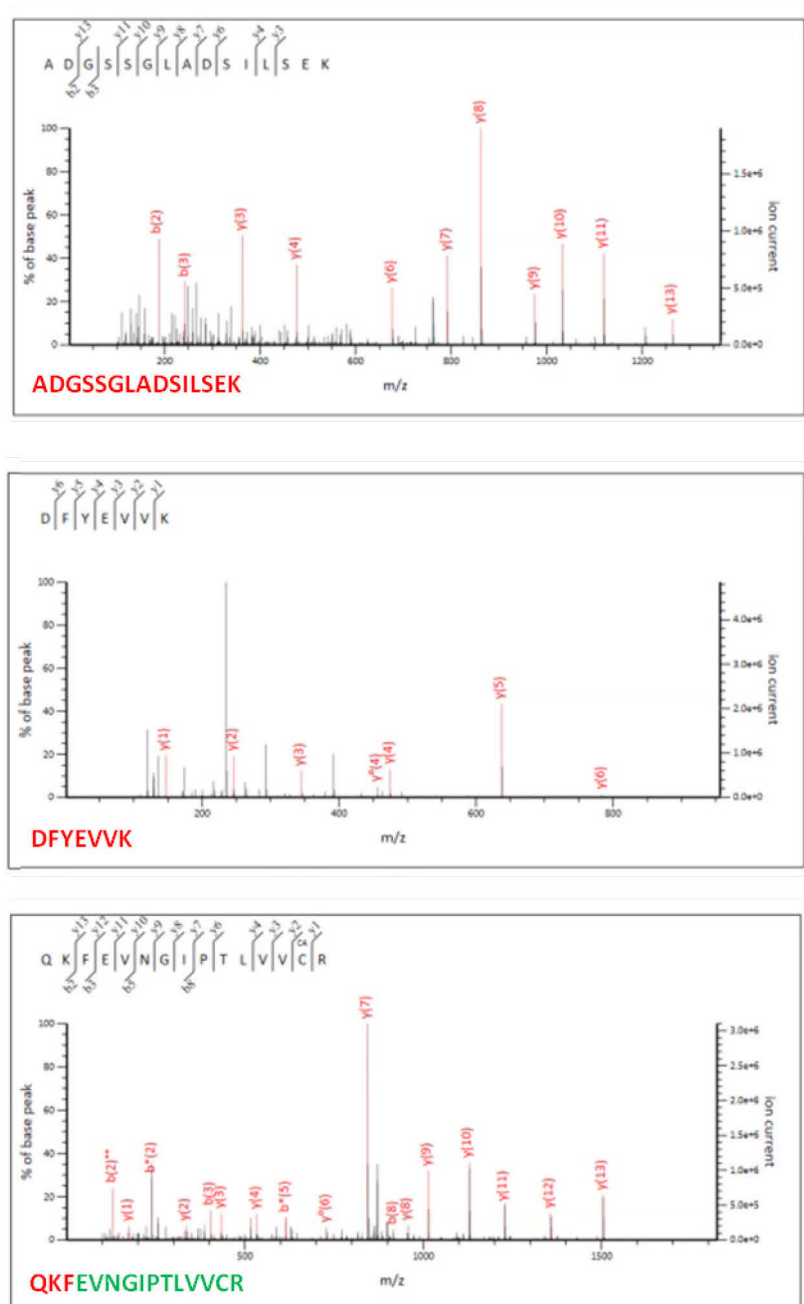


Figure 76: Spectres des peptides identifiés communs à hydra RdCVFa court et hydra RdCVFa long en rouge et spécifique de hydra RdCVFa long en vert.

Malgré ces résultats encourageants, l'identification de la protéine courte a échoué, certainement parce que le messenger *short hydra Nxnla* est significativement moins exprimé que le messenger *long hydra Nxnla*. En effet *short hydra Nxnla* est environ 3,5 fois moins exprimé dans l'hydre totale que *long hydra Nxnla* (**Fig. 77**).

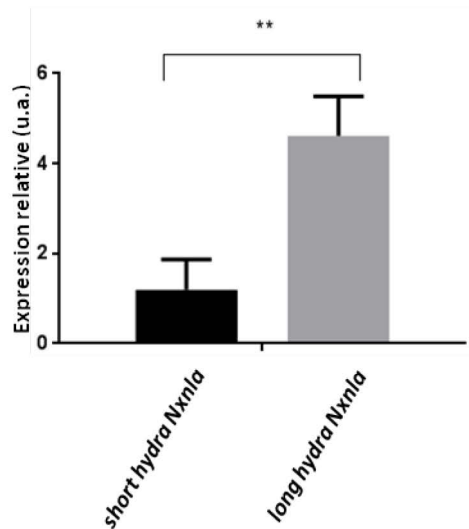


Figure 77: Expression du messenger *short hydra NxnlA* et *long hydra NxnlA* dans l'hydre totale. u.a: unité arbitraire.

Les peptides analysés en spectrométrie de masse sont produits par digestion par la trypsine qui est une enzyme connue pour digérer les liaisons peptidiques en C-terminal d'une arginine (R) ou d'une lysine (K). Comme indiqué dans la figure 75b, la partie C-terminale de la protéine *hydraRdCVFa* est constituée d'une lysine suivie par une phénylalanine (F). La digestion par la trypsine génère donc un seul fragment spécifique de cette protéine courte qui est composé que d'un unique acide aminé. En effet, le seul peptide qui diffère entre la protéine courte et longue codée par le gène *hydra NxnlA* est composé par l'unique acide aminé F, or en spectrométrie de masse, l'identification d'un seul acide aminé est quasiment impossible. Deux peptides communs aux deux protéines *hydraRdCVFb* et *hydraRdCVFLb* ont été identifiés et sont représentés en violet dans la figure 75b et 2 peptides spécifiques de la forme longue sont représentés en rose dans la figure 75b (**Fig. 78**).

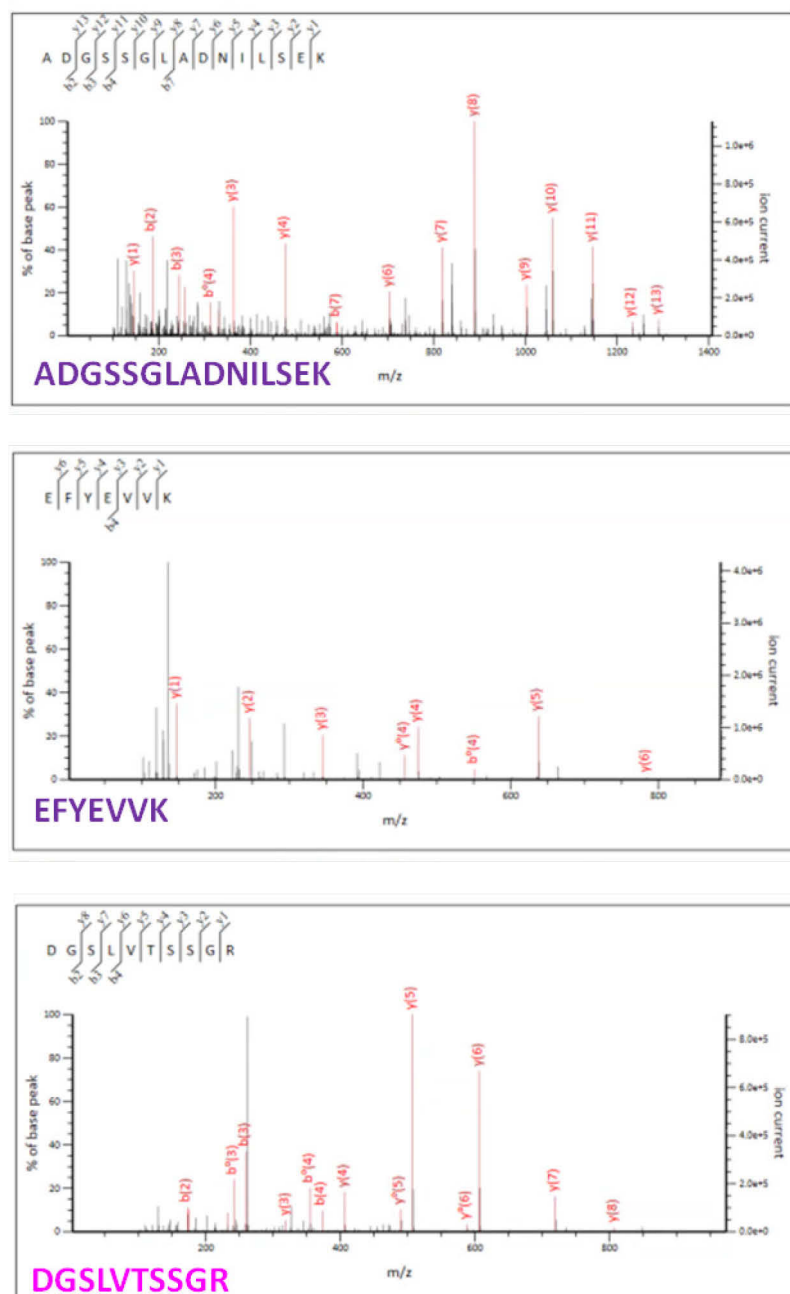


Figure 78: Spectres des peptides identifiés communs à *hydra* RdCVFb court et *hydra* RdCVFb long en violet et spécifique de *hydra* RdCVFb long en rose

Tout comme pour *hydra*RdCVFa, les résultats de cette expérience n'ont pas permis l'identification de *hydra*RdCVFb. Les explications de cet échec sont les mêmes que celles évoquées précédemment. Toutefois, la différence d'expression entre le messager *long hydra* *Nxn1b* et *short hydra* *Nxn1b* est beaucoup plus importante que celle entre le

messenger *long hydra Nxnla* et *short hydra Nxnla* entraînant certainement un masquage du signal de la protéine *hydraRdCVFb* par *hydraRdCVFLb* (**Fig. 79**).

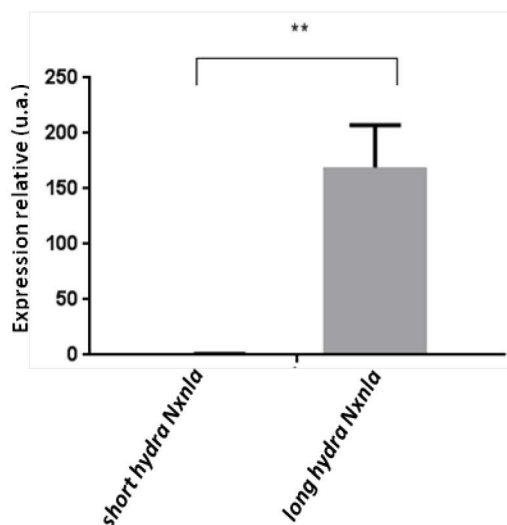


Figure 79: Expression du messenger *short hydra Nxnla* et *long hydra Nxnla* dans l'hydre totale. u.a: unité arbitraire.

Nous n'avons pas réussi à prouver par spectrométrie de masse que la rétention de l'intron n°4 lors de l'épissage alternatif des gènes *hydra Nxnla* et *b* chez *Hydra vulgaris* produit un ARNm codant pour les protéines *hydraRdCVFa* et *hydraRdCVFb*. Est-ce parce que ce messenger qui présente un codon stop pourrait induire le mécanisme de *nonsense mediated decay* (NMD)? Le NMD est un mécanisme qui détruit l'ARN lorsque celui-ci présente un codon stop prématuré, empêchant l'accumulation de protéines tronquées dans la cellule. Cependant, ayant amplifié ces messagers cet argument peut donc être écarté. C'est pourquoi, à ce stade de notre étude, nous pensons qu'il est tout de même important d'investiguer si les messagers *short hydra Nxnla* et *b* exprimés chez l'hydre qui ne possède pas de système visuel de type œil sont traduits en protéines. La technologie de la spectrométrie de masse n'ayant pas apporté d'éléments de réponse à cette question, nous décidons de répondre à cette question par une stratégie alternative. Pour cela, nous décidons de produire des anticorps capables de reconnaître les protéines *hydraRdCVFa* et *hydraRdCVFb* et les protéines *hydraRdCVFLa* et *hydraRdCVFLb* chez l'hydre. Cette stratégie se base sur celle qui nous avait permis de mettre en évidence l'expression de la protéine RdCVF et RdCVFL chez la souris dans

les travaux de l'équipe publiés en 2004 (Léveillard et al., 2004). Pour cela, les structures tertiaires de *hydraRdCVFLa* et *hydraRdCVFLb* et celles de *RdCVFL* de souris sont modélisées et comparées (**Fig. 80**).

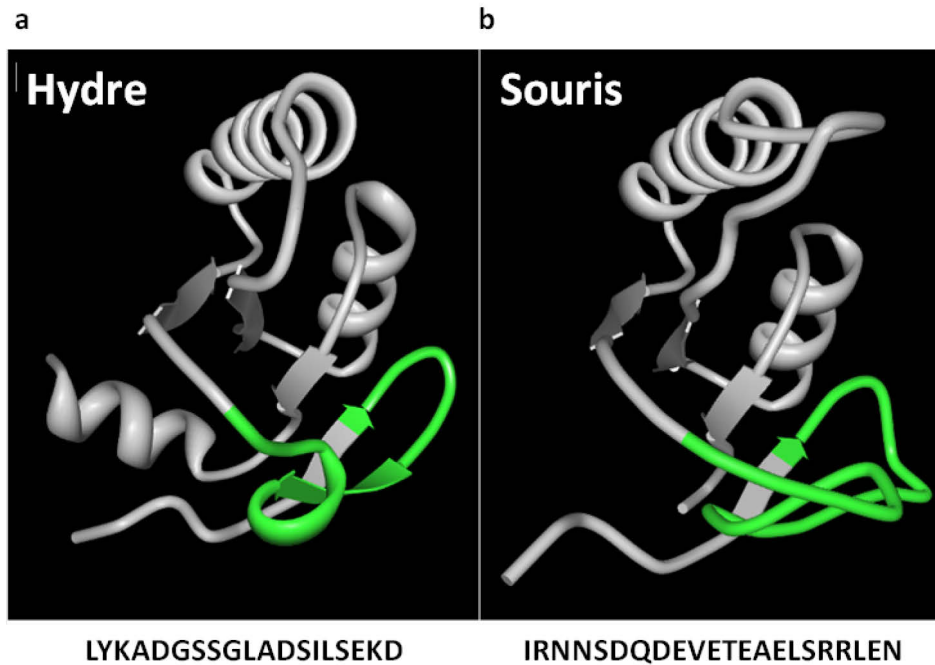


Figure 80: Structure tertiaire des protéines, a) *hydraRdCVF* et b) *MusRdCVF*. En vert est représenté l'épitope sélectionné pour être reconnu par les anticorps produits. La séquence de chacun des épitopes représentés en vert est indiquée. Mus: *Mus musculus*.

À partir de ces structures tertiaires, l'épitope de *hydraRdCVFa* de l'hydre exposé à la surface de la protéine, identiquement à celui ciblé pour produire les anticorps de souris est sélectionné. Il est représenté en vert dans la figure 80. La séquence du peptide sélectionné est LYKADGSSGLADSILSEKD. Ce peptide est codé par *hydraRdCVFa* et *hydraRdCVFLa* et est légèrement différent de celui codé par *hydraRdCVFb* et *hydraRdCVFLb*. Ce choix s'explique par le fait que la différence d'expression entre le messenger *short hydra Nxnla* et *long hydra Nxnla* est moins importante que celle entre *short hydra Nxnlb* et *long hydra Nxnlb* (**Fig. 77 et 79**). La probabilité que les anticorps produits à partir de ce peptide reconnaissent les deux protéines *hydraRdCVFa* et *hydraRdCVFLa* est plus importante que ceux qui seraient spécifiques de *hydraRdCVFb* et *hydraRdCVFLb*. Toutefois, ces anticorps produits reconnaîtront aussi très

certainement les protéines *hydraRdCVFb* et *hydraRdCVFLb* car la différence qu'il existe entre les deux peptides ciblés repose uniquement sur deux acides aminés, une phénylalanine (F) et une asparagine (N) (**Fig. 81**).

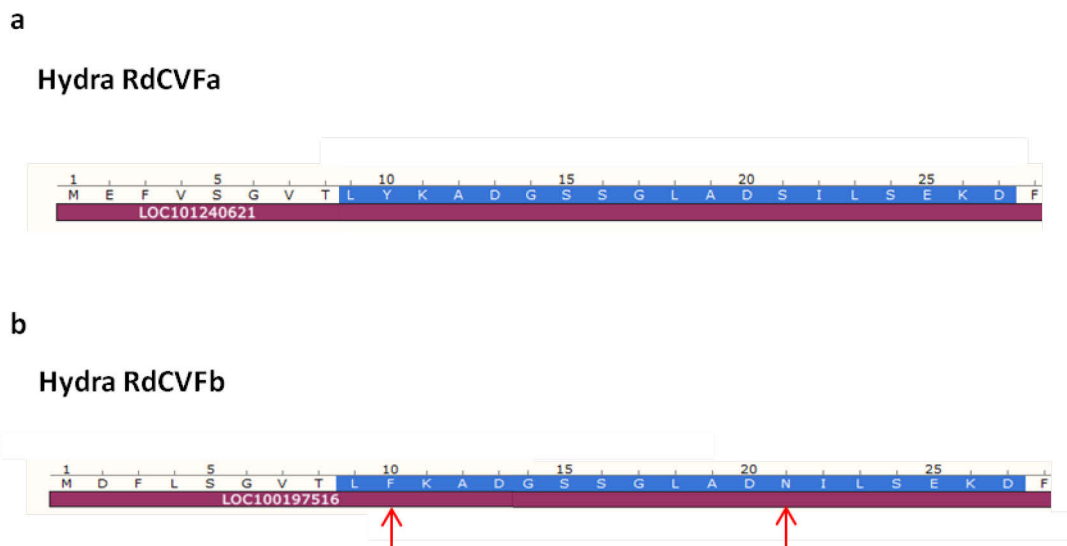


Figure 81: Séquence peptidique des épitopes reconnus par les anticorps polyclonaux produits de **a)** *hydraRdCVFa* et *hydraRdCVFLa* et **b)** *hydraRdCVFb* et *hydraRdCVFLb*. Les flèches rouges représentent les acides aminés qui diffèrent entre les protéines.

Le peptide est localisé dans la partie N terminale qui est commune aux deux protéines courte et longue, les anticorps produits reconnaîtront bien *hydraRdCVFa* et *hydraRdCVFLa* et peut-être *hydraRdCVFb* et *hydraRdCVFLb*. Avant l'immunisation de deux lapins par le peptide sélectionné pour la production des anticorps, leurs sérums ont été prélevés et annotés saignée ou *bleed PN0*. Ensuite, après leur immunisation par le peptide, le sérum de ces lapins a été prélevé 28 jours plus tard et notés *bleed PN28*, 56 jours plus tard et notés *bleed PN56* et 70 jours plus tard et notés *bleed PN70*. Dans la but d'identifier lequel des *bleeds* prélevés a produit le plus d'anticorps spécifiques, un *western blot* est réalisé à partir d'extraits protéiques totaux d'hydre. Aucun signal n'est identifié lorsque le *bleed PN0* qui correspond au sérum pré-immunisé est testé, confirmant que les signaux détectés par les autres *bleeds* sont spécifiques des anticorps produits par les lapins (**Fig. 82**).

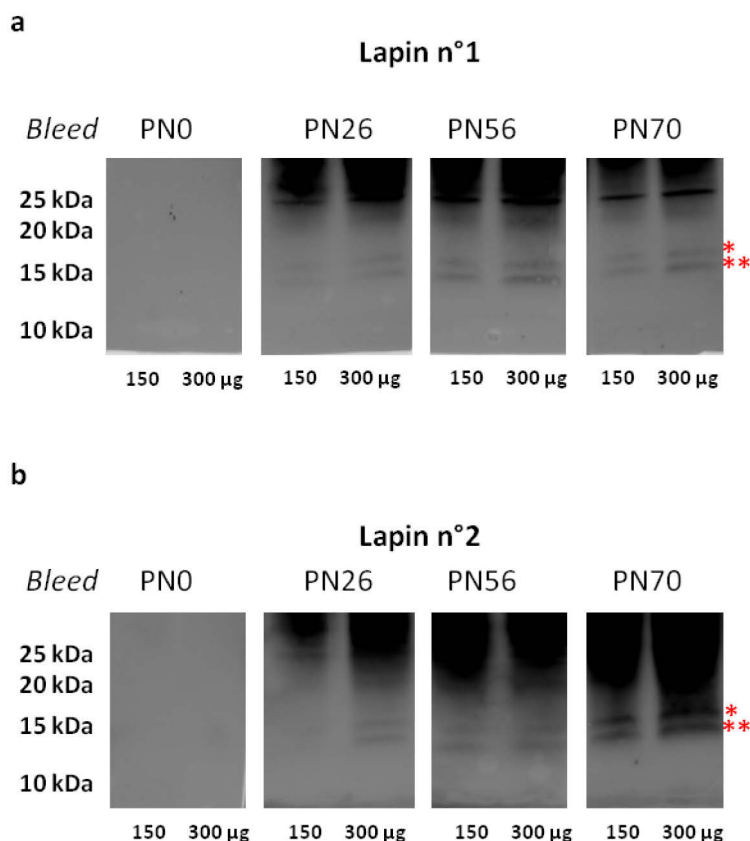


Figure 82: Validation des saignées pour la purification des anticorps. a) saignées issues du lapin n°1 et b) saignées s issues du lapin n°2.

La protéine indiquée par l'astérisque dans la figure 81 qui a migré à environ 15,9 kDa pourrait correspondre aux protéines *hydraRdCVFLa* et *hydraRdCVFLb* attendues à cette position. Les protéines *hydraRdCVFa* et *hydraRdCVFb*, attendues à 11,8 kDa pourraient correspondre au signal protéique indiqué par les 2 astérisques. Notons que les protéines retrouvées ont plutôt migré à une taille plus grande que celle attendue et d'environ 15 kDa. Le gel utilisé pour cette analyse est concentré à 20%, ce qui pourrait expliquer le retard de migration de cette protéine courte et pourquoi nous la retrouvons à cette taille supérieure à celle attendue. Dans les prochaines expériences, nous utiliserons un gel de 12% et le tampon de migration MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid) recommandé par le fournisseur ThermoFisher dans le but de mieux séparer les protéines entre 10 et 15 kDa (**Fig. 83**).

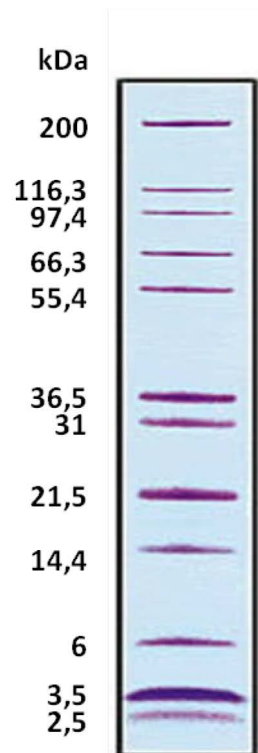


Figure 83: Migration du marqueur de taille Mark 12™ Unstained Standard sur un gel NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris et dans un tampon MES

Les expériences suivantes consistent à tester l'efficacité des anticorps purifiés par affinité à l'aide du peptide et à partir des bleed *PN70* des deux lapins que nous avons validé (**Fig. 84**).

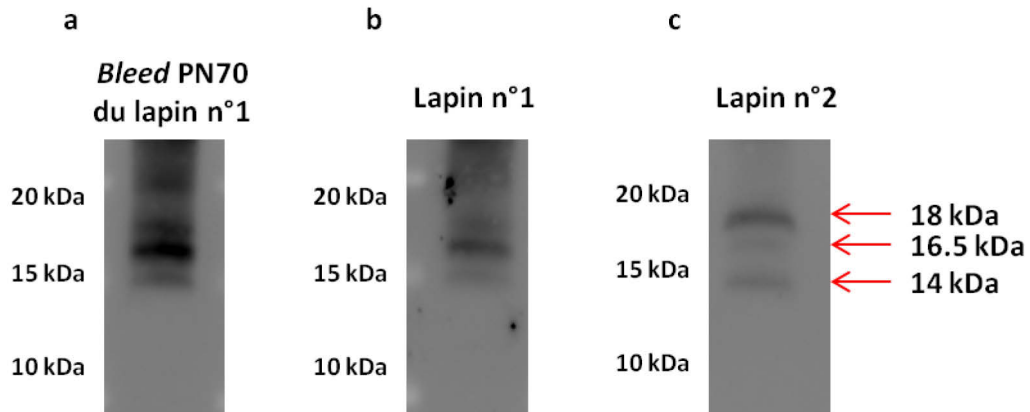


Figure 84: Identification des anticorps anti-hydra RdCVF a et b les plus affins. a) Le bleed PN70 du lapin n°1 est utilisé comme contrôle. b) Test des anticorps purifiés à partir du bleed PN70 du lapin n°1. c) Test des anticorps purifiés à partir du *bleed* PN70 du lapin n°2.

Le résultat de ce *western blot* indique que les anticorps purifiés détectent moins de signal non spécifique au dessus de 20 kDa, mais également 3 protéines à environ 14 kDa, 16,5 kDa et 18 kDa. Malheureusement le gel 12% ne nous a pas permis de mieux séparer les protéines reconnues par l'anticorps. Cependant, tout comme lors de l'utilisation du *bleed PN70*, la bande qui ressort à 14 kDa pourrait représenter *hydraRdCVFa* et *hydraRdCVFb* théoriquement attendus à 11,8 kDa et la bande identifiée à 16,5 kDa correspondrait à *hydraRdCVFLa* et *hydraRdCVFLb*, attendue à 15,9 kDa. Les anticorps purifiés à partir du lapin n°1 montre que l'expression des protéines *hydraRdCVFLa* et *hydraRdCVFLb* de 16,5 kDa est plus importante que celle de *hydraRdCVFa* et *hydraRdCVFb* de 14 kDa. Ces résultats corrént avec ceux qui indiquent que les messagers *long hydra Nxnla* et *long hydra Nxnlb* sont plus exprimés que les messagers *court hydra Nxnla* et *court hydra Nxnlb* (**Fig. 77 et 79**). Le signal retrouvé à 18 kDa correspond à un signal non spécifique. Les anticorps purifiés à partir du lapin n°2, montrent que les protéines à 14 kDa et 18 kDa sont plus exprimées que celle de 16,5 kDa. Pour ces raisons, nous décidons de nous concentrer et de valider dans un premier temps les anticorps purifiés à partir du lapin n°1. Pour vérifier la spécificité de ces anticorps produits et purifiés, des protéines recombinantes *hydraRdCVFa* et *hydraRdCVFb*, et *hydraRdCVFLa* et *hydraRdCVFLb* sont produites. Pour cela, des vecteurs qui expriment le transgène qui code pour chacune de ces protéines sont construits et utilisés pour transfecter des cellules HEK293 dont les lysats protéiques sont

par la suite préparés. Un *western blot* est réalisé à l'aide des anticorps anti-*hydraRdCVF* purifiés à partir du lapin n°1. Les transgènes qui codent pour *hydraRdCVFa* et *hydraRdCVFLa* sont suivis du tag HA dont la séquence peptidique est YPYDVPDYA, alors que ceux qui codent pour *hydraRdCVFb* et *hydraRdCVFLb* sont suivis par le tag V5 dont la séquence est G K P I P N P L L G L D S T (**Fig. 85**).

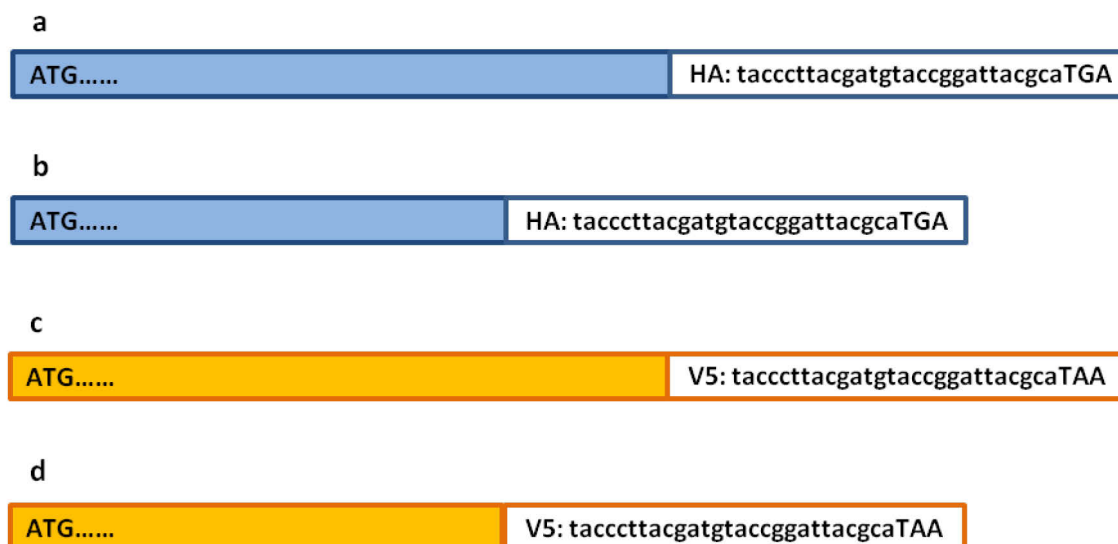


Figure 85: Représentation schématique des transgènes qui codent pour a) hRdCVFa court suivi d'un tag HA, b) hRdCVFa long suivi d'un tag HA, c) hRdCVFb court suivi d'un tag V5, d) hRdCVFb long suivi d'un tag V5.

Quarante μg de lysats protéiques sont déposés sur un gel d'électrophorèse et un *western blot* à l'aide des anticorps purifiés est réalisé ainsi qu'avec les anticorps anti HA et anti V5 (**Fig. 86**).

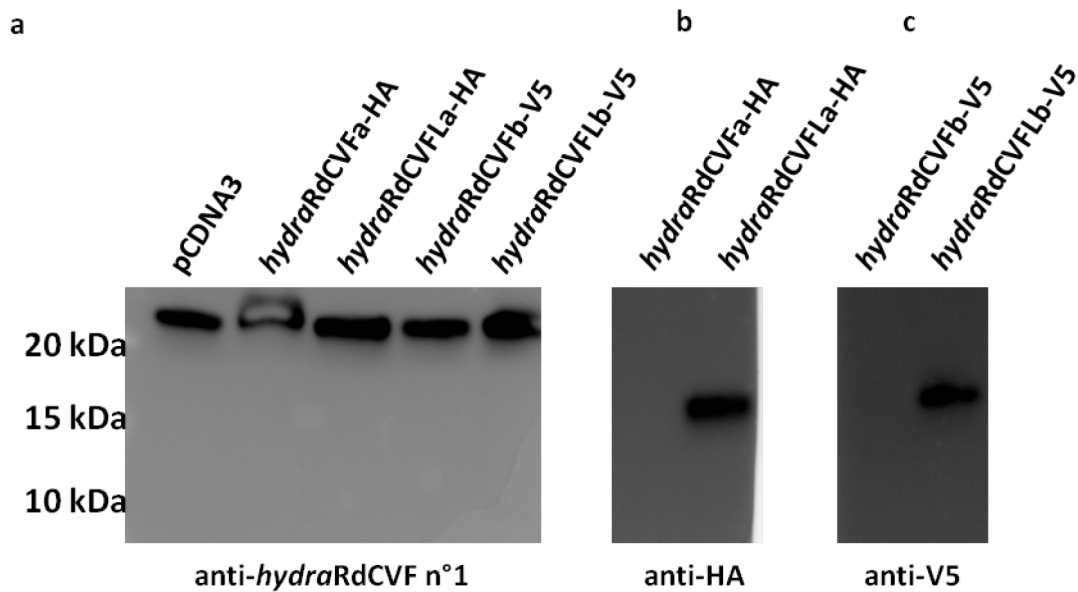


Figure 86: Validation des anticorps purifiés à partir du *bleed PN 70* du lapin n°1. Western blot de lysats protéiques issus de cellules HEK293 transfectées par le plasmide pCDNA3 seul, par le plasmide qui code pour le transgène *hydraRdCVFa-HA*, le transgène *hydraRdCVFLa-HA*, le transgène *hydraRdCVFb-V5* et le transgène *hydraRdCVFLb-V5* et révélé à l'aide de l'anticorps a) anti-*hydraRdCVF* issue du lapin n°1, b) anti-HA et c) anti-V5.

Les résultats de cette expérience indiquent que les anticorps purifiés ne détectent pas les protéines *hydraRdCVFa*, *hydraRdCVFb*, *hydraRdCVFLa* et *hydraRdCVFLb* mais détectent une protéine non spécifique de plus de 20 kDa. Toutefois ces résultats négatifs ne sont pas la conséquence d'une absence d'expression des transgènes car la révélation à l'aide des anticorps anti HA et anti V5 indiquent la présence des protéines *hydraRdCVFLa* et *hydraRdCVFLb* codées par leurs transgènes respectifs. Cependant, ces révélations à l'aide des anticorps anti HA et anti V5 ne permettent pas d'identifier l'expression des protéines *hydraRdCVFa* et *hydraRdCVFb*. L'instabilité de ces protéines ou leur complète sécrétion par les cellules HEK293 pourraient expliquer ces résultats négatifs. Ces nouveaux résultats relancent de nouveau la question posée concernant la traduction ou pas des messages qui codent pour *hydraRdCVFa* et *hydraRdCVFb* chez l'hydre. Ces expériences ne valident pas l'efficacité de ces

anticorps purifiés, c'est pourquoi nous avons décidé de renouveler leur production par un autre prestataire.

*Bien que l'hydre exprime les messagers short hydra *Nxnla* et *b* et long hydra *Nxnla* et *b*, seule la traduction des protéines *hydraRdCVFLa* et *hydraRdCVFLb* a été mise en évidence. La question qui concerne la traduction des messagers short hydra *Nxnla* et *b* demeure non résolue. Quelle est la fonction des protéines *hydraRdCVFLa* et *hydraRdCVFLb* chez un organisme ancêtre qui ne possède pas de système visuel ? Est-ce qu'à l'origine ces protéines jouaient un rôle de protection contre le stress oxydatif dans tout l'organisme et que c'est seulement plus tard au cours de l'évolution qu'elles se sont spécialisées dans la vision?*

1.4: QUELLE EST LA FONCTION DES PROTEINES *HYDRARDCVFLA* ET *HYDRARDCVFLB*?

Les mitochondries qui sont de petits organites cellulaires jouent un rôle prépondérant dans de nombreuses fonctions cellulaires comme la production d'énergie, la respiration, la synthèse des lipides. Elles jouent également un rôle dans le métabolisme des acides aminés, des nucléotides et du fer. Elles sont connues pour être impliquées dans le maintien de l'homéostasie intracellulaire des ions inorganiques, la prolifération cellulaire et l'apoptose. Dans les mitochondries, environ 98% du dioxygène présent est réduit en eau (H₂O), les 2 % restant vont aussi être réduits en H₂O mais en passant par plusieurs étapes de réductions monoélectroniques durant lesquelles 4 électrons sont apportés les uns après les autres. Toutes ces étapes intermédiaires vont former des entités chimiques oxydantes, très réactives, dont la plus active est le radical hydroxyle libre de l'oxygène (HO·), que l'organisme est incapable de neutraliser efficacement. Ce radical hydroxyle HO· nommé également espèces réactives oxygénées ou *reactive oxygen species* (ROS) en anglais, a une durée de vie très courte mais aura le temps d'oxyder toutes les molécules localisées dans son environnement immédiat, comme l'ADN par exemple. Les cations métalliques ferreux (Fe²⁺) ou cuivreux (Cu⁺)

existent en très faible concentration dans les cellules à l'état libre et sont pour la plus grande partie présent sous forme de complexes inactifs, mais peuvent aussi initier la formation du radical hydroxyle HO·, via la réaction de Fenton. Dans la cellule, un excès par exemple de cuivre sous forme ionisée Cu^+ / Cu^{2+} va entraîner une cascade d'évènements dont la formation du radical hydroxyle HO·, qui pourrait aboutir à la dégradation progressive des macromolécules et de la structure de la cellule. L'augmentation de cations cuivriques Cu^{2+} va augmenter la peroxydation des lipides insaturés qui sont les constituants des biomembranes, ainsi que l'oxydation des protéines cytosoliques et parfois de l'ADN (Fig. 87).

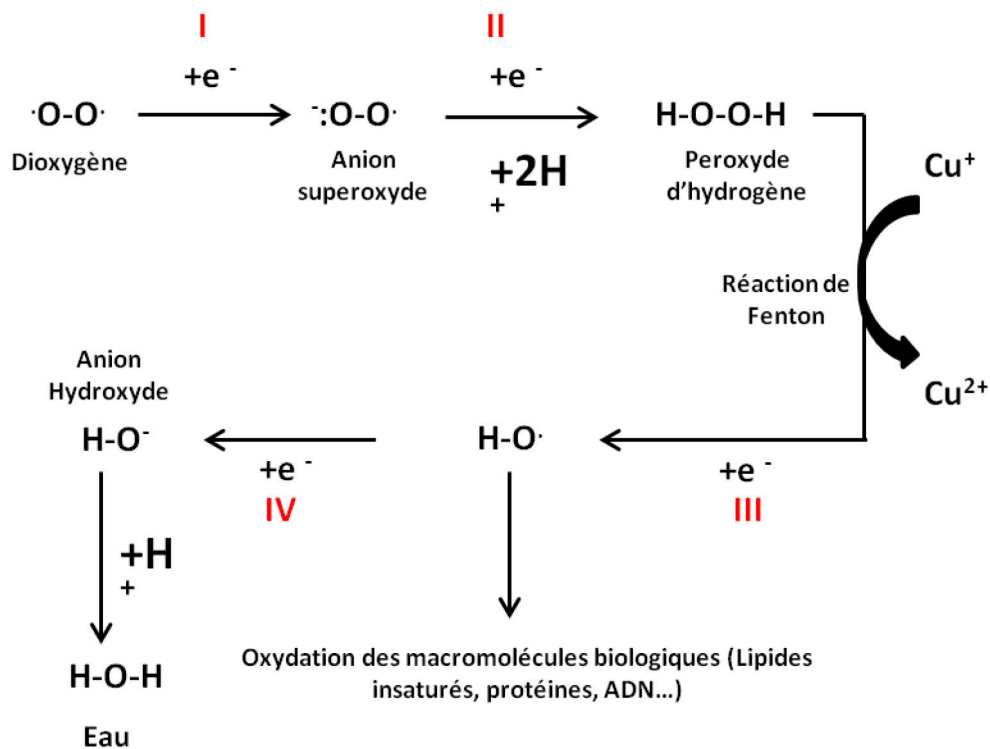
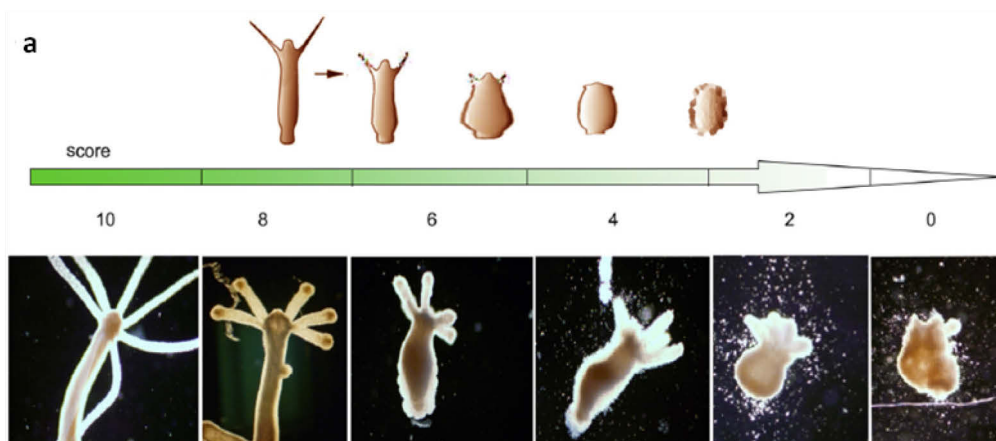


Figure 87 : Réaction de Fenton. L'Anion-superoxyde est chargé négativement et son second atome d'oxygène possède un électron libre. A partir de l'anion-superoxyde, dans une seconde étape, l'apport d'un électron et de deux protons conduit à une molécule, le peroxyde d'hydrogène ou eau oxygénée. Le peroxyde d'hydrogène subit une nouvelle réduction par l'apport d'un électron et sa molécule se scinde en deux avec libération de radical hydroxyle. Cette réaction de réduction, découverte par Fenton, nécessite pour acquérir une vitesse de réaction suffisante, la présence du cation métallique cuivreux sous forme réduite (Cu^+). Le radical hydroxyle ($\text{HO}\cdot$) peut fixer un électron et conduire à l'anion hydroxyde (HO^-) qui en se liant avec un proton (H^+) donnera de l'eau.

Chez les métazoaires aussi, les radicaux libres de l'oxygène sont produits lors de fuites de la chaîne respiratoire au niveau de la mitochondrie. Ces fuites entraînent l'oxydation des groupes thiols des cystéines dans les protéines et peut entraîner une perte de la fonction des protéines. Cependant, la nature a pourvu les animaux de systèmes de défense tels que le système des thiorédoxines qui réduisent les cystéines oxydées des protéines. Considérant que l'activité des thiorédoxines s'oppose aux effets toxiques du cuivre, notre objectif est de démontrer l'existence d'une activité enzymatique d'une thiorédoxine ancestrale en termes d'évolution, codée par les gènes *hydra Nxnla* ou *b*. Est-ce que pour empêcher les dégâts causés par la formation du radical hydroxyle HO[•], oxydant extrêmement puissant, l'hydre fait appel aux protéines *hydraRdCVFLa* et *hydraRdCVFLb* qui joueraient alors déjà de rôle de thiorédoxines? L'hydre est une espèce qui est utilisée pour évaluer la toxicité des polluants d'eau douce. Elle a déjà été utilisée dans plusieurs études pour des tests biologiques simples et peu coûteux de toxicité aiguë par des métaux lourds tels que le cuivre, le cadmium ou le zinc (Beach and Pascoe, 1998; Karntanut and Pascoe, 2000) ou de nanoparticules (Ambrosone et al., 2017; Tortiglione et al., 2011). Du fait de sa morphologie simple diploblastique (seulement deux couches épithéliales) qui la met directement en contact avec les polluants, l'hydre est très sensible aux expositions toxiques de l'environnement. L'autre avantage de l'utilisation de l'hydre pour des essais de toxicité est qu'elle se reproduit de manière asexuée réduisant les variations génétiques susceptibles de montrer des résistances variables aux traitements et son utilisation permet une minimisation des variations des résultats expérimentaux et une meilleure reproductibilité. Dans un premier temps, avec Kamila Remini, stagiaire en première année de BTS, nous avons analysé les effets de l'exposition de l'hydre à différentes doses de cuivre. La mesure de la toxicité de ce métal est obtenue et mesurée par l'observation des changements morphologiques progressifs chez les animaux tels que détaillés par Wilby en 1990 dans une table (Wilby et al., 1990). Cette table est basée sur un système de classement de scores, développé à l'origine pour surveiller et quantifier les effets des polluants aquatiques sur le potentiel de régénération de l'hydre. Plus précisément, les effets délétères de la toxicité du polluant ont été déterminés en évaluant l'état morphologique du polype auquel un score entre 0 et 10 est attribué. Le score 0 décrit un polype complètement désintégré et 10, un polype normal (**Fig. 88**).



b

Score	Morphologie du polype de l'hydre
10	Tentacules détendues et corps réactif
9	Partiellement contracté et réactions lentes
8	Tentacules arrondies et corps légèrement contracté
7	Tentacules raccourcies et corps légèrement contracté
6	Tentacules et corps raccourcies
5	Totalement contracté et tentacules visibles
4	Totalement contracté et tentacules non visibles
3	Arrondie et tentacules visibles
2	Arrondie et tentacules non visibles
1	Mort mais intact
0	Desintégré

Figure 88: Score système établi pour mesurer et quantifier les effets du cuivre sur les hydres. **a)** Illustration de l'état morphologique des hydres correspondant à chaque score. **b)** Description détaillée de l'état morphologique des hydres correspondant à chaque score.

Les scores compris entre 0 et 4 sont considérés comme létaux. Après avoir équilibré une plaque avec une solution de cuivre à 100 mg/l pendant 24 h, 5 hydres sont placées dans les puits de cette plaque contenant 1 ml de milieu HM à pH 7,7 et une solution de cuivre à pH 7,7. Les doses de cuivre testées sont 0, 0,019, 0,029, 0,061, 0,208, 0,400 et 0,600 mg/l et l'observation de l'état morphologique des hydres suite à l'exposition au cuivre est réalisée immédiatement, puis au bout de 24 h, de 48 h, de 72 h et de 96 h d'exposition (**Fig. 89**).

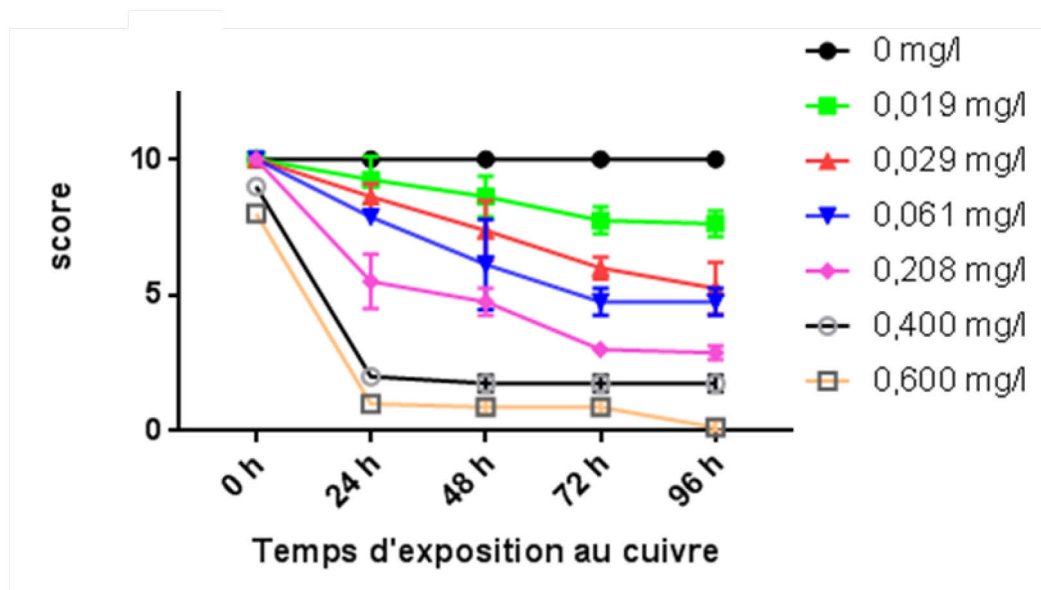


Figure 89: Evolution de l'état des hydres au cours du temps exposées à différentes concentrations de cuivre.

Cette expérience a été répétée 4 fois. Lorsque les hydres sont incubées dans le milieu HM à pH 7,7 sans cuivre, leur morphologie correspond à un état normal, c'est à dire avec des tentacules détendues et un corps réactif qui correspond au score 10 de la table de Wilby. Cet état reste stable au cours du temps. Plus les hydres sont exposées à des concentrations de cuivre importantes et plus leur état morphologique se dégrade et plus la valeur du score attribué diminue. Le cuivre a donc bien un effet toxique sur les hydres qui est dépendant de la dose et du temps d'exposition. Le score des hydres lorsqu'elles sont incubées en présence de solution de cuivre concentrée à 0,029 mg/l est de 10 en tout début d'expérience puis diminue jusqu'à environ 8,6 au bout de 24 h d'exposition au cuivre, puis est de 7,3 au bout de 48 h d'exposition, de 6 après 72 h d'exposition est enfin de 5,2 après 96 h d'exposition. Cette dégradation de l'état des hydres est

progressive mais pas complète même au bout de 96 h, c'est pourquoi nous décidons de choisir cette valeur de référence pour la suite de nos expériences (**Fig. 90**).

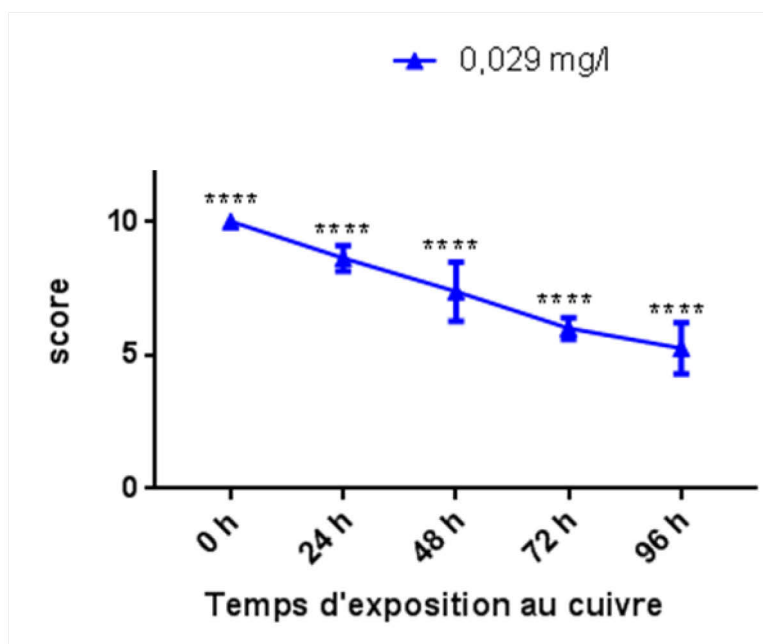


Figure 90: Evolution de l'état des hydres au cours du temps d'exposition à 0.029 mg/l de cuivre.

Puisque les messagers *hydra Nxnla long* et *hydra Nxnlb long* sont exprimés par l'ensemble des cellules de l'organisme, nous souhaitons étudier les effets de leur inactivation par ARN interférence par délivrance d'un ARN interférent synthétique (siARN) dans des conditions de pH contrôlées. L'ARN interférence est une méthode expérimentale permettant de créer des phénotypes de perte de fonction et est donc un puissant outil utilisé pour évaluer la fonction des gènes. Cette expérience devrait permettre de tester l'existence d'une aggravation de la toxicité du cuivre sur les populations d'hydres suite à la diminution de l'expression des protéines *hydraRdCVFLa* et *hydraRdCVFLb*. Le système d'administration des siARNs doit pour cela être efficace. Le potentiel zêta des siARN, qui représente la charge électrique qu'une particule acquiert grâce aux ions qui l'entourent quand elle est en solution dépend du pH de la solution (Hunter, 1988). A pH neutre, le siARN montre des valeurs de potentiel zêta négatives dues à la présence de groupes phosphates dans le squelette de l'ARN alors qu'à pH acide, la présence d'ions divalents du calcium neutralise les charges négatives, conférant une charge positive aux molécules qui influencent

l'électrocinétique des molécules de siARN et favorisant ainsi leur absorption intracellulaire par les hydres (**Fig. 91**).

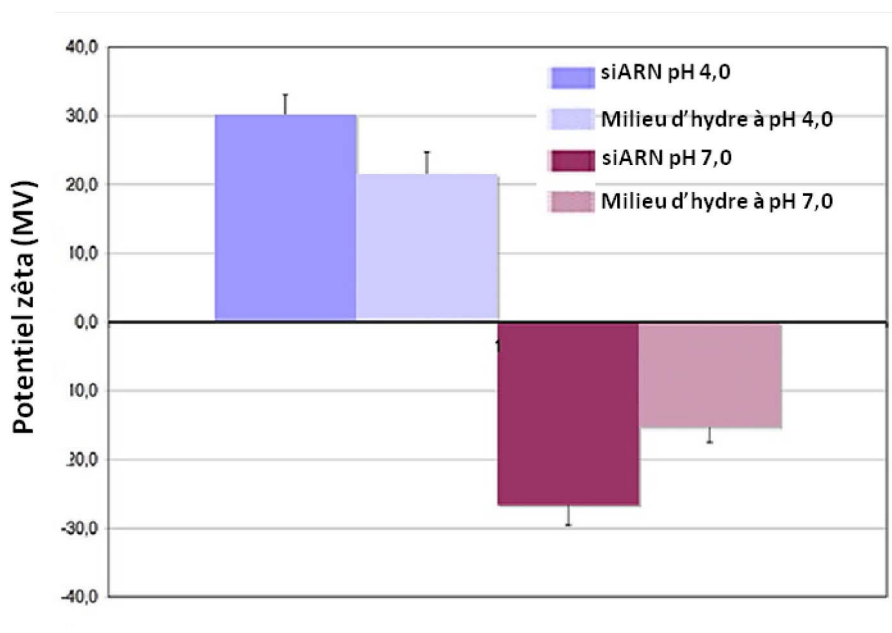


Figure 91: Potentiel zêta des siRNA en fonction du pH. (Adapté de Ambrosone et al., 2012)

Il convient alors d'administrer les siARN aux hydres dans des conditions de pH acide en présence de cuivre et d'analyser leur état morphologique au cours du temps. Mais quels sont les effets du cuivre sur les hydres à pH acide? Pour répondre à cette question, nous incubons une hydre dans du milieu HM à pH 4,0 en présence de solution de cuivre (0,029 mg/l) à pH 4,0 pendant 24 h (**Fig. 92**).

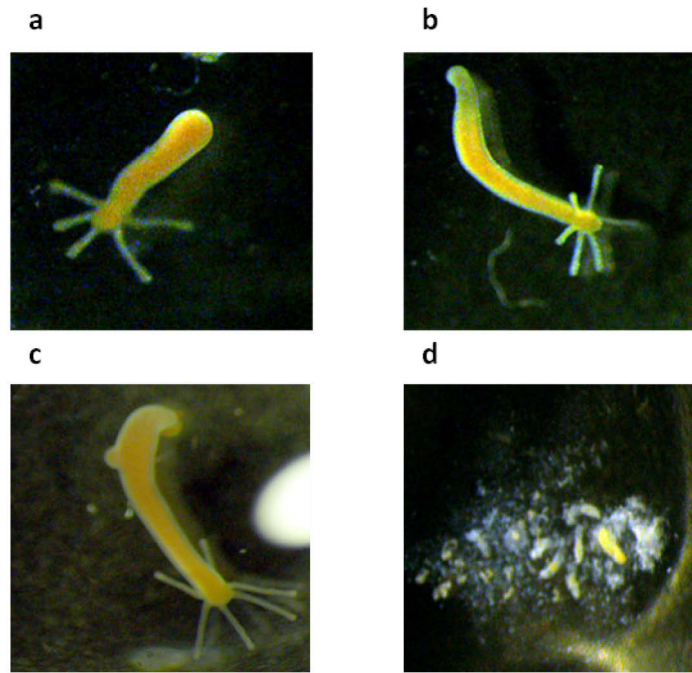


Figure 92: Image représentative du polype de l'hydre incubée a) dans le milieu d'hydre (HM) à pH 7,0 b) dans le milieu d'hydre (HM) à pH 4,0 c) dans le milieu d'hydre (HM) à pH 7,0 en présence de cuivre à pH 7,0 et d) dans le milieu d'hydre (HM) à pH 4,0 en présence de cuivre à pH 4,0.

Les résultats de cette expérience indiquent que lorsque l'hydre est placée dans un milieu acide en présence de cuivre à 0,029 mg/l est complètement désintégrée au bout de 24 h alors que lorsqu'elle est incubée dans les mêmes conditions mais en présence d'une solution de cuivre à pH 7,0, l'hydre est intacte et présente une morphologie de score 10. L'incubation de l'hydre dans un milieu acide à pH 4,0, montre les mêmes caractéristiques qu'une hydre incubée dans un milieu neutre à pH 7,0, le polype semble sain, avec de longs tentacules étendus et ne présente aucun signe de toxicité induit par le traitement. Ceci confirme que c'est bien le cuivre qui est beaucoup plus toxique en condition acide qu'en condition neutre. Pour contourner cette difficulté, nous décidons de procéder en plusieurs étapes distinctes. Dans un premier temps nous inhibons l'expression des messagers *hydra Nxnla long* et *hydra Nxnlb long*. Pour cela, 5 hydres sont incubées pendant 48 h dans le milieu HM à pH 4,0 en présence de 70 nM siARN spécifiques des messagers ciblés. Ensuite ces hydres sont soigneusement rincées pour retirer et éliminer toute trace de milieu à pH 4,0. Enfin les hydres sont placées dans les puits d'une plaque préalablement équilibrée en présence d'une solution de cuivre à

0,029 mg/l à pH 7,0. Les siARN sont dessinés à l'aide du programme disponible sur le site de ThermoFisher (<https://rnaidesigner.invitrogen.com>). Pour cela, les séquences ciblées sont chargées dans ce programme qui calcule et propose les séquences des siARN les plus optimisés et efficaces. Deux siARN par séquence ciblées sont testés dans cette expérience. Les séquences, GCCAGGAAGATATGATAAA et GCTAATGATGATGTTTGTG, qui ciblent le messenger *hydra long Nxnl*a sont sélectionnées (Fig. 93).

Choix	N°	Début	Séquence (ADN)	%GC	Efficacité
<input type="checkbox"/>	1	36	TGATGGCTCTAGTGGCTTA	47.37	★★★★☆
<input type="checkbox"/>	2	43	TCTAGTGGCTTAGCAGATA	42.11	★★★★☆
<input checked="" type="checkbox"/>	3	209	GCCAGGAAGATATGATAAA	36.85	★★★★☆
<input type="checkbox"/>	4	241	TTCATGGTGATTGGTATT	36.85	★★★★☆
<input type="checkbox"/>	5	250	GATTGGTATTGTGTGGAAT	36.85	★★★★☆
<input type="checkbox"/>	6	311	TCAACGGAATACCTACATT	36.85	★★★★☆
<input type="checkbox"/>	7	315	CGGAATACCTACATTAGTT	36.85	★★★★☆
<input type="checkbox"/>	8	364	GCCGATGCTAATGATGATG	47.37	★★★★☆
<input checked="" type="checkbox"/>	9	370	GCTAATGATGATGTTTGTG	36.85	★★★★☆
<input type="checkbox"/>	10	400	TCAGCCCTCTTTGCTGAAT	47.37	★★★★☆

Figure 93: Sélection des siARN pour cibler le messenger *long hydra Nxnl*a.

Le contrôle négatif de l'expérience qui représente un siARN dont la séquence est la suivante, ATTGATCAGAACAGAGAAT, appelé siARN *scramble* est également synthétisé. Ce *scramble* présente la même composition nucléotidique que le premier siARN mais organisée différemment de manière à ne pas cibler le messenger *hydra long Nxnl*a. Les siARN GACTTTGTTCAAAGCTGAT et GCCGTTGCTGATTGGAGAA sont sélectionnés pour cibler et inhiber l'expression du messenger *hydra long Nxnl*b (Fig. 94).

Choix	N°	Début	Séquence (ADN)	%GC	Efficacité
<input checked="" type="checkbox"/>	1	21	GACTTTGTTCAAAGCTGAT	36.85	★★★★☆
<input type="checkbox"/>	2	55	GCAGACAACATACTTAGTG	42.11	★★★★☆
<input type="checkbox"/>	3	122	GCAGACAGTTTACACCTGT	47.37	★★★★☆
<input type="checkbox"/>	4	125	GACAGTTTACACCTGTGTT	42.11	★★★★☆
<input type="checkbox"/>	5	307	GGCATTAGAGGAATACCTA	42.11	★★★★☆
<input type="checkbox"/>	6	308	GCATTAGAGGAATACCTAC	42.11	★★★★☆
<input type="checkbox"/>	7	338	GCAGAAAGGATGGGTCTCT	52.64	★★★★☆
<input type="checkbox"/>	8	400	TCAGCAGCCGTTGCTGATT	52.64	★★★★☆
<input checked="" type="checkbox"/>	9	406	GCCGTTGCTGATTGGAGAA	52.64	★★★★★
<input type="checkbox"/>	10	407	CCGTTGCTGATTGGAGAAA	47.37	★★★★★

Figure 94: Sélection des siARN pour cibler le messenger *long hydra Nxnlb*.

Afin de visualiser la délivrance des siARN dans les hydres, les siARN qui ciblent les messagers sont couplés à un fluorochrome Alexa 647 visible dans le rouge lointain, alors que les oligonucleotides *scramble* sont couplés à un fluorochrome Alexa 488 visible dans le vert. Des images réalisées à l'aide d'un microscope confocal indiquent que les siARN n°1 et n°2 qui ciblent les messagers *long hydra Nxnla* et les siARN n°1 et n°2 qui ciblent les messagers *long hydra Nxnlb* sont localisés dans l'intégralité du polype de l'hydre ainsi que dans ses tentacules (Fig. 95).

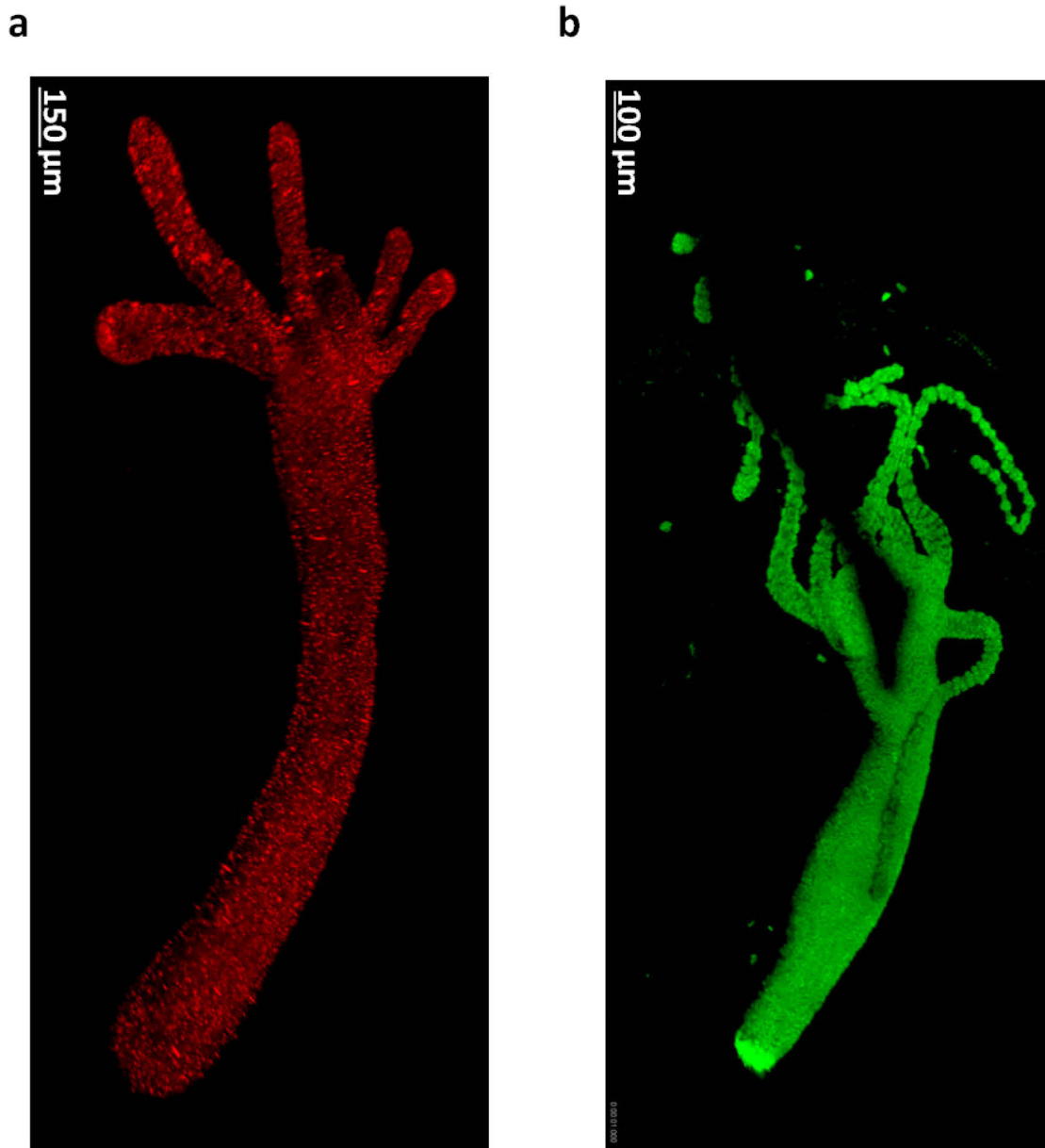


Figure 95: Intégration des siARN par les hydres a) qui ciblent les messagers *long hydra Nxnla* et b) *scramble*.

Les mêmes résultats sont obtenus avec le *scramble*. Ces résultats confirment que les siARN sont bien ingérés par le corps de l'hydre. Avant d'exposer les hydres au cuivre, nous vérifions l'efficacité des siARN sélectionnés et nous testons s'ils ont bien inhibé l'expression des messagers qu'ils ciblent. Pour cela, à partir des ARN des hydres traitées, une étude d'expression des messagers *long hydra Nxnla et b* à l'aide d'amorces spécifiquement sélectionnées est réalisée. Le siARN n°1 noté si-hydra long Nxnla n°1

qui cible le messenger *long hydra Nxnla*, inhibe l'expression de ce messenger de 10% par rapport au *scramble*, tandis que le n°2, si-hydra long *Nxnla* n°2 inhibe l'expression de ce messenger de 20%. Le siARN n°1 qui cible le messenger *long hydra Nxnlb*, si-hydra long *Nxnlb* n°1 inhibe l'expression de ce messenger d'environ 20% par rapport au *scramble*, alors que le n°2, si-hydra long *Nxnlb* n°2 inhibe l'expression de ce messenger de 30% (Fig. 96).

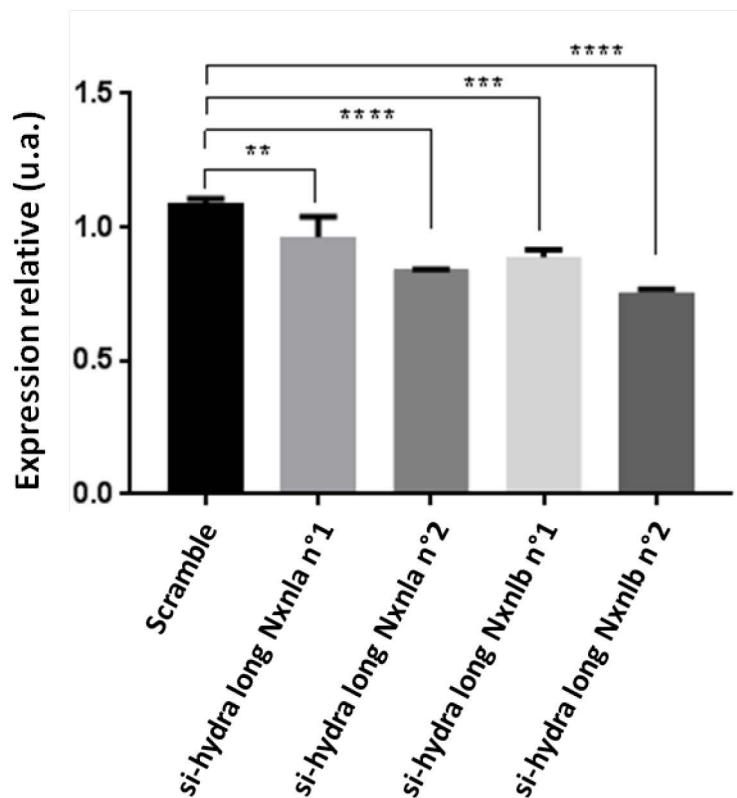


Figure 96: Etude de l'expression des messagers *long Nxnla* et *b* de l'hydre après leur inhibition par interférence ARN. u.a: unité arbitraire.

L'expression des messagers ciblés diminue chez l'hydre après exposition aux siARN correspondants, cependant, il semble que les deux siARN n°2 soient plus efficaces. Pour analyser les effets du cuivre lorsque les protéines *hydraRdCVFLa* et *hydraRdCVFLb* sont moins exprimées, les hydres sont exposées à une solution de cuivre concentrée à 0,029 mg/l après la réduction des messagers qui codent pour ces protéines par ARN interférence (Fig. 97).

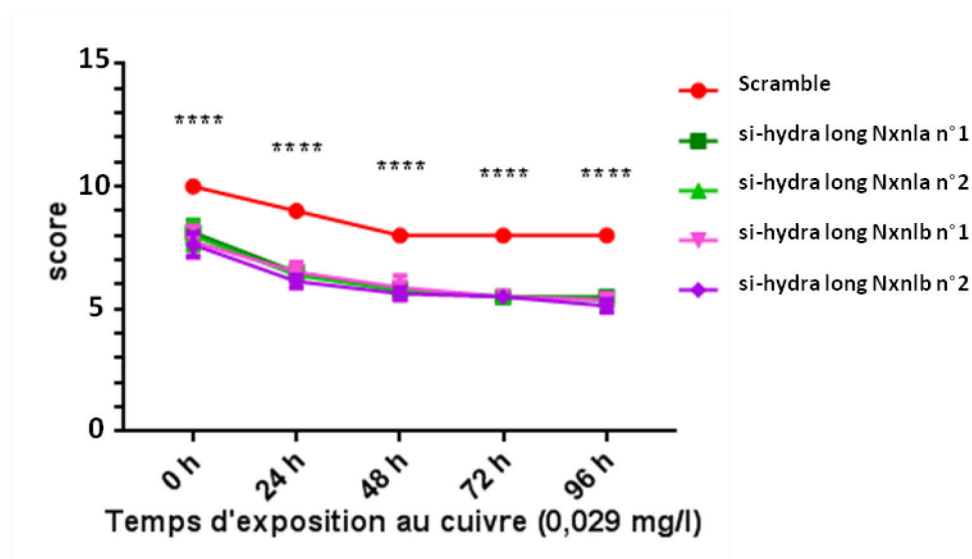


Figure 97: Evolution de l'état des hydres au cours du temps exposées à 0,029 mg/l de cuivre après inhibition du messenger *long hydraNxnla* et *long hydraNxnlb*.

L'inhibition des protéines *hydraRdCVFLa* et *hydraRdCVFLb* entraîne une dégradation de l'état des hydres bien avant qu'elles soient exposées au cuivre. Il semblerait que déjà en l'absence de ces protéines, l'hydre soit sujette et plus sensible aux effets d'oxydation endogènes ou générés par d'autres agents toxiques environnementaux que le cuivre. Les résultats observés après l'ingestion des *scrambles* par les hydres indiquent que la morphologie des hydres se détériore légèrement au cours du temps même quand l'expression des protéines étudiées n'est pas diminuée. L'état morphologique des hydres dans ces conditions passe d'un score de 10 lorsqu'elles ne sont pas exposées au cuivre à un score de 8, après 96 h. Ces résultats indiquent que les effets du cuivre ne sont pas aussi drastiques que lorsque les hydres ne sont pas exposées au siARN, mais confirment que le cuivre a un effet toxique sur les hydres qui est dépendant du temps d'exposition. Toutefois, la morphologie des hydres qui sont exposées au cuivre se détériore beaucoup plus au cours du temps lorsque les protéines *hydraRdCVFLa* et *hydraRdCVFLb* sont moins exprimées. Les effets toxiques du cuivre sur les hydres sont exacerbés lorsque les protéines *hydraRdCVFLa* et *hydraRdCVFLb* sont moins exprimées. Alors que les siARN n°2 semblaient plus efficaces, leurs effets sur l'état de l'hydre ne sont pas plus prononcés que ceux des siARN n°1. Ceci indique que seule une diminution de 10% des messagers qui code pour les protéines *hydraRdCVFLa* et *hydraRdCVFLb* suffit pour que ces protéines ne remplissent plus suffisamment leurs fonctions de protéines

protectrices chez l'hydre. Les protéines *hydraRdCVFLa* et *hydraRdCVFLb* jouent un rôle de thioredoxine puisque lorsque leur expression est diminuée, les effets du cuivre sur l'état de l'hydre sont plus importants. Les protéines, *hydraRdCVFLa* et *hydraRdCVFLb* jouaient donc probablement un rôle protecteur contre les effets toxiques des radicaux libres de l'oxygène chez l'hydre il ya 600 millions d'années.

*Nous avons montré que les effets du cuivre sur la morphologie de l'hydre étaient dépendants de sa concentration et du temps d'exposition. La diminution de l'expression des gènes *hydra Nxnla* et *hydra Nxnlb* par interférence ARN dans les conditions de pH contrôlées a conduit à l'aggravation de la toxicité du cuivre sur les populations d'hydres. Nous n'avons pas mesuré la concentration des radicaux libres de l'oxygène, mais pu montrer une aggravation de la toxicité en réduisant le niveau d'expression de *hydraRdCVFLa* et *hydraRdCVFLb* exprimées dans l'ensemble des cellules de cet animal par interférence ARN. Comme les thioredoxines réparent les dommages causés par les radicaux libres de l'oxygène sur les protéines par la réduction des cystéines oxydées, il nous est permis de conclure que la toxicité du cuivre résulte ici de l'oxydation des protéines de l'hydre par les radicaux libres de l'oxygène. Chez l'hydre, *hydraRdCVFLa* et *hydraRdCVFLb* ont une fonction ancestrale de thioredoxine réparatrice par réduction de ces protéines.*

1.5: HYDRA VULGARIS N'EXPRIME PAS BASIGIN 1

Les gènes *hydra Nxnla* et *hydra Nxnlb* sont alternativement épissés pour coder pour les messagers *short hydra Nxnla* ou *b* et *long hydra Nxnla* ou *b*. Comme chez les mammifères, le messager *short Nxnla* n'est pas dégradé par le mécanisme de NMD alors qu'il présente un codon stop prématuré et code pour RdCVF, nous supposons qu'il en est de même chez l'hydre. Il existe donc une forte probabilité pour que les messagers *short hydra Nxnla* et *b* ne soient pas dégradés par le phénomène de NMD et qu'ils codent pour une protéine, même si cela n'a pas été démontré. Mais alors si une protéine RdCVF courte est exprimée chez l'hydre, joue-t-elle un rôle similaire à celui d'un facteur trophique ancestral ? Est-ce que cette protéine appartient à la même signalisation

que chez les mammifères ? Est-ce qu'elle interagit avec un récepteur de type BSG1 via un domaine immunoglobuline (Ig) 0 ? Rappelons que chez l'Homme, le récepteur BSG1 de RdCVF est un produit d'épissage du gène *Basigin* également nommé CD147 (Muramatsu, 2016). Ce gène code pour une autre isoforme *basigin 2* traduit en une protéine appelé basigin 2 (BSG2). BSG1 et BSG2 sont constituées d'une région extracellulaire, d'une région transmembranaire et d'une courte séquence cytoplasmique. BSG2 qui est présente dans la plupart des tissus est composée de deux domaines extracellulaires immunoglobulines Ig1 et Ig2. Cette protéine connue pour induire la sécrétion de cytokines et comme chaperonne des transporteurs du lactate n'est pas le récepteur de RdCVF (Kirk et al., 2000; Marchiq et al., 2015). BSG1, le récepteur de RdCVF est spécifique de la rétine et composée de 3 domaines extracellulaires immunoglobulines, Ig0, Ig1 et Ig2 où Ig0 est nécessaire pour l'interaction de RdCVF. Avant nos travaux publiés en 2015 dans lesquels nous avons mis en évidence le mode d'action de RdCVF via son interaction avec son récepteur BSG1 (Ait-Ali et al., 2015), très peu d'informations étaient connues concernant la structure et la fonction de cette protéine (**Fig. 98**).

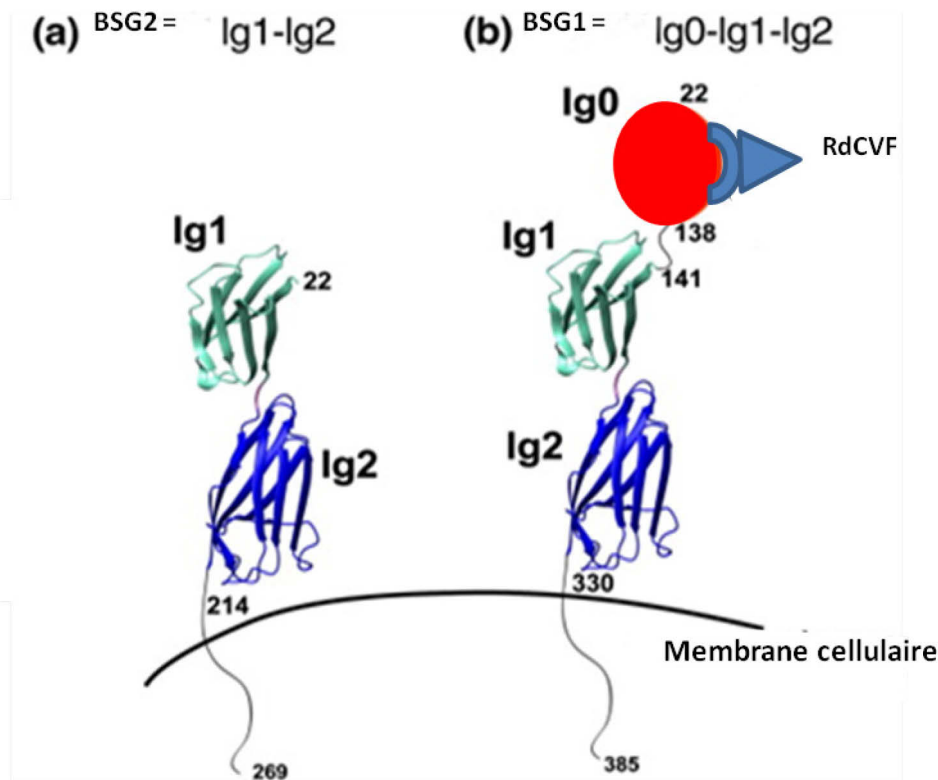


Figure 98: Représentation cristallographique de a) Basigin 2 et b) Basigin 1, le récepteur de RdCVF. Adaptée de Redzic *et al*, 2011.

Une séquence qui code pour un récepteur de type basigin chez l'hydre est retrouvée sur le NCBI. Elle est annotée « *PREDICTED: Hydra vulgaris neural cell adhesion molecule 1-like* » et a pour référence de séquence XM_002161535.3 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/828217991>). Ce gène d'une taille de 1 670 pb code pour un messageur qui possède une région 5' UTR localisée entre 0 à 38 pb, un peptide signal entre le 39^{ème} et le 51^{ème} nucléotide, un domaine extracellulaire qui n'est pas un domaine immunoglobuline entre le 52^{ème} et le 336^{ème} nucléotide, et de deux autres domaines extracellulaires immunoglobuline Ig1 entre le 337^{ème} et le 651^{ème} nucléotide et Ig2 entre le 669^{ème} et le 951^{ème} nucléotide (**Fig. 99**).

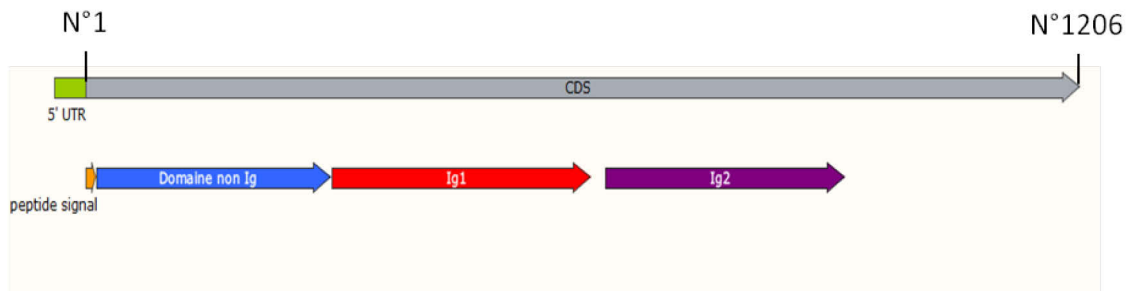


Figure 99: Représentation schématique des différentes régions nucléotidiques correspondants aux différents domaines de BSG chez l'hydre.

À partir d'ARN d'hydre totale et à partir d'amorces dessinées spécifiquement pour amplifier le fragment entre le domaine de Ig1 et Ig2, une RT-PCR est réalisée (**Fig. 100**).

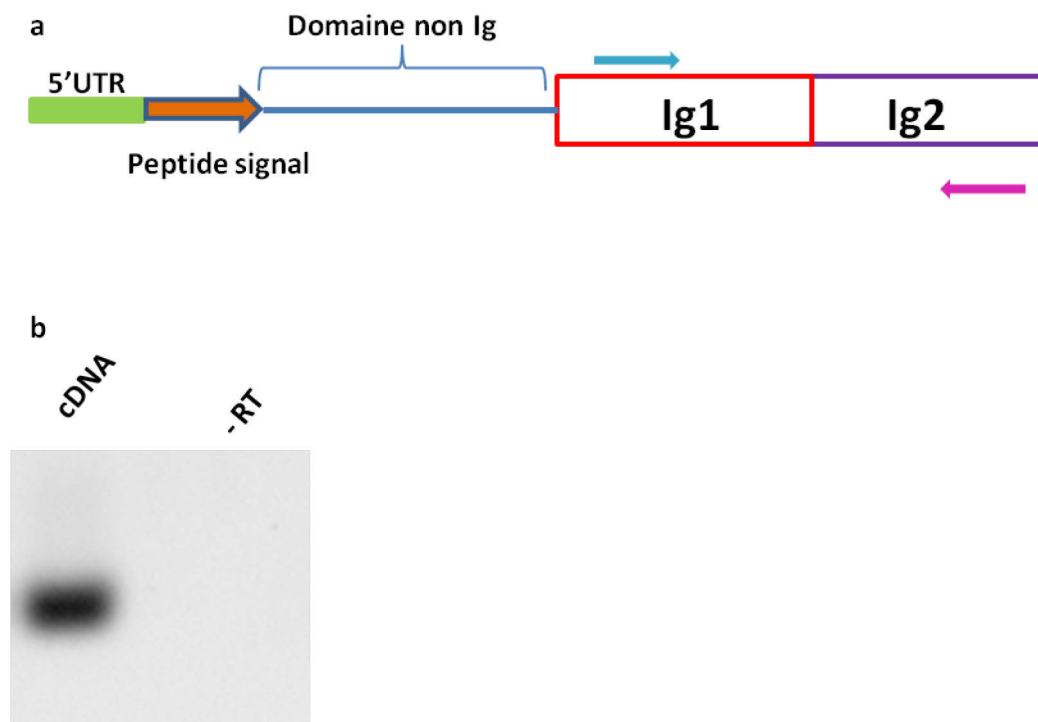


Figure 100: Expression de l'Ig1 et l'Ig2 de Basigin de l'hydre. **a)** représentation schématique de la région amplifiée. Les flèches bleues et roses représentent les amorces sens et antisens utilisées pour amplifier le fragment. **b)** PCR des fragments amplifiés à partir d'ARN extraits des hydres entières. Le témoin -RT représente l'expérience où la transcriptase reverse n'a pas été ajoutée lors de la reverse transcription.

Le résultat de cette RT-PCR indique que le fragment attendu est spécifiquement amplifié. Cela confirme que l'hydre exprime le messenger qui code pour une protéine comportant les domaines Ig1 et Ig2. Pour savoir si l'hydre exprime le domaine extracellulaire supplémentaire qui n'est pas un domaine immunoglobuline, une amorce sens a été dessinée dans la partie 5'UTR de ce messenger et l'amorce antisens a été dessinée dans ce domaine non Ig (**Fig. 101**).

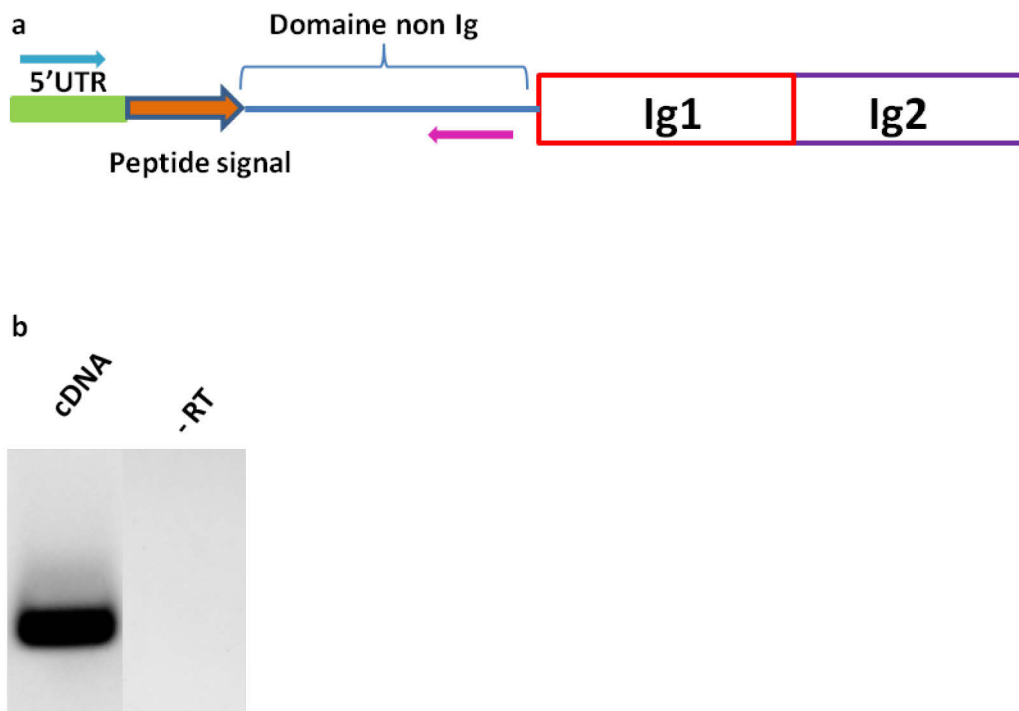


Figure 101: Expression du domaine non Ig0 de Basigin de l'hydre. a) représentation schématique de la région amplifiée. Les flèches bleues et roses représentent les amorces sens et antisens utilisées pour amplifier le fragment. b) PCR des fragments amplifiés à partir d'ARN extrait des hydres entières. Le témoin -RT représente l'expérience où la transcriptase reverse n'a pas été ajoutée lors de la reverse transcription.

L'amplification par RT-PCR indique que le fragment attendu est spécifiquement amplifié. Ces résultats confirment que l'hydre exprime le messenger qui code pour une protéine qui n'est pas équivalente à BSG1 avec 3 domaines extracellulaires dont un qui n'est pas un domaine immunoglobuline et qui n'est pas Ig0. *Hydra vulgaris* n'exprime pas le récepteur de RdCVF, BSG1. Est-ce que le gène qui code pour cette protéine est alternativement épissé? Est-ce qu'il code pour les deux protéines, hydra BSG Ig1+Ig2 et hydra BSG non Ig0+Ig1+Ig2 ou code-t-il uniquement pour cette deuxième protéine ?

Pour répondre à cette question, deux amorces sont dessinées dans le but de placer l'amorce sens dans la région 5'UTR du messager et l'antisens à la fin de la séquence qui code pour Ig1 (**Fig. 102**).

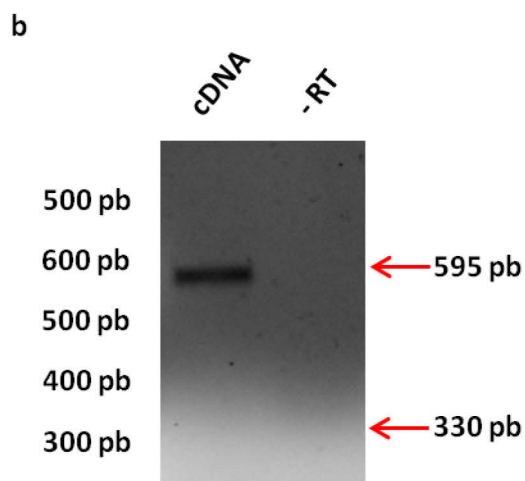
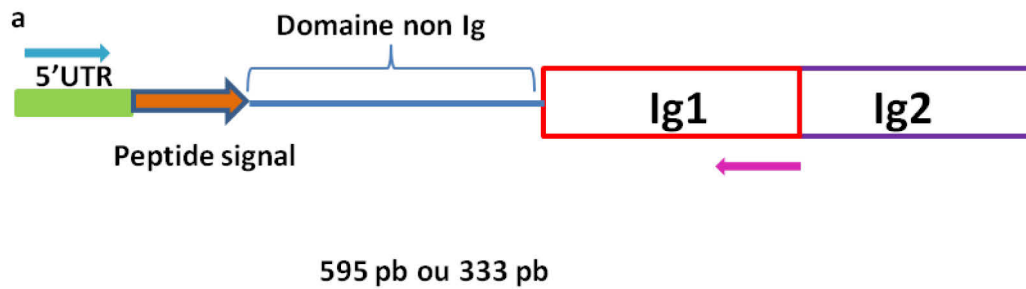


Figure 102: Seule BSG avec le domaine non Ig0 est exprimé chez l'hydre. a) représentation schématique des différentes régions amplifiées. Les flèches bleues et roses représentent les amorces sens et antisens utilisées pour amplifier le fragment. b) PCR des fragments amplifiés à partir d'ARN extraits des hydres entières. Le témoin -RT représente l'expérience où la transcriptase reverse n'a pas été ajoutée lors de la reverse transcription.

Avec ces amorces, le produit qui code pour le messenger hydra BSG non Ig0+Ig1+Ig2 est attendu à une taille de 595 pb alors que celui pour le messenger hydra BSG Ig1+Ig2 est attendu à 333 pb. Seul le fragment de 595 pb est amplifié avec les amorces utilisées. Ce résultat indique que l'hydre n'exprime que hydra BSG non Ig0+Ig1+Ig2 et que le gène qui code pour ce produit ne présente pas la forme pas alternativement épissée qui correspond à BSG 2. Afin d'identifier le rôle ou la fonction cette séquence non Ig0, un BLAST de cette séquence est réalisé dans la base de données du NCBI. Le résultat de ce BLAST indique qu'aucune information n'est connue concernant cette séquence. Il semblerait que cette séquence qui n'est pas un domaine Ig ne ressemble à rien de connu et ne correspond à aucune autre séquence. *Hydra vulgaris* qui exprime le messenger qui code pour la protéine ancestrale de RdCVF, exprime aussi le messenger qui code pour une protéine qui ne possède pas le domaine d'interaction Ig0 de RdCVF. Est-ce que le messenger qui code pour hydra BSG non Ig0+Ig1+Ig2 code cette protéine ? Pour répondre à cette question, la séquence sous format FASTA du messenger décrite dans le NCBI est chargée dans le logiciel InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>). Ce logiciel, réalise à partir des modèles prédictifs une analyse fonctionnelle des séquences protéiques en les classifiant par familles et en prédisant la présence de sites et de domaines importants. Cette analyse fonctionnelle est fournie par plusieurs bases de données qui composent le consortium InterPro (CATH / Gene3D, Conserved Domains, MobiDB, High-quality Automated and Manual Annotation of Proteins, PANTHER, Pfam, PIRSF, PRINTS, ProDom, PROSITE, Structure-Function Linkage Database, Simple Modular Architecture Research Tool, SUPERFAMILY et TIGRFAMs). Cette analyse confirme que la séquence *Hydra vulgaris neural cell adhesion molecule 1-like* code pour une protéine qui possède un domaine cytoplasmique, un domaine transmembranaire et un domaine extracellulaire. Elle confirme également que ce domaine extracellulaire est constitué de 3 domaines dont deux immunoglobulines relatifs à Basigin et un domaine non immunoglobuline (**Fig. 103**).

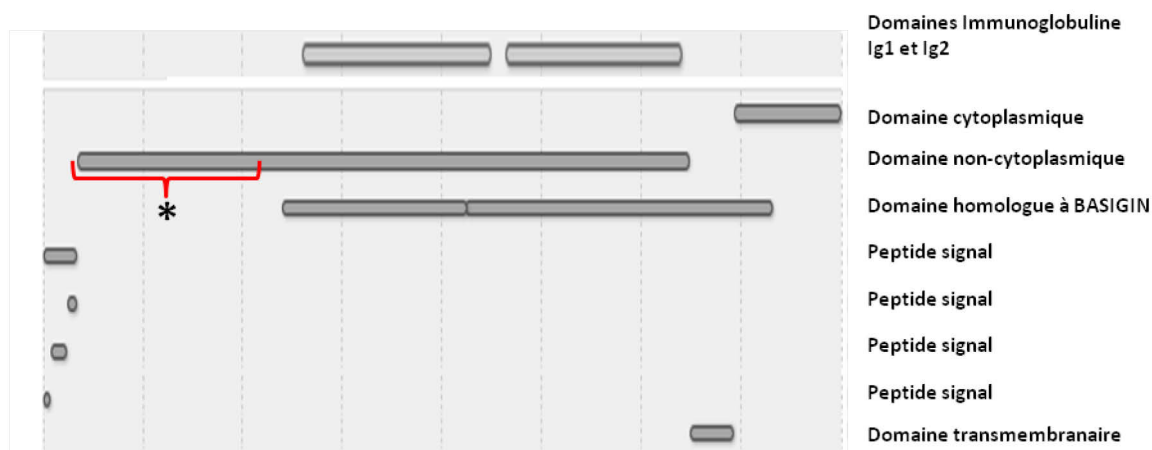


Figure 103: Analyse et classification protéique de la séquence peptidique de neural cell adhesion molecule 1-like de l'hydre. La région représentée par un * correspond au domaine non immunoglobuline.

Cette dernière information confirme qu'en dépit de son annotation dans le NCBI, cette protéine correspond bien à BSG. Cette protéine est composée de 401 acides aminés (**Fig. 104**) et a un poids moléculaire de 45 kDa.

```
>XP_002161571.3 PREDICTED: neural cell adhesion molecule 1-like [Hydra vulgaris]
```

```
MILKTLCLFLYFVKCLLAEVKFHIEPSSPIFAVENTTLFIKCIAEDTAGNINTTTKFRAGPNEIKTTPDNH
IVVTTTTYIGSKTI IELKISGIQSKDLVDQSKLYCATPNSDYQMDVYILSEQYVVPK FVNDAPTTLSTVYGS
DFSFSCSVVSKRNEKYHVDIEWNFDGILESNIKYIPDASNQTFLRSKVI ISGVKYSNNGGKYSCI AKLSVD
GYEKKYTKI FNLAEI SAETNQPSKEEIVKAGSDVTLVCDIAGYPAPKYVWKKFEAVIDNYTDSRYKFSKE
NSSEYETLTISDVTYS DRAVYSCIVNFNNSQVVKEFTLRVRDPLNALWPAVGILIEAVLLAII IFSCEAC
KKSKQGKKNYKMKENEENEETSPLVGN SPTKIVYSGAEDSARLRSSKEIVA
```

Figure 104: Séquence protéique de neural cell adhesion molecule 1-like sous format FASTA. Séquence issue de la base de donnée NCBI.

L'analyse de spectrométrie de masse réalisée à partir de lysat protéique total d'hydre identifie la présence de 10 peptides hydra BSG non Ig0+Ig1+Ig2 avec un recouvrement de la protéine de 28% (**Fig. 105**).

a

1	MILKTL	CFLY	FVKCLL	AEVK	FHIEPSS	PIF	AVENTTL	FIK	CIAEDTAGNI
51	NTTTKFRAGP	NEIK	TTPDNH	IVVTTTTYIGS	KTIIELKISG	IQSK	DLYDQS		
101	KLYCATPNSD	YQMDVYILSE	QYVPK	FVND	PTTLSTVYGS	DFSFSCSVVS			
151	KRNEKYHVDI	EWNFDGILES	NIKYIPDASN	QTFLRSKVII	SGVKYSNGGK				
201	YSCIAKLSVD	GYEKKYTKIF	NLAEISAETN	QPSKEEIVKA	GSDVTLVCDI				
251	AGYPAPKYVW	KKFEAVIDNY	TDSRYKFSKE	NSSEYETLTI	SDVTYS DRAV				
301	YSCIVNFNNS	QVVKEFTLRV	RDPLNALWPA	VGILIEAVLL	AIIIFSCEAC				
351	KKSKQGGKKNY	KMKENEENEE	TSPLVGN	SPT	KIVYSGAEDS	ARLRSSKEIV			
401	A								

b

TTPDNHIVVTTTTYIGSK
DLYDQSK
LYCATPNSDYQMDVYILSEQYVPK
YHVDIEWNFDGILESNIK
SKVIIISGVK
VIISGVK
LSVDGYEK
IFNLAEISAETNQPSK
IFNLAEISAETNQPSKEEIVK
IVYSGAEDSAR

Figure 105: Séquences peptidiques de BSG d'hydre. a) Les peptides colorés représentent les peptides identifiés. La séquence encadrée en bleu représente le domaine non Ig0. b) Liste des peptides identifiés.

Parmi ces 8 peptides identifiés (Table 4), le peptide TTPDNHIVVTTTTYIGSK localisé dans le domaine non Ig0 est identifié avec un spectre parfaitement résolu (Fig. 106) dans 2 analyses consécutives et distinctes.

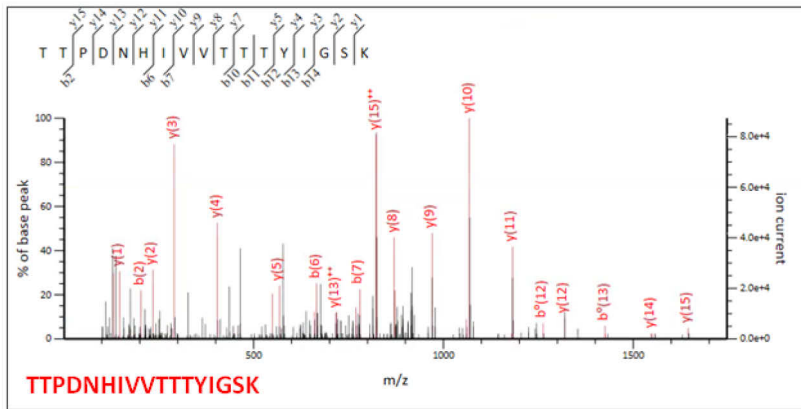


Figure 105: Spectres du peptide identifié spécifique du domaine non Ig0.

La protéine hydra BSG est bien exprimée et comprend son domaine non Ig0.

Hydra vulgaris exprime une protéine qui est homologue au récepteur de RdCVF, BSG1 mais qui ne comprend pas le domaine Ig0, nécessaire à l'interaction de RdCVF. *Hydra vulgaris* n'exprime que la protéine correspondant à l'homologue de BSG2 connue pour jouer le rôle de chaperonne des transporteurs du lactate.

1.6 : TEST D'INTERACTION PROTEIQUE ENTRE HYDRA BSG ET *HYDRARdCVFa* ET *HYDRARdCVFb* PAR UN ESSAI IMPLIQUANT DES PROTEINES DE FUSION PHOSPHATASE ALCALINE

L'existence d'une interaction entre les protéines *hydraRdCVFa* et *hydraRdCVFb* et le récepteur hydra BSG est testée par une méthode qui fait intervenir une protéine de fusion phosphatase alcaline-*hydraRdCVFa* ou phosphatase alcaline-*hydraRdCVFb*. Cette technique a déjà été utilisée, optimisée et validée pour mettre en évidence l'interaction entre RdCVF et BSG1 dans nos travaux publiés en 2015 (Ait-Ali et al., 2015). Avant cela, elle avait déjà été utilisée pour identifier les récepteurs de surface cellulaire impliqués dans la signalisation de molécules du guidage axonal (Tartaglia et coll., 1995; He et coll., 1997; Flanagan et coll., 2000) mais aussi pour permettre de valider l'interaction de la semaphorin III/F avec son récepteur, la

neuropiline (Chédotal et coll., 1998). L'interaction entre la semaphorin et la neuropiline sera d'ailleurs utilisée comme contrôle positif dans nos expériences. Cet essai consiste à transfecter des cellules COS-1 par un vecteur CMV dans lequel l'ADNc qui code pour hydra BSG a été cloné suivi d'un tag HA en C-terminal. Quarante huit heures après la transfection, ces cellules sont incubées en présence d'un milieu conditionné et concentré en protéine de fusion. Ces protéines de fusion sont exprimées à partir du transgène qui code pour les protéines *hydraRdCVFa* et *hydraRdCVFb* cloné dans le plasmide pAPtag-5, en 3' de l'insert qui code pour la phosphatase alcaline. Le transgène est cloné entre le site de restriction XhoI et XbaI (**Fig. 107**).

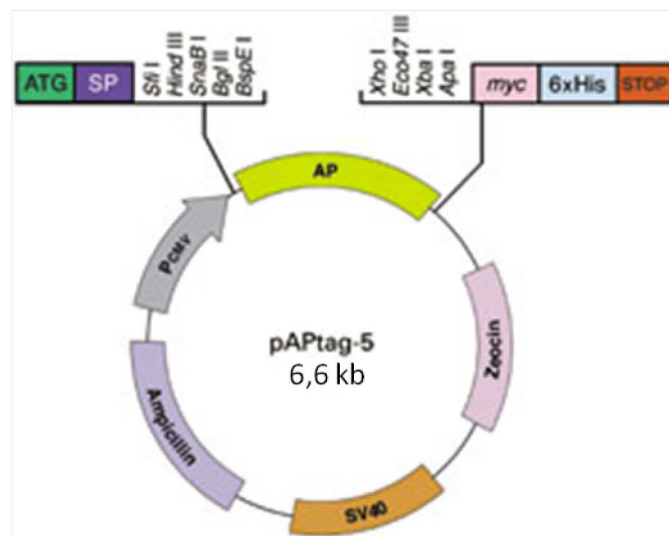


Figure 107: Vecteur plasmidique pAPtag-5: AP, représente l'insert qui code pour la phosphatase alcaline, pCMV, représente le promoteur du plasmide, Ampicillin représente l'antibiotique de résistance du plasmide, SV40 qui est l'origine de répllication du virus simiens qui permet au plasmide de se répliquer dans les cellules. ATG correspond au codon d'initiation de traduction, SP correspond au peptide signal, Sfi I, Hind III, SnaB I, Bgl II, BspE I sont les sites de clonage en 5' de la phosphatase alcaline, Xho I, Eco47 III, Xba I, Apa I sont les sites de clonage en 3' de la phosphatase alcaline, *myc* et 6 His sont des tag et STOP représente le codon stop de traduction.

Entre la phosphatase alcaline et la protéine étudiée est insérée une protéine GFP. Pour que cette protéine soit fusionnée entre les deux autres afin de jouer un rôle d'espaceur, son codon d'initiation de la traduction ATG et son codon stop sont retirés. Trois protéines de fusion sont produites, AP-GFP-*hydraRdCVFa*, AP-GFP-*hydraRdCVFb* et AP-GFP- *MusRdCVFa* qui servira de contrôle positif pour l'expérience (**Fig. 108**).

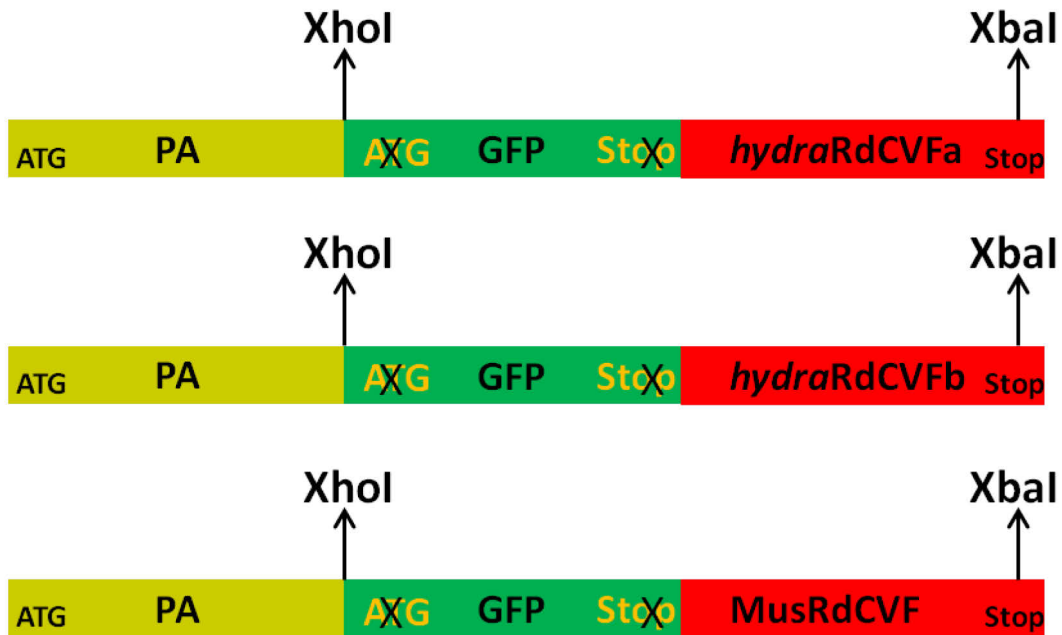


Figure 108. Représentation schématique des inserts qui codent pour AP-GFP-*hydraRdCVFa*, AP-GFP-*hydraRdCVFb* et AP-GFP-*musRdCVF*. Mus: *Mus musculus*.

Le milieu utilisé lors de l'expérience est obtenu après concentration du milieu de culture conditionné récolté des cellules HEK293 transfectées par ces vecteurs. Des essais préliminaires de *western blot* réalisés pour les travaux qui ont permis d'établir une interaction entre RdCVF de souris et son récepteur BSG1 indiquaient que lorsque RdCVF était fusionnée à l'extrémité N-terminale de la phosphatase alcaline, la protéine de fusion n'était pas excrétée et pas détectée dans le milieu conditionné des cellules HEK293 transfectées alors que c'était le cas lorsque RdCVF était fusionnée à l'extrémité C-terminale de la phosphatase alcaline. C'est pourquoi dans nos essais actuels *hydraRdCVFa* et *b* sont clonés en C-terminal de la phosphatase alcaline. De plus, durant ces expériences passées, nous avons constaté que comme la phosphatase alcaline est une protéine de plus grande taille que la protéine RdCVF, il est possible qu'elle entraîne un changement de conformation de RdCVF lors de l'expression de la protéine de fusion, créant ainsi une interférence avec la liaison de RdCVF à son récepteur BSG1 en provoquant un encombrement stérique. C'est aussi pour contourner ce problème que nous avons décidé d'insérer la GFP entre *hydraRdCVFa* et *b* et la phosphatase alcaline. Comme indiqué précédemment, nous avons également utilisé dans

ces essais la protéine semaphorin III/F comme contrôle positif. Cette protéine a déjà été utilisée pour détecter son récepteur de surface cellulaire neuropiline à l'aide de ce même essai (Chédotal et coll. 1998). Un milieu conditionné de cellules HEK293 transfectées par la construction de la protéine de fusion phosphatase alcaline-semaphorine (PA-sema) concentrée a été utilisé comme sonde et incubée en présence de cellules COS-1 transfectées par un vecteur d'expression de la neuropiline. Les cellules, après avoir été transfectées par les plasmides qui codent pour ces protéines de fusion, vont surexprimer et sécréter ces protéines dans leur milieu de culture appelé ici milieu conditionné. Ces milieux de culture conditionnés et enrichis en protéine de fusion ont été contrôlés avant leur utilisation pour les essais d'interaction. Pour cela un *western blot* à partir des lysats cellulaires (**Fig. 109a**) et des surnageants (**Fig. 109b**) de cellules HEK293 transfectées par les vecteurs qui codent les protéines de fusion testées, est réalisé à l'aide d'un anticorps dirigé contre la phosphatase alcaline et un autre dirigé contre la GFP.

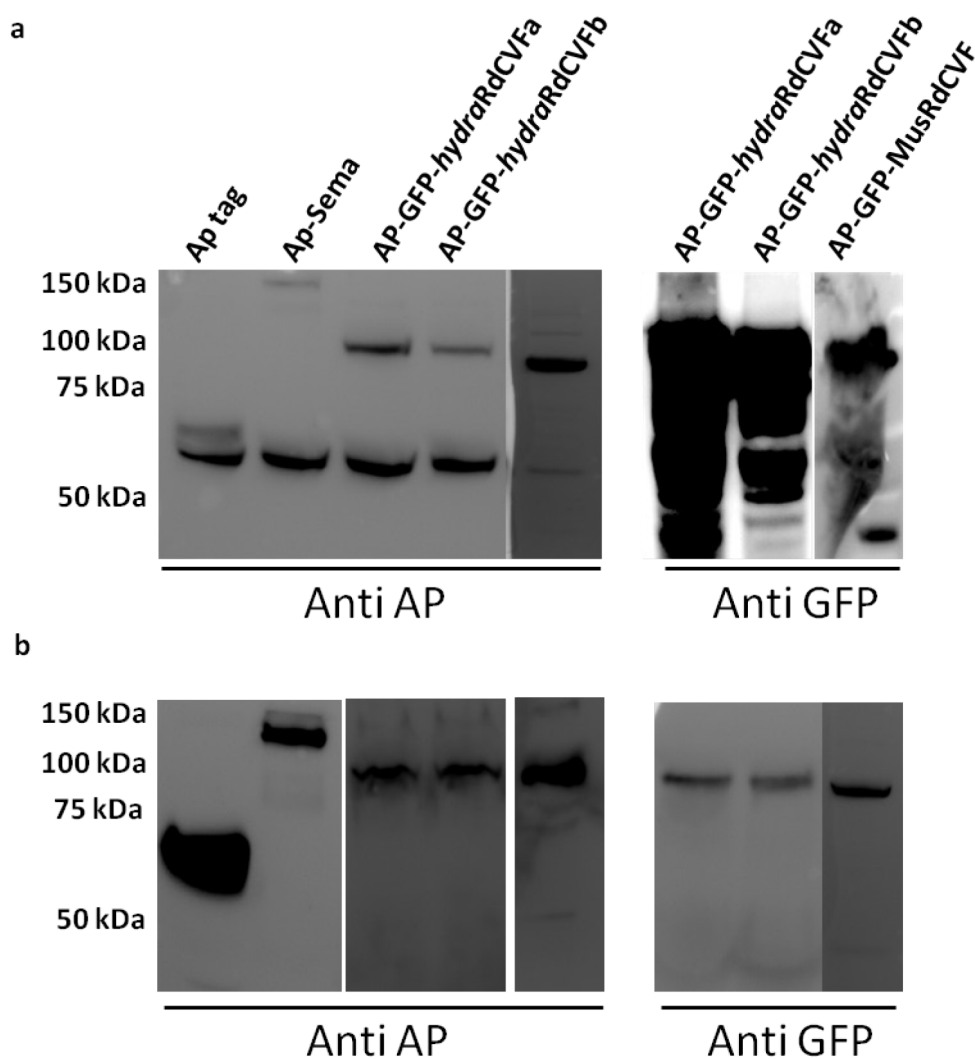


Figure 109: *Western blot* à l'aide d'anticorps dirigés contre la phosphatase alcaline et contre la GFP a) réalisé à partir des lysats protéiques issus des cellules de HEK293, b) réalisé à partir des lysats protéiques issus des surnageant de HEK293. Mus: *Mus musculus*.

Le résultat du *western blot* réalisé avec l'anticorps anti alcaline phosphatase indique que les protéines alcaline phosphatase d'une taille de 58 kDa et phosphatase alcaline-semaphorine d'une taille de 144 kDa sont bien exprimées dans le culot cellulaire et le surnageant des cellules HEK293. Les protéines de fusion phosphatase alcaline-GFP-*hydraRdCVFa* et phosphatase alcaline-GFP-*hydraRdCVFa* d'hydre de respectivement 99 kDa et 96 kDa ainsi que la protéine de fusion phosphatase alcaline-GFP-MusRdCVF de 99 kDa sont exprimées par le culot cellulaire ainsi que par le surnageant des cellules

HEK293 transfectées par les plasmides qui codent pour ces protéines de fusion. Ces résultats sont confirmés par le *western blot* anti-GFP. Après plusieurs lavages, un marquage spécifique représenté par l'apparition d'une coloration (bleu/violet) a été obtenu après l'ajout du substrat de la phosphatase alcaline. Aucun signal n'est détecté lorsque la phosphatase alcaline non fusionnée est incubée (**Fig. 110 a et b**). Ces résultats indiquent que la phosphatase alcaline est localisée à la surface cellulaire suite à l'interaction de la semaphorin III / F avec la neuropiline. Les résultats obtenus avec le deuxième contrôle positif sont concluants et montre une interaction spécifique entre BSG1 de souris et RdCVF de souris (**Fig. 110 c et d**). Des expériences identiques montrent qu'en présence du substrat de la phosphatase alcaline et après l'incubation de la protéine AP-GFP-*hydra*RdCVFa avec les cellules COS-1 qui exprime la protéine hydra BSG, aucune coloration violette n'est observée. Les mêmes résultats négatifs sont obtenus lorsque la protéine AP-GFP- *hydra*RdCVFb est incubée ainsi que lorsque la phosphatase alcaline non fusionnée est incubée (**Fig 110 e, f et g**). Ces résultats confirment que le domaine Ig0 du récepteur BSG est indispensable pour une interaction avec RdCVF, ceci s'applique aussi pour l'interaction de protéines ancestrales *hydra*RdCVFa et *hydra*RdCVFb avec hydra BSG. Cette conclusion est confirmée par un essai dans lequel des cellules COS-1 qui expriment à leur surface hydra BSG sont incubées en présence de la protéine de fusion AP-GFP-*Mus*RdCVF. Les résultats de cet essai montrent qu'il n'y a pas d'interaction entre ces deux protéines (**Fig. 110 h**).

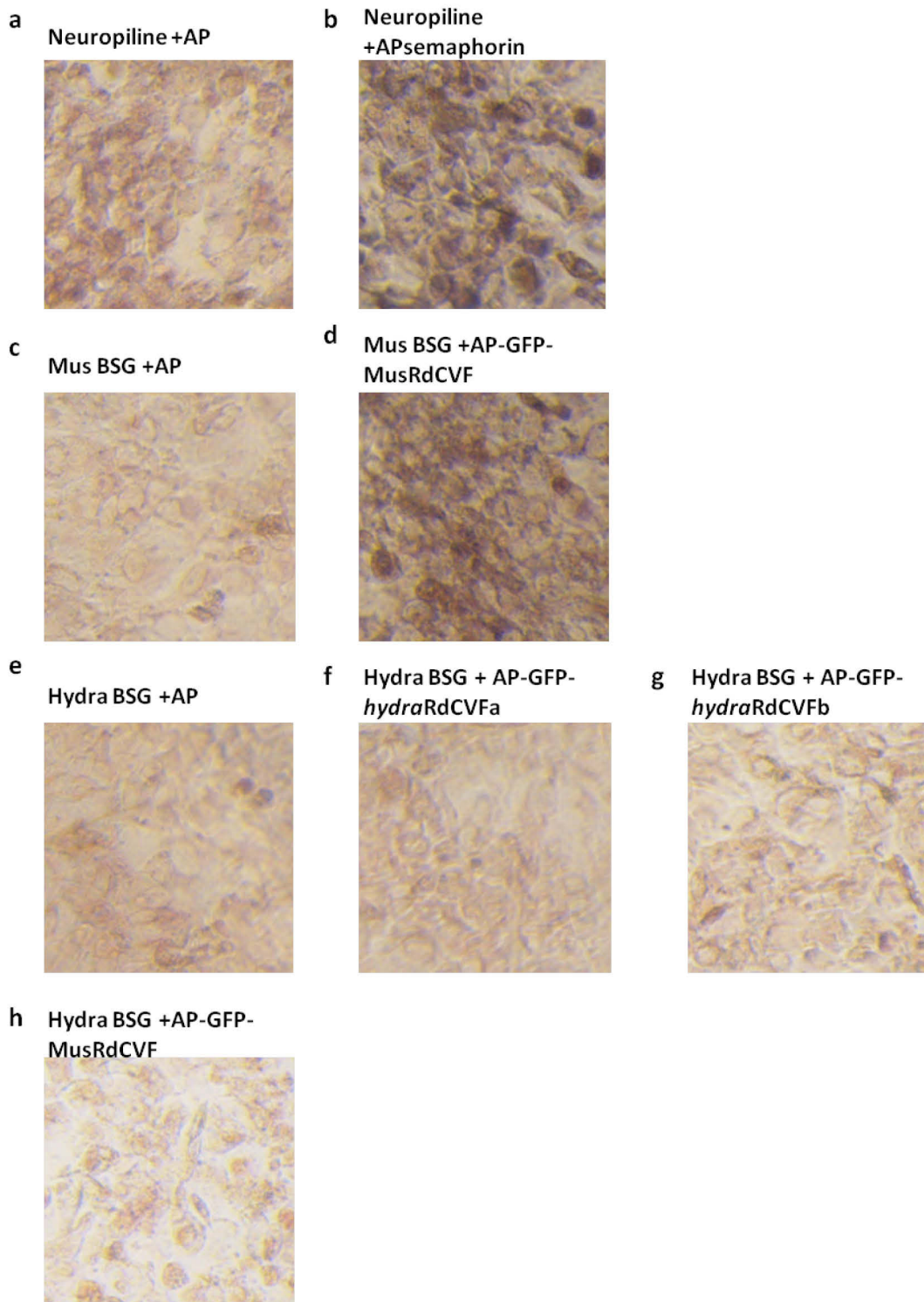


Figure 110: Tests d'interaction entre hydra RdCVFa et b et hydra BSG. Les essais réalisés sont **a)** neuropiline incubée en présence de la phosphatase seule, **b)** neuropiline incubée en présence de la phosphatase couplée à la semaphorine, **c)** Mus BSG incubée en présence de la phosphatase seule, **d)** Mus BSG incubée en présence de la phosphatase couplée à MusRdCVF, **e)** hydra BSG incubée en présence de la phosphatase seule, **f)** hydra BSG incubée en présence de la phosphatase couplée à hydra RdCVFa, **g)** hydra BSG incubée en présence de la phosphatase couplée à hydra RdCVFb, **h)** hydra BSG incubée en présence de la phosphatase couplée à RdCVF de souris. Mus: *Mus musculus*.

La protéine hydra BSG qui ne possède pas de domaine Ig0 ne permet pas d'établir d'interaction avec les protéines hydraRdCVFa et hydraRdCVFb. L'interaction de RdCVF avec son récepteur BSG1 requiert la présence du domaine Ig0.

Chez l'hydre, la protéine RdCVFL joue un rôle ancestral de thiorédoxine. Cette protéine qui répare les dommages causés par les radicaux libres de l'oxygène sur les protéines protège l'hydre contre le stress oxydatif. L'hydre n'exprime pas le récepteur BSG1 qui définit la fonction de RdCVF. De ce fait, cette deuxième protéine qui est exprimée chez cet organisme dépourvu de bâtonnets ne semble pas avoir de fonction particulière mais n'étant pas toxique serait tolérée. Tous ces résultats laissent à penser que dans un premier temps, le gène ancestral de NXNL1 était systématiquement épissé et qu'il codait par pression de sélection pour une thiorédoxine ancestrale de RdCVFL. Ce n'est que plus tard qu'un défaut d'épissage de ce gène est apparu. Ce défaut entraîne la rétention d'un intron qui deviendra plus tard l'unique intron de NXNL1 présentant un codon stop en phase de lecture entraînant l'expression de l'ancêtre du facteur trophique RdCVF. L'épissage alternatif de ce gène existait donc bien avant l'apparition des bâtonnets. Ceci amène une autre question, est-ce l'épissage du gène basigin qui code pour le récepteur de RdCVF qui est apparue au cours de l'évolution avec les photorécepteurs? L'hydre exprime une protéine homologue de BSG qui ne possède pas de domaine extracellulaire immunoglobuline Ig0, domaine d'interaction de RdCVF. Est ce l'apparition de ce domaine qui est contemporain de l'apparition des bâtonnets ?

La plupart des vertébrés possède une rétine duplexe constituée de photorécepteurs à bâtonnets responsables de la vision en faible luminosité et de photorécepteurs à cônes pour la vision de jour et pour la détection des couleurs. Ces derniers sont présents chez de nombreux embranchements d'invertébrés tout comme chez les chordés. Sans expliquer précisément la séquence des événements, des études montrent que les bâtonnets ont évolué à partir des cônes (Fain et al., 2010; Lamb and Hunt, 2017). Les rétines duplexes sont également présentes chez les agnathes qui sont dépourvus de mâchoires que chez les gnathostomes, défini par la présence de mâchoires

généralement pourvues de dents. Ces deux infra-embranchements de vertébrés qui ont divergé il y a plus de 400 millions d'années peuvent donc être utilisés pour analyser certaines caractéristiques ancestrales des photorécepteurs. La lamproie marine, ou *Petromyzon marinus* (*P. marinus*), est un vertébré qui appartient à la famille des agnathes et est le modèle de référence chez les cyclostomes actuels représentés par un très petit nombre de formes réparties en deux groupes, les myxines marines et les lamproies marines ou dulcicoles (d'eau douce). La morphologie générale de la lamproie ressemble de près à celle de l'anguille, elles sont reconnaissables à leur corps allongé plus ou moins cylindrique dépourvu d'écailles avec une bouche armée de denticules rétractiles formés de corne et qui fait office de ventouse. La lamproie possède également une paire d'yeux apparents chez l'adulte alors qu'ils sont enfouis sous une couche mésenchymateuse chez la myxine. Sa position phylogénétique fait de la lamproie une espèce d'intérêt majeur pour comprendre l'origine des vertébrés. La lamproie, peut mesurer de 70 cm à plus d'un mètre de long et possède un squelette cartilagineux qui présente des vertèbres rudimentaires. Cette espèce migratrice, dont les pontes sont très abondantes mais saisonnières, est retrouvée en Europe mais aussi en Amérique du Nord et son maintien en laboratoire est possible. Cependant, compte tenu de la complexité de son cycle de vie et de la durée des stades larvaires qui peuvent s'étendre sur plusieurs années, cette espèce ne fait actuellement l'objet d'aucun élevage en laboratoire. De nombreuses différences existent entre la structure de la rétine adulte de lamproie et celle des gnathostomes, posant entre autres la question de l'état ancestral de ce tissu avant la séparation de ces deux infra-embranchements. La lamproie possède deux types de photorécepteurs, appelés «court» et «long» qui présentent une morphologie de leurs segments externes similaire à celle des cônes et composés d'un empilement de disques entourés par une membrane en continue avec la membrane plasmique. Les photorécepteurs «court» semblent être des bâtonnets, tandis que photorécepteurs «long» des cônes (Collin et al., 2003; Dickson and Graves, 1979). Les travaux d'Ala Morshedian et Gordon Fain récemment publiés ont confirmé cette hypothèse. En effet ces chercheurs ont démontré par des analyses électrophysiologiques que les photorécepteurs «court» de lamproie étaient capables de répondre à la stimulation d'un unique photon tout comme les bâtonnets des autres vertébrés (Morshedian and Fain, 2015; 2017). Ainsi, les photorécepteurs présentant des caractéristiques de bâtonnets ont émergé *terminus ante quem* la séparation des agnathes et des gnathostomes. Chez la

souris, seuls les bâtonnets expriment les deux messagers du gène *Nxn1l* alors que les cônes n'expriment que le messager *long Nxn1l* (Mei et al., 2016). Toutefois, nous avons démontré que l'hydre qui ne possède pas de rétine et pas de bâtonnets exprime tout de même les messagers *short hydra Nxn1 a* et *b* en plus des messagers *long hydra Nxn1 a* et *b*. L'émergence des bâtonnets ayant eu lieu plus tard au cours de l'évolution, nous en déduisons qu'il n'y a pas de corrélation fonctionnelle entre l'épissage alternatif du gène *Nxn1l* et l'apparition de ces photorécepteurs. Qu'en est-il chez la lamproie qui représente le premier vertébré connu pour posséder des cellules de type bâtonnets dans sa rétine ? Est-ce que le gène *Nxn1l* est également alternativement épissé dans ces cellules et est-ce que l'intron de ce gène n'est jamais retenu dans les cônes ? Alors que la fonction éventuelle de RdCVF chez l'hydre n'a pas été élucidée, cette protéine a-t-elle été recrutée au cours de l'évolution par la rétine et plus précisément par les bâtonnets pour remplir sa fonction de maintien des cônes par son interaction avec son récepteur BSG1 et via l'activation de la glycolyse aérobie ? Pour répondre à ces questions, nous décidons d'étudier l'expression de *Nxn1l* dans la rétine de lamproie et l'épissage de ce gène dans les 2 types de photorécepteurs présents chez cet organisme. Pour cela une collaboration a été établie avec l'équipe de Gordon Fain du Department of Integrative Biology and Physiology à l'University of California Los Angeles (UCLA) où je me suis rendue à deux reprises durant l'année 2017.

2: ETUDE DE L'EXPRESSION DE *NXN1L* CHEZ LA LAMPROIE

2.1: LA LAMPROIE, *PETROMYZON MARINUS* EXPRIME LE GENE *NXN1L*

Le séquençage réalisé à partir d'ADN de tissu somatique prélevé chez l'adulte de lamproie et l'assemblage sommaire de son génome ont été effectués par le *Joint*

Genome Institute qui est un centre de séquençage américain, situé en Californie. Alors que ce séquençage couvre le génome de la lamproie uniquement d'un facteur 5,9, l'annotation de ce génome reconstitué par l'assemblage d'une série de 310 000 contigs d'une taille moyenne de 2,6 kb à été réalisé par le consortium européen Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>). Ces données conduisent à une première estimation de la taille de ce génome de 0,8 milliard de paires de bases. Puisqu'il est connu que le génome de la lamproie subit des réarrangements majeurs qui conduisent à l'élimination de séquences en quantité significative au cours de son développement précoce (Smith et al., 2009), l'estimation de sa taille doit certainement être supérieur mais reste surtout entachée de zones d'ombre. C'est pourquoi l'étude de certains gènes chez cet organisme reste délicate. Le gène *Nxn11* chez la lamproie est retrouvé dans la base de donnée Ensembl sous le numéro ENSPMAG00000002968, il est présenté sous forme de deux exons de 329 et 271 pb et d'un intron de 250 pb qui présente un codon stop en phase de lecture tout de suite en 3' après l'exon n°1 (Fig. 111).

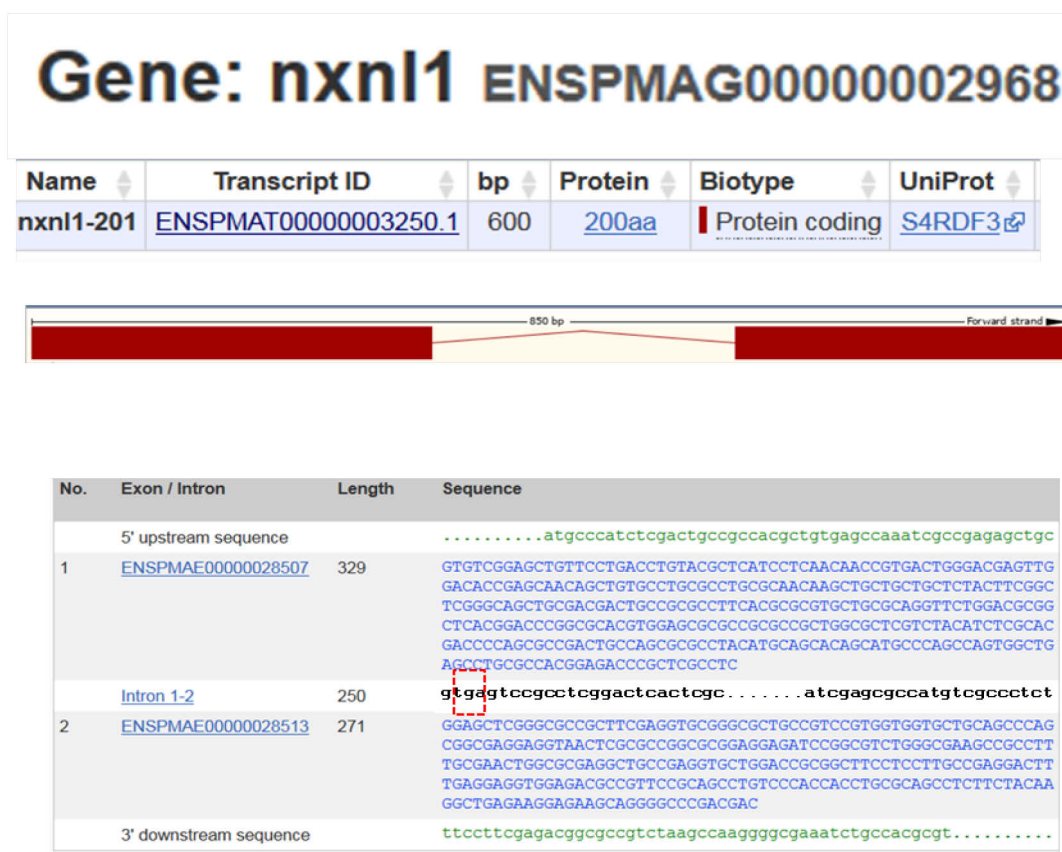


Figure 111: Description du gène *Nxn11* de lamproie dans Ensembl.

Les tissus de lamproies sont fournis par le laboratoire de Gordon Fain. Lors de mon premier séjour dans son laboratoire, en Janvier 2017, seules des lamproies juvéniles étaient disponibles. Les yeux de lamproies juvéniles sont complètement développés et présentent les mêmes caractéristiques que les yeux d'adultes. Lors de mon deuxième séjour en juillet 2017, des lamproies adultes qui avaient remonté les grands lacs entre Mai et Juin étaient disponibles. Nicholas Johnson, un chercheur en écologie de la station biologique Hammond Bay de l'United States Geological Survey (USGS) à Millersburg dans le Michigan aux USA s'occupe de fournir les lamproies après les avoir capturées dans les affluents du lac Huron et Erié durant leur migration (**Fig. 112**).



Figure 112: Les Grands Lacs où sont retrouvées les lamproies aux USA.

Les animaux peuvent être gardés pendant plus de 6 semaines à UCLA dans un grand réservoir rempli d'eau sans chlore en circulation constante et refroidie à 4°C. Le

réservoir est conservé dans une chambre froide à 10°C et est maintenu sous des cycles de 12 h d'éclairage suivi de 12 h d'obscurité. Les dissections des yeux de lamproie sont réalisées par Ala Morshedian, étudiant de Gordon Fain. Pour cela, les animaux sont décapités à l'aide d'un scalpel pour les lamproies juvéniles et à l'aide d'une guillotine pour les adultes après avoir été anesthésiés par immersion dans du tricaine méthane sulfonate (**Fig. 113b et c**). Le crane est séparé en deux dans l'axe rostral-caudal pour retirer plus facilement les yeux (**Fig. 113d**). Les yeux sont placés sur un support dans lequel des empreintes de tailles différentes sont incrustées pour stabiliser les yeux, puis recouvert par un socle pour les fixer avant de les découper en deux avec une lame de rasoir ce qui permet de séparer l'avant de l'œil (la lentille et la cornée) du fond (sclère et rétine) (**Fig. 113e, f, g et h**). La rétine est séparée de l'EPR et est récupérée (**Fig. 113i**).

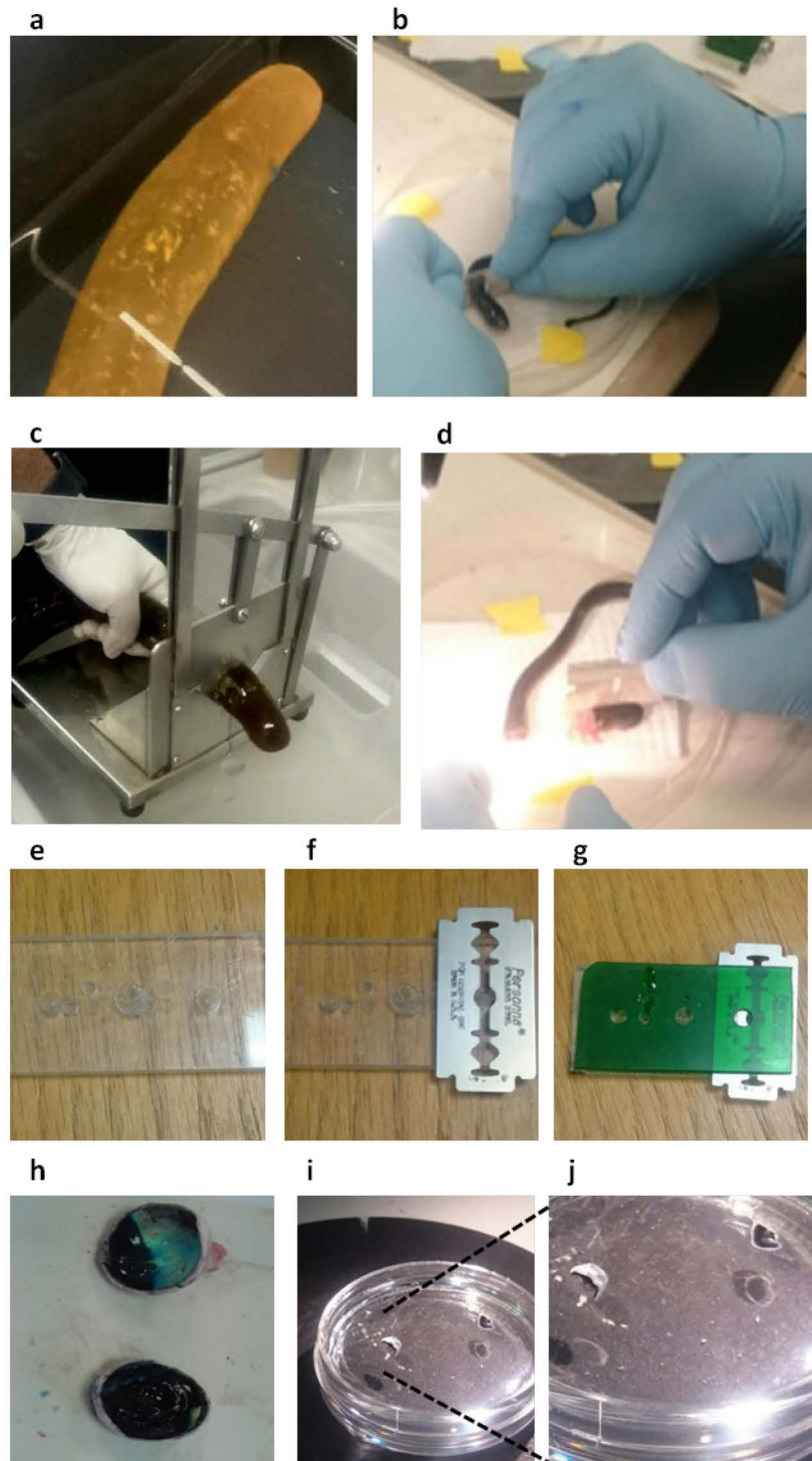


Figure 113: Sacrifice de lamproie et dissection de sa rétine. **a)** Lamproie adulte. **b)** Sacrifice d'une lamproie juvénile à l'aide d'une lame de rasoir. **c)** Sacrifice d'une lamproie adulte à l'aide d'une guillotine. **d)** Séparation de la tête en deux parties. **e)** Support en plexiglas avec empreinte pour déposer et stabiliser l'œil. **f)** Dépôt de la lame de rasoir qui va servir à découper l'œil en deux parties. **g)** Placement du support supérieur pour stabiliser l'œil. **h)** Globe oculaire de lamproie séparé en deux. **i)** Rétine de lamproie disséquée. **j)** Agrandissement de la photo i.

Les rétines prélevées sont placées dans une solution de guanidine-HCl pour une extraction des ARN au chlorure de césium qui est une méthode permettant de stabiliser les ARN. Cette méthode a été standardisée par notre équipe et publiée dans le journal technique JOVE en 2013 (Delyfer et al., 2013). Le contrôle qualité de ces ARN réalisé à l'aide du Bioanalyzer 2100 permet la distinction des deux pics des ARNs ribosomaux 18S et 26S validant leur qualité (**Fig. 114**).

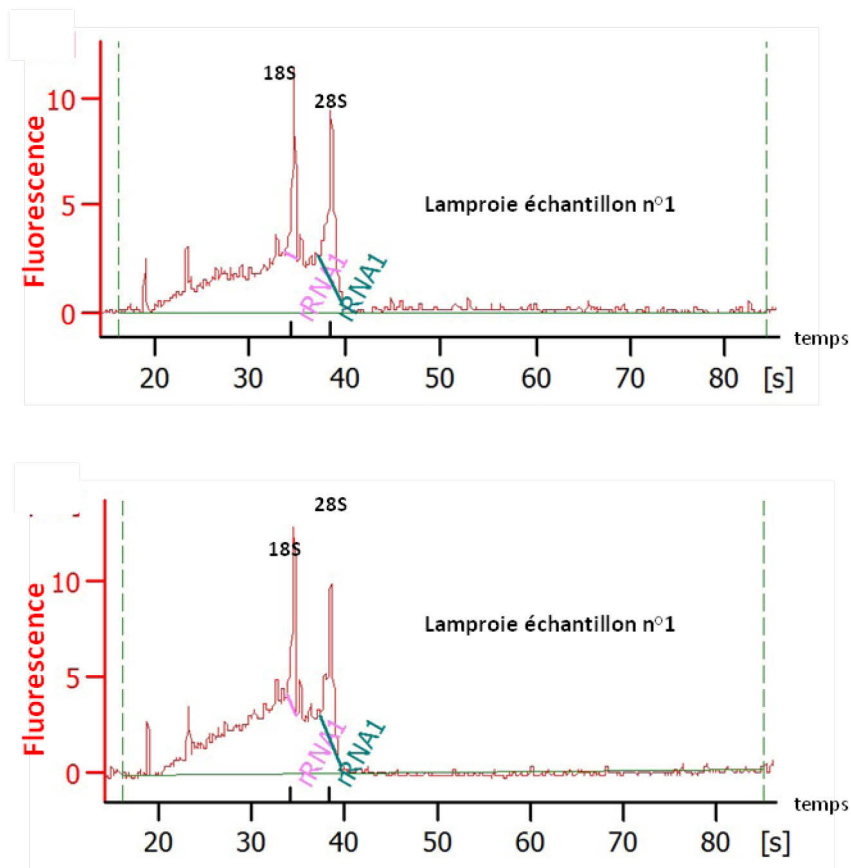


Figure 114: Analyse d'ARN extraits à partir de deux échantillons de rétine de lamproie.

Une fois la transcription inverse effectuée, l'étude de l'expression des isoformes du gène *Nxn11* est réalisée en utilisant des amorces spécifiques. L'amorce sens qui permet d'amplifier l'isoforme *short Nxnl1* est dessinée dans l'exon n°1 alors que l'amorce antisens est dessinée dans l'intron immédiatement en 3' du premier codon stop retrouvé. L'amorce sens qui permet d'amplifier l'isoforme *long Nxnl1* est la même que celle

utilisée pour amplifier l'isoforme *short Nxn1* alors que l'amorce antisens est placée dans l'exon n°2 (Fig. 115a).

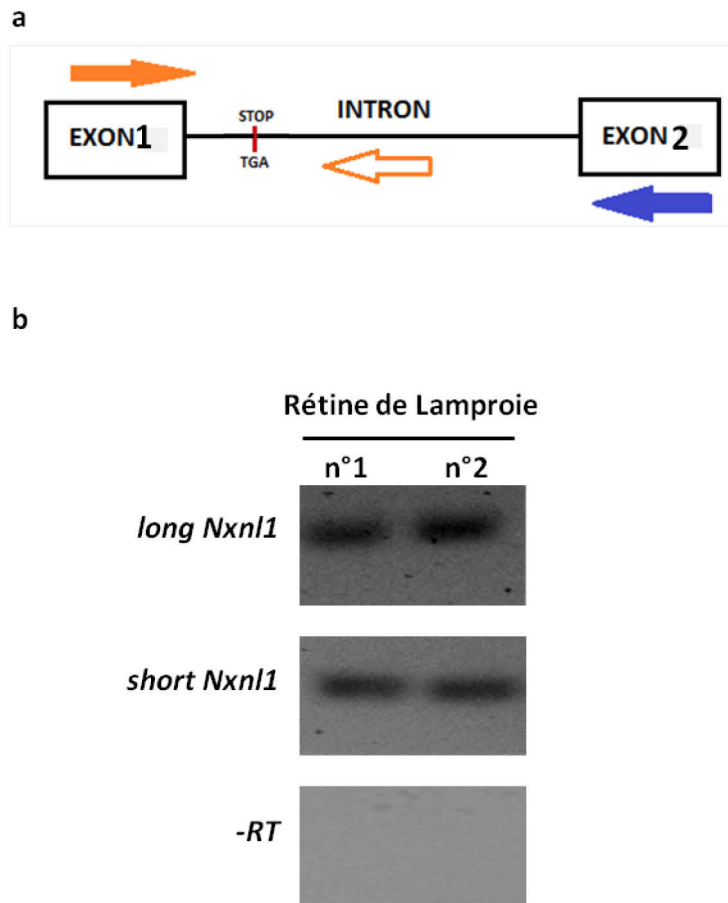


Figure 115: Expression des formes courte et longue du gène *Nxn1* chez la lamproie. **a)** représentation schématique de la région amplifiée. Les flèches orangées représentent les amorces utilisées pour amplifier le messenger *short Nxn1* et les flèches pleines représentent les amorces utilisées pour amplifier le messenger *long Nxn1*. **b)** PCR des fragments amplifiés à partir d'ARN extraits de deux rétines de lamproie. Le témoin -RT représente l'expérience où la reverse transcriptase n'a pas été ajoutée lors de la reverse transcription.

Le résultat de cette expérience indique que les deux isoformes sont amplifiées à partir de rétine totale de lamproie et que chez cette dernière *Nxn1* est alternativement épissé (Fig. 115b). Tout comme pour l'hydre, le génome de lamproie n'étant pas

complètement annoté, nous décidons de vérifier les séquences des fragments amplifiés par RT-PCR. Toutefois, comme indiqué précédemment, l'annotation du génome de la lamproie réalisée par le consortium Ensembl, aucune information concernant cette espèce n'est disponible dans la base de données du NCBI. Le logiciel BLAST du NCBI n'est donc pas utilisable pour comparer les séquences obtenues avec celles renseignées dans le NCBI. Les séquences obtenues, après purification et séquençage des fragments amplifiés par RT-PCR, sont alors comparées avec la séquence fournie par Ensembl à l'aide de l'outil contig du logiciel de Vector NTI®. Le séquençage du fragment *short Nxn11* amplifié indique qu'il s'agit bien de la fin de l'exon n°1 du gène *Nxn11* de lamproie, suivi du début de l'intron comprenant le codon stop en phase de lecture (**Fig. 116**).

```
TCTACATCTCGCACGACCCCAGCGCCGACTGCCAGCGCGCCTACATGCAGCACAGCAT
GCCAGCCAGTGGCTGAGCCTGCGCCACGGAGACCCGCTCGCCTCGTGATGTCCGCCTC
GGACTCACTCGCGGCCGTGCGCTGCGGCGGAAA CGCCGATTGAACCGCG
```

Figure 116: Séquence obtenue après avoir séquençé le fragment *short Nxn11* de lamproie amplifié. La séquence en bleu correspond à l'exon 1 du gène *Nxn11* de lamproie. La séquence en noir correspond à l'intron du gène *Nxn11* de lamproie. Le codon stop en phase de lecture de la forme courte est représenté en rouge.

Ce messager amplifié a retenu l'intron du gène et correspond parfaitement à celui qui code pour la protéine RdCVF (**Fig. 117**).

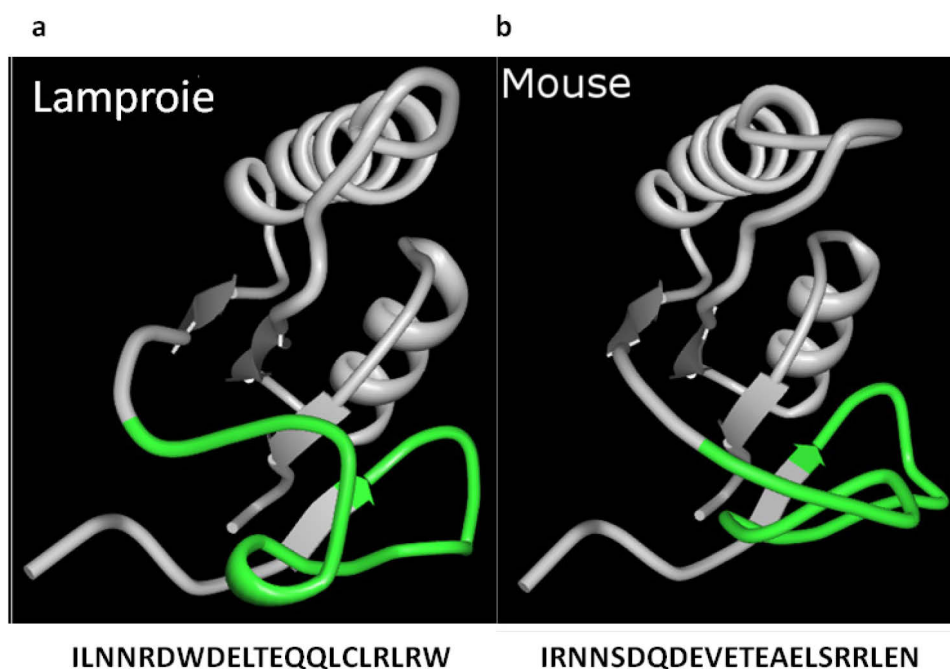


Figure 117: Structure tertiaire des protéines, a) lampreyRdCVF et b) MusRdCVF. La séquence de chacun des épitopes représentés en vert est indiquée. Mus: *Mus musculus*.

L'analyse de la séquence du fragment *long Nxn11* amplifié indique la présence de la fin de l'exon n°1 du gène *Nxn11* de lamproie, immédiatement suivi de celle du début de l'exon n°2 du gène *Nxn11* de lamproie (**Fig. 118**).

CAGCGCGCCTACATGCAGCACAGCATGCCAGCCAGTGGCTGAGCCTGCGCCACGGA
 GACCCGCTCGCCTCGGAGCTCGGGCGCCGCTTCGAGGTGCGGGCGCTGCCGTCCGTG
 GTGGTGCTGCAGCCAGCGGCGAGGAGTAA

Figure 118: Séquence obtenue après avoir séquencé l'isoforme *long Nxn11* de lamproie amplifié. La séquence en bleu correspond à l'exon 1 du gène *Nxn11* de lamproie. La séquence en rouge correspond à l'exon 2 du gène lamproie *Nxn11*.

Cette analyse confirme que le messenger *long Nxn11*, représente la jonction des deux exons du gène et que l'intron a été épissé.

Tout comme chez l'hydre le gène *Nxn11* est alternativement épissé chez la lamproie. Ce gène exprime les deux messagers *short Nxn11* et *long Nxn11* dans la rétine de lamproie qui présente les deux types de photorécepteurs, bâtonnets et cônes.

2.2: LA LAMPROIE *PETROMYZON MARINUS* EXPRIME L'ISOFORME *SHORT NXL1* DANS LES BATONNETS ET L'ISOFORME *LONG NXL1* DANS LES BATONNETS ET LES CONES

Nous voulons savoir maintenant si RdCVF codé par l'isoforme *short Nxn11* a au cours de l'évolution été recruté et est spécifiquement exprimé par les bâtonnets pour jouer son rôle de maintien des cônes chez les organismes ayant acquis des yeux et une rétine duplexe. Pour cela, l'étude de l'expression des différentes isoformes du gène *Nxn11* dans les bâtonnets et dans les cônes de lamproie s'avère nécessaire. À partir d'un fragment d'une rétine de lamproie disséquée comme décrit précédemment, des cellules de bâtonnets ou de cônes sont isolées (**Fig. 119**).

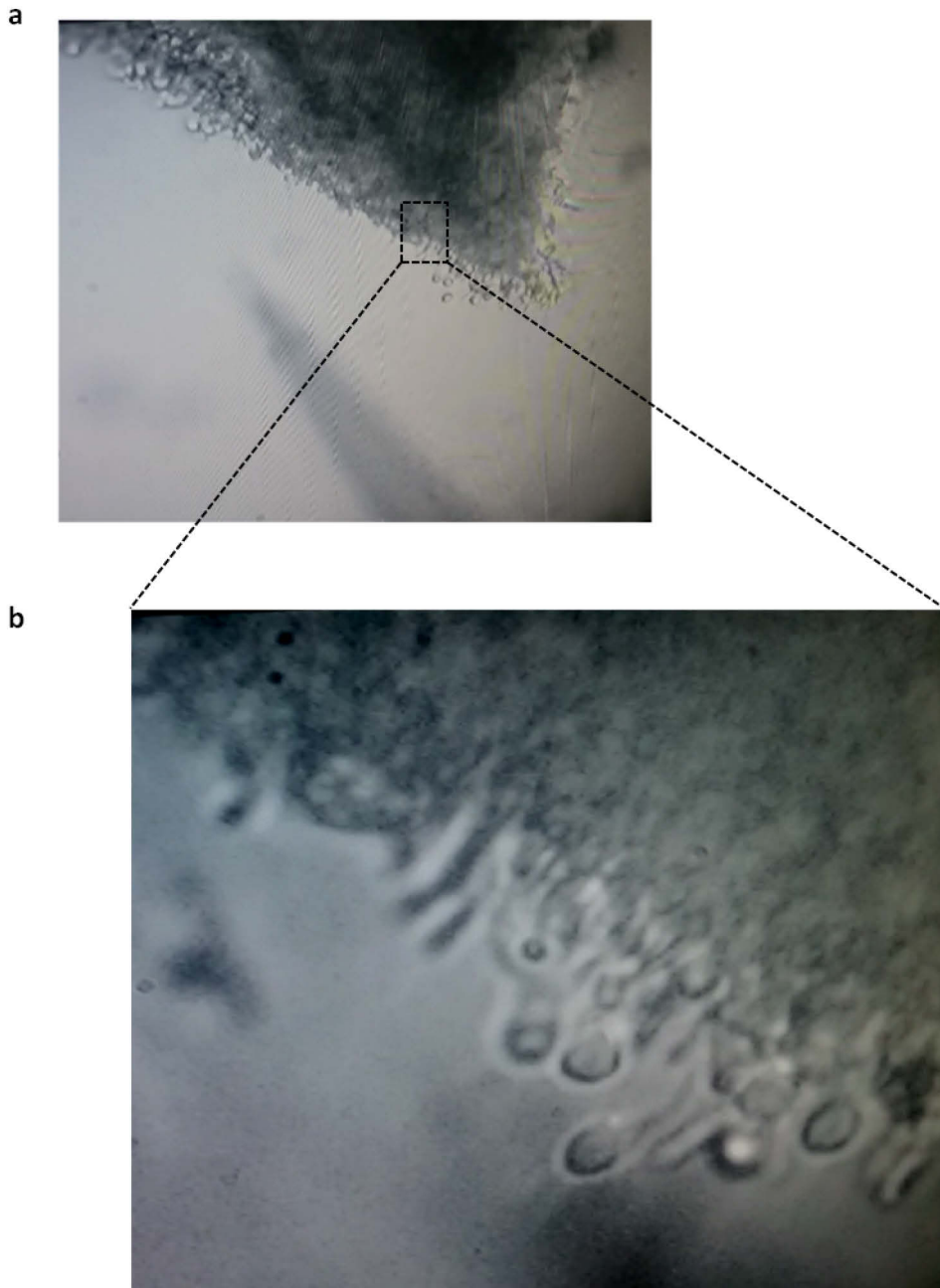


Figure 119: Rétine de lamproie. a) Fragment de rétine de lamproie. **b)** Zone de la rétine de lamproie agrandie 40 fois.

Notons que sous microscope, la couche des photorécepteurs des rétines de lamproie est déjà aisément identifiable (**Fig. 119a**). L'électrophysiologiste, Ala Morshedian, est capable de reconnaître ces cellules simplement en se basant sur leur morphologie suite

aux nombreux enregistrements de bâtonnets ou de cônes isolés qu'il a réalisé pour ses études. Il est capable de les isoler et de les prélever par aspiration à l'aide d'une pipette en verre. Les pipettes utilisées sont des pipettes à queue effilée produites à partir de verre de borosilicate étiré à l'aide d'un micropipette *puller* (**Fig. 120a**).

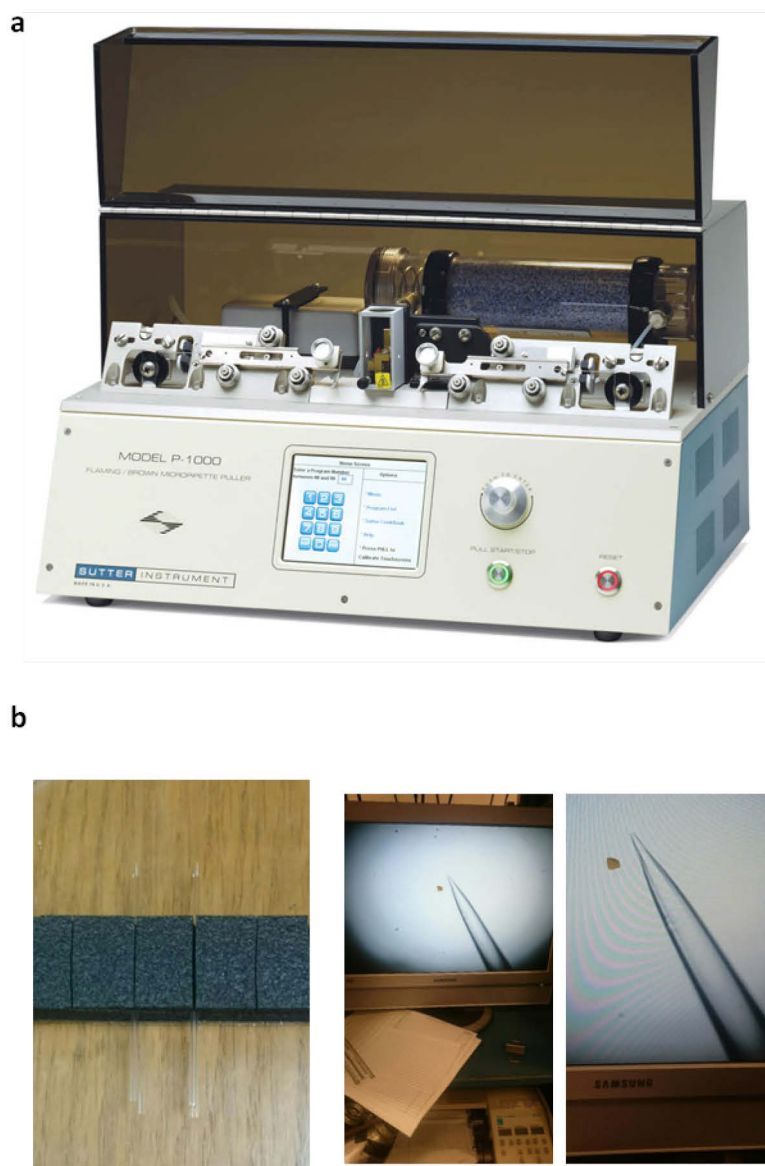


Figure 120: Préparation des pipettes pour récupérer les photorécepteurs individuellement. a) Micropipette *puller*. b) Micropipettes de diamètre et de résistance variables.

La taille de la pointe est ajustée sous microscope en déplaçant la pipette près du fil d'une platine chauffée jusqu'à ce que l'extrémité présente un diamètre intérieur qui correspond au segment externe du photorécepteur à prélever. La résistance des pipettes est également ajustée en fonction de la cellule à récolter, elle est d'environ 3 à 4 M Ω pour les bâtonnets et de 2,5 à 3 M Ω pour les cônes (**Fig. 120b**). Les bâtonnets qui sont majoritaires dans la rétine de lamproie, présentent une morphologie plus fine et plus allongée que les cônes. Ils sont localisés plus à l'intérieur de la rétine et il est donc moins facile de les récupérer dans leur intégrité (segment interne et externe) sans contamination (**Fig. 121**).

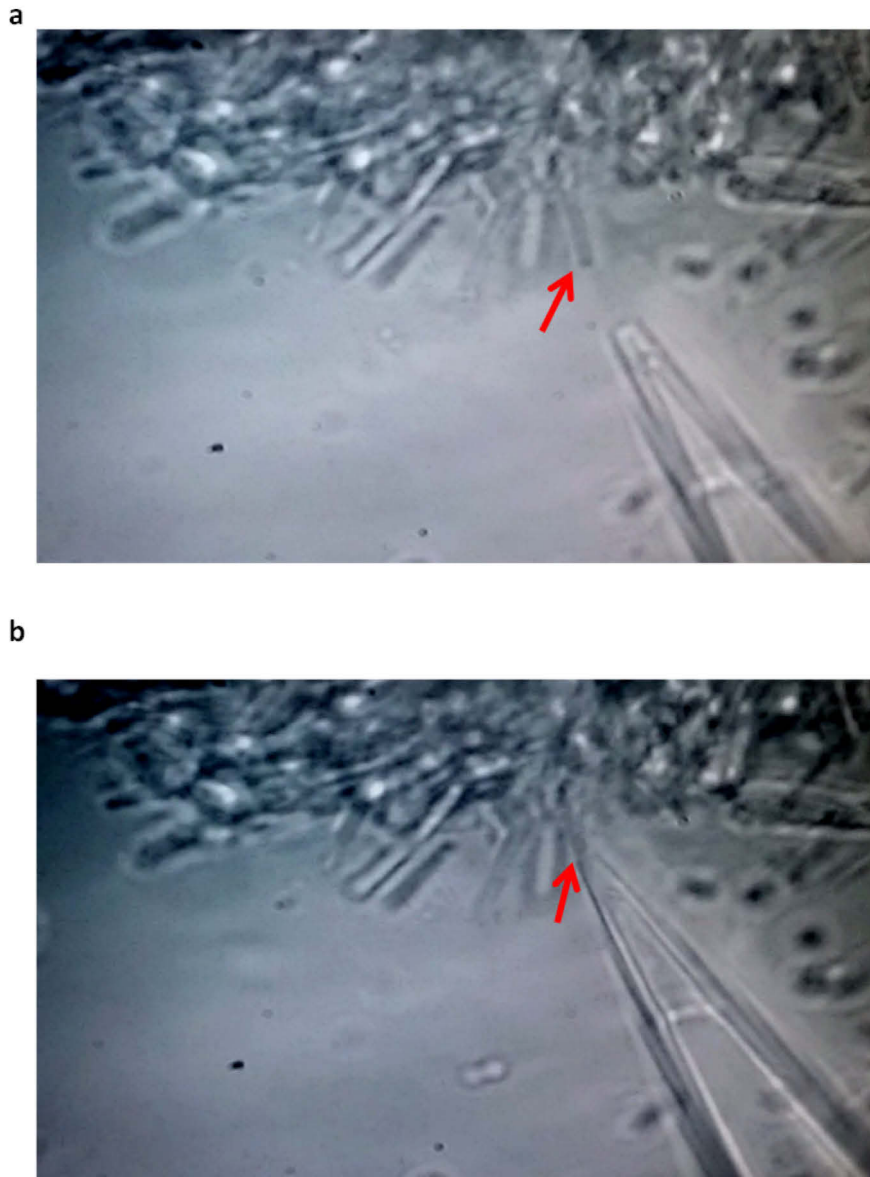


Figure 121: Bâtonnets de lamproie. a) Photographie d'un bâtonnet. b) Photographie d'un bâtonnet de lamproie aspiré par la pipette.

Les cônes sont eux plus épais avec leurs segments externes et internes bien discernables mais qui se séparent assez facilement (**Fig. 122**).

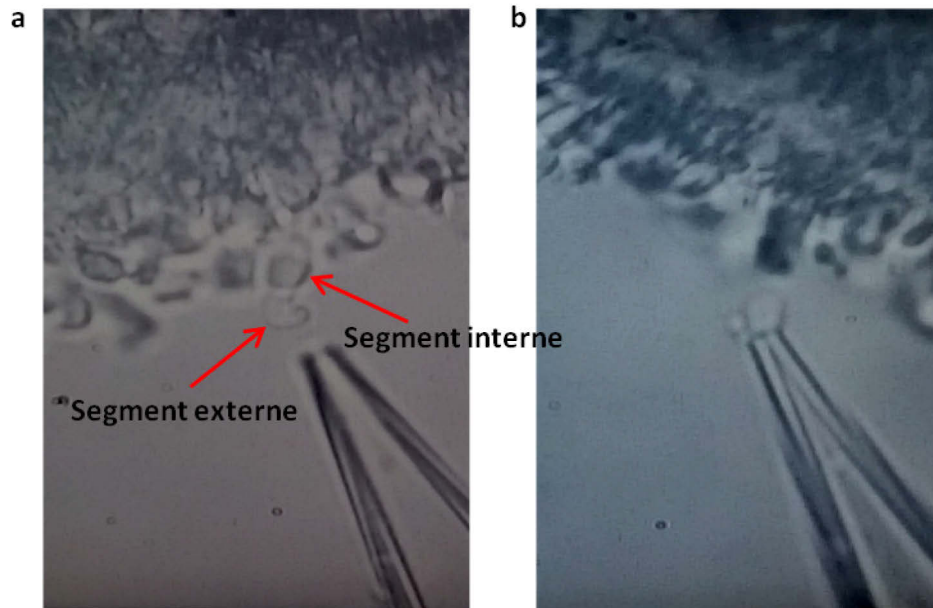


Figure 122: Cônes de lamproie. a) Photographie d'un cône de lamproie où le segment interne est bien séparé du segment externe. b) Photographie d'un cône de lamproie aspiré par la pipette.

Ces cellules se cassent lors de l'aspiration, séparant leur segment externe qui est récolté, de leur segment interne, où est localisé le noyau, qui reste accroché au tissu. La collecte des cônes est tout de même moins complexe que celle des bâtonnets. Récupérer ces cellules individuellement reste difficile du fait qu'elles entraînent souvent d'autres cellules et des ARNs de cellules avoisinantes ayant éclatées lors de la préparation du tissu. Parmi 40 cellules collectées, seules 8 exprimaient spécifiquement le marqueur rhodopsin des bâtonnets de lamproie et 2 exprimaient spécifiquement le marqueur opsin rouge (*red-sensitive opsin*) des cônes (**Fig. 123**).

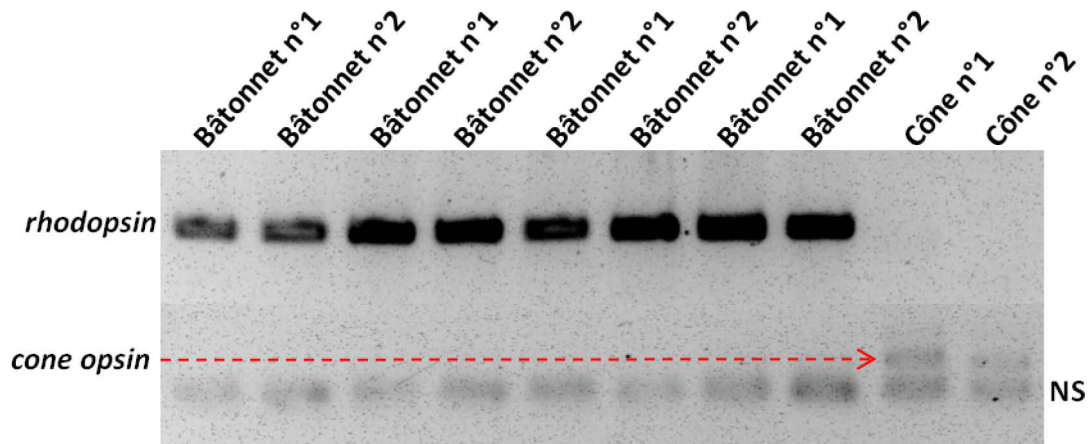


Figure 123: Cellules récoltées à partir de rétine de lamproie qui sont identifiés comme des bâtonnets ou des cônes. NS: amplification non spécifique.

Ces résultats confirment que les amplifications à partir de cellules isolées restent très difficiles à réaliser du fait de la rareté et la fragilité du matériel présent dans ces cellules. Les cellules collectées sont directement placées dans un mélange réactionnel de transcription reverse qui est incubé toute la nuit à 37°C, puis conservé en aliquote de 5 µl. C'est à partir d'un premier aliquote qu'une première réaction en chaîne par polymérase emboîtée ou *Nested* RT-PCR pour les identifier (bâtonnets ou cônes) est réalisée alors que les autres sont immédiatement congelés à -20°C. Pour amplifier un fragment à partir de ces cellules uniques, la réaction de *nested* RT-PCR est nécessaire afin d'augmenter la sensibilité. Cette réaction consiste à amplifier un premier fragment d'ADN avec une première paire d'amorces (amorces externes). Puis, le produit de la première réaction subit une seconde PCR avec une seconde paire d'amorces (amorces internes) (**Fig. 124**).

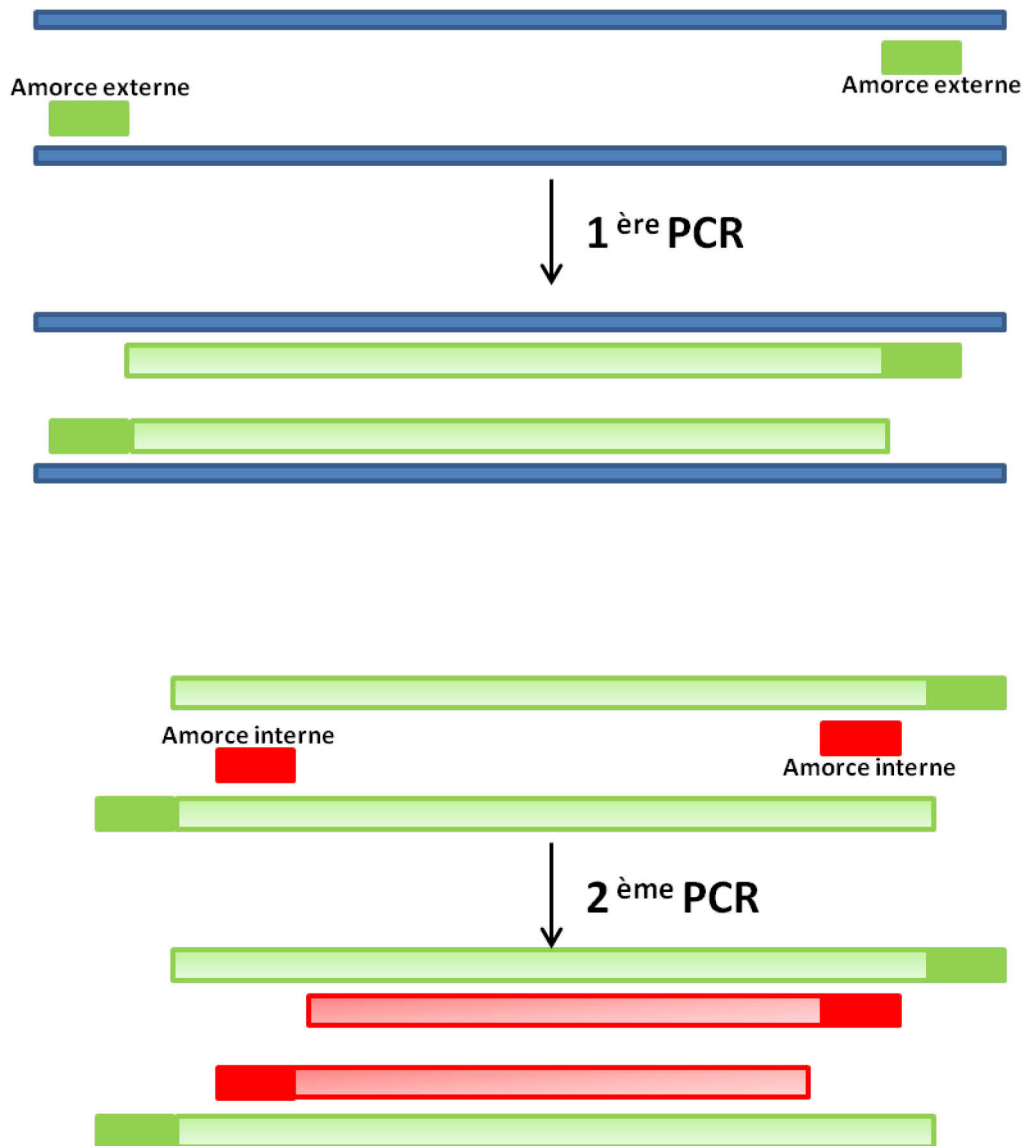


Figure 124: Principe de la réaction en chaîne par polymérase emboîtée ou *Nested PCR*.

À partir des 8 bâtonnets validés seulement 2 expriment le messenger *long Nxn11*. Le matériel biologique des 6 autres cellules uniques a très probablement subi une dégradation, soit durant l'extraction, soit durant la reverse transcription ou soit plus probablement durant le premier cycle de congélation décongélation. En effet cette deuxième nested PCR est réalisée à partir d'un deuxième aliquote ayant déjà été congelé une première fois. L'ADN complémentaire amplifié aurait eu le temps de se dégrader et serait donc inutilisable pour les réactions suivantes. Parmi ces deux bâtonnets, un

n'exprime que ce messager alors que le deuxième exprime aussi le messager *short Nxn11* (Fig. 125).

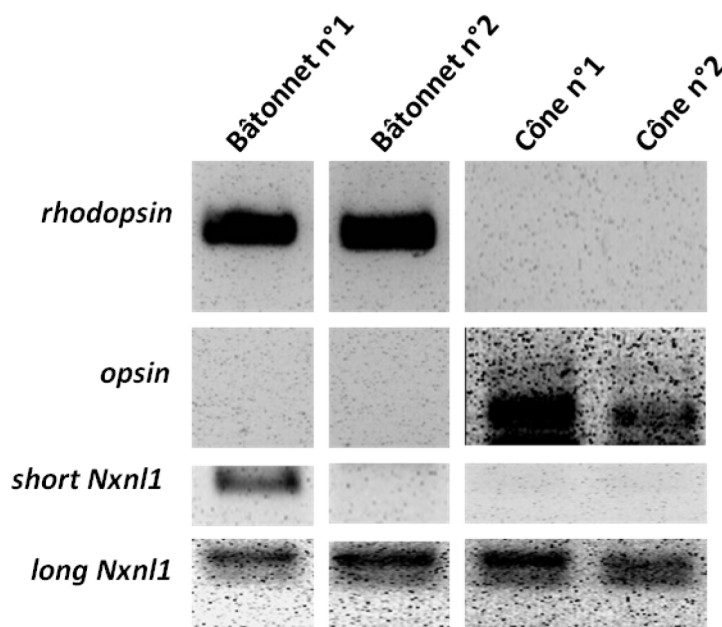


Figure 125: *Single Cell PCR* à partir de bâtonnets et de cônes de lamproie.

Les 2 cônes validés n'expriment que le messager *long Nxn11*. Ces résultats confirment que l'épissage alternatif du gène *Nxn11* chez la lamproie a lieu dans les bâtonnets alors que dans les cônes l'épissage du gène est systématique.

Chez la lamproie qui possède des yeux, une rétine duplexe avec des photorécepteurs à bâtonnets et à cônes l'épissage du gène Nxn11 produite deux variants d'épissage pour les batonnets et un seul pour les cônes. Tout comme chez la souris, seuls les bâtonnets de lamproie expriment le messager short Nxn11 qui code pour le facteur trophique RdCVF.

2.3: LES MESSAGERS *SHORT NxNL1* ET *LONG NxNL1* SONT-ILS TRADUITS EN PROTEINES?

Afin d'identifier les protéines RdCVF et RdCVFL de lamproie, des rétines entières de lamproie sont envoyées à la plateforme LSMBO pour réaliser des analyses de spectrométrie de masse. Après plusieurs essais aucun peptide de RdCVF et ni même de RdCVFL n'ont été identifiés. Cependant, des peptides du marqueur rhodopsine des bâtonnets ont été identifiés dans la rétine de lamproie à plusieurs reprises. La séquence peptidique de ce marqueur dont le numéro d'accèsion est Q98980 est complètement décrite sur la base de données Uniprot (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q98980>). Les analyses de MS/MS ont permis d'identifier des peptides localisés en début, en milieu et en fin de séquence de la protéine rhodopsine (**Fig. 126**).

```

1  MNGTEGENFY  IPFSNKTGLA  RSPFEYPQYY  LAEPWKYSVL  AAYMFFLILV
51  GFPVNFLTIF  VTVQHKKLRT  PLNYILLNLA  VANLFMVLFG  FTLTMYSSMN
101 GYFVFGPTMC  NFEQFFATLG  GEMSLWSLV  LAIERYIVIC  KPMGNFRFGS
151 THAYMGVAFT  WFMALSCAAP  PLVGWSRYLP  EGMQCSCGPD  YYTLNPNFNN
201 ESFVIYMFLV  HFIIPFIVIF  FCYGRLLCTV  KEAAAAQQES  ASTQKAEKEV
251 TRMVVLMVIG  FLVCWVPYAS  VAFYIFTHQG  SDFGATFMTV  PAFFAKTSAL
301 YNPIIYILMN  KQFRNCMITT  LCCGKNPLGD  EDGASTSKT  EVSSVSTSQV
351 SPA

```

Figure 126: Séquence peptidique de rhodopsine de lamproie. Les peptides colorés représentent les peptides identifiés.

Le marqueur opsine (Red-sensitive opsin) des cônes dont la séquence peptidique est également connue et répertoriée sur Uniprot sous le numéro d'accèsion B2D1T1 (<http://www.uniprot.org/uniprot/B2D1T1>) est exprimé dans la rétine de lamproie. En effet, plusieurs peptides sont identifiés par les analyses de spectrométrie de masse et cela à plusieurs reprises (**Fig. 127**).

```

1  MTASWQGAMF AARRRQDDED TTESLFRYT NENNTKDPFE GPNYHIAPRW
51  VFNLTSVWMI IVVVLSTLFSN GLVLVATVKF KCLRHLNWI IVNLAIADIL
101 ETIFASTISV CNQVYGYFIL GHMPCVFEGY VVSTCGIAGL WSLAISWER
151 WMVCKPFGN IKFDGKIATI LIVFSWVWPA SWCSLPIFGW SRYWPHGLKT
201 SCGPDVFSGS TDPGVQSYMV VLMITCCFLP LSIILCYLQ VWLAIHSVAQ
251 QQKESETTQK AERDVSRMVV VMILAYVFCW GPYTFACFA AANPGYSFHP
301 IAAALPAYFA KGATIYNPII YVFMNRQFRN CILQLFGKKV DDGSEVSSSS
351 RTEVSSVSNS SVSPA

```

Figure 127: Séquence peptidique de l'opsine des cônes de lamproie. Les peptides colorés représentent les peptides identifiés.

Il est possible que les séquences récupérées des bases de données pour réaliser l'analyse d'identification peptidique de RdCVF et RdCVFL comportent de nombreuses erreurs qui interfèrent avec leur identification. C'est certainement pour ces raisons que l'identification par spectrométrie de masse de RdCVF et RdCVFL a échoué. En effet, le réarrangement et l'élimination de séquence du génome connues et souvent retrouvées chez les espèces parasites telle que la lamproie doit possiblement concerner le gène *Nxn11* chez cette espèce. Nous pensons que des peptides de RdCVF et de RdCVFL sont analysés et présents mais pas retrouvés car comparés à des séquences erronées. Ou alors, les peptides identifiés correspondent à des séquences manquantes et non décrites dans les bases de données génomiques. Pour essayer de contourner cette difficulté, nous décidons d'identifier les extrémités 5' et 3' du gène *Nxn11* de lamproie par une technique appelée *RNA Ligase Mediated Rapid amplification of cDNA ends RT-PCR* (RLM RACE RT-PCR). Cette technique permet d'amplifier et d'identifier la séquence complète d'un ADN complémentaire à partir d'une séquence connue. Les régions 5' et 3' de *Nxn11* de lamproie n'étant pas décrites dans Ensembl (**Fig. 111**), nous allons donc pour couvrir les parties manquantes du gène, réaliser une 5'RLM RACE RT-PCR et une 3'RLM RACE RT-PCR. La première étape de la 5'RLM RACE RT-PCR consiste à traiter les ARN totaux avec une phosphatase alcaline d'intestin de veau ou *Calf Intestine Alkaline Phosphatase* (CIP) afin de retirer toutes les extrémités 5' phosphate des ARN ribosomiaux, des ARN de transfert ou de l'ADN génomique. Ensuite, la *cap* des ARNm en 3' est retirée à l'aide d'une phosphatase acide de tabac ou *Tobacco Acid Pyrophosphatase* (TAP) et un oligonucléotide adaptateur de 45 pb est ajouté par ligation

à cette région. Cet adaptateur peut uniquement se lier à une extrémité 5' phosphate absente chez les ARN traités par la CIP. Un brin d'ADNc est alors synthétisé à partir des ARNm par transcription réverse. Enfin, une amorce dessinée sur la partie connue du gène et une amorce complémentaire à l'adaptateur sont utilisées pour amplifier la séquence entre ces deux amorces (**Fig. 128**).

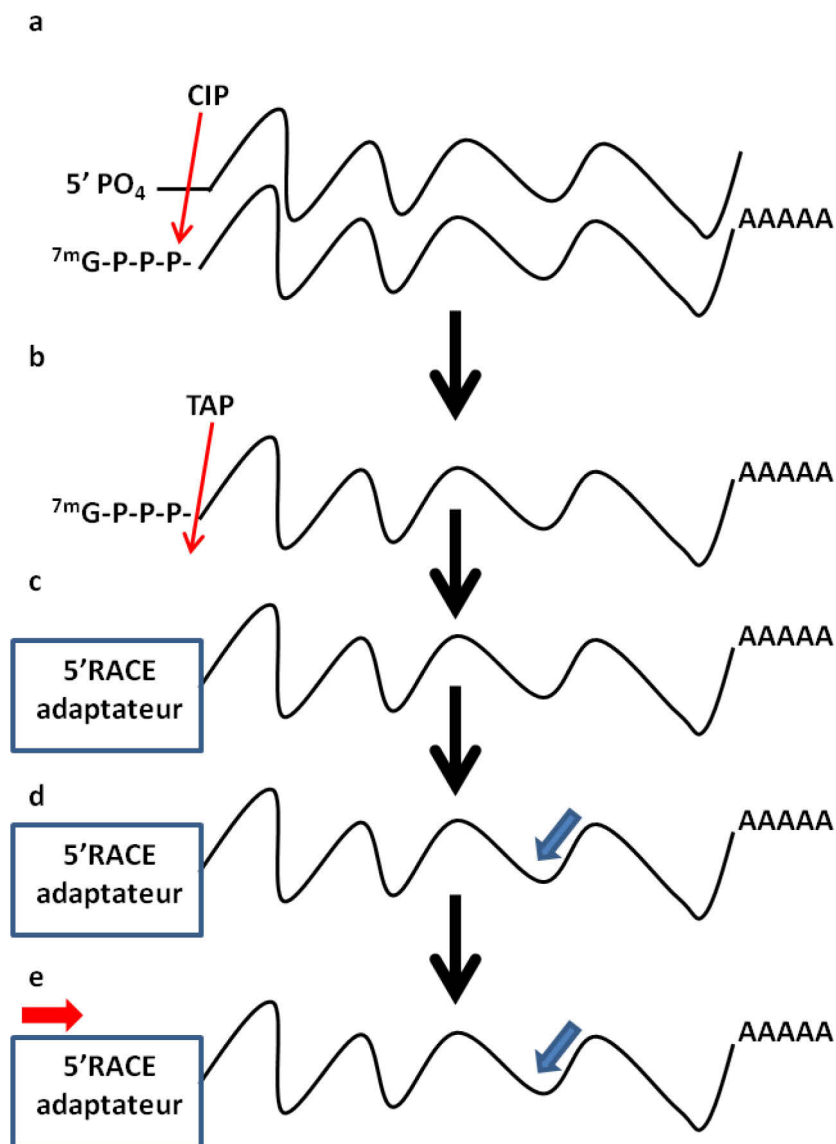


Figure 128: 5'RLM RACE PCR. a) Traitement des ARN avec la CIP pour retirer les extrémités 5' phosphate. b) Traitement des ARNm avec la TAP pour retirer la cap des ARNm. c) Ligation de l'adaptateur. d) Amorce antisens dessinée sur le brin connu du gène. e) Amorce sens dessinée sur l'adaptateur.

Une deuxième paire d'amorce est alors dessinée afin de réaliser une *nested* RT-PCR comme décrit précédemment (**Fig. 124**). Le gène qui code pour la protéine CXCR-4 qui est une protéine G couplé à un récepteur de chemokine est utilisé comme contrôle positif (Ganju et al., 1998). Pour cela, l'ARN de thymus de souris est traité de la même manière que celui de lamproie. La *outer* RT-PCR du contrôle positif permet l'amplification d'un fragment d'une taille de 350 pb (**Fig. 129a**).

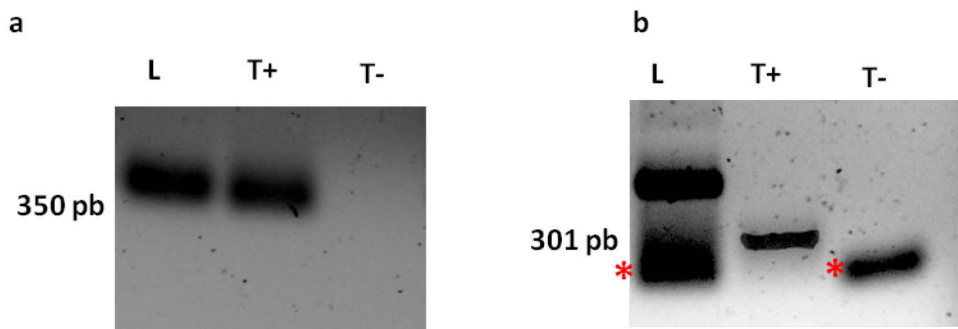
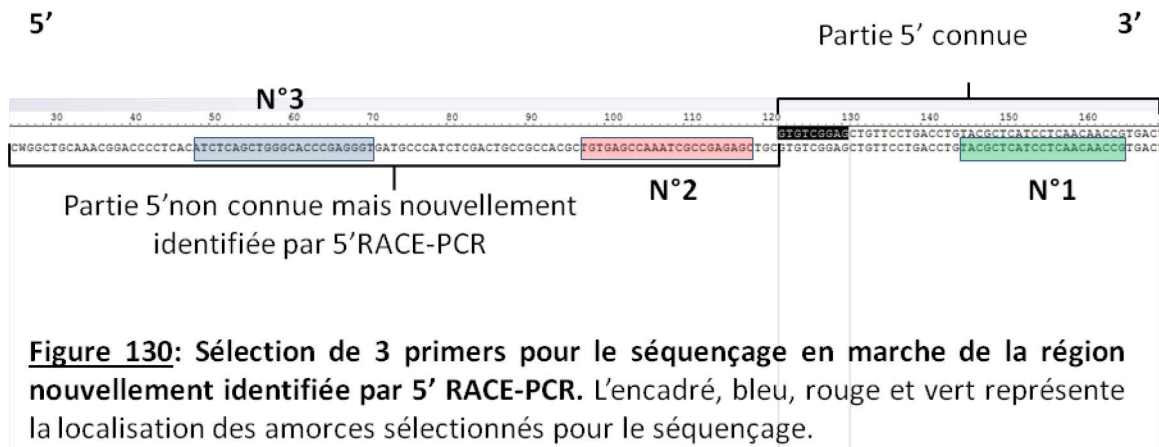


Figure 129: 5' RACE-PCR. **a)** PCR externe. **b)** PCR interne. Expérience réalisée à partir d'ARN de lamproie L, T+ expérience réalisée à partir d'ARN de thymus de souris, témoin positif fourni par le kit, T- expérience réalisée sans ARN. L'astérisque représente des amplifications non spécifiques.

Le fragment amplifié lors de la *outer* PCR à partir de l'ARN de lamproie a une taille très faiblement supérieure à celui du contrôle positif, il est d'environ 370 pb. L'absence d'amplification du contrôle négatif (T-), indique que ces amplifications sont spécifiques. L'*inner* PCR du contrôle positif permet l'amplification d'un fragment d'une taille de 301 pb (**Fig. 129b**), alors que celui amplifié à partir de la *outer* PCR de lamproie a une taille supérieure qui est estimée à environ 350 pb. Une amplification non spécifique représentée par un astérisque est retrouvée à partir du témoin négatif ainsi qu'à partir des échantillons de lamproie. Celle-ci doit probablement correspondre à une contamination. Le fragment amplifié à partir de la *inner* PCR de lamproie est purifié du gel d'agarose et est séquencé. Le séquençage est réalisé en plusieurs étapes, où chaque nouvelle amorce de séquençage utilisée est dessinée à partir de la séquence nouvellement identifiée (**Fig. 130**).



L'amorce de couleur verte est dessinée à partir de la séquence connue et identifiée dans Ensembl. Elle va permettre de séquencer et d'identifier un premier fragment. À partir de ce premier fragment identifié, l'amorce de couleur rouge est dessinée et va permettre d'identifier un deuxième fragment qui servira de matrice pour le dessin de l'amorce de couleur bleu qui va permettre d'identifier un troisième et dernier fragment. Cette méthode permet d'obtenir des fragments qui se chevauchent et qui vont recouvrir la plus grande région à identifier. Cette expérience a été renouvelée 3 fois et le séquençage des fragments des *inner* PCR a permis d'identifier une nouvelle séquence en 5' du gène de *Nxn11* de lamproie de 96 pb (**Fig 131**).

```

CTGGCTGCAAACGGACCCCTCACATCTCAGCTGGGCACCCGAGGGTGATGCCCATCTCGACTGCCGCCACGCTGTGAGCCAAATCG
CCGAGAGCTGCTGTGCGAGCTGTTCTGACCTGTACGCTCATCCTCAACAACCGTGACTGGGACGAGTTGGACACCGAGCAACAG
CTGTGCCCTGCGCTGCGCAACAAGTGTGCTGCTCTACTTTCGGCTCGGGCAGCTGCGACGACTGCCGCGCCTTCACGCGCGTGT
GCGCAGGTTCTGGACGCGGCTCACGGACCCGGCGCACGTGGAGCGCGCCGCGCTGGCGCTCGTCTACATCTCGCACGACCCCA
GCGCCGACTGCCAGCGCCTACATGCAGCACAGCATGCCAGCCAGTGGCTGAGCCTGCGCCACGGAGACCCGCTCGCTCGGAG
CTCGGGCGCCGCTTCGAGGTGCGGGCGCTGCCGTCCGTGGTGGTGTGCTGCAGCCAGCGGGGAGGTAAGTTCGGCCGGCGCGGA
GGAGATCCGGCGTCTGGGCGAAGCCGCTTTGCGAACTGGCGCGAGGCTGCCGAGGTGCTGGACCCGCGGCTTCCTCCTTGGCGAGG
ACTTTGAGGAGGTGGAGACGCCGTTCCGCAGCCTGTCCACCACCTGCGCAGCCTCTTCTACAAGGCTGAGAAGGAGAAGCAGGGG
CCCGACGAC
    
```

Figure 131: Identification de la séquence 5' amplifiée par 5'RACE RLM PCR. En rouge est représenté la séquence nouvellement identifiée et en noir est représentée la séquence déjà connue dans les bases de données.

La séquence nouvellement obtenue a été alignée avec le génome de 2,6 kb de la lamproie établi sur Ensembl à partir de l'assemblage de contigs (**Fig. 132**).

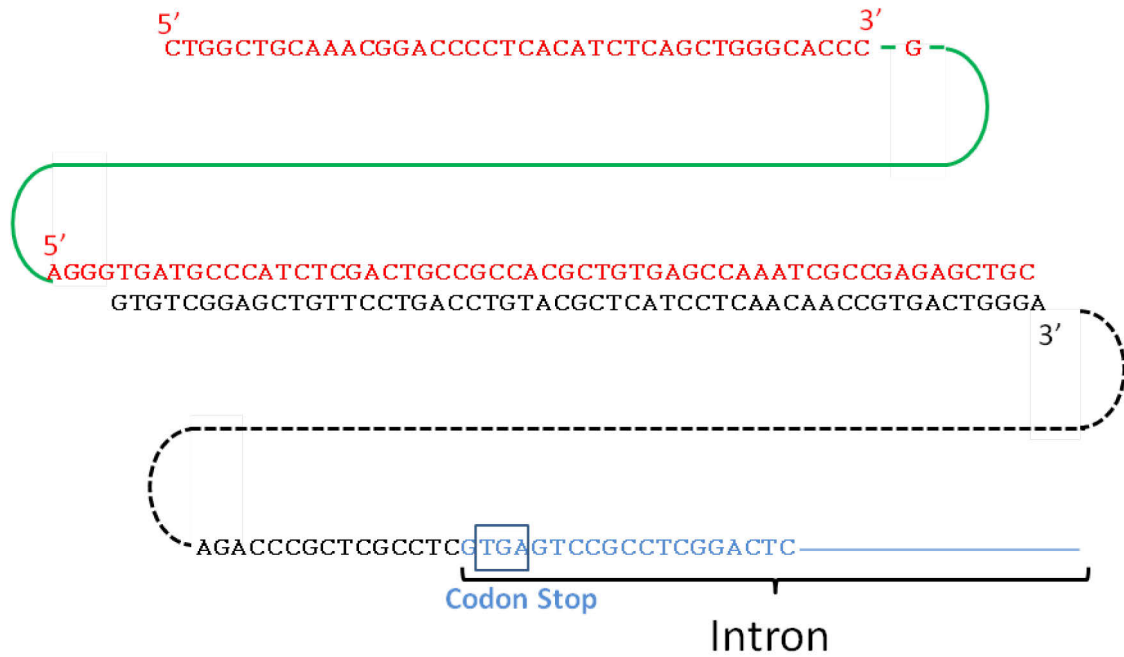


Figure 132: BLAST de la nouvelle séquence de *Nxn11* de lamproie identifiée par 5'RACE-PCR avec les données présentes dans la base de données Ensembl. La séquence en rouge représente la nouvelle séquence identifiée par 5'RACE-PCR. La séquence en noire représente la séquence exonique connue dans Ensembl. Le reste de cette séquence connue est représentée par des pointillés noirs. Le trait vert représente les nouveaux introns identifiés par 5'RACE-PCR. La séquence et le trait bleu représentent l'intron connu dans Ensembl.

Cet alignement indique la présence de deux introns supplémentaires dans la partie 5' du gène *Nxn11* de lamproie représentés en trait plein vert dans la figure 132. Cet alignement indique également la présence de deux exons supplémentaires dans le gène *Nxn11* de lamproie dont l'un est composé d'un seul nucléotide G représenté par la séquence en rouge. La séquence en noir et complétée par des pointillés représente la séquence d'une région exonique décrite dans Ensembl qui ressemble à l'exon n°1 de *Nxn11* des mammifères. Cette séquence exonique est suivie en 3' par une séquence intronique représentée par la séquence et le trait bleu. Nous constatons que cette séquence intronique présente un codon stop en phase de lecture de la même manière que celui présent et conservé dans l'intron du gène *Nxn11* des mammifères (**Fig. 13**). Compte tenu du haut degré de conservation du gène *Nxn11* chez les mammifères, ces résultats

indiquant la présence d'exons supplémentaires dans le gène *Nxn1* de lamproie et la présence d'un exon constitué uniquement du nucléotide G semblent particulièrement étranges et étonnant. En ne tenant compte que de ces résultats, la séquence suivante AGGGCATTGACGTGCAGCAGCAGCAGATG retrouvée à partir des contigs de Ensembl et localisée dans la région 5' en amont de la séquence identifiée par 5' RACE RLM PCR et qui ne présente pas de codon standard d'initiation de la traduction ATG est identifiée (**Fig. 133**).

a
 AGGGCATTGACGTGCAGCAGCAGCAGATGCTGGCTGCAAACGGACCCCTCACATCTCAGCT
 GGGCACCCAGGGTGTATGCCATCTCGACTGCCGCCACGCTGTGAGCCAAATCGCCGAGAG
 CTGCGTGTTCGGAGCTGTTCTGACCTGTACGCTCATCCTCAACAACCGTGACTGGGACGAGTT
 GGACACCGAGCAACAGCTGTGCCTGCGCCTGCGCAACAAGCTGCTGCTGCTCTACTTCGGCT
 CGGGCAGCTGCGACGACTGCCGCGCCTTACGCGCGTGTGCGCAGGTTCTGGACGCGGCT
 CACGGACCCGGCGCACGTGGAGCGCGCCGCGCCGCTGGCGCTCGTCTACATCTCGCACGACC
 CCAGCGCCGACTGCCAGCGCGCCTACATGCAGCACAGCATGCCAGCCAGTGGCTGAGCCTG
 CGCCACGGAGACCCGCTCGCCTCGGAGCTCGGGCGCCGCTTCGAGGTGCGGGCGCTGCCGT
 CCGTGGTGGTGCTGCAGCCAGCGGCGAGGAGGTAAGTTCGCGCCGGCGCGGAGGAGATCC
 GGCGTCTGGGCGAAGCCGCCTTTGCGAACTGGCGCGAGGCTGCCGAGGTGCTGGACCGCG
 GCTTCTCCTGCCGAGGACTTTGAGGAGGTGGAGACGCCGTTCCGCAGCCTGTCCCACCAC
 CTGCGCAGCCTCTTCTACAAGGCTGAGAAGGAGAAGCAGGGGCCCGACGAC

b
 RALTCSSSRCWLQTDPSHLSWAPEGDAHLDCRHAVSQIAESC
 VSE
 LFLTCTLILNNRDWDDELDEQQLCLRLRNKLLLLLYFGSGSCDDCRA
 FTRVLRWFTRLTDPAHVERAAPLALVYISHDPSADCQRAYMQHS
 MPSQWLSLRHGDPLASELGRRFVLRALPSVVVLQPSGEEVTRAGA
 EEIRRLGEEAFANWREAAEVLDRGFLLAEDFEEVETPFRSLSHHLR
 SLFYKAEKEKQGPDD

Figure 133: Identification de la région 5' du gène *Nxn1* de Lamproie par 5'RLM RACE PCR. **a)** Séquence nucléotidique identifiée. En noir est indiquée la séquence déjà connue de *Nxn1* de lamproie et décrite dans Ensembl. En rouge et en gras est indiquée la séquence identifiée par 5'RLM RACE PCR et en bleu est indiquée la séquence retrouvée par alignement avec les contigs fournis par Ensembl. En vert est indiquée le nucléotide G qui forme un exon. **b)** Séquence peptidique correspondant à la séquence nucléotidique identifiée.

Si nous décidons d'admettre que ce nucléotide G est une aberration et de ne pas en tenir compte, alors un ATG est immédiatement décrit dans les contigs de la base de données

Ensembl juste en amont de la séquence identifiée par la 5' RACE RLM PCR et décrit en bleu dans la figure suivante (**Fig. 134**).

a

ATGCTGGCTGCAAACGGACCCCTCACATCTCAGCTGGGCACCCAGGGTGATGCCATCTCGAC
TGCCGCCACGCTGTGAGCCAAATCGCCGAGAGCTGCGTGTCGGAGCTGTTCTGACCTGTAC
 GTCATCCTCAACAACCGTGACTGGGACGAGTTGGACACCGAGCAACAGCTGTGCCTGCGCCT
 GCGCAACAAGCTGCTGCTGCTCTACTTCGGCTCGGGCAGCTGCGACGACTGCCGCGCCTTAC
 GCGCGTGCTGCGCAGGTTCTGGACGCGGCTCACGGACCCGGCGCACGTGGAGCGCGCCGCG
 CCGCTGGCGCTCGTCTACATCTCGCACGACCCAGCGCCGACTGCCAGCGCGCCTACATGCAG
 CACAGCATGCCAGCCAGTGGCTGAGCCTGCGCCACGGAGACCCGCTCGCCTCGGAGCTCGG
 GCGCCGCTTCGAGGTGCGGGCGCTGCCGTCCGTGGTGGTGCTGCAGCCAGCGGCGAGGAG
 GTAACGCGCCGGCGCGGAGGAGATCCGGCGTCTGGGCGAAGCCGCCTTTGCGAACTGGC
 GCGAGGCTGCCGAGGTGCTGGACCGCGGCTTCTCCTTGCCGAGGACTTTGAGGAGGTGGA
 GACGCCGTTCCGAGCCTGTCCACCACCTGCGCAGCCTTCTACAAGGCTGAGAAGGAGAA
 GCAGGGGCCCGACGAC

b

MLAANGPLTSQLGTQGDAHLDCRHAVSQIAESCVSEFLTCTLILN
 NRDWDELDETEQQQLCLRLRNKLLLLYFGSGSCDDCRAFTRVLRRFWT
 RLTDPAHVERAAPLALVYISHDPSADCQRAYMQHSMPSQWLSLRH
 GDPLASELGRRFVRLPSVVVLQPSGEEVTRAGAEIIRRLGEAAF
 ANWREAAEVLDRGFLLAEDFEEVETPFRSLSHHLRSLFYKAEKEKQ
 GPDD

Figure 134: Identification de la région 5' du gène *Nxn1* de Lamproie par 5'RLM RACE PCR. a) Séquence nucléotidique identifiée. En noire est indiquée la séquence déjà connue de *Nxn1* de lamproie et décrite dans Ensembl. En rouge et en gras est indiquée la séquence identifiée par 5'RLM RACE PCR et en bleu est indiquée la séquence retrouvée par alignement avec les contigs fournis par Ensembl. b) Séquence peptidique correspondant à la Séquence nucléotidique identifiée.

Les deux nouvelles séquences identifiées et représentées en rouge dans les figures 133 et 134 sont chargées dans le logiciel InterPro afin d'identifier d'éventuelles homologies avec des protéines existantes. Toutefois, cette expérience indique que ces séquences ne correspondent à aucune protéine connue. La réaction 3' RLM RACE RT-PCR qui permet d'amplifier une séquence inconnue à partir de l'extrémité 3' d'un ARNm a également été réalisée. Cette technique consiste à réaliser dans un premier temps une transcription reverse à partir d'ARNm et à l'aide d'un oligo poly T auquel est lié un adaptateur. Ensuite une *nested* PCR est réalisée à partir d'une première paire d'amorce

dont l'une est complémentaire à la séquence connue et l'autre à l'adaptateur. La deuxième paire d'amorce utilisée pour la *nested* PCR est dessinée à l'intérieur du premier fragment amplifié (Fig. 135).

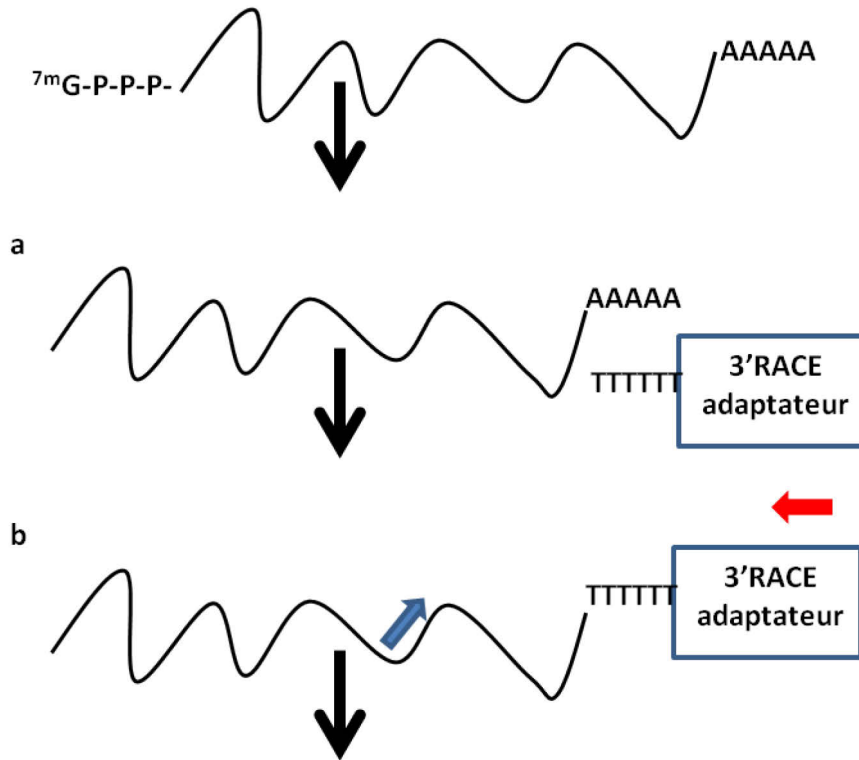


Figure 135: 3'RLM RACE PCR. **a)** Transcription reverse à partir d'ARNm et à l'aide d'un oligo poly T auquel est lié à un adaptateur. **b)** Amorce sens dessinée sur le brin connu du gène et l'amorce antisens dessinée sur l'adaptateur.

La 3' RLM RACE RT-PCR qui présente beaucoup moins d'étapes que la 5' RLM RACE RT-PCR est décrite comme étant plus facile à réaliser. De manière très surprenante, aucune séquence de la région 3' du gène *Nxn11* de lamproie n'a été amplifiée. Le génome de la lamproie ayant peut être subi tellement de modifications que le gène *Nxn11* de lamproie comporte certainement de nombreuses modifications non répertoriées par les bases de données. L'échec de la 3' RLM RACE RT-PCR pourrait s'expliquer par l'utilisation d'une séquence issue des bases de données erronée à partir de laquelle ont été dessinées les amorces pour la *nested* PCR. Seule la séquence N terminale identifiée et les deux options étudiées dans la figure 133 et 134 sont alors transmises à la plateforme LSMBO afin de tenter d'identifier d'éventuels peptides de

RdCVF ou RdCVFL de lamproie. Toutefois, chez la lamproie comme dans la grande majorité des organismes le messenger qui code pour RdCVFL est 4 fois plus exprimé que celui qui code pour RdCVF (**Fig. 136**), nos efforts sont alors plutôt focalisés sur l'identification de peptides de RdCVFL plutôt que de RdCVF.

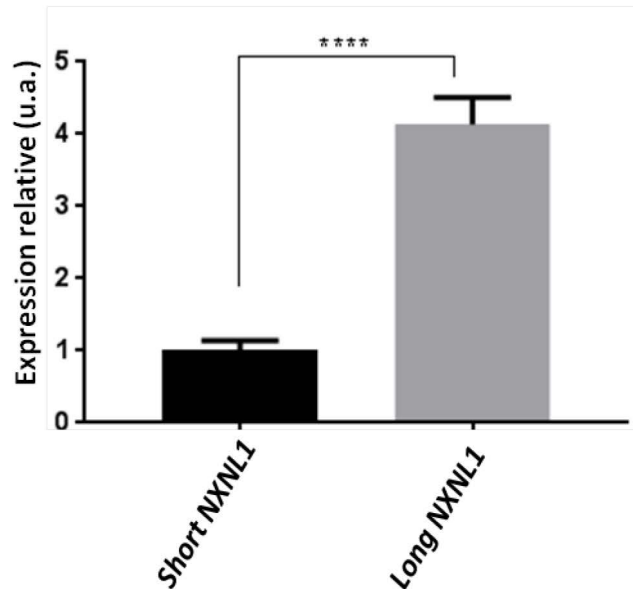


Figure 136: Expression du messenger *short Nxn11* et *long Nxn11* dans la rétine de lamproie.

Malheureusement cette séquence peptidique supplémentaire n'a pas permis d'identifier de nouveaux peptides. RdCVF étant tronquée dans sa partie C-terminale, l'identification de peptide en C terminal à l'aide de la 3' RLM RACE RT-PCR nous aurait été d'une grande aide pour identifier des peptides spécifiques de RdCVFL.

La lamproie exprime bien les messagers qui codent pour les protéines RdCVF et RdCVFL, Cependant, l'expression de ces protéines n'a pas été mise en évidence par nos travaux.

2.4: LA LAMPROIE EXPRIME LE RECEPTEUR DE RdCVF, BASIGIN 1

Alors que l'hydre exprime les messagers qui codent pour les protéines *hydraRdCVFa* et *hydraRdCVFb*, elle n'exprime pas le messenger qui code pour le récepteur BSG1. La fonction de RdCVF chez l'hydre qui ne possède pas d'organe visuel semble différente de celle de RdCVF chez les mammifères, tandis que RdCVFL présente déjà une fonction ancestrale de thioredoxine. Est-ce que chez la lamproie, qui présente une rétine composée de cellules nerveuses dont des photorécepteurs à bâtonnets et à cônes comme chez les mammifères, RdCVF jouerait également une fonction de maintien des cônes en survie ? Est-ce que le mode d'action de ce facteur trophique daterait d'au moins 450 millions d'années, date correspondant à l'apparition de la lamproie ? Sachant que la signalisation RdCVF est médiée par son récepteur BSG1, investiguons l'expression de ce récepteur chez la lamproie. Le gène qui code pour BSG chez la lamproie est annoté neuroplastine a dans la base de donnée Ensemble (https://www.ensembl.org/Petromyzon_marinus/Gene/Summary?db=core;g=ENSPMAG00000002087;r=GL483299:1717-14751;t=ENSPMAT00000002300) et a pour numéro d'accès ENSPMAG00000002087. Ce gène est décrit comme possédant 5 exons et 4 introns. Les régions 5'UTR et 3'UTR ne sont pas décrites. La protéine basigin de lamproie qui possède le numéro d'accès S4RAQ8 dans la base de données Uniprot (<http://www.uniprot.org/uniprot/S4RAQ8>) est décrite sous le nom de neuroplastin b (**Fig. 137**).

```
>tr|S4RAQ8|S4RAQ8_PETMA Neuroplastin b OS=Petromyzon
marinus 354 acides aminés.
```

```
GFSKSPMSETKFTGDSAELFCEVVGSPVPELQWWFAETNHMDA FRQLWEGARRRRVS
VTTAYGSNGASALRIAALAPEDSGVYECRASNAPQRNDFRRNPAMSWIRAQATIRVV
PHYDIKTSPDITLSNKTTEERLQCNTLPQPFS AHEINCYWEQDGEKIAGTEQMVEI
TASRIVTLDYTITKPKAEHSGVYVCFVQTSPPAKGNITVKSCAAWPDITTHKKSENH
GEGDAAELVCKCNGYPDVDWTWSYKPRDNDVVVVANGSRDGRLAIASTGNQTVLSL
HGLVVDTDGGEYTCQATNSEGTATHTMLLRVRSRLAALWPF LGIVAEVVILIAIIFI
YEKRKKPDDVPD
```

Figure 137: Séquence FASTA de la protéine BSG1 de lamproie.

Cette protéine est prédite pour posséder un domaine cytoplasmique, un domaine transmembranaire et un domaine extracellulaire constitué de 3 domaines immunoglobulines, Ig0, Ig1 et Ig2 (**Fig. 138**).

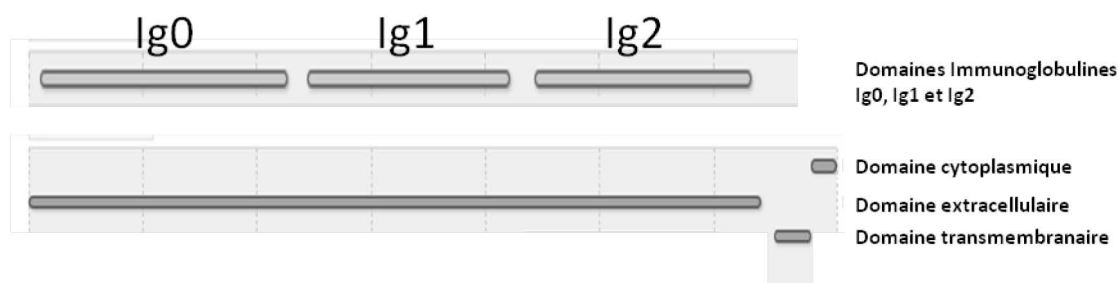


Figure 138: Analyse protéique de la séquence de BSG1 de lamproie.

Le domaine Ig0 représenté en orange dans la figure 139 a une longueur de 90 acides aminés et est codé par la séquence nucléotidique localisée entre le nucléotide 43 et le nucléotide 309, le domaine Ig1 représenté en rouge à une longueur de 95 acides aminés et est codé du nucléotide numéro 310 jusqu'au nucléotide numéro 591 et le domaine Ig2 représenté en bleu dans la figure 25 est codé par la séquence entre les positions 592 et 885 et à une longueur de 99 acides aminés (**Fig. 139 et 140**).

Position(s)	Description	Graphical view	Length
14 – 103	Ig-like		90
115 – 209	Ig-like		95
217 – 315	Ig-like		99

10	20	30	40	50
GFSKSPMSET	KFTGDSAELF	CEVVGSPVPE	LQWWFAETNH	MDAFRQLWEG
60	70	80	90	100
ARRRRVSVTT	AYGNSGASAL	RIAALAPEDS	GVYECRASNA	PQRNDFRRNP
110	120	130	140	150
AMSWIRAQAT	IRVVPHYDIK	TSPDITLSNK	TTEERLQCNL	TLPQPFSAHE
160	170	180	190	200
INCYWEQDGE	KIAGTEQMVE	ITASRIVTLD	YTITKPKAEH	SGVYVCVFQT
210	220	230	240	250
SPPAKGNITV	KSCAAWPDIT	THKSENHGE	GDAELVCKC	NGYPDVDWTW
260	270	280	290	300
SYKPRNDNDV	VVANGSRDG	RLAIASTGNQ	TVLSLHGLVV	DTDGGEYTCQ
310	320	330	340	350
ATNSEGTATH	TMLLRVRSRL	AALWPFLGIV	AEVVILIAII	FIYEKRKKPD
DVPD				

Figure 139: Description des différents domaines de BSG1 de lamproie par UNIPROT. En Orange est représenté le domaine Ig0, en rouge le domaine Ig1 et en bleu le domaine Ig2.



Figure 140: Représentation schématique des différentes régions nucléotidiques correspondants aux différents domaines de BSG1 de lamproie.

À partir des ARN extraits de rétine de lamproie utilisés pour les expériences précédentes et à l'aide d'amorces spécifiques, nous avons démontré que les domaines Ig0, Ig1 et Ig2 du gène *Basigin* sont exprimés par la lamproie (**Fig. 141**).

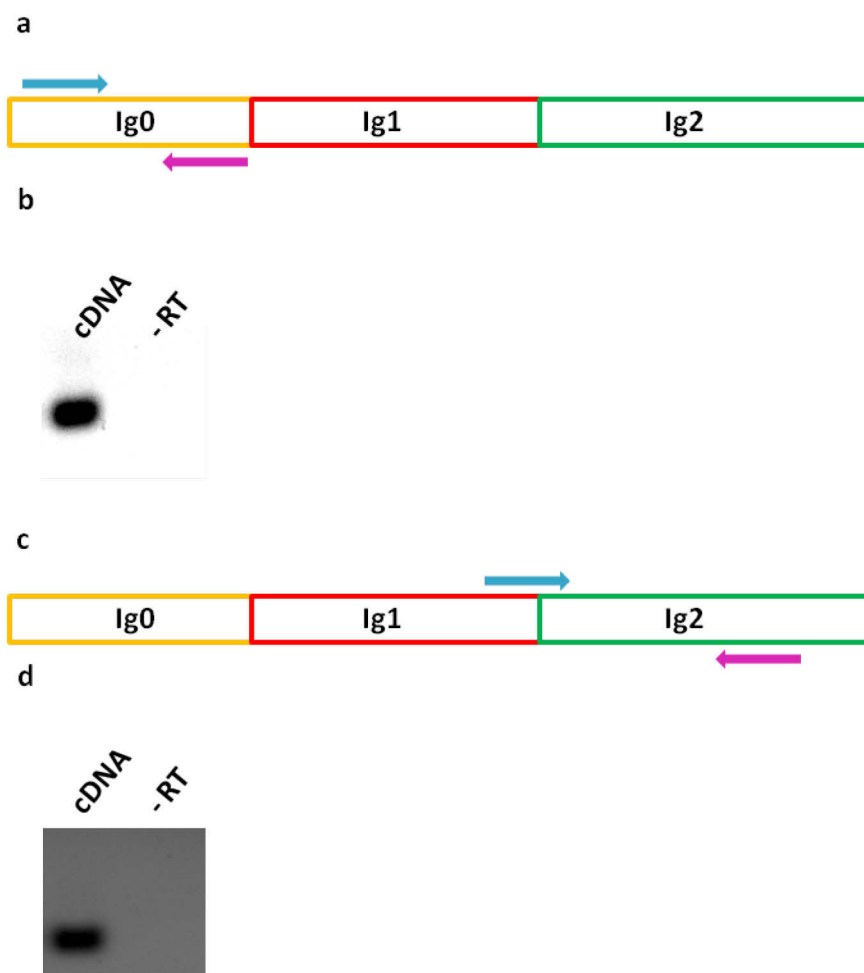


Figure 141: Expression de l'Ig0 de l'Ig1 et de l'Ig2 de BASIGIN de lamproie. a) Représentation schématique de la région de l'Ig0 amplifiée. Les flèches bleues et roses représentent l'amorce sens et antisens utilisées pour amplifier le fragment. b) RT-PCR du fragment Ig0 amplifié à partir d'ARN extraits de rétine de lamproie. c) Représentation schématique de la région de l'Ig1 et Ig2 amplifiée. Les flèches bleues et roses représentent l'amorce sens et antisens utilisées pour amplifier le fragment. d) RT-PCR du fragment Ig1 et Ig2 amplifié à partir d'ARN extraits de rétine de lamproie.

Nous savons que ce gène code chez la souris et chez d'autres mammifères par un épissage alternatif pour un second messenger *Basigin 2*. Cependant, la séquence de la région 5'UTR n'étant pas décrite, nous ne pouvons pas étudier la possibilité que la lamproie exprime le messenger qui code pour cette protéine BSG2 qui n'est pas le récepteur de RdCVF. À partir de lysats protéiques extraits de rétine de lamproie des analyses de spectrométrie de masse sont réalisées au LSMBO afin d'identifier des peptides spécifiques du récepteur BSG1 de RdCVF. Ces analyses ont permis l'identification de nombreux peptides de cette protéine, dont les peptides QLWEGAR, VSVTTAYGSNGASALR et IAALAPEDSGVYECR qui sont spécifiques du domaine Ig0, le domaine nécessaire pour l'interaction de ce récepteur avec RdCVF. Ces analyses ont également permis l'identification du peptide IAGTEQMVEITASRIVTLDYTITKPKAEHSGVYVCVFQTSPPAK qui est spécifique du domaine Ig1 et le peptide SENHGEGDAAELVCK spécifique du domaine Ig2 (**Fig. 142**).

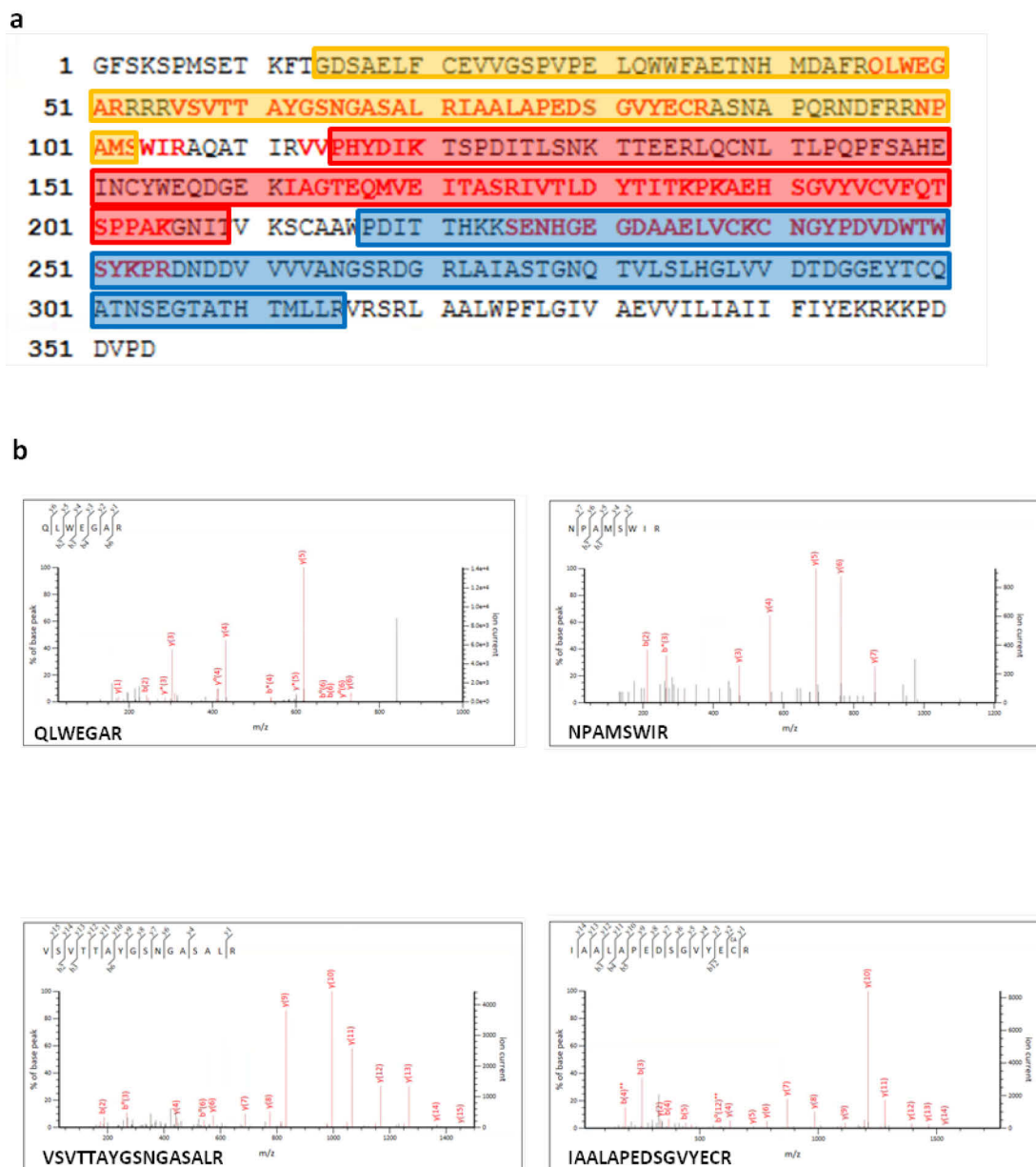


Figure 142: Séquences peptidiques de BSG de lamproie. a) Les peptides colorés représentent les peptides identifiés. La séquence encadrée en orange représente le domaine Ig0. La séquence encadrée en rouge représente le domaine Ig1 et La séquence encadrée en bleu représente le domaine Ig2. **b)** Spectres des peptides spécifiques de l'Ig0.

Tous les spectres des peptides identifiés ne sont pas représentés dans la figure mais sont répertoriés plus loin (**Table 5**).

*La lamproie, qui est le premier vertébré connu présentant des photorécepteurs de type bâtonnets, exprime les deux messagers du gène *Nxn11* qui codent pour *RdCVF* et *RdCVFL*. Le séquençage et l'annotation du génome de la lamproie sont connus pour être entachés d'erreur. De plus, les génomes d'organismes parasites tels que la lamproie sont connus pour présenter de nombreuses restructurations et réarrangements entraînant des pertes de séquences de certains de leurs gènes. Nous pensons que c'est pour toutes ces raisons que la protéine *RdCVFL* n'a pas pu être identifiée par spectrométrie de masse. Bien que l'expression du récepteur de *RdCVF* *BSG1* a été mis en évidence, nous n'avons pas pu démontrer l'existence de *BSG2*. Existe-t-il une interaction entre *RdCVF* et son récepteur *BSG1* chez la lamproie tout comme chez les mammifères?*

2.5 : TEST D'INTERACTION PROTEIQUE ENTRE BSG1 DE LAMPROIE ET RDCVF DE LAMPROIE PAR UN ESSAI IMPLIQUANT DES PROTEINES DE FUSION PHOSPHATASE ALCALINE

Nous avons démontré l'absence d'interaction entre les protéines hRdCVFa court et hRdCVFb et le récepteur hydra BSG, soulignant l'importance du domaine Ig0 de BSG1 dans cette interaction. Pour analyser l'existence d'une interaction entre RdCVF de lamproie et le récepteur BSG1 de lamproie qui possède le domaine Ig0, le même essai fonctionnel impliquant des protéines de fusion phosphatase alcaline que celui utilisé précédemment pour l'hydre est réalisé. Les protéines de fusion phosphatase alcaline-GFP-lampreyRdCVF (**Fig. 143**) codées par plasmide pAPtag-5 sont concentrées à partir du milieu conditionné de cellules HEK293 transfectées.



Figure 143: Représentation schématique de l'insert qui code pour AP-GFP-Lamprey RdCVF.

Ces cellules, après avoir été transfectées par les plasmides qui codent pour ces protéines de fusion, vont surexprimer et sécréter ces protéines dans leur milieu de culture appelé aussi milieu conditionné. Ces milieux de culture conditionnés et enrichis en protéine de fusion ont été contrôlés avant leur utilisation pour les essais d'interaction. Pour cela un *western blot* à partir des lysats protéiques issus des culots cellulaires (**Fig. 144a**) et des surnageants (**Fig. 144b**) de cellules HEK293 transfectées par les vecteurs qui codent les protéines de fusion testées, est réalisé à l'aide d'un anticorps dirigé contre la phosphatase alcaline et un autre dirigé contre la GFP.

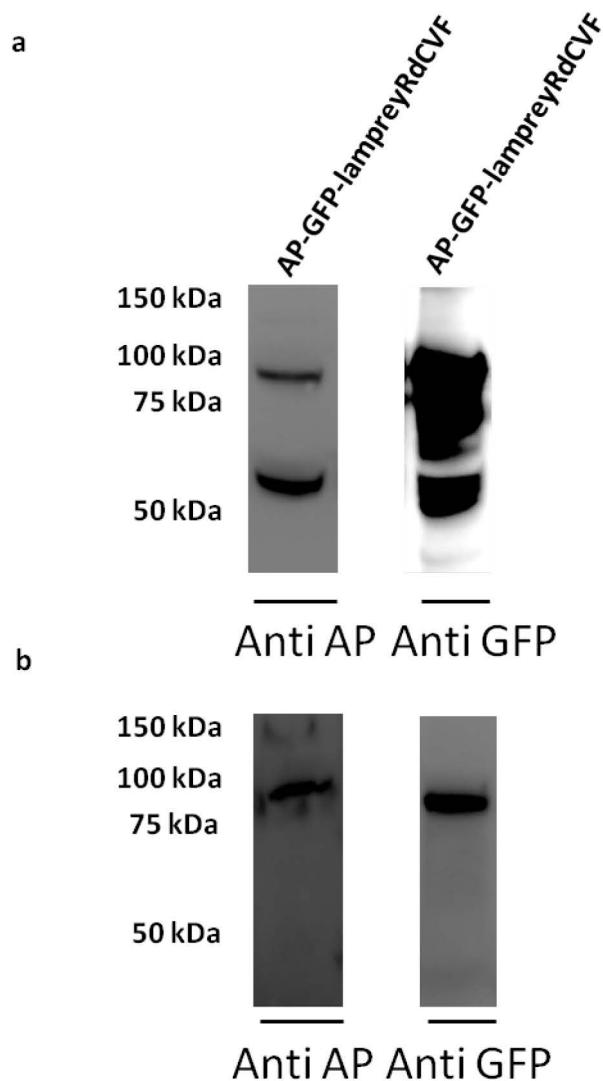


Figure 144: *Western blot* à l'aide d'anticorps dirigés contre la phosphatase alcaline et contre la GFP **a)** réalisé à partir des lysats protéiques issus des culots cellulaires de HEK293, **b)** réalisé à partir des lysats protéiques issus des surnageants de HEK293.

Le résultat du *western blot* indique que les protéines de fusion phosphatase alcaline-GFP-lampreyRdCVF de 99 kDa sont exprimées par le culot cellulaire ainsi que par le surnageant des cellules HEK293 transfectées par les plasmides qui codent pour ces protéines de fusion. Ces résultats sont confirmés par le *western blot* anti GFP. Comme décrit précédemment chez l'hydre, l'essai consiste à transfecter des cellules COS-1 par un vecteur qui code pour BSG1 de lamproie suivi d'un tag HA. Quarante huit heures

après la transfection, ces cellules sont incubées en présence des milieux conditionnés et enrichis en protéine de fusion. Dans cette expérience, le même contrôle positif que celui utilisé pour tester l'interaction entre hydra BSG et *hydraRdCVFa* et b, indique la présence d'une interaction spécifique entre la semaphorin et son récepteur la neuropiline (Fig. 145a et b).

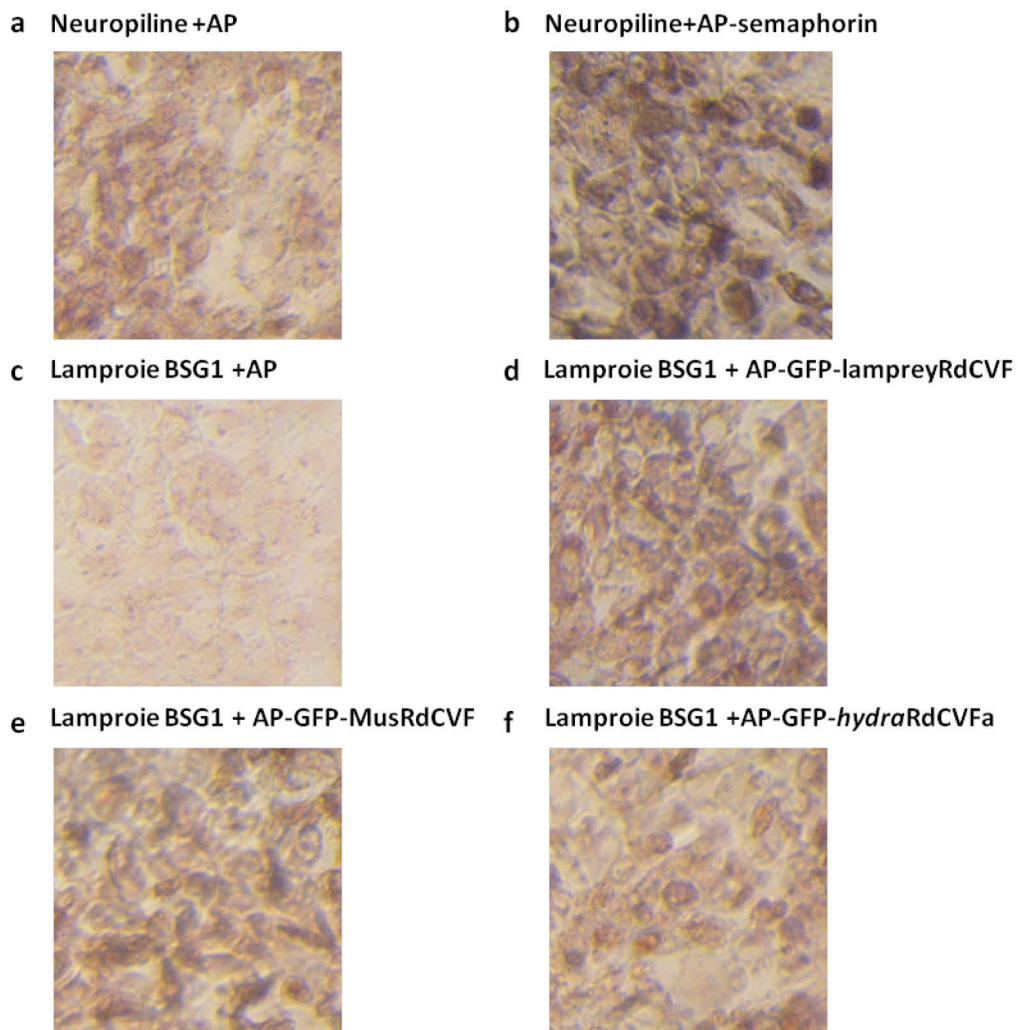


Figure 145: Identification de l'interaction entre lamproie RdCVF et lamproie BSG1. Les contrôles utilisés sont **a)** neuropiline et la phosphatase seule, **b)** La neuropiline et la phosphatase couplée à la semaphorine, **c)** Lamproie BSG1 et la phosphatase seule, **d)** Lamproie BSG1 et la phosphatase couplée à lampreyRdCVF, **e)** Lamproie BSG1 et la phosphatase couplée à MusRdCVF, **f)** Lamproie BSG1 et la phosphatase couplée à *hydraRdCVFa*. Mus: *Mus musculus*.

L'expérience où le milieu conditionné contient la protéine de fusion AP-GFP-lampreyRdCVF est incubé en présence des cellules COS-1 qui expriment BSG1 de

lamproie, montre qu'après plusieurs lavages, un marquage spécifique représenté par l'apparition d'une coloration (bleu/violet), est obtenu après l'ajout du substrat de la phosphatase alcaline alors qu'aucun signal n'est détecté lorsque la phosphatase alcaline non fusionnée est incubée (**Fig. 145c et d**). Des expériences complémentaires démontrent qu'il existe une interaction entre le récepteur BSG1 de lamproie et MusRdCVF (**Fig. 145e**), indiquant que cet interaction ne se fait pas uniquement au sein de la même espèce mais également entre espèces différentes. De manière très intéressante, nous avons également démontré l'existence d'une interaction entre BSG1 de lamproie et *hydra*RdCVFa, cette interaction qui utilise une protéine d'une espèce qui ne possède pas de récepteurs souligne d'autant plus l'importance et la nécessité du domaine Ig0 de BSG1 pour interagir avec la protéine RdCVF (**Fig. 145f**).

L'interaction de RdCVF et son récepteur implique son domaine extracellulaire immunoglobuline Ig0. Sans ce domaine, aucune interaction ne peut avoir lieu. Cependant ce domaine et cette interaction n'est pas spécifique d'une espèce, le facteur trophique RdCVF d'une espèce donnée peut interagir avec le récepteur BSG1 d'une autre espèce.

Il y a 600 million d'années, chez les cnidaires tel que l'hydre, la protéine RdCVF semblait ne pas avoir de fonction biologique. En effet, cet organisme n'exprime pas le récepteur BSG1 nécessaire pour le mode d'action et la signalisation de RdCVF. Ce genre d'exemple ressemble de très près à celui du tubercule de Woolner décrit par Darwin dans son livre « The Descent of Man, and Selection in Relation to Sex » (Darwin, 1871). Aucune fonction n'est connue pour ce tubercule mis en évidence par le sculpteur Woolner et pourtant présent chez de nombreux individus. Ce n'est que bien plus tard, il y a environ au moins 450 million d'années que la fonction du facteur trophique RdCVF est apparue avec l'apparition du domaine Ig0 du récepteur BSG1. Il s'agit d'un phénomène nommé en évolution-développement exaptation moléculaire. Tout comme les plumes présentes chez les dinosaures initialement sélectionnées pour assurer leur thermorégulation mais sans fonction pour le vol se sont avérées indispensables pour le vol des oiseaux, RdCVF est devenue essentiel pour maintenir les photorécepteurs à cônes en vie chez les vertébrés au cours de l'évolution.

PARTIE N°2

Le spliceosome qui est un large complexe ribonucléique (RNP) est la machinerie cellulaire responsable de l'épissage des pré-ARN messager. Cette machinerie va retirer les séquences non codantes de l'intron afin d'assembler les régions codantes pour générer un ARNm mature qui va par la suite être transféré dans le cytoplasme de la cellule pour être traduit en protéine. Parmi les 25 000 gènes codés par le génome humain, plus de 90 % vont produire des transcrits qui vont être alternativement épissés et ainsi coder pour différentes protéines. Un unique messenger peut donc coder pour plusieurs protéines enrichissant ainsi la diversité du protéome des organismes eucaryotes. De plus, les différentes isoformes issues d'un seul messenger peuvent présenter des fonctions et des activités biologiques distinctes. Cela est le cas pour les deux produits du gène *Nxn11*, RdCVF qui joue un rôle de facteur trophique et RdCVFL est connue pour être impliquée dans l'homéostasie redox des cellules. Les mécanismes impliqués dans l'épissage des gènes sont étudiés depuis environ 40 ans (Crick, 1979; Phillip A. Sharp, 1994). Il est connu qu'ils peuvent être totalement différents en fonction de l'intron à exciser (Lambowitz and Caprara, 1999). Quels sont les mécanismes d'épissage du gène *Nxn11* ? Et plus précisément quels sont les mécanismes qui vont retenir l'intron de ce gène qui va présenter un codon stop en phase de lecture pour permettre l'expression de RdCVF ou alternativement retirer cet intron ?

1: RESULTATS PRELIMINAIRES POSITIONNANT LE PROBLEME

1.1: EXPRESSION D'UNE PROTEINE DE PLUS DE 12 KDA

Afin d'initier un projet visant à étudier les bénéfices cliniques de la protéine RdCVF, une collaboration avec l'équipe de Jean Bennett (Bennett, 2005) à l'université de Pennsylvanie à Philadelphie a été mise en place. Parmi les expériences préliminaires

réalisées par cette équipe, l'une consistait à réaliser des transfections transitoires de cellules HEK293 par deux plasmides, ORFp623 et ORFp624. Tandis que ORFp623 comprend uniquement la phase ouverte de lecture ou *open reading frame* (ORF) de l'exon 1 du gène *NXNL1*, qui correspond au transcrit qui code strictement pour la protéine RdCVF, ORFp624 comprend en plus de ce transcrit une partie de la séquence 5'UTR du gène, ainsi que la séquence 3' UTR de l'exon 1 (**Fig. 146**).

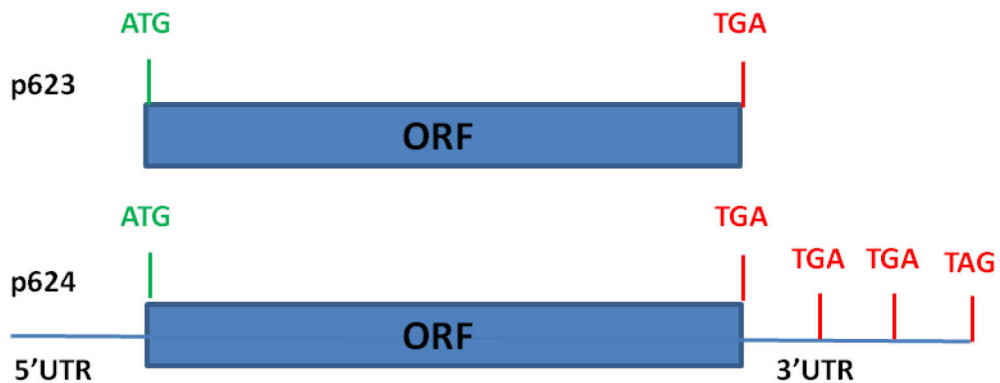


Figure 146: Représentation des séquences du gène *NXNL1* présentes dans le plasmide ORFp623 et ORFp624. Les rectangles bleus représentent la partie en phase de lecture ouverte de *NXNL1*, en vert sont représentés les codons d'initiation de la traduction et en rouge les codons de terminaison de traduction.

Un *western blot* réalisé à partir des lysats protéiques de ces cellules transfectées à l'aide d'un anticorps qui reconnaît la protéine RdCVF humaine indique que les cellules transfectées par ORFp623 expriment la protéine RdCVF attendue à 12 kDa (109 acides aminés) alors que les cellules transfectées par ORFp624 expriment en plus de cette protéine, une protéine complémentaire d'un poids moléculaire supérieur à 12 kDa (environ 17 kDa). Me basant sur le même protocole que celui utilisé par l'équipe de Jean Bennett, j'ai renouvelé cette expérience dans notre laboratoire et ai obtenu les mêmes résultats (**Fig. 147**).

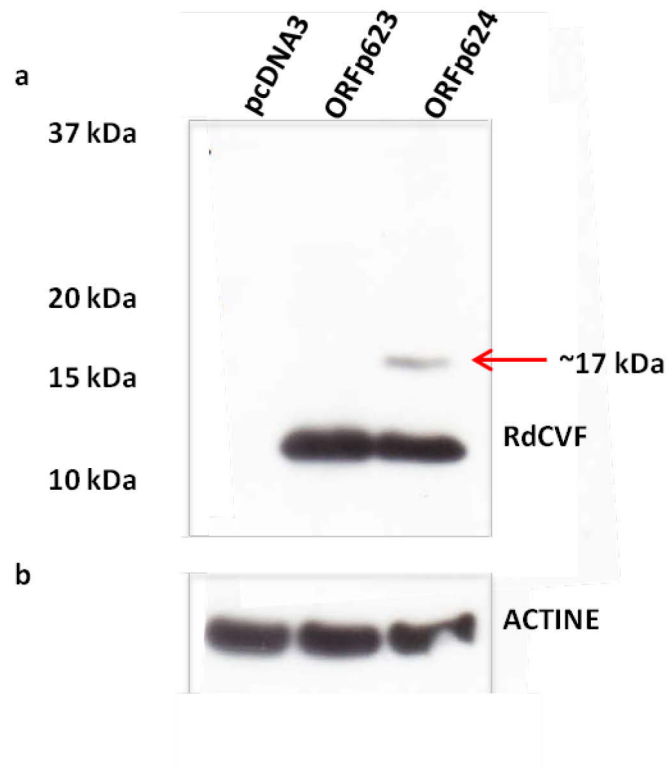


Figure 147: *NXNL1* code pour une protéine de 17 kDa. a) *Western blot* de lysats protéiques issus de cellules HEK293 transfectées par le plasmide pcDNA3 seul, par le plasmide ORFp623 ou ORFp624. L'anticorps utilisé est un anti RdCVF humain. b) *Western blot* de lysats protéiques issus de cellules HEK293 transfectées par le plasmide pcDNA3 seul, par le plasmide ORFp623 ou ORFp624. L'anticorps utilisé est un anti-actine.

L'expression de la protéine RdCVF de 17 kDa correspond à 17% du total des produits codés par cette séquence. Fait très intéressant, les travaux de notre équipe publiés en 2004 avaient déjà démontré que lorsque des cellules COS-1 (Gluzman, 1981) sont transfectées par un plasmide qui code pour l'exon 1 de *Nxn1l* de souris, ces cellules expriment la protéine RdCVF de 12 kDa alors que des rétines de souris sauvage expriment une protéine RdCVF endogène d'un poids moléculaire supérieur à 12 kDa (environ 17 kDa) (Léveillard et al., 2004). Ces résultats indiquent que la partie 5', ou 3'UTR, ou les deux, joueraient un rôle dans l'expression d'un autre produit du gène *NXNL1* différent de ceux prédits et attendus RdCVF et RdCVFL. Est-ce que le gène *NXNL1* coderait par un autre mécanisme pour une troisième protéine? Dans un premier

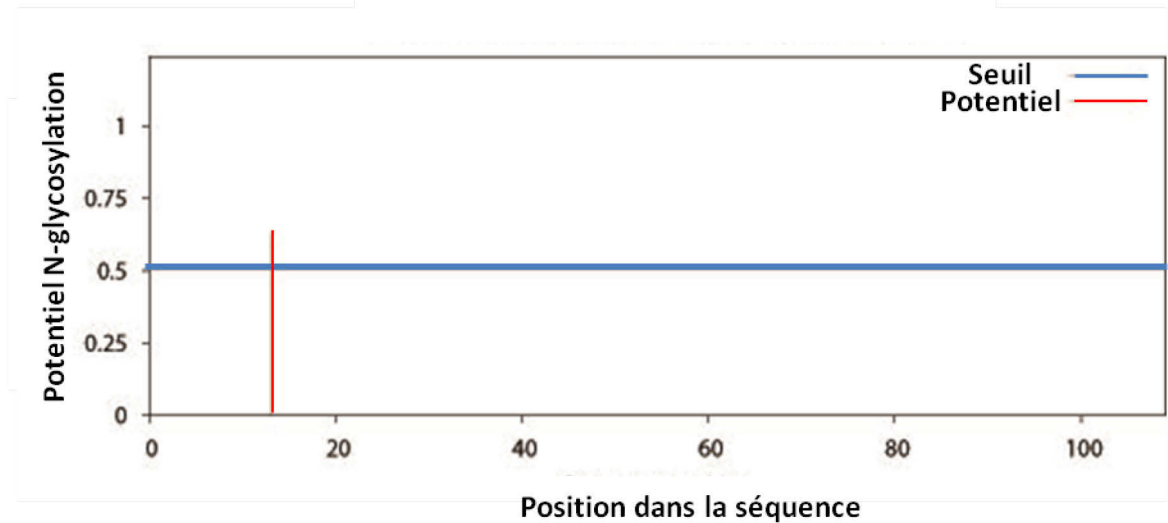
temps, avant même de chercher à définir la nature de cette protéine supplémentaire ou d'en comprendre les mécanismes d'expression, nous avons jugé utile de vérifier qu'il ne s'agissait pas simplement d'un artefact expérimental et de contrôler les résultats obtenus. En effet nous avons tout d'abord envisagé la possibilité que cette protéine supplémentaire pourrait correspondre à la protéine RdCVF 12 kDa ayant subi une modification post-traductionnelle.

1.2: LA PROTEINE DE PLUS DE 12 KDA N'EST PAS GLYCOSYLEE

La glycosylation étant l'une des modifications les plus courantes, nous nous sommes tout naturellement intéressés à ce type de modification. Les deux types de glycosylation les plus fréquentes dans les cellules eucaryotes se distinguent selon le type de liaison qui existe entre la protéine et le sucre qui est ajouté. Il existe la N-glycosylation, où le résidu glycosylé est lié à l'azote du groupement amide de l'asparagine, et la O-glycosylation, où le résidu glycosylé est lié à l'oxygène du groupement hydroxyle d'une sérine, d'une thréonine, ou dans de très rares cas d'une tyrosine, d'une hydroxyproline ou d'une hydroxylysine. Tout d'abord, une prédiction des sites potentiellement susceptibles d'être glycosylés de RdCVF 12 kDa a été réalisée à l'aide des logiciels NetNGlyc 1.0 Server et NetOGlyc 3.1. Ces logiciels sont utilisés respectivement pour prédire les sites de N-glycosylation des protéines humaines (**Fig. 148a**) et pour prédire les sites de O-glycosylation sur les protéines de mammifères (**Fig. 148b**) (Blom et al., 2004). Les résultats de ces analyses indiquent que seule l'asparagine en position 13 de RdCVF serait susceptible d'être N-glycosylée.

a

MASLFSGRILIRNNSDQDELDTAEVSRRLLENRLVLLFFGAGACPQCQAFVPIKDFVRLTDEFYVLR
AAQLALVYVSQDSTEEQQDLFLKDMPPKKWFLPFEDDLRR



b

MASLFSGRILIRNNSDQDELDTAEVSRRLLENRLVLLFFGAGACPQCQAFVPIKDFVRLTDEFYVLR
RAAQLALVYVSQDSTEEQQDLFLKDMPPKKWFLPFEDDLRR

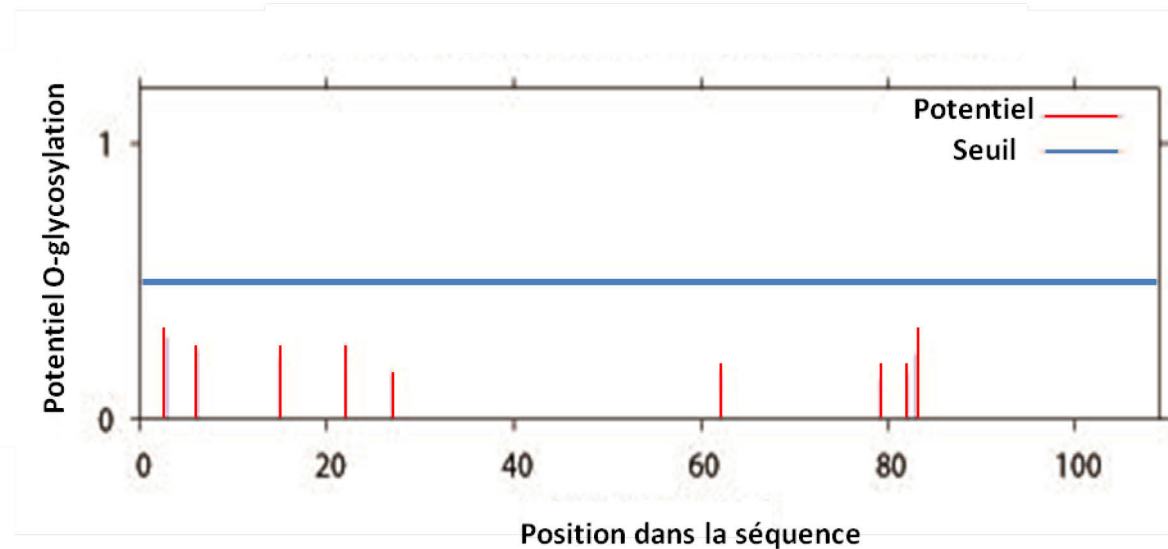


Figure 148. Prédiction des sites potentiellement glycolysables de RdCVF 12 kDa. a) prédiction des sites de N-glycosylation. b) prédiction des sites de O-glycosylation.

Est-ce que la glycosylation de l'asparagine en position n°13 de la protéine RdCVF 12 kDa aurait retardé sa migration, expliquant pourquoi la protéine migre comme une protéine de 17 kDa ? Pour répondre à cette question, une déglycosylation des extraits protéiques issus de cellules HEK293 transfectées par le plasmide ORFp624, de rétines de macaque et de rétines humaines a été réalisée. Pour cela, le kit Protein Deglycosylation Mix II de chez New England Biolabs a été utilisé. Ce kit est composé d'un mélange de plusieurs enzymes dont une O-Glycosidase, une PNGase F, une α -3,6,8,9 Neuraminidase A, une β 1-4 Galactosidase S et une β -N-Acetylhexosaminidase. Le rôle de ces enzymes est de retirer tous les N-et O-glycanes simples mais aussi les O-glycanes plus complexes des protéines. Les résultats du *western blot* réalisé à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-RdCVF indiquent que le profil de migration de la protéine de 17 kDa des trois lysats est exactement le même lorsque les échantillons sont traités que lorsqu'ils ne le sont pas (**Fig. 149b, c et d**). Notons que la fétuine bovine utilisée comme contrôle positif de la réaction de déglycosylation migre différemment après traitement. Ceci confirme l'efficacité de cette réaction de déglycosylation (**Fig. 149 a**).

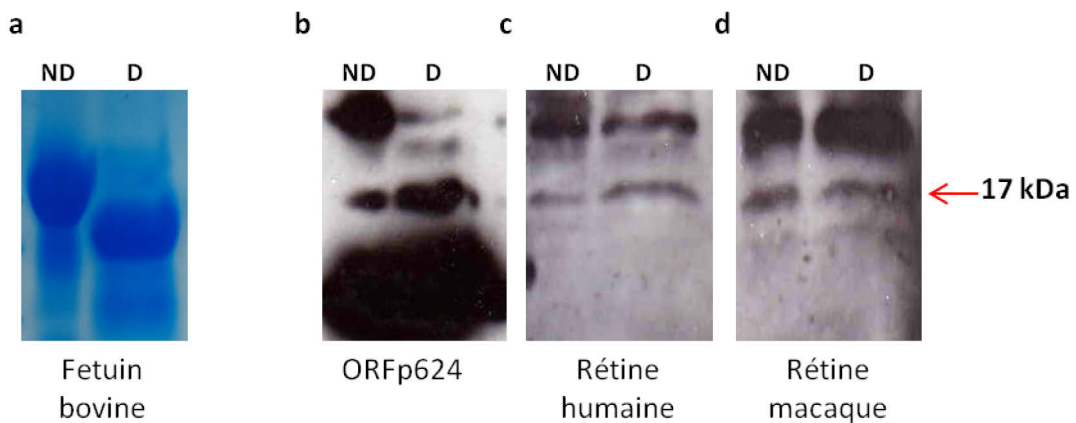


Figure 149: *Western blot* réalisé après la déglycolysation de la protéine RdCVF humain de 17 kDa. **a)** Contrôle positif fourni par le kit. **b)** Déglycolysation du lysat protéique issu de cellules HEK293 transfectées par le plasmide ORFp624, **c)** issu de rétine humaine, **d)** issu de rétine de macaque. ND: Non deglycosylé. D: Deglycosylé. L'anticorps polyclonal utilisé est un anti RdCVF humain.

La protéine RdCVF 17 kDa ne correspond pas à la protéine de 12 kDa glycosylée mais semble être une autre protéine exprimée par le gène NXNL1.

1.3: IMPLICATION DE LA REGION 5' ET 3' UTR DE NXNL1 DANS L'EXPRESSION DE LA PROTEINE DE PLUS DE 12 KDA

La première différence qui existe entre les plasmides ORFp623 et ORFp624 est la présence de la région 3'UTR de l'exon 1 du gène *NXNL1* dans le plasmide ORFp624. La deuxième différence repose sur la présence de la région 5'UTR de *NXNL1*. Est-ce que cette région 5'UTR joue un rôle dans l'expression de la protéine RdCVF à environ 17 kDa? Pour analyser l'éventuelle implication de cette région dans l'expression de RdCVF 17 kDa, j'ai construit un plasmide excluant cette région, ORFp624 WO 5'UTR. Par la suite, des cellules HEK293 ont été transfectées par cette construction afin d'étudier l'expression de la protéine RdCVF 17 kDa. Les résultats du *western blot* indiquent que les cellules transfectées par l'ORFp624 sans la partie 5'UTR n'expriment plus la protéine RdCVF 17 kDa (**Fig. 150**).

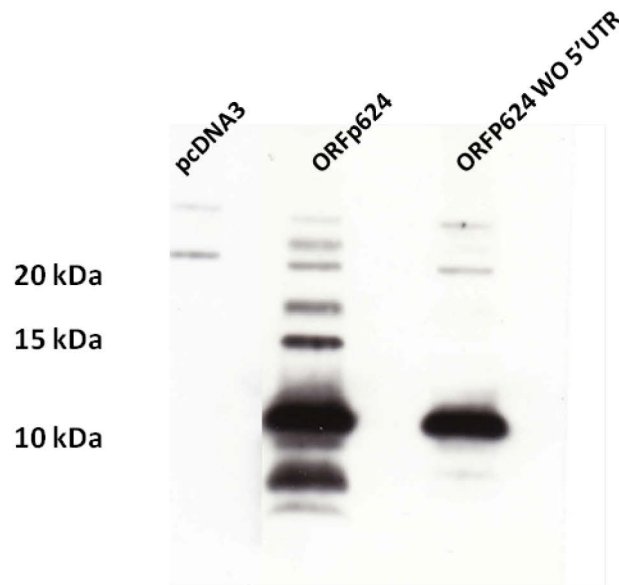


Figure 150: Implication de la partie 5'UTR de *NXNL1* dans l'expression de la protéine de 17 kDa. *Western blot* de lysats protéiques issus de cellules HEK293 transfectées par le plasmide pcDNA3 seul, par le ORFp624 et ORFp624 sans sa partie 5'UTR. L'anticorps utilisé est un anti RdCVF humain.

Il semblerait que cette région influe sur l'expression de RdCVF 17 kDa. Est-ce que cette région joue un rôle direct dans l'expression de la nouvelle protéine, ou s'agirait-il simplement d'un décalage de la phase ouverte de lecture du message avec une initiation de la traduction en 5' de l'AUG présent? Andrzej Elzanowski et Jim Ostell du NCBI précise dans une version mise à jour en Novembre 2016 que dans de rare cas la traduction chez les eucaryotes peut être initiée par d'autres codons que l'ATG. Le code génétique permet l'utilisation des codons GUG, UUG ou CUG comme codons mineurs d'initiation de la traduction (Prats et al., 1989; Takahashi et al., 2005). L'analyse de la partie 5' du plasmide ORFp624, indique la présence du codon d'initiation mineur CUG dans le promoteur de ce plasmide et en phase de lecture avec l'ORF du gène *NXNL1* cloné. Ce codon qui code pour une leucine pourrait alors jouer le rôle de codon d'initiation de traduction et décaler vers l'avant en 5' de la phase de lecture du transcrit. Cette hypothèse est d'autant plus crédible que l'addition de cette région à celle de l'ORF de l'exon 1 de *NXNL1* (ATG-TAG) coderait pour une protéine de masse prédite de 17,07 kDa (**Fig. 151**).

a

CTgacaggttggtgtacactagcggccgcgagaggagccagtcagcagaccggggaccacacgccgctgtcccca
gcaccaaccagggttacc**atg**gcctcctgttctctggccgcacctgatccgcaacaatagcgaccaggacgagctgg
 atacggaggctgaggtcagtcgcaggctggagaaccggctggtgctgtgttctttggtgctggggcttgcacagtgcc
 aggccttcgtgccatcctcaaggacttcttcgtcggctcacagatgagttctatgtactgcgggctcagctggcct
 ggtgtacgtgtcccaggactccacggaggagcagcaggacctgttctcaaggacatgccaagaatggcttttctgc
 cctttgaggatgatctgaggaggtga

b

RdCVFhumain:

LTGWCTLAAARGASQQTGDHTPRCPQHPTQVTMETASLFSGRILIRNNSDQDELDTAEVSRR
 LENRLVLLFFGAGACPQCQAFVPILKDFVRLTDEFYVLRAAQLALVYVSQDSTEEQQDLFLKDM
 ETPKKWLFLPFEDDLRRSTOP

Poids moléculaire isotopique = **17,079 kDa (32 + 109 aa)**

Figure 151: Possible utilisation exceptionnelle du codon d'initiation CTG a) Séquence génomique décalée du gène *NXNL1* humain; en orange est représenté le codon exceptionnel CTG d'initiation. En bleu est représenté le codon d'initiation standart. En rouge est représenté le codon-stop de l'ORF. La séquence soulignée représente la région 5'UTR du gène *NXNL1*. **b)** Séquence protéique codée par ce messenger *Nxn1*. aa: acide aminé

Afin de tester cette hypothèse, deux mutants du plasmide ORFp624 ont été construits. Dans le premier, pORF624-Mut1, le codon d'initiation mineur CUG est remplacé par le codon GCA qui code pour une alanine, acide aminé plutôt neutre, connu pour n'avoir aucune caractéristique spécifique. Dans le deuxième plasmide, pORF624-Mut2, le codon d'initiation mineur CUG est remplacé par le codon ATG qui est le codon d'initiation standard reconnu par les ribosomes et qui code pour une méthionine. Le *western blot* réalisé à partir des extraits protéiques issus des cellules HEK293 transfectées par ces plasmides mutés indique que la protéine RdCVF 17 kDa est toujours exprimée et dans des proportions quasi-équivalentes que celle des extraits issus des cellules transfectées par le plasmide ORFp624 (**Fig. 152**).

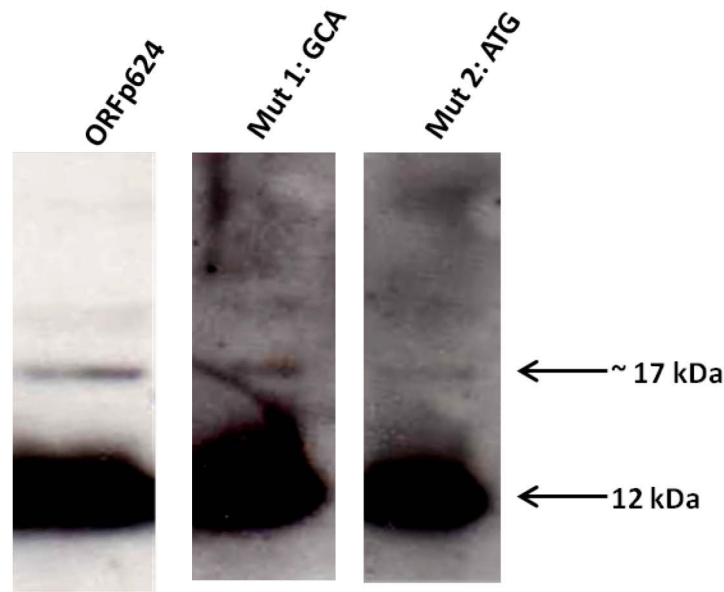


Figure 152: Absence d'implication du codon CUG dans l'expression de RdCVF 17 kDa. Western blot de lysats protéiques issus de cellules HEK293 transfectées par le plasmide ORFp624, par le plasmide ORFp6234 Mut1: GCA et ORFp624 Mut2: ATG.

Les mutations annulant le site d'initiation mineur CUG n'influent pas sur l'expression de RdCVF 17 kDa, il n'y a donc pas de décalage de la phase de lecture du transcrit. L'ORF du gène NXNLI débute bien à l'ATG mais semble ne pas se terminer au premier codon-stop TGA. La région 5'UTR du gène NXNLI influe sur l'expression de RdCVF 17 kDa mais ne décale pas la phase de lecture de l'exon de ce gène. Qu'en est-il alors de la région 3'UTR ?

1.4: UN PHENOMENE DE TRANSLECTURE INDUIRAIT-IL L'EXPRESSION DE LA PROTEINE DE PLUS DE 12 kDa

L'analyse de la séquence 3'UTR du gène *NXNLI* également présente dans le plasmide ORFp624 indique la présence de deux codons stop TGA en phase de lecture en plus de celui présent en fin de l'ORF de l'exon 1 de *NXNLI* représenté en rouge et

avant un codon stop TAG, représenté en bleu (**Fig. 151a**). Il est connu que dans certains cas rares le codon stop n'est pas reconnu comme tel et les facteurs de terminaison de transduction n'activent alors pas le détachement du polypeptide nouvellement synthétisé. L'ARN de transfert ne reconnaît pas le codon stop et insère un acide aminé. Il s'agit du phénomène appelé translecture. De nombreuses études indiquent que le codon stop TGA (UGA) (opale) est connu pour présenter une plus grande susceptibilité à être recodé que les autres codons stop (Ebashi, 1972; Hofhuis et al., 2016). La protéine RdCVF de 17 kDa pourrait correspondre au produit pour lequel au moins un des trois codons stop TGA serait recodé et présenterait un acide aminé non identifié à cette position. À l'aide du logiciel « ExPASy translate » (web.expasy.org/translate/), le poids moléculaire des protéines traduites lorsque les codons stop sont translus ont été évalués. Dans le cas où le deuxième codon stop situé juste en 3' celui de fin du ORF serait translus, la protéine nouvellement codée aurait un poids moléculaire de 14,9 kDa (**Fig. 153c**), dans le cas où les deux codons stop suivant celui de l'ORF seraient translus, la protéine nouvellement codée aurait un poids moléculaire de 15,1 kDa (**Fig. 153d**), et dans le cas où tous les codons stop seraient translus la protéine aurait un poids moléculaire de 15,3 kDa (**Fig. 153e**).

a
ATGGCCTCCCTGTTCTCTGGCCGCATCCTGATCCGCAACAATAGCGACCAGGACGAGCTGGA
TACGGAGGCTGAGGTCAGTCGCAGGCTGGAGAACC GGCTGGTGCTGCTGTTCTTTGGTGC
TGGGGCTTGCCACAGTGCCAGGCCTTCGTGCCATCCTCAAGGACTTCTTCGTGCGGCTCA
CAGATGAGTTCTATGTA CTGCGGGCGGCTCAGCTGGCCCTGGTGTACGTGTCCCAGGACTCC
ACGGAGGAGCAGCAGGACCTGTTCTCAAGGACATGCCAAAGAAATGGCTTTTCTGCCCT
TTGAGGATGATCTGAGGAGgtgaggaggggcagggagggcttcctggaggaggggcatgttcgctgaagt
gaagcatccattctaactag

b
RdCVFhumain:
M A S L F S G R I L I R N N S D Q D E L D T E A E V S R R L E N R L
V L L F F G A G A C P Q C Q A F V P I L K D F F V R L T D E F Y V L
R A A Q L A L V Y V S Q D S T E E Q Q D L F L K D M P K K W L F L P
F E D D L R R **Stop**
Poids moléculaire isotopique = 12,723 kDa (109 aa)

c
XRdCVFhumain (X = acide aminé inconnu)
M A S L F S G R I L I R N N S D Q D E L D T E A E V S R R L E N R L
V L L F F G A G A C P Q C Q A F V P I L K D F F V R L T D E F Y V L
R A A Q L A L V Y V S Q D S T E E Q Q D L F L K D M P K K W L F L P
F E D D L R R **X** G G A G R A S W R R G H V R **Stop**
Poids moléculaire isotopique = 14,862 kDa (109 + 15 aa)

d
XRdCVFhumain (X = acide aminé inconnu)
M A S L F S G R I L I R N N S D Q D E L D T E A E V S R R L E N R L
V L L F F G A G A C P Q C Q A F V P I L K D F F V R L T D E F Y V L
R A A Q L A L V Y V S Q D S T E E Q Q D L F L K D M P K K W L F L P
F E D D L R R **X** G G A G R A S W R R G H V R **X** K **Stop**
Poids moléculaire isotopique = 15,101 kDa (109 + 17 aa)

e
XRdCVFhumain (X = acide aminé inconnu)
M A S L F S G R I L I R N N S D Q D E L D T E A E V S R R L E N R L
V L L F F G A G A C P Q C Q A F V P I L K D F F V R L T D E F Y V L
R A A Q L A L V Y V S Q D S T E E Q Q D L F L K D M P K K W L F L P
F E D D L R R **X** G G A G R A S W R R G H V R **X** K **X** S I H S N **Stop**
Poids moléculaire isotopique = 15,345 kDa (109 + 23 aa)

Figure 153: Modèle de recodage des codons stop UGA et incorporation d'un acide aminé inconnu à leur place. **a)** Séquence génomique du gène *NXNL1* humain; en rouge sont représentés les codons stop dit opale. En bleu est représenté le codon stop dit ambre. La séquence soulignée représente la phase de lecture ouverte qui code pour le messenger *court NXNL1*. **b)** Séquence protéique codée par le messenger *court NXNL1*. **c)** Séquence protéique codée par le messenger plus un acide aminé inconnu à la place du deuxième codon stop. **d)** Séquence protéique codée par le messenger plus un acide aminé inconnu à la place du troisième codon-stop. **e)** Séquence protéique codée par le messenger plus un acides aminé inconnus a la place du quatrième codon-stop. aa: acide aminé

Certains aminoglycosides tel que l'ataluren, sont connus et utilisés en thérapie pour recoder les codons stop (Keeling and Bedwell, 2011; Welch et al., 2007; Wilschanski et al., 2011). J'ai donc étudié les effets de cet aminoglycoside sur le recodage de la protéine RdCVF 17kDa. Pour cela, des cellules HEK293 transfectées par les plasmides ORFp623 et ORFp624 ont été incubées et mises en culture en présence de différentes concentrations d'ataluren avant d'être lysées pour récupérer les protéines exprimées. Les résultats de cette expérience indiquent que l'ataluren n'a pas d'effet sur l'expression de la protéine RdCVF 17 kDa codée par le plasmide ORFp624 alors qu'il produit de manière dose dépendante des polypeptides de plus hauts poids moléculaires codés par le plasmide ORFp623 (Fig. 154).

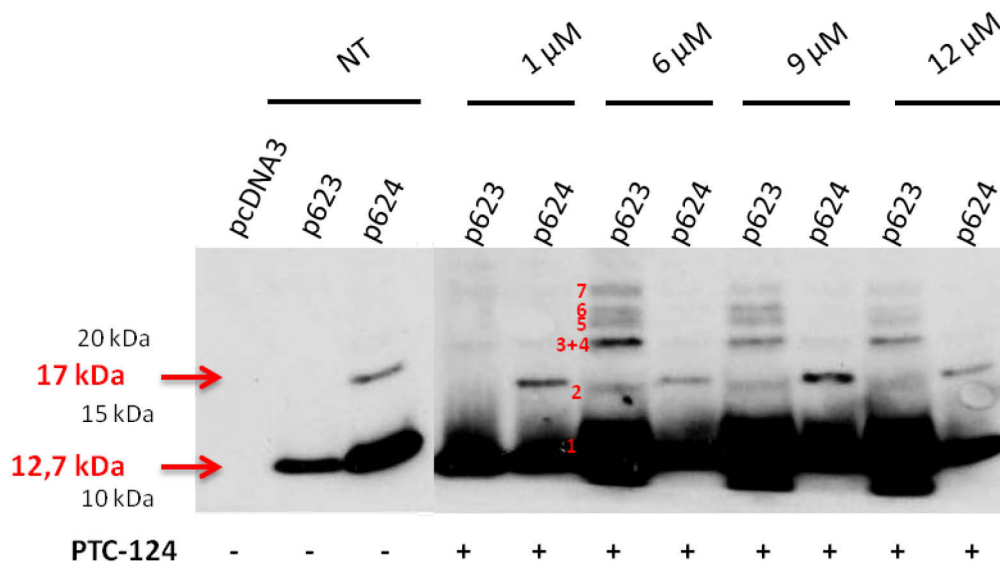


Figure 154: Effet de l'aminoglycoside PTC-124 (Ataluren) sur la translecture. Western blot de lysats protéiques issus de cellules HEK293 transfectées par le plasmide pcDNA3 seul, par le plasmide ORFp623 ou ORFp624 et incubées avec différentes concentrations de PTC-124. Les polypeptides issus de la translecture sont indiqués en rouge et numérotés de 1 à 7. L'anticorps utilisé est un anti-human RdCVF.

De manière très intéressante, la migration des polypeptides traduits s'accorde avec les poids moléculaires théoriques d'un recodage des codons stop du plasmide ORFp623. En effet, l'utilisation du logiciel Sequence Manipulation (http://www.bioinformatics.org/sms2/protein_mw.html) qui permet de prédire la migration d'une protéine sur un gel d'électrophorèse, indique que si chacun des codons

stop du plasmide ORFp623 étaient translus, alors sept polypeptides pourraient être produit par ce plasmide (**Fig. 155a**). Le premier polypeptide (1) identifié par le *western blot* correspond à l'ORF du gène *NXNL1* et migre à une taille 12,7 kDa comme prédit par le logiciel « Sequence Manipulation ». Les mêmes résultats sont obtenus pour le second polypeptide (2) d'une taille de 16,6 kDa, mais également pour le troisième (3) qui a une taille de 21,0 kDa et qui semble être superposé sur le gel d'électrophorèse avec le quatrième (4) de 21,6 kDa. Cette superposition de deux polypeptides correspond à la bande plus intense notée 3+4 dans la figure 9. La prédiction de la migration du cinquième polypeptide (5) d'une taille de 22,3 kDa est vérifiée par le *western blot* ainsi que pour le sixième (6) d'une taille de 25,9 et enfin pour le septième (7) d'une taille de 27,5 kDa (**Fig. 155b**).

a

a) MASLFSGRILIRNNSDQDELDTAEVSRRLLENRLVLLFFGAGACPQCQAFVPIPKD
 FFVRLTDEFYVLRAAQLALVYVSQDSTEEQQDLFLKDMPPKWLFLPFEDDLRR-
 b) SSHGSCRSASTVPSSCQPSVVCPSVPVPSLTLEGATPTVLS-
 c) NEEIASHCLSRCHSILGGGVGQDSKGEDWEDNSRHAGDSSST-
 d) ISSMAG-
 e) SLTTRNP-
 f) WSWPLPLCALARSLRPGDQRSPDARALPGRPQ-
 g) ASERAALINLRKMK-

b

a: 109aa: 12,73 kDa
 a+b: 149aa: 16,62 kDa
 a+b+c: 191aa: 21,04 kDa
 a+b+c+d: 197aa: 21,58 kDa
 a+b+c+d+e: 204aa: 22,35 kDa
 a+b+c+d+e+f: 236aa: 25,90 kDa
 a+b+c+d+e+f+g: 250aa: 27,49 kDa

Figure 155: Polypeptides prédits après recodage des codons stop du plasmide ORFp623. a) Séquence des peptides prédit après chaque codon stop. **b)** Poids moléculaire des polypeptides prédits.

L'ataluren force le recodage des codons stop du plasmide ORFp623 mais pas ceux du plasmide ORFp624.

1.5: L'ELEMENT NRE INDUIRAIT-IL L'EXPRESSION DE LA PROTEINE DE PLUS DE 12 KDA

À la suite d'une collaboration avec Alain Lescure et Eric Westhof, spécialistes de l'architecture et de la réactivité de l'ARN travaillant à l'Institut de biologie moléculaire et cellulaire du CNRS à Strasbourg et avec l'aide de Frédéric Blond, bio-informaticien de l'équipe, la région 3'UTR de *NXNL1* a été minutieusement investiguée. Les résultats de cette analyse indiquent la présence dans cette région d'une séquence d'une trentaine de nucléotides, que nous avons nommée *NXNL1 Redefinition Element* (NRE) et qui ressemble étrangement à la séquence Selenocysteine Redefinition Element (SRE) du gène *SEPNI* qui code pour la protéine selenoprotein N1 (Howard et al., 2005) (**Fig. 156**).

a
NRE
CAGGGAGGGCUUCCUGGAGGAGGGGGCAUGUUCGCU

b
SRE
GGCGGACUCUCCGGGAGACUGUCCUGGAAAGUUCGC

Figure 156: Séquence nucléotidique de l'ARN du NRE et du SRE. Partie 3'UTR du gène a) *NXNL1* et b) *SEPNI*.

Par la suite le logiciel « RNAfold web server » permettant de prédire les structures secondaires de séquences d'ARN a été utilisé pour comparer la structure secondaire de la séquence ARN du NRE avec celle du SRE. De manière très intrigante, les résultats de ces analyses indiquent qu'il existe une ressemblance très prononcée entre ces deux structures secondaires (**Fig. 157**).

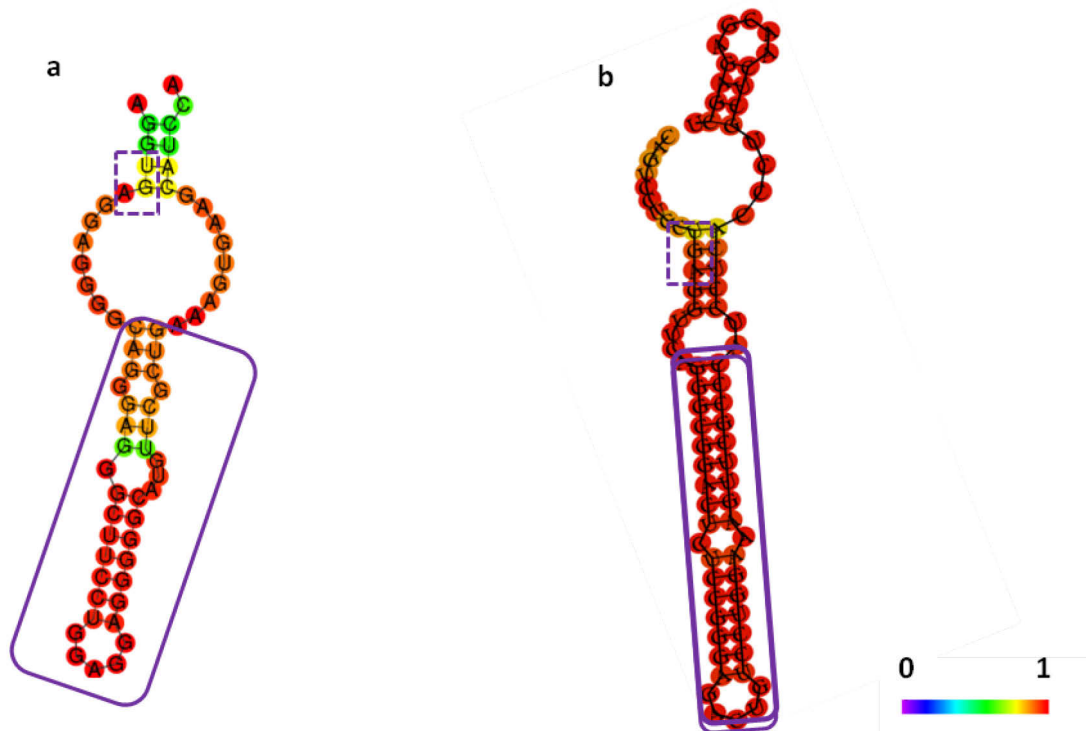


Figure 157: L'élément NRE de *NXN1* ressemble structurellement à l'élément SRE de *SEPN1*. Structure tertiaire de la partie 3'UTR de l'ARN de a) ORFp624 et b) *SEPN1*. Les codons-STOP TGA des ORF des gènes sont encadrés en pointillés. Les éléments NRE et SRE sont encadrés en trait pleins. L'énergie des appariement augmente du violet vers le rouge

La structure secondaire du NRE tout comme celle du SRE est caractérisée par sa forme en épingle à cheveux, ou tige-boucle très stable où l'énergie des appariements est très forte. Cette structure particulière est connue pour inciter les ribosomes à traduire les codons stop TGA (UGA) appelé opale par un acide aminé au lieu d'arrêter la traduction. Des mutations dans le SRE du gène *SEPN1* entraîne la réduction de l'incorporation de la sélénocystéine dans la protéine codée. Il semblerait que ces mutations joueraient un rôle d'autant plus important qu'elles déstabilisent la structure secondaire de l'élément SRE (Maiti et al., 2010). En se basant sur ces données, différents plasmides ORFp624 présentant des mutations dans le NRE ont été construits pour étudier l'influence de ces substitutions sur l'expression de la protéine RdCVF 17 kDa (**Fig. 158**).

a)
 AGG UGA GGA GGG GCA GGG AGG GCU UCC UGG AGG AGG GGG CAU GUU CGC UGA AAG UGA AGC
 AUC CA

b)
 AGG UGA GGA GGG GCA GGG AGG GCU GGG UGG AGG AGG GGG CAU GUU CGC UGA AAG UGA AGC
 AUC CA

c)
 AGG UGA GGA GGG GCA GGG AGG GCU UCC UGG AGG AGG GCG CAU GUU CGC UGA AAG UGA AGC
 AUC CA

d)
 AGG UGA GGA GGG GCA GGG AGG GCG UCC UGG AGG AGG GCG CAU GUU CGC UGA AAG UGA AGC
 AUC CA

e)
 AGG UGA GGA GGG GCA GGG AGG GGA UCC UGG AGG AGG GGG CAU GUU CGC UGA AAG UGA AGC
 AUC CA

f)
 AGG UGA GGA GGG GCA GGG AGG GGA UCC UGG AGG AGG GUC CAU GUU CGC UGA AAG UGA AGC
 AUC CA

g)
 AGG UAA GGA GGG GCA GGG AGG GGA UCC UGG AGG AGG GUC CAU GUU CGC UGA AAG UGA AGC
 AUC CA

Figure 158: Séquence nucléotidique de l'ARN du NRE a) sans mutation, b) avec la mutation UCC25GGG, c) avec la mutation G38C, d) avec les mutations G38C et U24G, e) avec la mutation CU23GA, f) avec les mutations CU23GA et GG38UC, g) avec la mutation du codon stop. En bleu est représentée la séquence NRE. Les codons soulignés représentent les codons stop.

La première mutation où les nucléotides UCC en position 25 du SRE (la position est établie à partir du nucléotide n°1 du premier codon décrit situé juste avant le codon stop TGA de l'exon 1) sont remplacés par les nucléotides GGG, vise à complètement déstabiliser la structure tridimensionnelle du NRE (**Fig. 159b**). La deuxième mutation G38C déstabilise partiellement la structure du NRE car elle permet un maintien de la structure en épingle à cheveux tout en diminuant l'énergie de son appariement (**Fig. 159c**). La mutation suivante, U24G est une mutation compensatoire qui permet de rétablir les caractéristiques du NRE lorsqu'elle est appliquée en complément de la mutation G38C (**Fig. 159d**). La mutation CU23GA, tout comme la G38C, déstabilise partiellement la structure du NRE (**Fig. 159e**) et la mutation GG38UC tout comme la mutation U24G est une mutation compensatoire (**Fig. 159f**). D'après les travaux de Howard *et al*, lorsque le codon stop TGA (UGA) est remplacé par le codon stop TAG (UAG), le phénomène de translecture est faiblement impacté alors que lorsque le codon stop TGA (UGA) est remplacé par le codon stop TAA (UAA), il n'y a plus de translecture de ce codon stop (Howard et al., 2005). En se basant sur ces données, nous avons aussi construit un autre plasmide pORF624 muté qui permet d'étudier

l'importance du codon stop TGA dans l'expression du RdCVF 17 kDa. Cette mutation consiste à remplacer le codon stop TGA de l'exon 1 du gène *NXNL1* par un codon stop TAA (**Fig. 159g**).

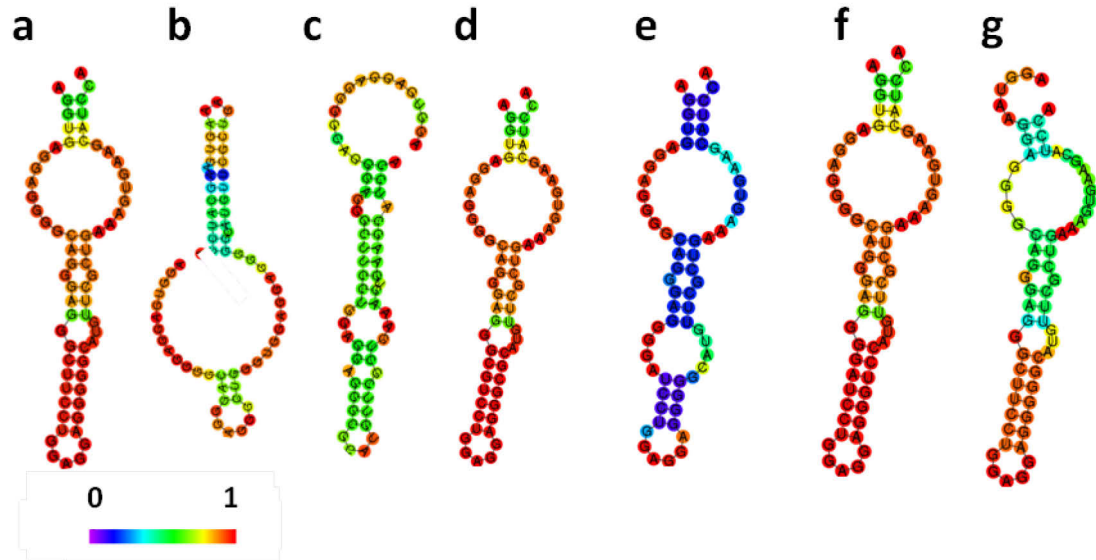


Figure 159: Modélisation des effets de mutations sur la structure du NRE. Structure tertiaire du NRE du **a**) sans mutation, **b**) avec la mutation UCC25GGG, **c**) avec la mutation G38C, **d**) avec les mutations G38C et U24G, **e**) avec la mutation CU23GA, **f**) avec les mutations CU23GA et GG38UC, **g**) avec la mutation du codon-stop. L'énergie des appariements augmente du violet vers le rouge.

Nous avons constaté que les mutations qui perturbent la structure secondaire du NRE (CU23GA et G38C) inhibent l'expression de la protéine à 17 kDa, mais les mutations compensatoires (GG38UC et U24G) ne restaurent pas son expression (**Fig. 160**). Fait intéressant la séquence du codon stop TGA joue un rôle essentiel.

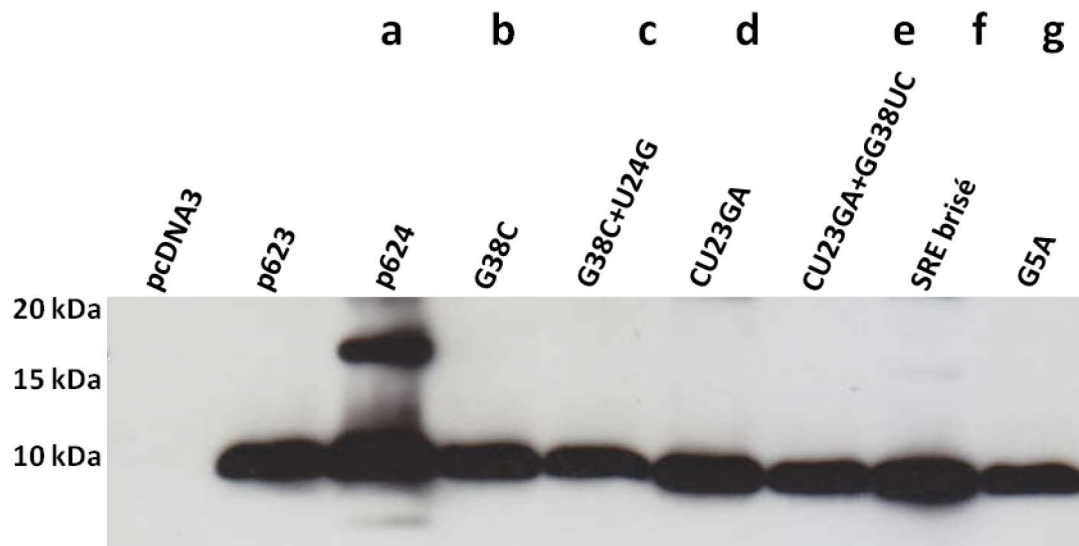


Figure 160: Effets des différentes mutations structurales du NRE sur l'expression de la protéine 17 kDa. *Western blot* de lysats protéiques issus de cellules HEK293 transfectées par les plasmides qui codent pour les NRE mutés. L'anticorps utilisé est un anti-human RdCVF.

Il semble donc que pour le gène NXNLI, ce soit la séquence nucléotidique du NRE qui est importante et non seule sa structure secondaire. La question qui se pose alors est: quel est le ou les acides aminés insérés en place du ou des codons stop lors de la synthèse de la protéine RdCVF 17 kDa?

1.6: LA PROTEINE DE PLUS DE 12 kDa N'EST PAS UNE SELENOPROTEINE

Le gène *SEPNI* possède également dans sa région 3'UTR un deuxième élément de type épingle à cheveux appelé élément SECIS, de l'anglais *selenocystein insertion structure* qui ressemble beaucoup au SRE mais en plus long. D'une soixantaine de nucléotides, cet élément conduit le ribosome à traduire le codon UGA par une sélénocystéine. Le gène *NXNLI* code pour deux protéines, dont un facteur trophique et une thiorédoxine. Ces deux protéines possèdent des résidus cystéines dans leur site actif. Bien que l'analyse de la région 3'UTR et de l'exon 2 du gène *NXNLI* n'indique pas de présence d'élément SECIS indispensable pour l'insertion de l'acide aminé sélénocystéine des sélénoprotéines, l'élément NRE ressemble à l'élément SRE de *SEPNI* qui code pour une sélénoprotéine. De plus, étant donné que la vingtaine de

sélenoprotéines décrites sont souvent liées à la signalisation redox tout comme les thiorédoxines, nous avons envisagé la possibilité que le (ou les) codon(s) UGA, en 3' de l'exon 1 pourrait être traduit en un résidu sélénocystéine. Nous avons alors décidé de vérifier si le troisième produit codé par notre gène d'intérêt de 17 kDa était ou non une sélénoprotéine. Les sélénoprotéines sont produites par incorporation de sélénocystéine au codon stop/Sec TGA (UAG) en 3' (Hatfield and Gladyshev, 2002) et protègent les cellules contre les stress oxydatifs. Ces protéines possèdent une sélénocystéine (Sec ou U), le 21^{ème} acide aminé naturel du code génétique qui est chimiquement plus réactif que la cystéine (Cys) mais structurellement identique aux cystéines à la seule différence que l'atome soufre (S) présent dans les Cys est remplacé par un sélénium (Se). Il n'existe que 25 sélénoprotéines décrits chez l'Homme dont la glutathione-peroxydase (GPX), la thiorédoxine réductase (TXNRD) et l'iodothyronine (DIO). Je me suis alors rendue pour deux semaines au laboratoire d'Elias Arner de l'Institut Karolinska à Stockholm pour tester cette hypothèse. Avec l'aide de Xiaoxiao Peng, étudiant en thèse d'Elias Arner, nous avons mis en place une culture de cellules HEK293. Ces cellules ont par la suite été transfectées par le plasmide vide pcDNA3 qui a servi de contrôle négatif pour nos expériences, par le plasmide ORFp623, par le plasmide ORFp624, et enfin par un plasmide qui code pour la sélénoprotéine thioredoxin reductase 1 (TXNRD1) (Arner, 2017) utilisée comme contrôle positif de l'expérience. Le lendemain, de la transfection le milieu de culture des cellules a été remplacé par un milieu contenant du sélénium radioactif (⁷⁵Se) à une concentration finale de 1 µCi/ml. À partir de ces cellules, les lysats protéiques ont été récupérés et déposés sur un gel d'électrophorèse, qui a été coloré ensuite au bleu de Coomassie. Les résultats de cette coloration indiquent que pour chaque cas, quasiment la même quantité de protéine a été chargée sur le gel (**Fig. 161a**). À partir de ce mêmes extraits, un *western blot* a été réalisé et a confirmé l'expression de la protéine RdCVF 17 kDa à partir du ORFp624 (**Fig. 161b**). Finalement, une autoradiographie à partir de ces lysats indiquent que la protéine TXNRD1 a bien incorporé le ⁷⁵Se, alors qu'aucun signal spécifique n'est détecté pour la protéine RdCVF 17 kDa (**Fig. 161c**).

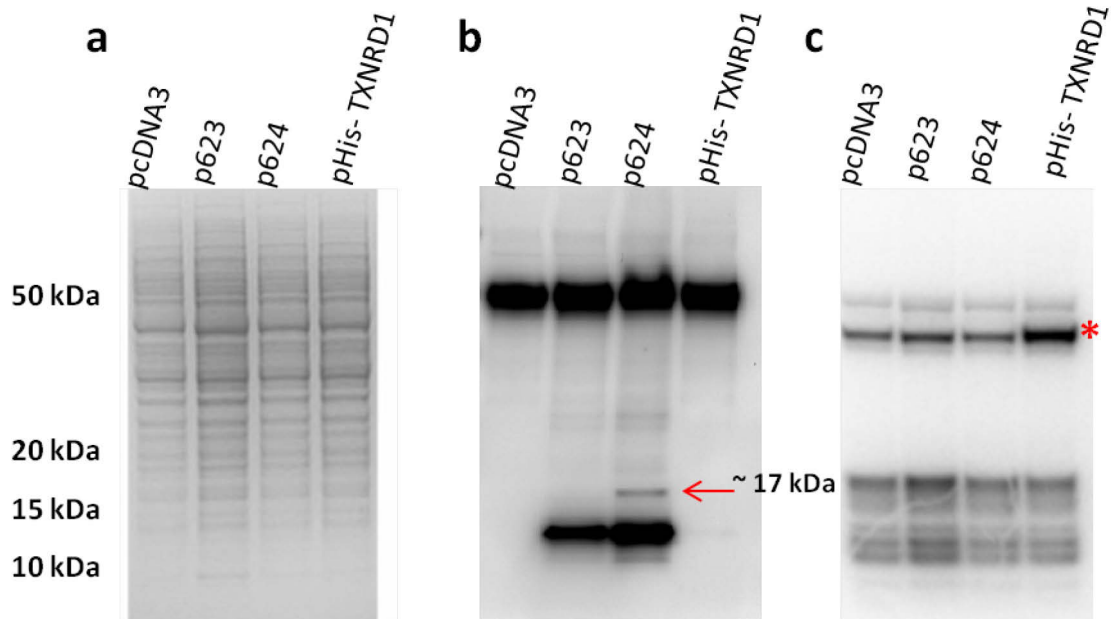


Figure 161: *NXNL1* code pour une protéine de 17 kDa qui n'est pas une sélénoprotéine. **a)** Lysats protéiques issus de cellules HEK293 transfectées par le plasmide pcDNA3 seul, par le plasmide ORFp623, par le plasmide ORFp624 ou par le plasmide pHis- TXNRD1, déposés sur gel et colorés au bleu de Coomassie. **b)** *Western blot* de ces lysats protéiques. L'anticorps utilisé est un anti-human RdCVF. **c)** Radio-marquage de ces lysats protéiques. * TXNRD1 qui a incorporé du ^{75}Se .

Ces expériences montrent donc l'absence d'incorporation de ^{75}Se dans la protéine à 17 kDa issue d'extrait cellulaire total. Cependant, l'autoradiographie révèle la présence de nombreuses autres bandes correspondant aux sélénoprotéines endogènes des cellules HEK293. Afin de se débarrasser de ces bandes parasites et pour s'assurer qu'elles ne masquent pas un éventuel signal radioactif issu de la protéine RdCVF 17 kDa, une immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps dirigé contre RdCVF est réalisée. L'anticorps dirigé contre RdCVF est fixé sur de ces billes magnétiques. Ensuite, les différents lysats protéiques, utilisés lors de l'expérience précédente, ont été incubés en présence des billes magnétiques. Ces dernières ont été lavées trois fois pour éliminer toutes les protéines qui n'interagissent pas avec l'anticorps fixé. Finalement, les protéines qui ont spécifiquement interagi avec cet anticorps sont éluées et déposées sur gel d'électrophorèse. Un *western blot* a été réalisé à l'aide du même anticorps que celui utilisé pour l'immunoprécipitation. Les résultats de cette expérience indiquent qu'en plus d'une protéine non spécifique de 50 kDa exprimée par les cellules HEK293, seules

RdCVF 12 kDa exprimée par ORFp623 et ORFp624 et RdCVF 17kDa exprimée uniquement par ORFp624 sont révélées (**Fig. 162a**). Cependant, l'autoradiographie réalisée à partir des mêmes protéines éluées indique l'absence d'incorporation de ⁷⁵Se par RdCVF 17 kDa et confirme que cette protéine n'est pas une sélénoprotéine (**Fig. 162b**).

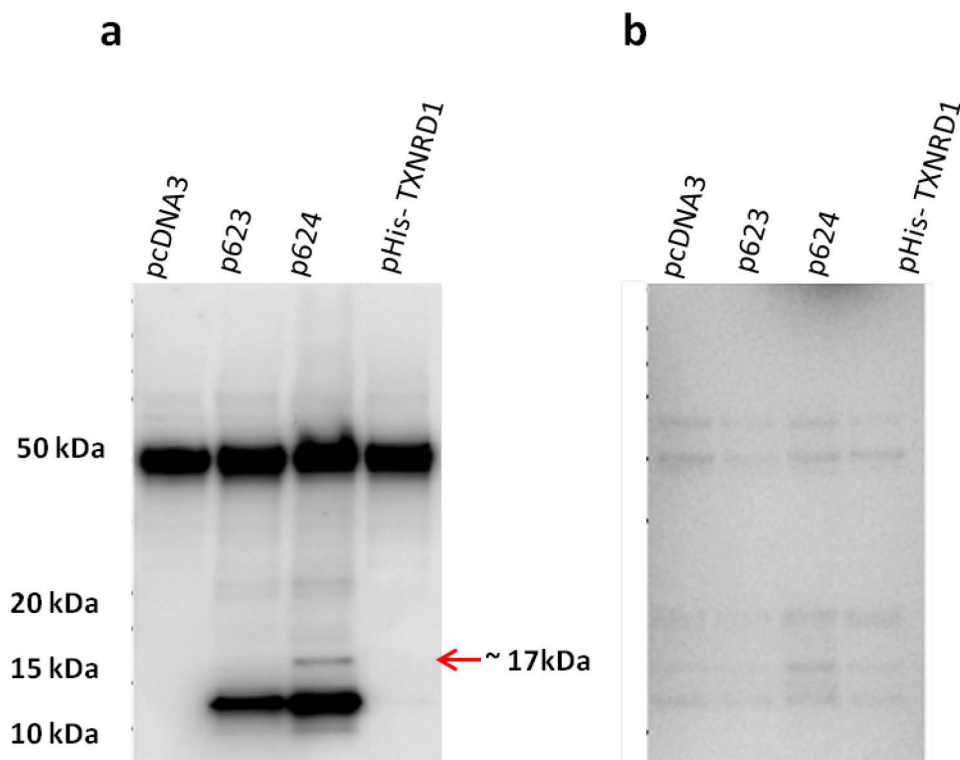


Figure 162: *NXNL1* code pour une protéine de 17 kDa qui n'est pas une sélénoprotéine. a) Western blot à partir protéines immunoprécipitées à l'aide de l'anticorps anti-humain RdCVF. b) Radio-marquage des protéines immunoprécipitées .

NXNL1 code pour une protéine autre que RdCVF et RdCVFL qui n'est pas une sélénoprotéine. L'expression de cette protéine est dépendante de la séquence du codon stop TGA. La séquence de l'élément NRE ainsi que les régions 5' et 3'UTR du gène *NXNL1* jouent un rôle dans l'expression de cette protéine.

2: CONFIRMATION CHEZ LES PRIMATES QUE L'ÉPISSAGE ALTERNATIF DE *NXNLI* N'A LIEU QUE DANS LES BATONNETS

2.1: DISSECTION ET ISOLEMENT DES DIFFÉRENTES ZONES DE LA RETINE

La rétine des primates apparaît dans sa totalité comme un disque d'environ 42 mm de diamètre. Les globes oculaires d'un macaque (*Macaca fascicularis*) utilisé dans le cadre d'autres expériences et issus de la plateforme de MIRCen (Molecular Imaging Research Center) située au CEA (Commissariat à l'énergie atomique) de Fontenay-aux-Roses ont été récupérés. Suite à l'énucléation des globes et la dissection de la rétine (**Fig. 163a**), j'ai récupéré la fovéa qui représente une zone enrichie en cônes, responsable de la vision centrale (**Fig. 163b**).



Figure 163: Dissection d'une rétine de macaque. a) description des différents étapes de la dissection d'une rétine de macaque adulte. b) Les différentes parties de la rétine de macaque récupérées pour étudier l'expression des différents gènes d'intérêt.

Elle apparaît comme une petite dépression et est localisée au centre de la macula. La macula, qui est une région caractérisée par une tache jaunâtre due à un pigment

xanthophylle de couleur jaune est hautement spécialisée et uniquement peuplée de cônes (**Fig. 164**), a également été isolée. Elle est localisée entre 0,5 et 1 mm autour de la fovéa et correspond avec cette dernière à la région de la rétine appelée la rétine centrale.

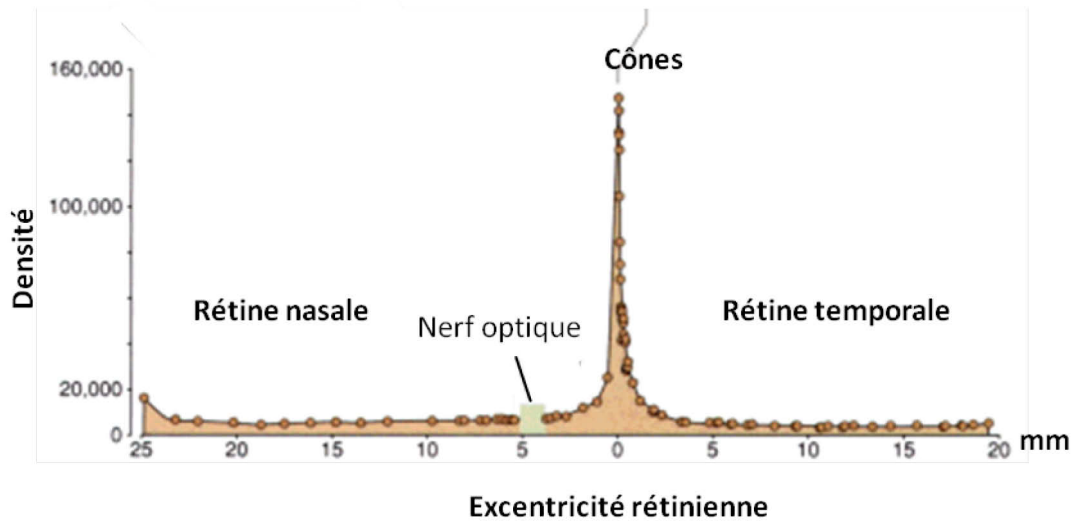


Figure 164: Densité des cônes en fonction de l'excentricité rétinienne (0° représente la fovéa). La fovéa correspond au pic. (d'après Rodieck, 1998).

Les bâtonnets sont présents seulement à partir de 1 mm du centre de la fovéa, dans la région appelée rétine périphérique qui, par opposition à la macula, présente une densité de cônes bien moins importante. Cette région de la rétine est généralement divisée en 4 zones depuis Duke-Elder (Duke-Elder, 1958). La périphérie proche, la périphérie moyenne, la périphérie éloignée et l'*ora serrata* ou extrême périphérie que nous n'étudions pas dans ce travail. Plus précisément, la densité des bâtonnets est nulle dans la fovéa, maximale à une excentricité de 5 à 7 mm, et chute lentement en périphérie (Rodieck, 1998) (**Fig. 165**).

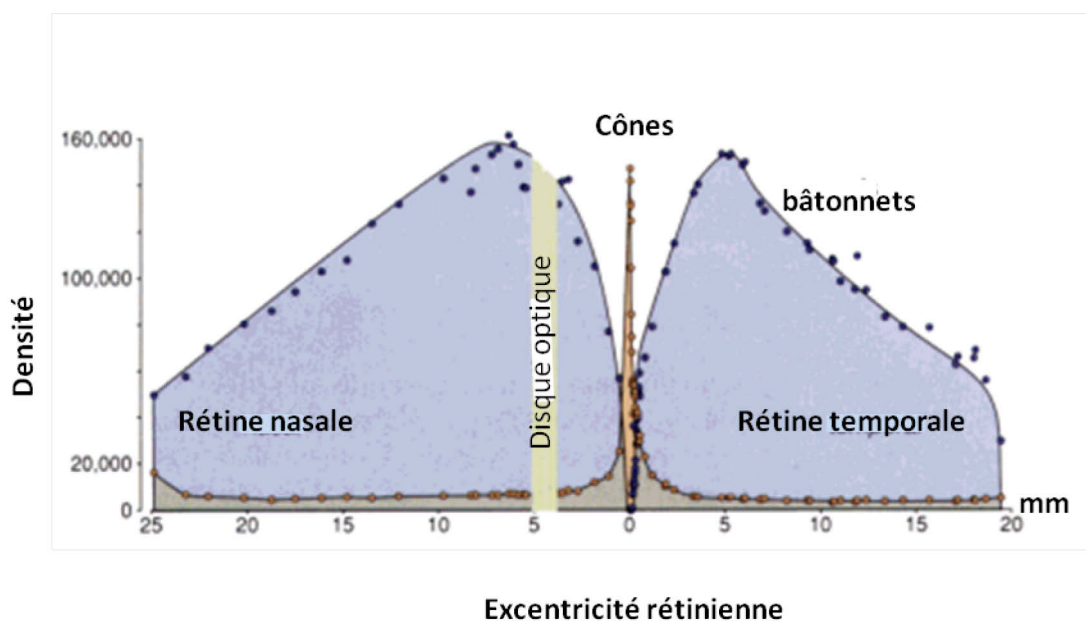


Figure 165: Densité des cônes et des bâtonnets en fonction de l'excentricité rétinienne (0° représente la fovéa). La fovéa correspond au pic. Schéma décrivant la répartition des cônes et des bâtonnets en bleu en fonction de l'excentricité rétinienne. (d'après Rodieck, 1998).

Afin d'analyser et comparer la différence d'expression d'un gène ou d'une protéine dans les bâtonnets et dans les cônes de macaque, j'ai également isolé la rétine périphérique proche qui s'étend sur 1,5 mm à partir de la macula, puis la rétine périphérique moyenne qui mesure 3 mm à partir de la rétine périphérique proche et enfin la rétine périphérique éloignée qui peut s'étendre entre 9 à 15 mm depuis la macula. Afin d'étudier l'expression de plusieurs gènes d'intérêt par RT-PCR quantitative, les ARN totaux de chacun des morceaux de rétine isolé sont extraits. Sachant que le macaque utilisé pour ces expériences est également utilisé pour d'autres expériences réalisées ailleurs (dans d'autres laboratoires de recherche), il est possible que parfois, et indépendamment des précautions prises, le temps écoulé entre l'énucléation et la dissection de l'œil et de la rétine soit suffisamment long pour que les ARNs soient dégradés. C'est pourquoi, pour m'assurer de l'intégrité du matériel utilisé avant de procéder aux expériences suivantes, un contrôle qualité des ARN extraits est réalisé à l'aide d'un Bioanalyzer 2100. L'image du gel reconstruit de chaque échantillon fait apparaître deux pics représentant les ARN ribosomiaux 18S et 28S avec une prédominance de celui de 18S, témoignant de l'intégrité des ARN (**Fig. 166**).

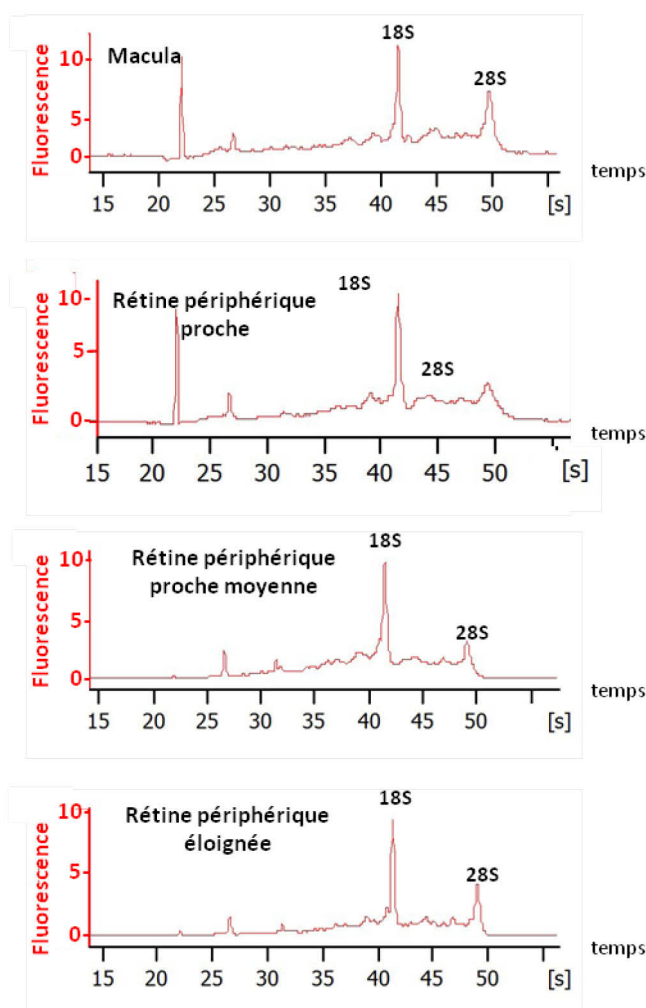


Figure 166: Analyse des échantillons d'ARN extraits des régions de la rétine de macaque au Bioanalyzer 2100 (Agilent).

À partir de ces ARNs, une première RT-PCR quantitative à l'aide d'amorces spécifiques amplifiant soit un gène spécifique des cônes soit un gène spécifique des bâtonnets est réalisée. Cette expérience a pour but de s'assurer que les régions isolées de la rétine correspondent bien à des régions constituées majoritairement de cônes ou de bâtonnets. La première paire d'amorce utilisée amplifie le gène *opsin 1, medium wave sensitive (OPN1MW)* qui code pour un pigment visuel de la famille des opsines de cônes qui est un récepteur composé de sept domaines transmembranaires couplé à une protéine G. Les expressions relatives des gènes étudiés sont normalisées par le gène qui code pour la GAPDH, qui est une protéine ubiquitaire et dont la quantité quasi constante nous permet d'établir une garantie concernant la quantité d'ADNc utilisée dans les réactions (**Fig. 167**).

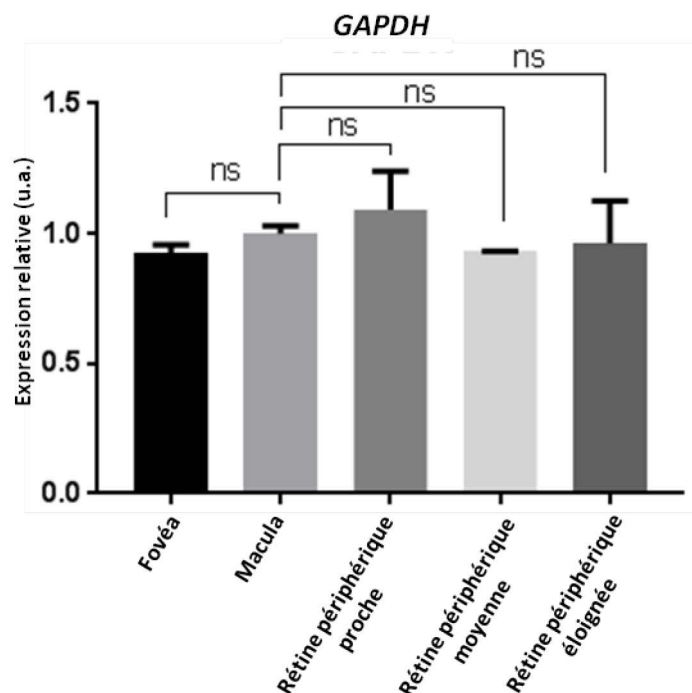


Figure 167 : Expression de la GAPDH dans les différentes parties de la rétine de macaque. RT-PCR quantitative de l'expression de la GAPDH dans la fovéa, la macula, la rétine périphérique proche, la rétine périphérique moyenne et la rétine périphérique éloignée. u.a.: unité arbitraire.

Comme attendu, l'expression relative du gène *OPNIMW* est 2,5 fois plus importante dans la fovéa de rétine de macaque que dans la macula. Ces résultats indiquent que proportionnellement à l'expression du gène *OPNIMW*, il y a 2,5 fois plus de cônes dans la fovéa que dans la macula. De la même manière, nous pouvons observer que la quantité de cônes diminue d'autant plus que nous nous progressons vers la rétine périphérique. Ces résultats confirment que la rétine périphérique proche possède moins de cônes que la macula. Les résultats de cette expérience démontrent une diminution, non significative, du nombre de cônes entre la rétine périphérique moyenne et la rétine périphérique proche. Nous observons également que la quantité de cônes est inférieure dans la rétine périphérique éloignée que dans la rétine périphérique moyenne (**Fig. 168a**). Cette expérience est répétée avec cette fois une paire d'amorces amplifiant spécifiquement le gène *rhodopsine* exprimé spécifiquement par les bâtonnets. Les résultats de cette expérience indiquent que dans la fovéa il n'y a pas de bâtonnets. Leur quantité est très faible dans la macula alors qu'elle augmente significativement dans la rétine périphérique atteignant un maximum dans la rétine périphérique moyenne. Comme décrit dans la littérature et comme attendu, l'expression du gène *rhodopsine*

(*RHO*), proportionnelle à la quantité de bâtonnets, diminue de nouveau dans la rétine périphérique éloignée (**Fig. 168b**).

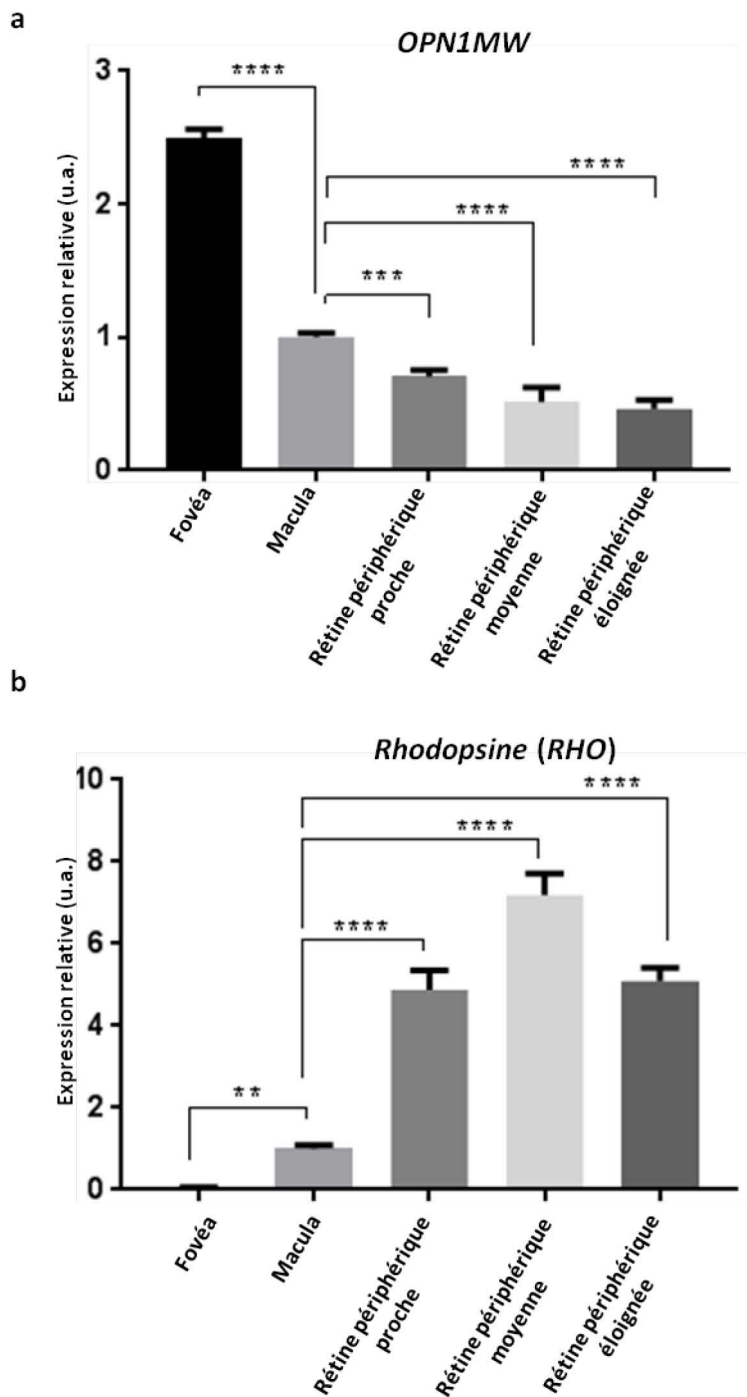


Figure 168 : Expression du marqueur des photorécepteurs à cône et à bâtonnets dans les différentes parties de la rétine de macaque. **a)** RT-PCR quantitative de l'expression de l'opsine verte des cônes dans la fovéa, la macula, la rétine périphérique proche, la rétine périphérique moyenne et la rétine périphérique éloignée. **b)** RT-PCR quantitative de l'expression de la rhodopsine dans la fovéa, la macula, la rétine périphérique proche, la rétine périphérique proche moyenne et la rétine périphérique éloignée. u.a.: unité arbitraire.

Ces résultats lorsqu'ils sont combinés confirment que le prélèvement effectué du centre de la rétine de macaque est bien composé de cônes comme attendu alors que celui de la périphérie de la rétine est composé de bâtonnets. Les ARNs extraits de ces régions isolées de rétine peuvent donc être utilisés pour la suite de nos expériences.

2.2: ETUDE DE L'EXPRESSION DU MESSAGER *SHORT NXNLI* ET *LONG NXNLI*

Avant de commencer d'autres expériences, j'ai dans un tout premier temps cherché à étendre chez les primates les résultats obtenus chez la souris (Mei et al., 2016). Dans les bâtonnets de souris, *Nxn1l* est alternativement épissé, ils expriment donc RdCVF et RdCVFL, alors que dans les cônes, *Nxn1l* est systématiquement épissé et les cônes n'expriment que RdCVFL. À partir des ARNs validés et à l'aide de paires d'amorces spécifiques, l'expression des formes courtes et longues du gène *NXNLI* chez le primate par RT-PCR a été comparée. L'amorce sens est utilisée pour les 2 formes et a donc été choisie dans la partie du gène *NXNLI* commune aux deux formes, l'exon 1 alors que l'amorce antisens amplifiant le messager codant pour RdCVF a été choisie dans l'intron suivant, juste en 5' du codon-stop en phase. L'amorce antisens pour le messager codant pour RdCVFL a été sélectionnée dans l'exon 2 (**Fig. 169**).

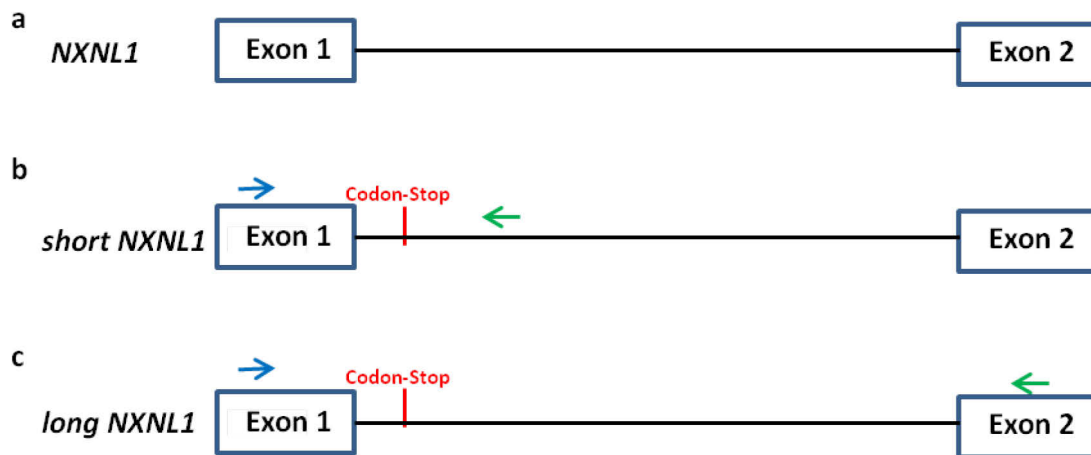


Figure 169: Schéma représentatif des isoformes du gène *NXNL1*. a) Représentation schématique du gène *NXNL1*. b) Représentation schématique de l'isoforme *short NXNL1*. c) Représentation schématique de l'isoforme *long NXNL1*. les exons sont représentés par des rectangles bleus, et les introns par un trait connectant les exons. Les flèches bleues symbolisent la localisation des amorces sens et les flèches vertes des amorces antisens spécifiques de *short NXNL1* et *long NXNL1* utilisées lors de la RT-PCR. Données issues et adaptées d'Ensembl.

Les résultats de la RT-PCR indiquent que le messenger *short NXNL1* est environ 20 fois plus exprimé dans la rétine périphérique proche et éloignée que dans la macula, et au moins 30 fois plus exprimé dans la rétine périphérique moyenne que dans la macula (**Fig. 170a**). Le messenger *long NXNL1* est environ 3,5 fois plus exprimé dans la rétine périphérique proche que dans la macula, 10 fois plus exprimé dans la rétine périphérique moyenne que dans la macula, et environ 7 fois plus exprimé dans la rétine périphérique éloignée que dans la macula (**Fig. 170b**).

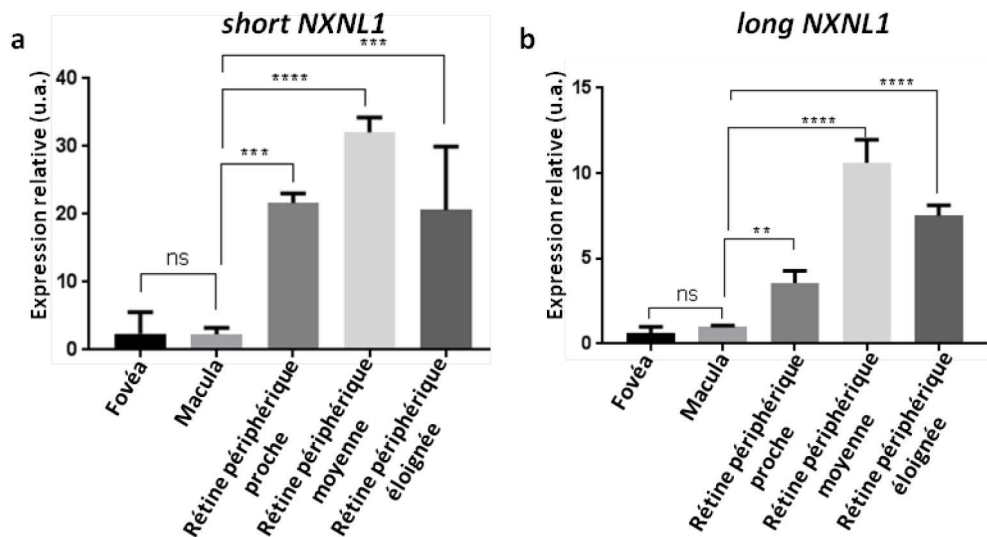


Figure 170: Expression des produits du gène *NXNL1* dans les différentes parties de la rétine de macaque. **a)** RT-PCR quantitative de l'expression de *short NXNL1* dans la fovéa, la macula, la rétine périphérique proche, la rétine périphérique moyenne et la rétine périphérique éloignée. **b)** RT-PCR quantitative de l'expression de *long NXNL1* dans la fovéa, la macula, la rétine périphérique proche, la rétine périphérique moyenne et la rétine périphérique éloignée. u.a.: unité arbitraire.

L'ensemble des résultats de cette expérience indique que la différence d'expression du messager *short NXNL1* entre les bâtonnets et les cônes de la rétine de macaque est plus importante que celle du messager *long NXNL1*. Ces données indiquent que la macula de macaque exprime 20 à 30 fois moins le messager *short NXNL1* que la rétine périphérique alors que le messager *long NXNL1* est environ 3 à 10 fois moins exprimé dans la macula de macaque que dans la rétine périphérique. Les bâtonnets de macaque en périphérie expriment les deux messagers. Il semble que les cônes de macaque n'expriment pas ou très peu le messager *short Nxn11* alors qu'ils expriment le messager *long Nxn11*, tandis que les bâtonnets de macaque expriment les deux messagers. Ces expériences ont été renouvelées à partir d'une rétine humaine. Tout comme pour la rétine de macaque, la fovéa, la macula, la rétine périphérique proche, moyenne et éloignée ont été isolées. Les ARN extraits de ces tissus ont été contrôlés et les analyses de ces échantillons indiquent que la qualité ces ARNs est moindre à celle de ceux extraits de la rétine de macaque (**Fig. 171**).

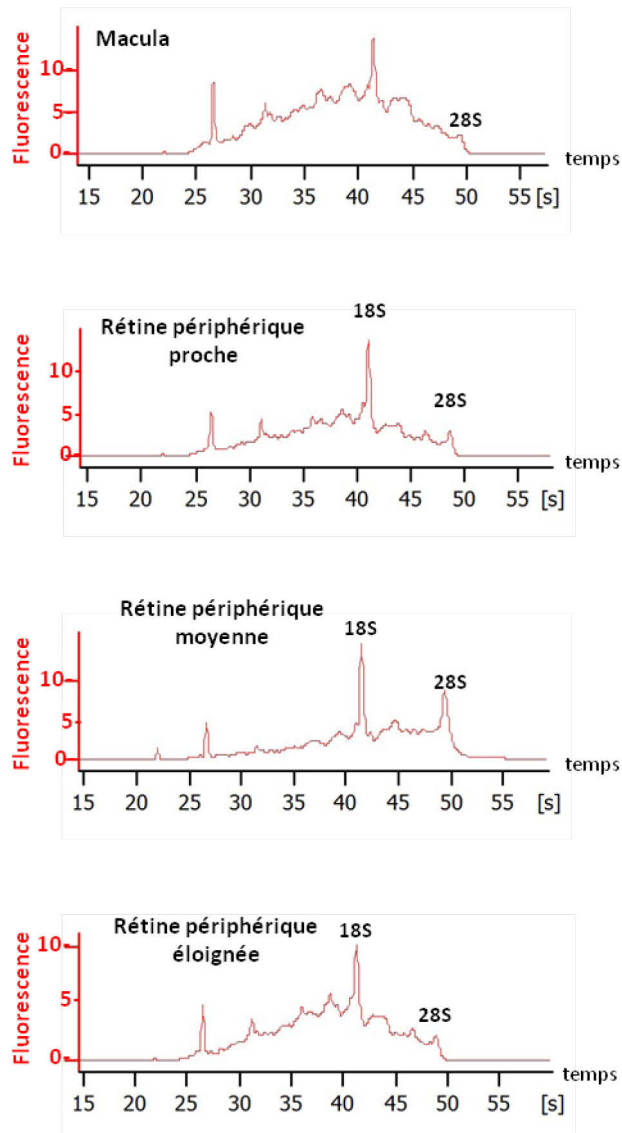


Figure 171: Analyse des échantillons d'ARN extraits des régions d'une rétine humaine au Bioanalyzer 2100 (Agilent).

Le délai écoulé entre le décès du donneur d'organe et la préparation, le transport, la dissection et la distribution de la rétine a certainement été suffisamment long pour entraîner une dégradation des ARNs. Nous savons que le matériel biologique humain est difficilement accessible et cela est d'autant plus vrai pour des tissus tels que la rétine qui, comme nous pouvons aisément le comprendre, ne peut pas faire l'objet de don du vivant d'un individu. L'unique moment pour collecter ce tissu humain est après le décès d'une personne, ce qui rend ces échantillons d'autant plus précieux. Ceci explique

pourquoi, même si la qualité des ARNs de rétine humaine est moins bonne que celle de la rétine de macaque, j'ai tout de même pris la décision de réaliser les études d'expression des messagers *short NXNL1* et *long NXNL1* pour les comparer dans les différentes régions de la rétine humaine définie par leur densité en cônes et en bâtonnets. Les résultats de ces expériences confirment les résultats obtenus à partir de rétine de macaque, c'est-à-dire que le messager *short NXNL1* est significativement plus exprimé dans la rétine périphérique que dans la rétine centrale humaine (**Fig. 172a**). J'ai également démontré que la différence d'expression du messager *long NXNL1* est non significativement différente entre la macula, la rétine périphérique proche et la rétine périphérique moyenne (**Fig. 172b**).

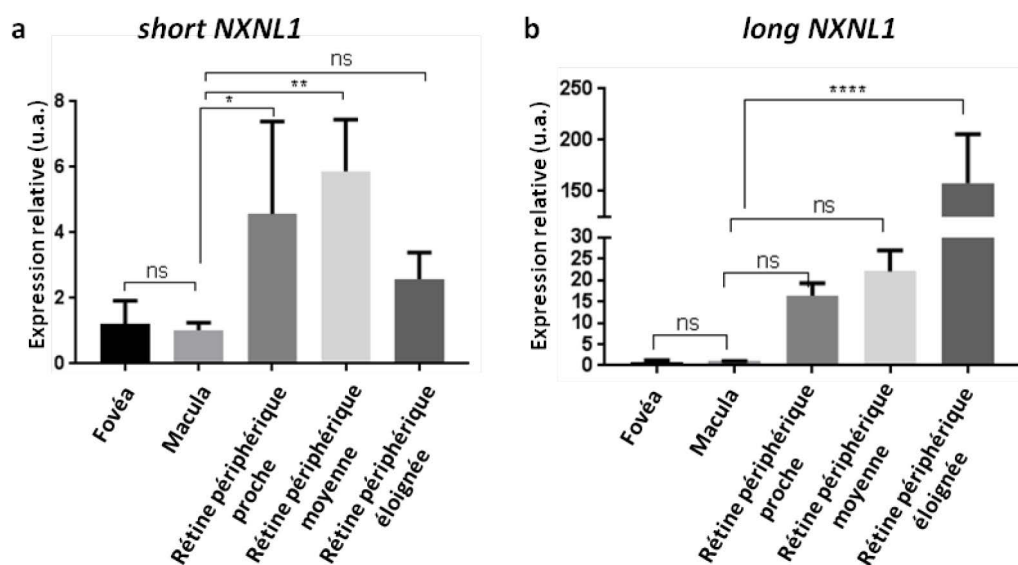


Figure 172: Expression des produits du gène *NXNL1* dans les différentes parties de la rétine humaine. **a)** RT-PCR quantitative de l'expression de *short NXNL1* dans la fovéa, la macula, la rétine périphérique proche, la rétine périphérique moyenne et la rétine périphérique éloignée. **b)** RT-PCR quantitative de l'expression de *long NXNL1* dans la fovéa, la macula, la rétine périphérique proche, la rétine périphérique moyenne et la rétine périphérique éloignée. u.a.: unité arbitraire.

Ces résultats confirment que les cônes humains expriment principalement le messager qui code pour RdCVFL tandis que les bâtonnets expriment ce messager mais également celui qui code pour RdCVF. En tenant compte de l'axe des ordonnées des figures 170 et 172, le messager *short NXNL1* est moins exprimé chez l'Homme que chez le macaque et l'inverse est observé concernant l'expression du messager *long NXNL1*. Cependant, de manière générale le messager *long NXNL1* est plus exprimé dans la rétine que le

messenger *short NXNL1*. À partir d'un morceau de rétine humaine totale, où le centre de la rétine et la rétine périphérique ne sont pas discernés, et en utilisant les mêmes amorces que précédemment, j'ai démontré que chez l'Homme le messenger *long NXNL1* est 4 fois plus exprimé que le messenger *short NXNL1* (**Fig. 173a**). Ces résultats sont également confirmés à partir de rétine de souris où les amorces sont sélectionnées de la même manière que pour l'Homme (**Fig. 173b**).

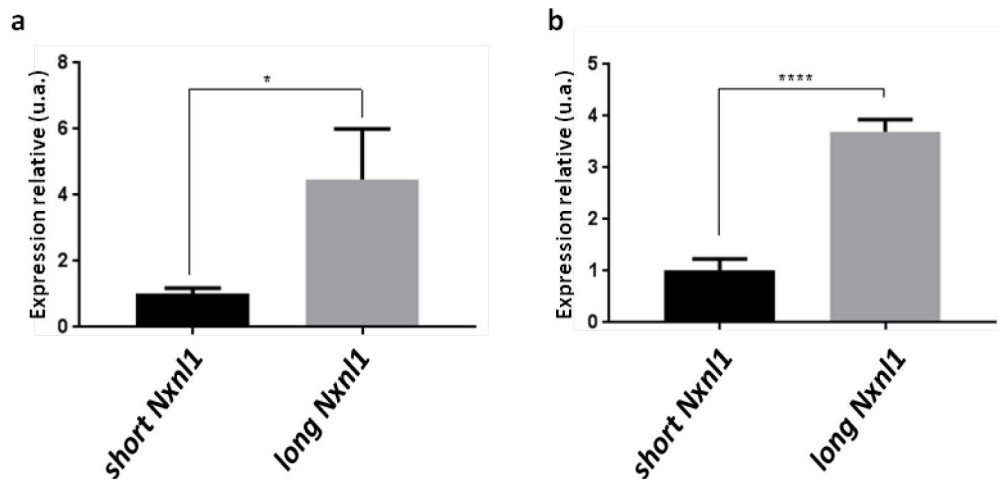


Figure 173: Expression des produits codés par le gène *NXNL1* dans la rétine a) humaine, b) de souris sauvage. u.a.: unité arbitraire.

Tout comme chez la souris, l'épissage alternatif de NXNL1 et la rétention de l'intron ont lieu dans les photorécepteurs à bâtonnets de primate alors que ce gène semble systématiquement épissé dans ses photorécepteurs à cônes.

3: INVESTIGATION DES REGIONS DE *NXNLI* IMPLIQUEES DANS SON EPISSAGE ALTERNATIF

3.1. LA SEQUENCE *NXNLI* REDEFINITION ELEMENT (NRE)

Alors que nous avons démontré que la séquence NRE ne recode pas les codons stop de *NXNLI* en sélénocystéine (**Fig. 161 et 162**), d'autres résultats démontrent son implication dans l'expression d'une autre protéine codée par ce gène (**Fig. 147**). Cet élément jouerait-il un rôle dans l'épissage alternatif et donc dans la rétention de l'intron de *NXNLI*? Pour répondre à cette question et avec l'aide de Frédéric Blond, la séquence du début de l'intron du gène *NXNLI* de plusieurs vertébrés ont été extraits à partir de la base de données Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>) (**Table 6**). La séquence humaine utilisée lors de cette analyse est composée du début de l'intron de *NXNLI* qui présente le NRE de 36 pb, positionné 12 pb en 5' de l'exon1 de *NXNLI*. À l'aide du logiciel Jalview (<http://www.jalview.org/>), qui permet d'aligner des séquences d'ADN, d'ARN, ces séquences nucléotidiques ont été alignées. Afin de faciliter les analyses des alignements, Jalview permet également de les visualiser sous la forme d'un arbre phylogénétique (**Fig. 174**).

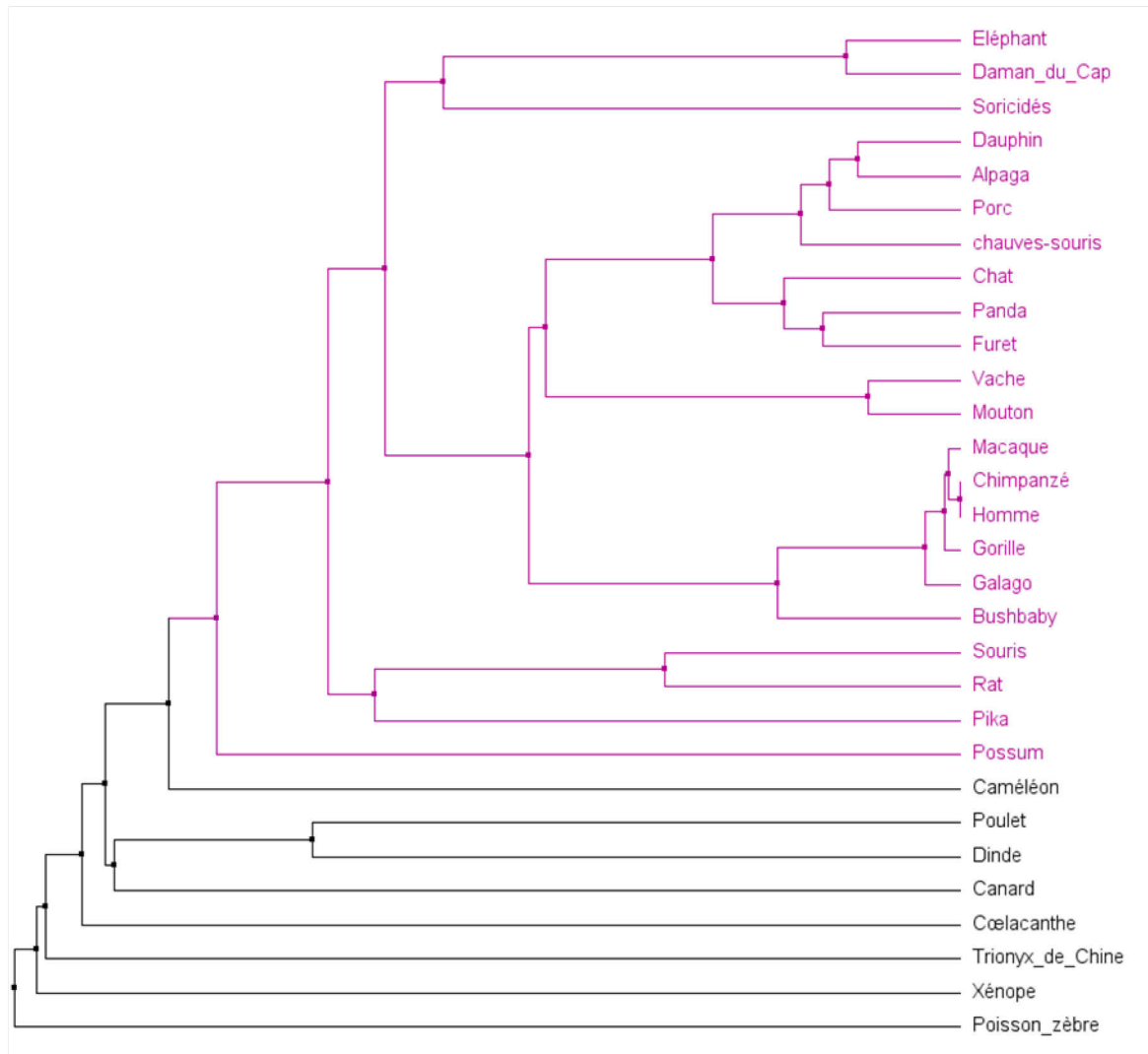


Figure 174: Phylogénie de la séquence NRE présente dans l'intron du gène *NXNL1* de vertébrés. En rose sont représentées les espèces possédant une rétine composée majoritairement de bâtonnets.

Comme attendu, les séquences nucléotidiques de l'Homme, du chimpanzé, du macaque et du gorille sont regroupées sur le même embranchement. Les vertébrés dont la rétine est majoritairement constituée de bâtonnets, représentés en rose, sont regroupés. Les autres vertébrés de cet arbre phylogénétique présentent une rétine qui n'est plus majoritairement constitué de bâtonnets mais composée d'environ 50% de bâtonnet et 50% de cônes pour les poissons et les batraciens et majoritairement de cônes pour les oiseaux. Suite à l'alignement de la séquence NRE présente dans la partie intronique de ces vertébrés étudiés, nous observons que le NRE est une séquence hautement

conservée soulignant son importance. De plus nous constatons que la séquence NRE est plus conservée chez les espèces possédant une rétine riche en bâtonnets (représentés en rose) que chez les autres espèces (**Fig. 175**).

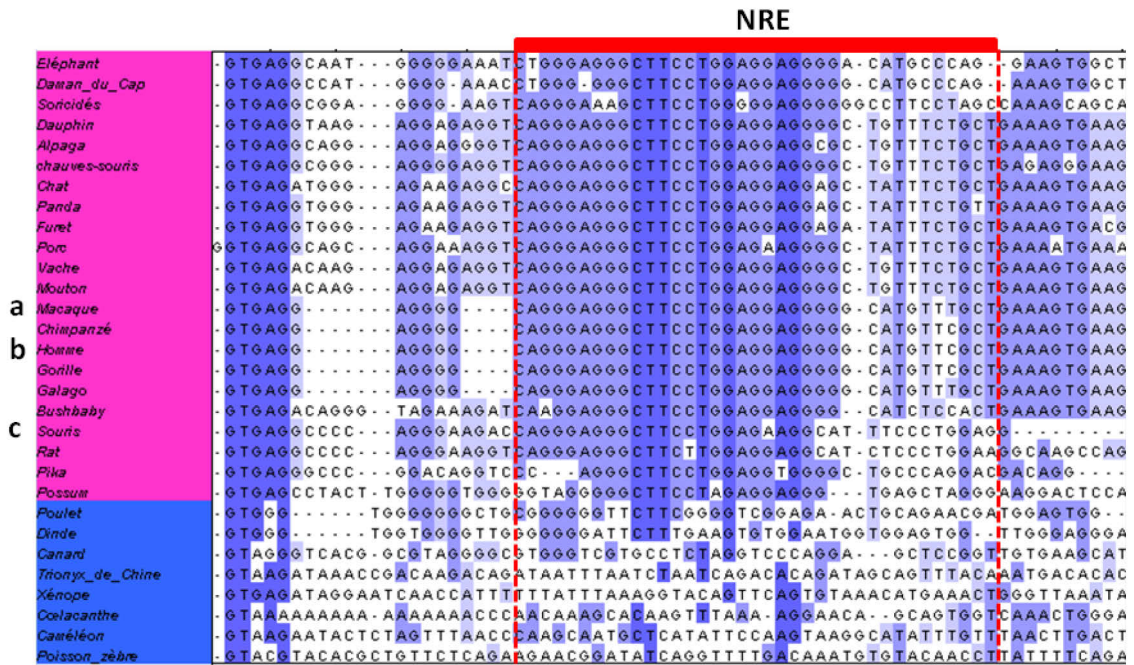


Figure 175: Phylogénie de la séquence NRE. La séquence NRE est encadrée en pointillées rouges. Les nucléotides conservés sont représentés en bleu. Plus ils sont conservés et plus le bleu est foncé. A gauche, en rose sont représentés les animaux possédant une rétine enrichie en bâtonnets. **a)** Séquence nucléotidique intronique du macaque. **b)** Séquence nucléotidique intronique de l’homme. **c)** Séquence nucléotidique intronique de la souris.

D’un côté, nous avons démontré que l’épissage alternatif de *NXNL1* et la rétention de son intron avait lieu essentiellement dans les bâtonnets de primates (**Fig. 170 et 172**), confirmant les résultats observés au préalable chez la souris (Mei et al., 2016). De l’autre, nous observons que la séquence NRE est plus conservée chez les espèces dont la rétine est majoritairement constituée de bâtonnets. C’est pourquoi, nous envisageons comme première hypothèse l’existence d’une possible corrélation entre la présence hautement conservée de la séquence NRE et l’épissage alternatif de *NXNL1* dans les

bâtonnets. Cette séquence doit certainement encourager la rétention de l'intron de *NXNL1* et ainsi permettre l'expression du messager *short NXNL1* dans ces cellules.

3.2. ETUDE DES DIFFERENTES REGIONS EXONIQUES ET INTRONIQUES DU GENE SUSCEPTIBLES D'ETRE IMPLIQUEES DANS L'EPISSAGE ALTERNATIF DE *NXNL1*

Un gène de mammifère typique est composé de plusieurs exons en général relativement courts qui sont interrompus par des introns beaucoup plus longs. D'après la base de données Ensembl, *NXNL1* est composé d'un exon 1 d'une taille de 326 pb, d'un intron de 4 584 pb et d'un exon 2 d'une taille de 535 pb (**Fig 176**).

Gène: *NXNL1*
 Description : *TXNL6*, RdCVF
 Localisation: Chromosome 19

	Taille	Séquence
3'UTR		AAAGATTTCTATTTCTGGGAGAGGAGCCAG TCAGCAGACCGGGGACCACACGCCGCGCTG TCCCCAGCACCCAACCCAGGTTACCATGGC
Exon 1	326 pb	CTCCCTGTTCTCTGGCCGCATCCTGATCCG CAACAATAGCGACCAGGACGAGCTGGATAC GGAGGCTGAGGTCAGTCGCAGGCTGGAGAA CCGGCTGGTGCTGCTGTTCTTTGGTGCTGG GGCTTGTCCACAGTGCCAGGCCTTCGTGCC CATCCTCAAGGACTTCTTCGTGCGGCTCAC AGATGAGTTCTATGTACTGCGGGCGGCTCA GCTGGCCCTGGTGTACGTGTCCAGGACTC CACGGAGGAGCAGCAGGACCTGTTCTCAA GGACATGCCAAAGAAATGGCTTTTCCTGCC CTTTGAGGATGATCTGAGGAG
Intron	4584 pb	gtgaggaggggcagggagggttcc.....ccagactgacctgccgctccgcag
Exon 2	535 pb	GGACCTCGGGCGCCAGTTCTCAGTGGAGCG CCTGCCGGCGGTTCGTGGTGCTCAAGCCGGA CGGGGACGTGCTCACTCGCGACGGCGCCGA CGAGATCCAGCGCCTGGGCACCGCCTGCTT CGCCAAGTGGCAGGAGGCGGCGAGGTGCT GGACCGCAACTTCCAGCTGCCAGAGGACCT GGAGACCAGGAGCCACGGAGCCTCACCGA GTGCCTGCGCCGCCACAAGTACCGCGTGGA AAAGGCGGCGCGAGGCGGGCGGACCCCGG GGGAGGGGGTGGGGAGGAGGGCGGGCCGG GGGGCTGTTCTGACCCGCTAGGGTGGAGGA GAGGAGTGGGGTTTGTGATGAACCTCCAC CCCCACCCACCCCGCACGCCTGTAATCC CAGCACTTGGGGAGGCCAAGGCGGGAGGAT CGCTTGAGCCCAGAGGTTTCGAGATCAACCT GGGCAAGAGAGTGAGACCCTGACTCTACGA AAATTAAAAGTTAGCCCGGTGTGGTGGCGC GCACCTGTGGCTTAGCTACCCTGAA
5'UTR		

Figure 176: Informations concernant le gène *NXNL1* chez l'Homme. Descriptif du gène *NXNL1* issu de la base de donnée Ensembl. UTR: *Untranslated region*

Il est connu que chez les eucaryotes supérieurs, les conditions d'un épissage précis sont définies par l'identité des jonctions exon-intron qui sont des éléments *cis* introniques hautement conservés tel que le site donneur d'épissage 5' et le site accepteur d'épissage 3' mais aussi par des éléments introniques tel que le point de branchement. Ces éléments

peuvent être impliqués dans la régulation de l'épissage alternatif. Ils agissent soit en stimulant (*enhancers*) soit en réprimant (*silencers*) l'épissage. Pour commencer, nous nous sommes intéressés aux *Exonic Splicing Enhancers* (ESE) du gène *NXNL1* qui pourraient être impliqués dans son épissage. Pour cette étude, le logiciel ESEfinder (<http://krainer01.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home>) a été utilisé. Ce logiciel recherche sur des séquences données, l'éventuelle présence de cinq séquences ESE connues, SRSF1 (SF2/ASF), SRSF1 (IgM-BRCA1) (Smith06-HMG-matrix), SRSF2 (SC35), SRSF5 (SRp40) and SRSF6 (SRp55), capable d'interagir spécifiquement avec de protéines *serine/arginine-rich* (SR) qui jouent un rôle dans l'épissage. Ce logiciel détermine une matrice où chaque valeur calculée rapporte la fréquence de chaque nucléotide à une position donnée, corrélée à la hauteur de chaque lettre pour former le motif consensus correspondant aux domaines de liaison à l'ARN *RNA-recognition motifs* (RRM) de chaque protéine SR. Les logos indiqués correspondent à la table de matrice où pour chaque position, les nucléotides sont représentés de haut en bas dans l'ordre décroissant de fréquence; les lettres orange indiquent les fréquences au-dessus du bruit de fond. Cette méthode de représentation de pictogramme a été décrite dans *The RNA World* par Burge et ses collègues (Burge et al., 1999) (**Fig. 177**).

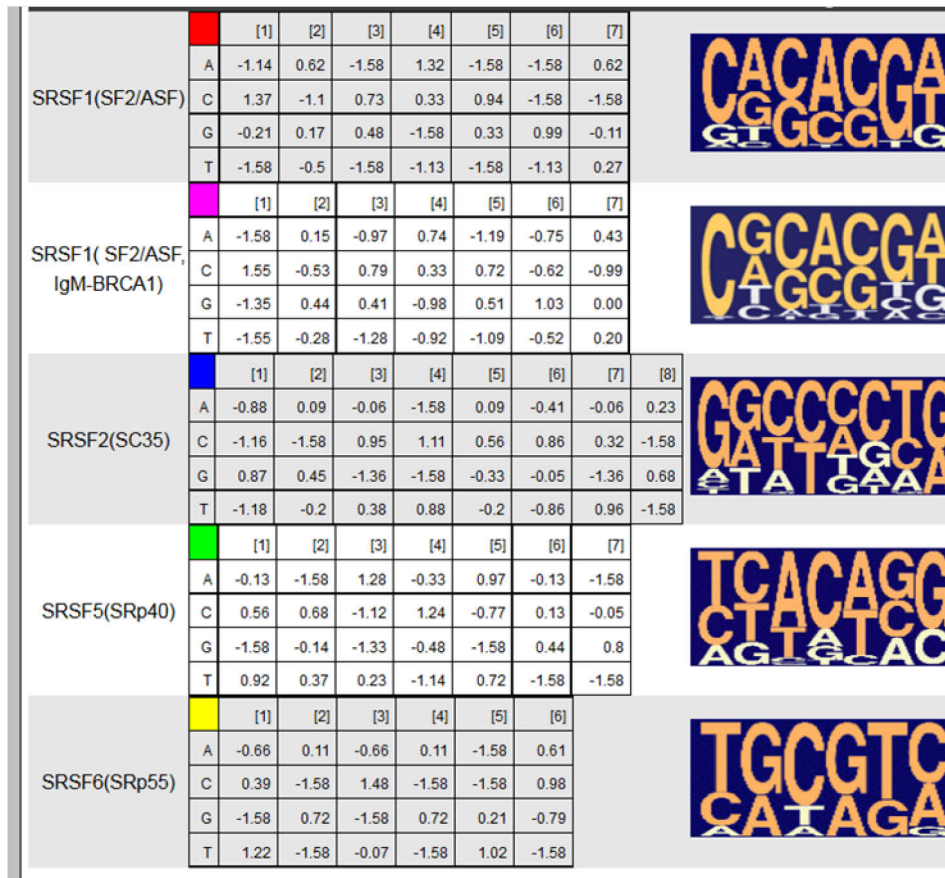


Figure 177: Descriptif de la matrice et des séquences consensus des domaines RRM des SR.

Les protéines SR peuvent soit recruter directement la machinerie d'épissage à travers leur domaine RS, soit inhiber l'action des éléments *silencers* voisins. Ce logiciel prend en entrée des séquences de taille inférieure à 5 000 nucléotides sous format FASTA. Ce format décrit une séquence avec une ligne unique de description commençant par ">" suivie de la séquence elle-même sur une ou plusieurs lignes. Nous avons commencé par investiguer l'exon 1 de ce gène afin de rechercher les éléments ESE de *NXNLI*. La séquence FASTA de cet exon est chargée à partir de la base de données Ensembl (Fig. 178).

>NXNL1-Exon1 326 pb

ATGGCCTCCCTGTTCTCTGGCCGCATCCTGATCCGCAACAATAGCGACCAGGACGAG
 CTGGATACGGAGGCTGAGGTCAGTCGCAGGCTGGAGAACCGGCTGGTGCTGCTGTTT
 TTTGGTGCTGGGGCTTGTCCACAGTGCCAGGCCTTCGTGCCCATCCTCAAGGACTTC
 TTCGTGCGGCTCACAGATGAGTTCTATGTACTGCGGGCGGCTCAGCTGGCCCTGGTG
 TACGTGTCCCAGGACTCCACGGAGGAGCAGCAGGACCTGTTCTCAAGGACATGCCA
 AAGAAATGGCTTTTCTGCCCTTTGAGGATGATCTGAGGAGgtgaggagggg

Figure 178: Séquence nucléotidique de l'exon 1 et du début de l'intron du gène *NXNL1*. Séquence issue de la base de donnée Ensembl. En majuscule est représentée la séquence exonique de *NXNL1*. En minuscule est représentée la séquence intronique de *NXNL1*. En rouge est représenté l'ATG d'initiation et en vert le site donneur d'épissage *NXNL1*.

L'analyse de cette séquence indique que la quasi-totalité de l'exon est susceptible de jouer un rôle dans l'épissage de *NXNL1* (**Fig. 179**).

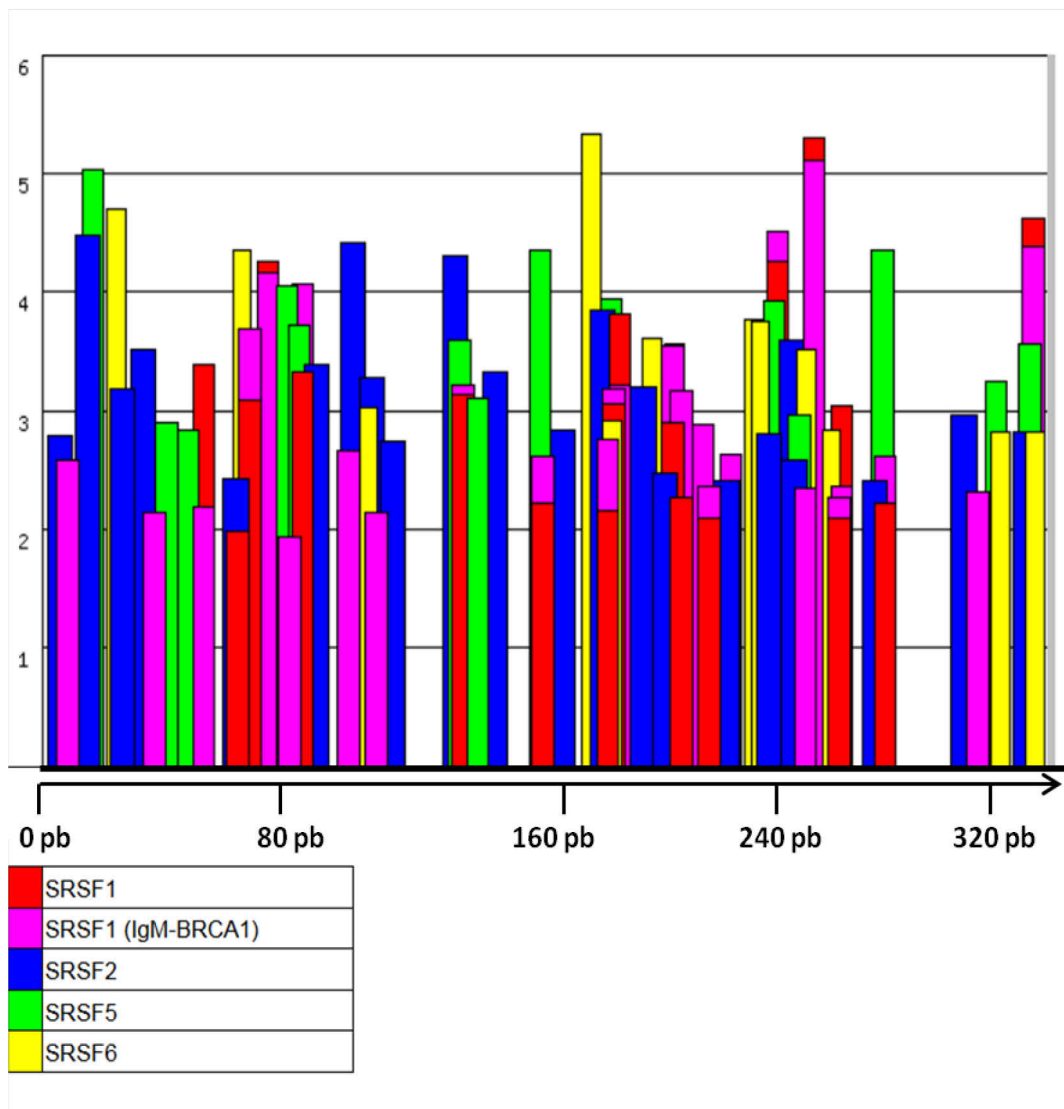


Figure 179: Domaine de liaison dans l'exon 1 de *NXNL1* des protéine SR. La séquence de 326 pb de l'exon 1 de *NXNL1* est analysée par le logiciel ESEfinder. La séquence est reproduite le long de l'axe x. Seules les valeurs supérieures au seuil définis pour chaque protéine SR sont représentées. Le seuil qui est la valeur au-dessus de laquelle le score pour une séquence donnée est considéré comme significatif est de 1,956 pour SRSF1 de 1,867 pour SRSF1 (IgM-BRCA1), de 2,383 pour SRSF2, de 2,67 pour SRSF5 et de 2,676 pour SRSF6. la hauteur des barres représente les scores des motifs et la largeur des barres indique la longueur du motif (6, 7 ou 8 nucléotides). Chaque couleur de barres représente le site de fixation de la protéine SR correspondante.

Les mêmes analyses ont été réalisées à partir de la séquence de l'exon 2 de *NXNL1* (Fig. 180).

>NXNL1-Exon2 535 pb
g c a g G G A C C T C G G G C G C C A G T T C T C A G T G G A G C G C C T G C C G G C G G T C G T G G T G C T C A
A G C C G G A C G G G G A C G T G C T C A C T C G C G A C G G C G C C G A C G A G A T C C A G C G C C T G G G C A
C C G C C T G C T T C G C C A A C T G G C A G G A G G C G G C C G A G G T G C T G G A C C G C A A C T T C C A G C
T G C C A G A G G A C C T G G A G G A C C A G G A G C C A C G G A G C C T C A C C G A G T G C C T G C G C C G C C
A C A A G T A C C G C G T G G A A A A G G C G G C G C G A G G C G G G C G C G A C C C C G G G G G A G G G G G T G
G G G A G G A G G G C G G G G C C G G G G G G C T G T T C T G A C C C G C T A G G G T G G A G G A G A G G A G T G
G G G T T T G T T G A T G A A C C T C C A C C C C A C C C C A C C C C G C A C G C C T G T A A T C C C A G C A
C T T G G G G A G G C C A A G G C G G G A G G A T C G C T T G A G C C C A G A G G T T C G A G A T C A A C C T G G
G C A A G A G A G T G A G A C C C T G A C T C T A C G A A A A T T A A A A G T T A G C C C G G T G T G G T G G C G
C G C A C C T G T G G C T T A G C T A C C C T G A

Figure 180: Séquence nucléotidique de la fin de l'intron et de l'exon 2 et du gène *NXNL1*. Séquence issue de la base de donnée Ensembl. En majuscule est représentée la séquence exonique de *NXNL1*. En minuscule est représentée la séquence intronique de *NXNL1*. En rouge est représenté le codon stop TGA et en vert le site accepteur d'épissage *NXNL1*.

Tout comme pour l'exon 1, les éléments ESE prédits sont présents tout le long de la séquence de l'exon 2 (**Fig. 181**).

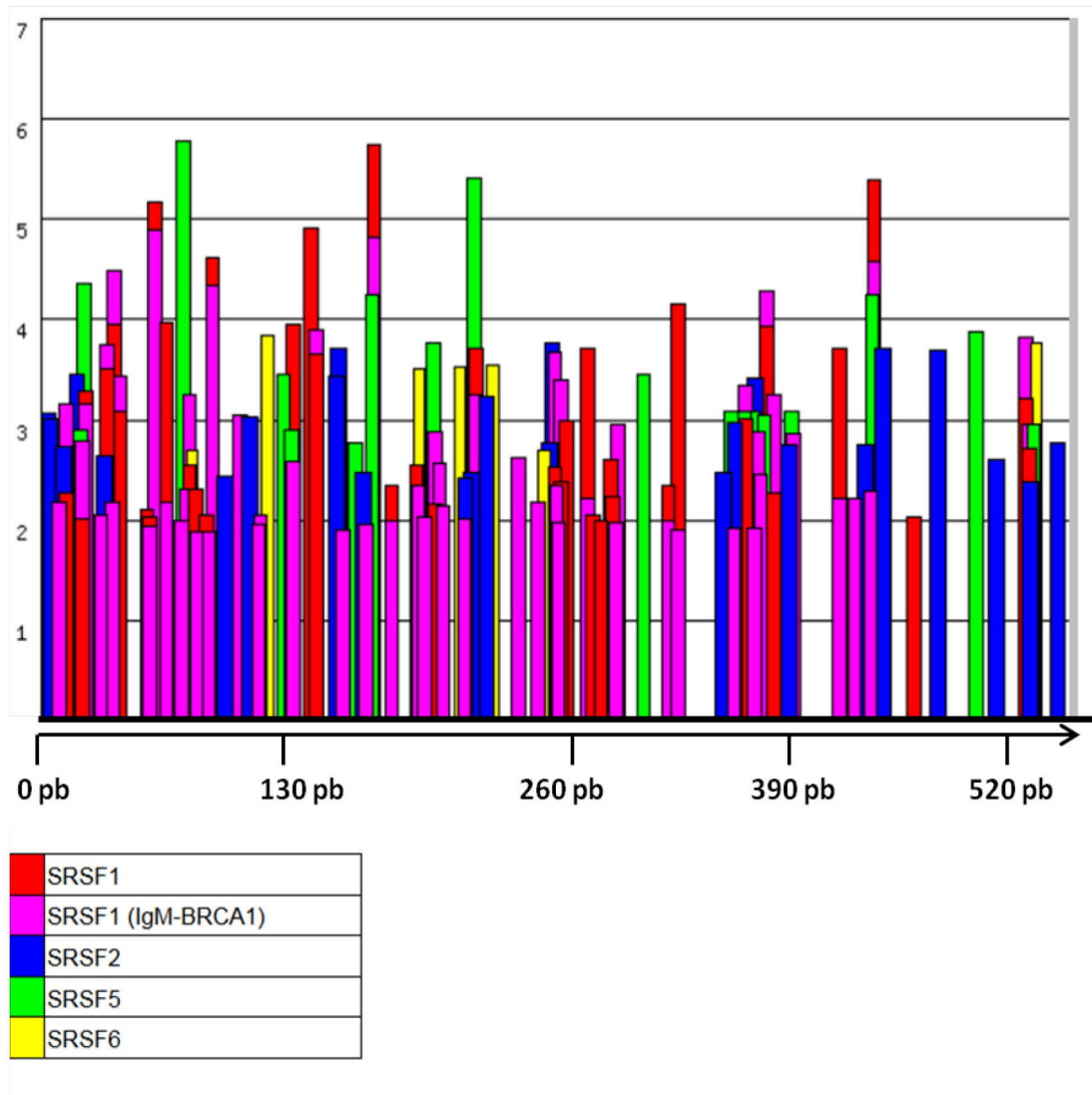


Figure 181: Domaine de liaison dans l'exon 2 de *NXNL1* des protéine SR. La séquence de 535 pb de l'exon 2 de *NXNL1* est analysée par le logiciel ESEfinder. La séquence est reproduite le long de l'axe x. Seules les valeurs supérieures au seuil définis pour chaque protéine SR sont représentées. Le seuil qui est la valeur au-dessus de laquelle le score pour une séquence donnée est considéré comme significatif est de 1,956 pour SRSF1 de 1,867 pour SRSF1 (IgM-BRCA1), de 2,383 pour SRSF2, de 2,67 pour SRSF5 et de 2,676 pour SRSF6. la hauteur des barres représente les scores des motifs et la largeur des barres indique la longueur du motif (6, 7 ou 8 nucléotides). Chaque couleur de barres représente le site de fixation de la protéine SR correspondante.

En plus des motifs exoniques susceptibles d'être impliqués dans l'épissage du gène *NXNL1*, nous nous intéressons ensuite aux motifs introniques. Après avoir extraits la séquence FASTA de l'intron de *NXNL1* à partir d'Ensembl (**Fig. 182**), nous la soumettons logiciel Human Splicing Finder (<http://www.umd.be/HSF3/HSF.shtml>).

>NXNL1-Intron 4584 pb
 GTGAGGAGGGGCAGGGAGGGCTTCCTGGAGGAGGGGGCATGTTTCGCTGAAAAGTGAAGCATCCATTCTAACTAGAGTGAATGAGCAGCC
 CCTGTGTGCCAGTCCATATACTGGAACTAGGGGGTACAGACAGGGGTGCCCACTTCCACATGCTGGCTTCCATGCCACCCAGGGAG
 CTTAGAGCCGAGTGGAGGGAACAGATGCAAAAACAGAAATCAACTATGTAATAGCAAGGCCGGGCATGGTGCTTAAACCTGTAAATCC
 CAGGACTTTGGCAGGCCGAGGTGGGCAGATCACCTGAGGTGCGGAGTITGAGACAAGCCTGGTCAACATAGTGAACCCCTGTCTCTAC
 TAAAAATACAAAAATTATCCAGGCCTGGTGGTGGCCGCTGTAAATCCAGCTGCTTGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATCGTTTGAACCT
 GGGAGGCAGATGCTGCAGTGAAGTAAAGATCTGTCCTCCCTCCAGCTGGGTGACAGAGGGAGACTCTGTCTAAAAAATCAAAAAA
 CAAATATATAATAGCGAATTGCAGTAGTGCTCAGAGGACAAAGCTAGGCCACAAAGTGGAAATACAATGAGGGAAACCTTGGTGGAGT
 TCCGGGGTCAGAGGATGCTTCCCGAAAAAGTGGCTTTAAAGAGAGACCCCTAGCTGGGCAGGGTGCTCATGCCCTGTAGTCTTAGCC
 ACCTGGGAGGCTATGTTAAGAGGATAACTGGAGCCTAGAGTITGAGGCTGCAGTGAAGTATGATCGCACCCTGCACTCCAGCCAGGG
 CAATACAGTGTACTGTCTCTAAAAAGTAAAGGCCAGGTACGGTGGCTCACACCTGTAATCTGACACTTGGGAGGCCAAGGTG
 AGCAGATCACCTGAGGTGAGGATTCGAGACTAGCCTGACCAATATGGCAAAACCTGTCTCTACTAAAAATACAAAAATTAGCCAGG
 CCTGGTGGCCACAGCTGTGGTCCCAGTACTTGGCAGGCTGAGGCAGGAGAATTGCTTGAATCCAGGAGGCCGAAAGTGCAGTATC
 CGAGATGTGCCACTGCACTCCAGCCTGGGCAACAGAGTGAGACTCTGTCTCAAAAAATAAAAAATAAAAAATAAAAAATGTAATAAATA
 AATAAATTACAGGGAGACTCCAATGAGAAGAAAGATAGGAGGATGGAGAATGAGGAAAAGGGGTTCCAGGCAGAGGGCACAGCA
 GAAAGGCTTGGAGGCTGTGAGAGAAAGAACCAACAGTTCAGGGAGACTGTAGTAAATCCGGAGAGGATCAAAATTTCAATGTATTG
 TTAGTCCACAGCAATTTGTCAATCTTTTATAGTGTGACAGGTCTGTGGTGCAGAGCCACTTAACAAGTATAGACATGATCCTCA
 GAGTAGCAGGGAGCCATGGTGGACATTAGAACAGAGGGAGAGGTAGTCCGATTCAAGCTTTATAAGGAGATGTCCAGCCAGGCATGGT
 GGCTGACACCTGCAATCCAGCACTTTTGGAGGCTGAGGCAGGAGGATTGCTTGGGCTGGGAGTGAAGACCAGCTTGGGCAACACA
 GCAAGACACCACCTCCATCTCTAAAAATTAAAAAAGAAAAAATTGAAAGGTGGCTTGGTGGGGTGGCTCATGCCTGTAATCCC
 AGCACACTTGGGAGGCCGAGGTGGGTGGATCAGTGAGGTCAGGAGTTCAGGACCACTGGCCCAACATGGTGAACCCCGTCTCTA
 CTAAAAAATACAAAAATTAGCCAGACTAGTGTGGTACTGTAGTCCAGCTACTCAGGAGGCTGAAAGCACGAGAATCGCTTGAACC
 CGGGAGGCCGAGGGTGCAGTGCAGCAAGATCGCACCCTGCACTCCAGGCTGAGGCACAGAGAAGACTCTGTCTCAAAAAAATAAAA
 AAAAAAATAAATTAAGATGCTTTAAAAAATTTACAAAAGGAGCTGCCCAATGAAACAGTATTATAGCTTGTACTTATTATGA
 TAAAAACGTTTCAGGCTGGGTGCAGTGGCTCACGCTTGTAACTCTAGCACTTTGAGAGGCCGAGGCAGGCGGAGTACAGGGTACGGAGA
 TTGCAGACTTCATGACATTTCCCAATGTGCATGCCCTTTGGTTACTCAACAAGTGGAAAGTTCGGTTCATCATCAGAAATTTGGACATC
 AGAGGCTGAGGCAAGAGAATGGTGTGAACCCGGGAGGTGGAGCTTGCAGTGACCCGAGATCTGCCACTGCACTCCAGCCTGGGCGAC
 AGAGCGAGACTATGTCAAAAAAATAAAAAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGTTC
 GAAAGAGTGTACAATGAACCCATCGCAATTTGTAACATTTTGCATATTCACTTTGTCTACAATACAAATACGTGTCTATAGACAC
 ATATACACTTTGTCTACAATAAAAAATACGTGTCTATATACAGTATATGCATACGTGTATAGTGTGTCTAAATTTTGAAGTGAG
 TTGCAGACTTCATGACATTTCCCAATGTGCATGCCCTTTGGTTACTCAACAAGTGGAAAGTTCGGTTCATCATCAGAAATTTGGACATC
 ATCAGAGTTTGGACACTGAATCTGCCCACTGCCCTCGGAGCTGAGGAGATTCTCCCTGACGCTAGCAACGCTTCTCCCTGGGG
 CAGAGACGCCAGTGCAGACAAATGCTGACCTTCTCTGAGACAGGGTCTCTCAACAACAACATTCACCAGACTAGTATGTTATCTGG
 GCAGTTCACATCCACATCCCCGATAGCAGGGATGTCCAGTAAATGAAATTCAGGCTGGGTGACAGTGGTTCATGCCCTGTAATCCCA
 GTGCTTTGGGAGGCAGAGATGGAAGGATCAGTGGAGCCAGGAGTTCAAAACAGCCTGGGCAACATAGCAAGACCATATCTTTACAA
 AAATTAAAAAAATAAATAGGTGGTGGTACGAGCCTGTAGTCCAGCTACTTAGGAGGCTGACGCTATAGGATCACTGGAGCCCA
 GGAGTTTGAAGTACCACGATCTGTGTCCCGCCTGCACTCTAGCCTGGGTGACAGATGGAGGCTCTGTCTCAAAAAAAGAAAA
 AGAAAAAATAATGAGATAAACAATGAATAATCTTTCTTTAGTATAAGTATGTCCATGCATTTGGTATACTTTACTATAAAGATT
 TTCAATTTATCTGAAATCAAAATTAAGTATGTTATATATAGAATAGAGAGAGATGGGGTCTCGTATGTTGCTGAAAGCTGG
 TCTCAAACCGTTGGGCTCAAGCAATCTCCACCTCGGCTCCCAAGTGTGGGATTACAGGGGTGAGCCACTGTACCCAGCCTCCA
 ATTTTTTTTTTTTTTAAAGAGAGGGAGTGTGCATATATATATATGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG
 GGCTGGAGTGCAGTGGCTGATCTGGGCTCACTGCAAGCTCTGCCCTCCGGGTTACGCCATTTCTCTGCTCAGCCTCTCCGAGTAG
 CTGGGACTACAGGCCTGCCACCACACCCGGCTAATTTTTGTATTTTTTGTAGTAGAGAGGGGTTTACCCTGTGTTAGCCAGGATGGT
 CTCGATCTCTGTGAGTGTCTTATATTTTAAATTAACCTGGCAATCTACTCATGGGATTTTGTAAAGTATCATGGGTCTCTTTG
 TGGCAGCTGGAAGGGCCACGGAAGAATGCAGCAGGCTGAAATTAAGAAGTGTAAACATGTTGGCTAGGCTGGTCTCGAACTCCT
 GGCTCCGGTGATCCGCTATCTCAGCCTCCCAAGTGTGAGATTACAGGCATGAGCCACCACGCCAGCCGAGGAGAAATTTTA
 AAAACCATACATGATGTTGGGTGCTGAAAGGCCTTTGGAGAAAAACTGCCTTGGAAATGTTATTATTCTATTTTCCGAGACAGGAT
 CTGGCTGTGTACCCAGGCTGGAGTGTAGTGGTCAATCATAGCTCACTGCAGCCTCGAAATCCTGGGCTCAAGGATACTTCTCGAG
 GGAAGTCCAGGTACCTCGCCCTCTGAGTACCTGGGACTACAGGAGCGCACCACCACACCCTGCTTTATTATTTTATTATTATT
 ATTTATTTATTTGAGAGACAGGGTCTTACTACAAATAAATGTAGTAAAGACCTTGTGCTTGGCATGTGAGGTTCCATACTACAGGG
 TCTTAGCCTGCAAAATGCTGAGGAGAGCCTCCAGACGTGGCAAGCAGCACAATGCCCCGAGGTTGGAGCATGCTCGGGGTCT
 GGAGACAAAGCGCGGGACCAAAGTGTCTGGCCCTGTCCCGTCTCTGTTGACCTACCAGTGCCTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG
 GAAGGCGTGCCTAAGTACTGGGAGGAGGATGTGGGCTCTCTGGTTCAGCATCAGGGATGTGGATCCGTCCAGACTGACCTGCCG
 CTCGGAG

Figure 180: Séquence nucléotidique de l'intron du gène *NXNL1*. Séquence issue de la base de donnée Ensembl. En vert sont représentés le site donneur et le site accepteur d'épissage de *NXNL1* et en rouge est représenté le point de branchement de l'épissage.

Ce logiciel contrairement au logiciel ESEfinder s'intéresse à la recherche et à l'identification des sites impliqués dans l'épissage de gènes, localisés dans les exons, mais aussi ceux présents dans les introns. Ce logiciel calcule les valeurs consensus entre

plusieurs algorithmes de recherche de potentiels sites d'épissage et recherche les points de branchement des introns. Les résultats de cette analyse indiquent que la totalité de l'intron est susceptible de jouer un rôle dans l'épissage de *NXNL1* (**Fig. 183**).

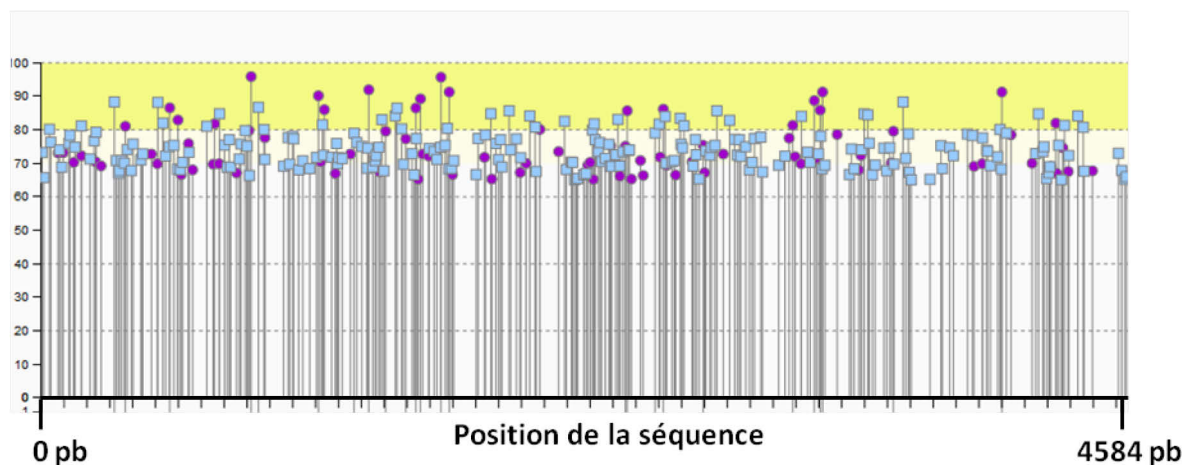


Figure 183: Localisation des potentiels sites d'épissage de l'intron de *NXNL1*. La séquence de 4584 pb de l'intron de *NXNL1* est analysée par le logiciel Human Splicing Finder. La séquence est reproduite le long de l'axe x. Seules les valeurs supérieures au seuil définis pour les sites accepteurs et donneurs de 65 et du point de branchement de 67 sont représentées. la hauteur des barres représente les scores des motifs. Les carrés bleus représentent les potentiels site accepteurs d'épissage et les ronds roses représentent les potentiels site donneurs d'épissage.

*Malheureusement, les résultats des analyses précédentes couplées aux analyses in silico ne nous permettent pas d'identifier une éventuelle région spécifique du gène *NXNL1* pouvant favoriser l'épissage de ce gène. En effet, ils indiquent que la séquence NRE hautement conservée chez les espèces dont la rétine est majoritairement composée de bâtonnets, l'exon 1 et l'exon 2 de *NXNL1* seraient probablement impliqués dans l'épissage de ce gène ainsi que chacune des régions de l'intron de *NXNL1*. Toutes ces régions pourraient jouer un rôle dans la rétention de l'intron de ce gène dans les bâtonnets.*

3.3. INVESTIGATION DES REGIONS INTRONNIQUES IMPLIQUÉES DANS L'ÉPISSAGE ALTERNATIF DE *NXNL1*

Il est connu que le point de branchement, le site 5' d'épissage et le site 3' d'épissage sont importants pour l'épissage. Par chance, ces dernières années de nombreux outils extrêmement efficaces sont apparus et ont été développés pour transférer des gènes *in vivo* dans la rétine. La manière la plus facile, la plus pratique et la plus efficace est l'infection de la rétine par des particules virales codant pour des transgènes. Ces particules virales sont exprimées et produites à partir de vecteurs associés à l'adénovirus (AAV) recombinant qui représentent les principaux types de vecteurs utilisés aujourd'hui en thérapie génique. Les essais chez l'animal ont démontré que ces vecteurs peuvent transduire efficacement des tissus tels que ceux du système nerveux central, le muscle, le foie, la rétine, et que l'expression du transgène persiste à long terme tout en présentant l'avantage d'être non pathogènes pour l'Homme donc peu dangereux. Afin d'étudier les mécanismes moléculaires de l'épissage de *NXNL1*, des expériences *in vitro* couplées et confirmées par des expériences *in vivo* ont été planifiées. Pour cela, des plasmides AAV construits à partir du plasmide *backbone* qui correspond au plasmide ORFp624 décrit et utilisé précédemment pour mes premières expériences (**Fig. 146**) sont utilisés. Le plasmide ORFp624 contient entre autres un promoteur cytomégalovirus/ bêta actine du poulet (CMV/CBA), un ADNc (l'exon 1 de *NXNL1* et sa séquence 3'), un signal de polyadénylation et les séquences de l'origine de réplication *inverted terminal repeats* (ITRs) qui sont des éléments nécessaires pour la réplication et l'encapsidation du génome viral lors de la production des particules virales après transfection des cellules HEK293. Ce plasmide a été optimisé par l'équipe de Jean Bennett et possède toutes les caractéristiques nécessaires pour la production de particules virales actives (**Fig 184**).

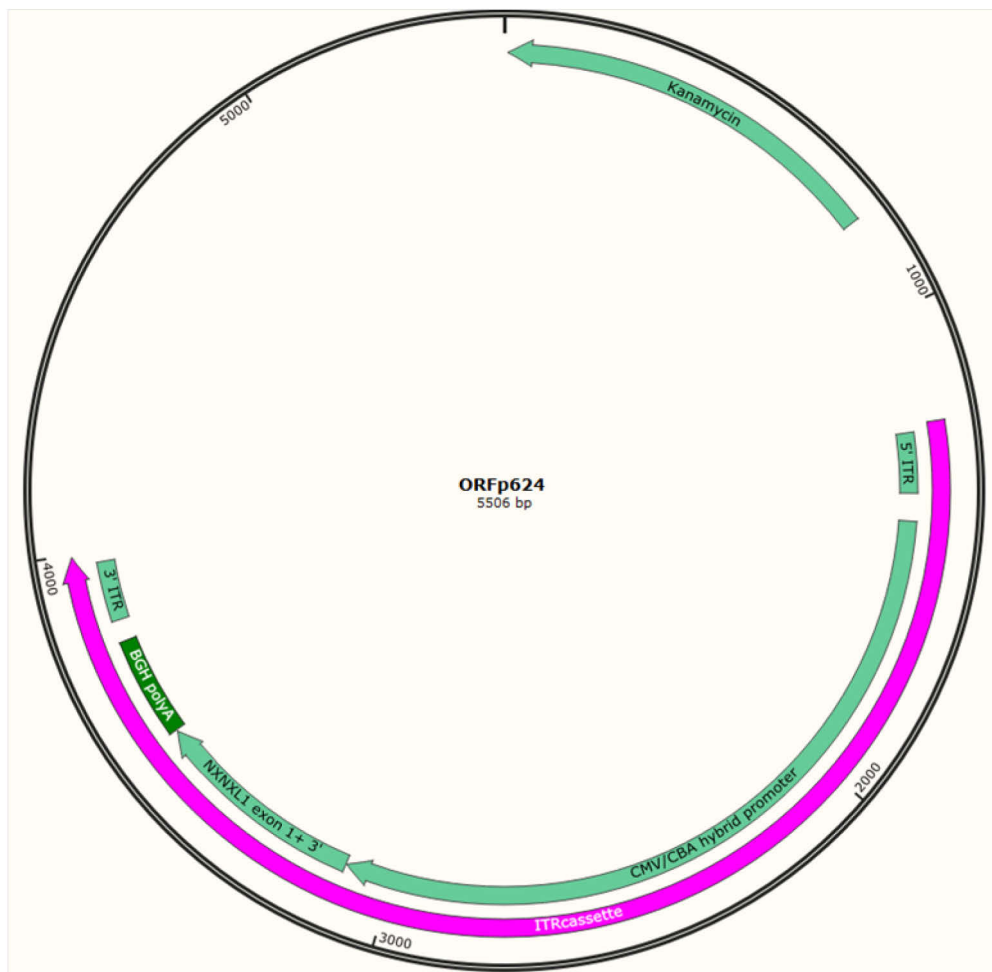


Figure 184: Organisation génomique de l'AAV ORFp624. en rose est représentée la cassette d'expression du transgène, elle contient le promoteur CMV/CBA, l'ADNc de l'exon 1 de *NXNL1* et sa région 3', un signal de polyadénylation et les séquences ITR de 130 pb chacun.

Pour vérifier expérimentalement s'il existe une région de l'intron de *NXNL1* qui serait plus impliquée qu'une autre dans son épissage, la cassette d'expression du transgène du plasmide ORFp624 est remplacée par une autre cassette composée d'un minigène qui est séquence connue pour étudier l'épissage des gènes (composé des exons et de l'intron épissé à étudier) et d'autres régions qui seront décrits plus loin. L'épissage alternatif qui conduit à la rétention de l'intron de *NXNL1* a lieu dans les bâtonnets indiquant que ces derniers posséderaient une machinerie que les cônes ne posséderaient pas ou qui serait inactive dans ces cellules et qui agirait spécifiquement sur une région de l'intron. Étudier l'épissage de *NXNL1* dans les deux types de cellules photoréceptrices de la rétine semble la stratégie optimale. Pour cela, nous incluons dans notre cassette

d'expression et en amont du minigène soit le promoteur spécifique des bâtonnets, rhodopsine (*RHO*), soit un promoteur qui contient en plus d'un promoteur minimal, l'amplificateur ou *enhancer Locus Control Région* (LCR) qui induit l'expression du gène *OPSIN1-Long wave* (*OPSIN1-LW*) et du gène *OPSIN1-Medium wave* (*OPNL/MW*) qui codent respectivement pour le pigment opsine des cônes rouges et pour le pigment opsine des cônes verts. Le LCR et le promoteur minimal que nous nommerons pour plus de commodité par la suite uniquement promoteur LCR, assurent donc une expression exclusive des opsines (rouges ou vertes) dans les cônes (**Fig. 185**).



Figure 185: Représentation des gènes *OPSIN1-LW* et *OPSIN1-MW* sous l'*enhancer* LCR. LW: Long Wave (ondes longues) MW: Medium Wave (ondes moyennes).

Le promoteur LCR qui mesure 2,1 kb a été mis au point et nous a gracieusement été fourni par Jeremy Nathans (Smallwood et al., 2002; Wang et al., 1992). Le promoteur *RHO* qui nous a été fournie par Deniz Dalkara a une taille plus petite de 0,8 kb. La taille de la capsid des particules virales limite la taille du génome du vecteur AAV à 4,7 kb, nous sommes donc limité à cette taille pour la cassette du transgène. Pour contourner cette difficulté technique, nous nous basons sur les travaux de Ye *et al.* dans lesquels ils ont optimisé la taille du promoteur LCR tout en le raccourcissant (Ye et al., 2016). En effet, Ye *et al.* ont démontré que le promoteur LCR de 1,7 kb pour lequel la séquence en 5' a été tronquée est plus efficace que le promoteur LCR complet de 2,1 kb. C'est ce promoteur LCR de 1,7 kb que nous utilisons dans nos constructions. Par la suite, pour illustrer nos descriptions dans cette partie de mémoire de thèse, nous nous baserons essentiellement sur les plasmides sous promoteur LCR. Exactement les mêmes expériences seront réalisées avec des plasmides contenant le promoteur *RHO*. Afin de suivre et de contrôler la distribution de nos minigènes dans les cellules ciblées, le reporteur GFP est inséré en phase de lecture entre le promoteur et le minigène. Pour

cela, le codon-stop de la GFP est retiré ainsi que le codon d'initiation de la traduction de l'exon 1 de *NXNLI*, ce qui produira une protéine de fusion GFP-minigène. La cassette d'expression du transgène est donc constituée de la séquence 5' ITR de 130 pb, du promoteur LCR de 1 723 pb, de la GFP de 717 pb, de l'exon 1 de *NXNLI* de 323 pb, du site accepteur 5' d'épissage plus du NRE de 73 pb, du point de branchement plus le site accepteur 3' d'épissage de 150 pb, de l'exon 2 plus la région 3' UTR de *NXNLI* de 535 pb et enfin de la séquence 3' ITR de 130 pb, pour un total de 3 781 pb. Or, l'intron de *NXNLI* mesure 4 584 pb (**Fig. 176**), il ne peut pas être cloné et intégré en une seule fois. Compte tenu de sa taille, l'intron est donc divisé en quatre parties en prenant soin de garder des parties chevauchantes de 10 pb entre les différentes régions afin de ne pas perdre d'éléments potentiellement impliqués. Les trois premières régions qui mesurent 1 110 pb et la dernière de 1 061 pb (**Fig. 186**) sont clonées individuellement dans le minigène de la cassette du transgène.

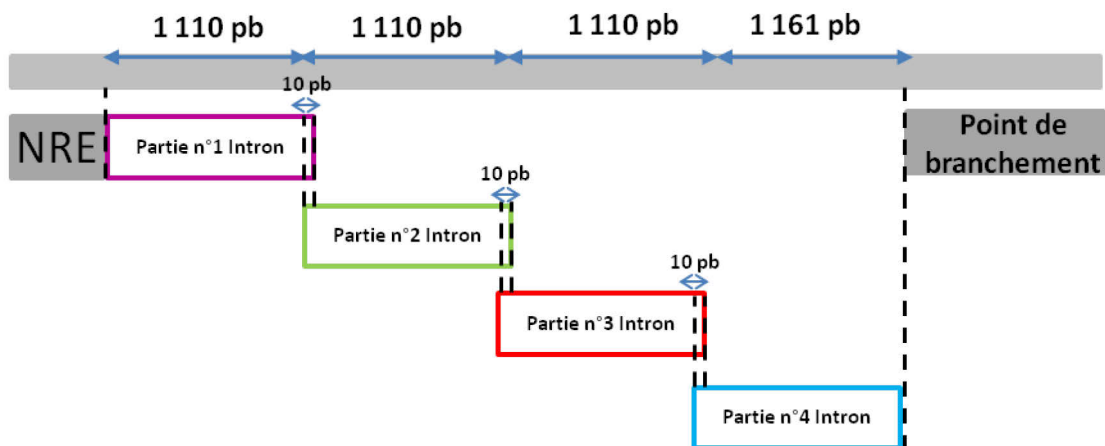


Figure 186: Représentation schématique de la division de l'intron de *NXNLI*. Les parties de l'intron sont localisées entre le NRE et le point de branchement. Chaque section de l'intron est représentée par un cadre coloré. Les parties chevauchantes entre deux sections sont représentées par une double barre entre les lignes verticales en pointillés.

Les trois premiers transgènes mesurent 4891 pb et le quatrième 4842 pb (**Fig. 187**).

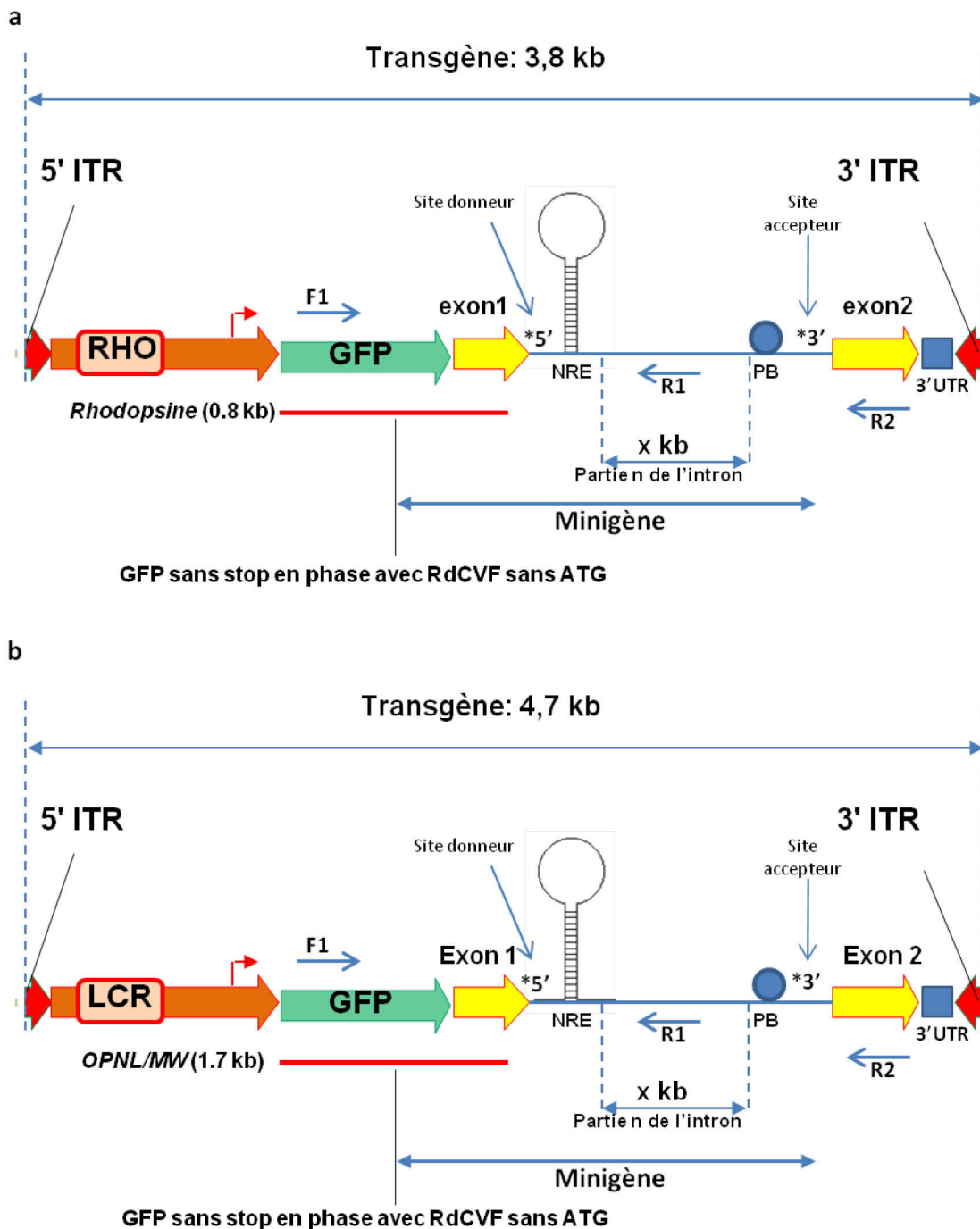


Figure 187: Représentation schématique des cassettes du transgène qui sont clonées dans le plasmide AAV. **a)** sous promoteur *RHO*, ciblant les bâtonnets, **b)** sous *OPNL/MW*, ciblant les cônes. Les flèches rouges, 5' et 3' ITR sont les séquences qui constituent les origines de répliation virale. La flèche verte, GFP est la séquence qui code pour la protéine fluorescente verte. Les flèches jaunes représentent l'exon 1 et exon 2 de *NXNL1*. La tige-boucle représente la séquence NRE. Le cercle bleu représente le point de branchement. Le rectangle bleu représente la partie 3'UTR de *NXNL1*. * correspond aux sites accepteur et donneur d'épissage fonctionnels respectivement en 5' et 3'. Les flèches F1, R1 et R2 représentent les amorces utilisées pour étudier l'épissage.

Chacun des 4 transgènes obtenus ciblant les cônes (promoteur LCR) ou les bâtonnets (promoteur *RHO*) est cloné dans le *backbone*. Les quatre plasmides construits et qui seront testés sont AAV-CMV/CBA-hRdCVF-GFP-Intron 1, AAV-CMV/CBA-hRdCVF-GFP-Intron 2, AAV-CMV/CBA-hRdCVF-GFP-Intron 3 et AAV-CMV/CBAhRdCVF-GFP-Intron 4 (**Fig. 188**).

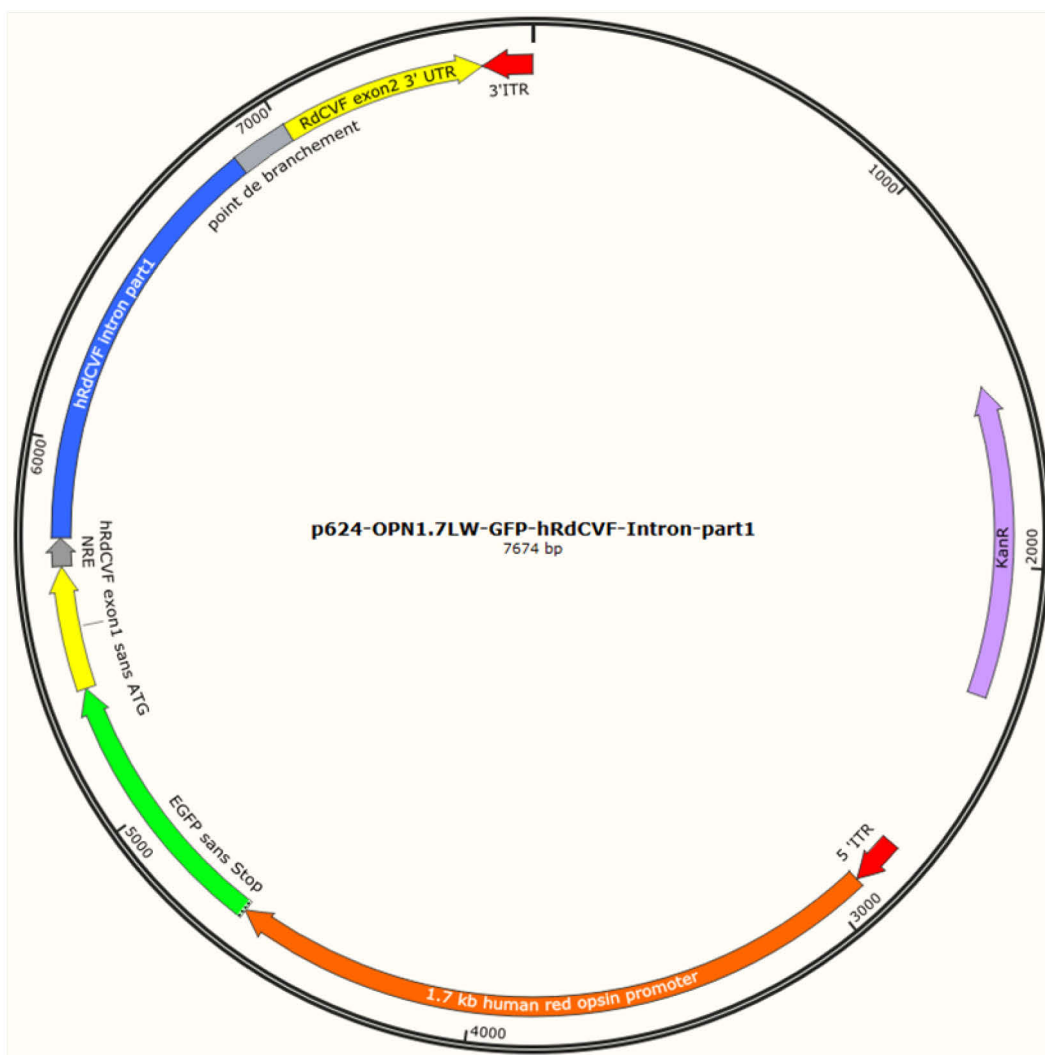


Figure 188: Représentation schématique du plasmide AAV dans lequel est clonée la cassette transgène qui code pour le LCR, la GFP et le minigène partie n°1 Intron. Le plasmide AAV-hRdCVF-GFP-Intron 1 a été choisi pour illustrer les constructions AAV obtenues. Les flèches rouges, 5' et 3' ITR sont les séquences qui constituent les origines de répllication virale. La flèche verte GFP est la séquence qui code pour la protéine fluorescente verte. Les flèches jaunes représentent l'exon 1 et exon 2 de *NXNL1*. La flèche grise représente la séquence NRE et le point de branchement. Le rectangle bleu représente la partie n°1 de l'intron. La flèche mauve représente l'antibiotique de résistance du plasmide, ici la kanamycine.

Pour valider l'hypothèse que la machinerie de l'épissage alternatif de *NXNLI* n'est active ou présente que dans les bâtonnets, nous décidons d'abord de tester *in vivo* les différentes régions de l'intron de *NXNLI* dans les cônes. Dans ces cellules, l'absence d'élément favorisant la rétention de l'intron induirait systématiquement un épissage des minigènes indépendamment de la partie de l'intron qu'il code. C'est pourquoi les premiers plasmides testés sont contrôlés par le promoteur LCR mais avant de débiter ces expériences nous décidons de contrôler les plasmides construits *in vitro*. Pour cela nous utilisons une paire d'amorce localisée entre la GFP et l'exon 1 commune à tous les plasmides. Comme attendu, les résultats de la RT-PCR réalisée avec ces amorces et à partir des ARN de cellules HEK293 transfectées par chaque plasmide indiquent la présence de l'amplification du fragment ciblé pour les quatre plasmides construits, mais pas pour le contrôle négatif utilisé pour nos expériences et qui n'exprime que la GFP et qui ne contient pas l'exon 1 de *NXNLI* (**Fig.189**).

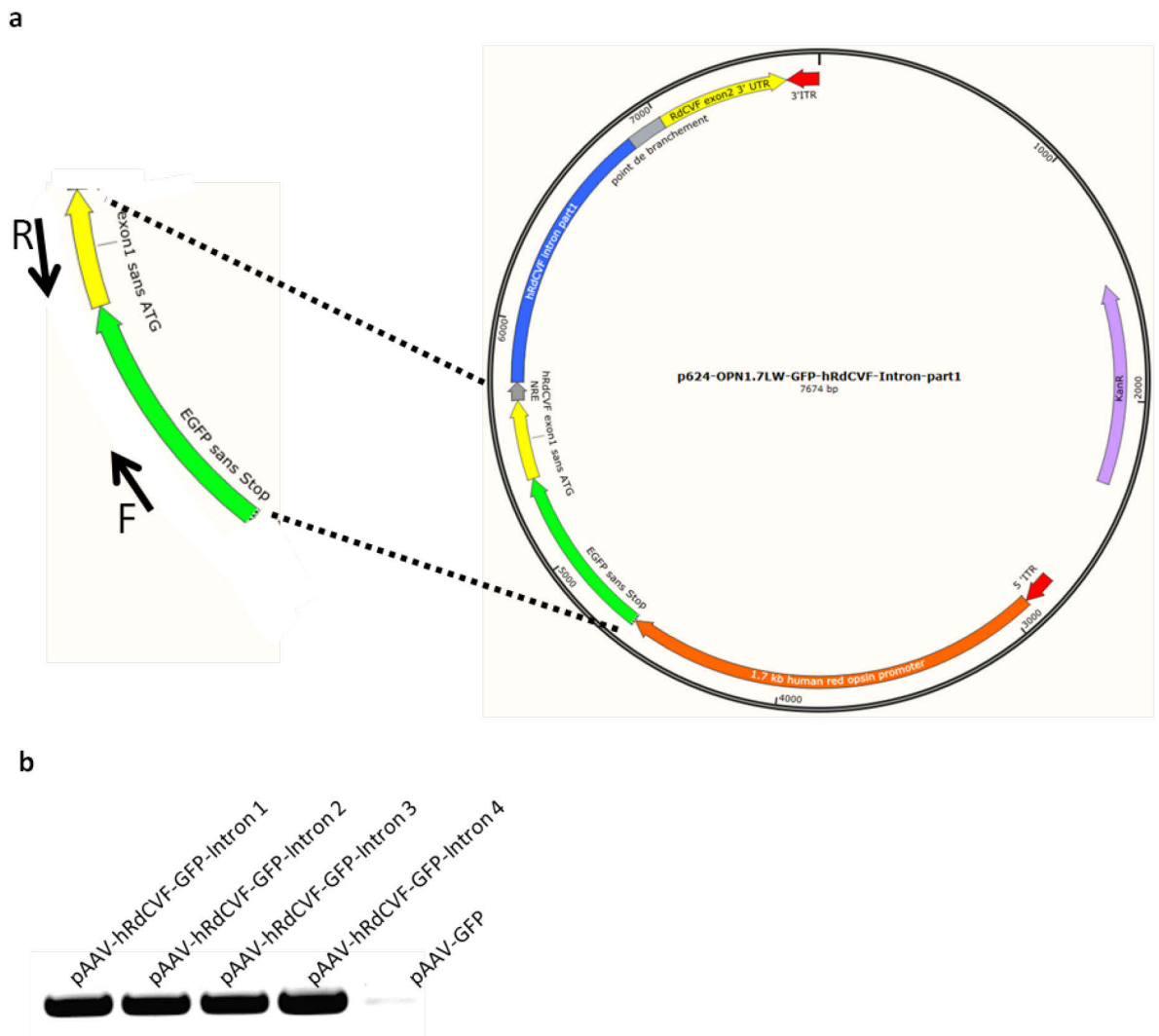


Figure 189: Contrôle des plasmides AAV dans lesquels sont clonées les cassettes minigène. **a)** Représentation schématique et agrandie de la région amplifiée. Les flèches F et R représentent les amorces utilisées pour amplifier le fragment. **b)** PCR des fragments amplifiés à partir d'ARN extraits de cellule HEK293 transfectées par les différents plasmides AAV+ cassette minigène.

Avant de débiter l'étude *in vivo* de l'épissage, les différents minigènes sont testés *in vitro*. En effet, à partir des ARNs utilisés lors de ces expériences et en utilisant une paire d'amorces dessinées entre la GFP et l'exon 2 du minigène, une PCR est réalisée. Les résultats de cette PCR indiquent que dans les cellules HEK293, l'épissage du gène *NXNLI* est alternatif en présence de la partie n°1, n° 2 et n° 3 de l'intron. Alors que l'épissage est constitutif en présence de la partie n°4 de l'Intron de *NXNLI*. Ces

résultats indiquent que la partie de l'intron n°4 n'est pas retenu dans les cellules HEK293 (Fig. 190).

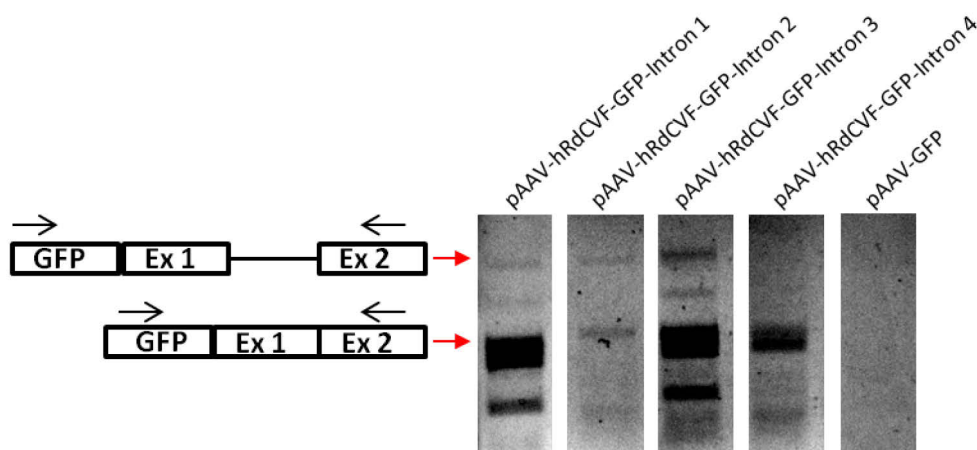


Figure 190: Analyse de l'épissage de *NXNL1* dans les cellules HEK293. PCR des fragments amplifiés à partir d'ARN extraits de cellule HEK293 transfectées par les différents AAV+ cassette minigène et par le contrôle AAV+GFP. Les produits pertinents sont indiquées par les flèches rouges.

Ces expériences indiquent que les cellules HEK293 possèdent la machinerie qui permet de retenir l'intron de *NXNL1* et le promoteur *OPNIL/MW* est fonctionnel, au moins partiellement, dans les cellules HEK293. Dans ces cellules les minigènes sont tous épissés pour chacune des constructions. Le produit de la rétention d'intron est retrouvé pour les minigènes n°1, n°2 et n°3, mais pas pour le minigène n°4 qui contiendrait donc un élément essentiel à la rétention de l'intron. Cependant ces expériences n'étant pas quantitatives et du fait que les deux produits d'amplification n'ont pas la même taille, il serait prématuré d'interpréter de manière strictement quantitative le rapport épissé/retenu. Néanmoins, le rapport épissé/retenu est très faible pour le minigène n°2, par rapport épissé/retenu du minigène n°1 et n°3. Ceci indique que l'épissage est affecté par un élément se situant dans la construction de minigène n°2. Cette région contiendrait un élément entravant l'épissage mais pas impliqué directement dans

l'épissage alternatif. En effet. L'épissage est défectueux mais ne conduit pas proportionnellement à la rétention de l'intron. Afin d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans l'épissage alternatif de *NXNLI in vivo*, la production de quatre lots de particules virales à partir des différents plasmides AAV est réalisée. Cette production consiste à co-transfecter des cellules humaines HEK293 adhérentes avec les plasmides vecteur AAV+ transgène (cassette minigène) décrits précédemment et un plasmide rep-cap sans les ITR, nécessaire pour la production des nombreuses protéines telles que celles impliquées dans l'encapsidation, l'intégration et la survie des virus (Rep78, Rep68, Rep52, Rep40) et les protéines d'encapsidation des particules virales (VP1, VP2, VP3). Dans notre cas, nous utilisons le plasmide AAV2 connu pour être optimal pour cibler les photorécepteurs de la rétine lors d'injections sous rétinienne (Planul and Dalkara, 2017). En plus de ces deux plasmides, les cellules HEK293 doivent également être co-transfectées avec un plasmide auxiliaire pHelper contenant les gènes adénoviraux nécessaires à la réplication du virus AAV. Les particules virales produites sont purifiées sur gradient d'iodixanol et concentrées par centrifugation avant d'être titrées (**Fig. 191**).

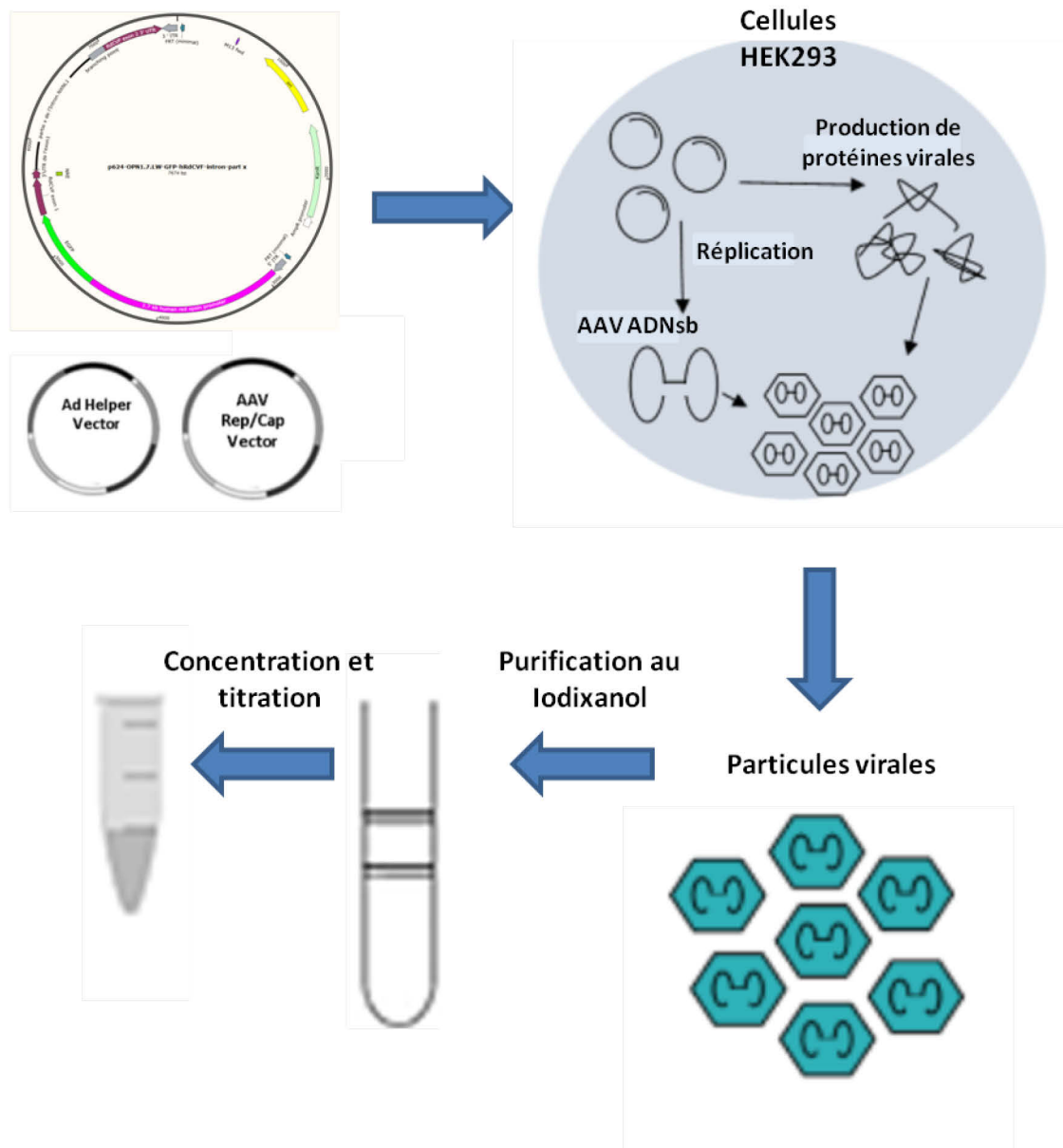
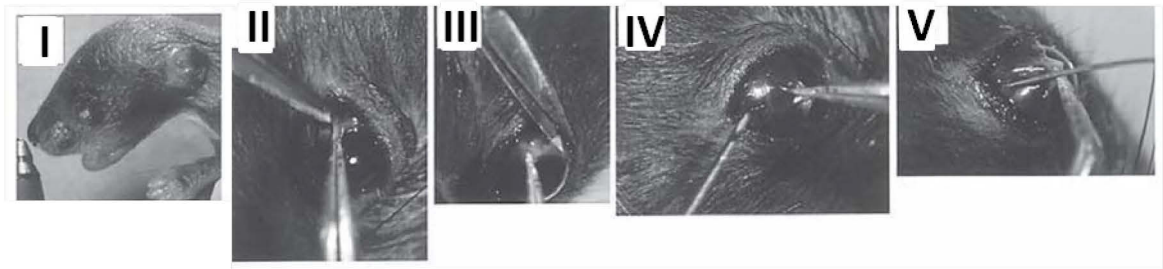


Figure 191: Production de particules virales AAV. Les cellules HEK293 sont co-transfectées par le plasmide AAV+ transgène (cassette minigène), le plasmide AAV Rep/Cap et le plasmide Helper. Les particules virales produites sont purifiées par centrifugation sur gradient d'Iodixanol après la lyse des cellules et la dégradation de l'ADN libéré. Les particules virales sont concentrées à l'aide d'un Amicon Ultra-15 et titrées par PCR quantitative .

Les titres obtenus ont une valeur entre facteur 10^{13} vector genomes/ml (vg/ml) et 10^{14} (Table 7), et comme il est recommandé selon l'expertise acquise par notre équipe d'injecter 1 μ l de solution à 3×10^{12} vg/ml pour les injections sous-rétiniennes chez la

souris, les solutions produites sont précédemment validées. Six souris sauvages C57BL/6J ont été injectées en sous-rétinien à *PN15* par chaque suspension AAV-CMV/CBA-hRdCVF-GFP-Intron 1, CMV/CBA-hRdCVF-GFP-Intron 2, CMV/CBA-hRdCVF-GFP-Intron 3 et CMV/CBA-hRdCVF-GFP-Intron 4 (**Fig. 192**).

a



b

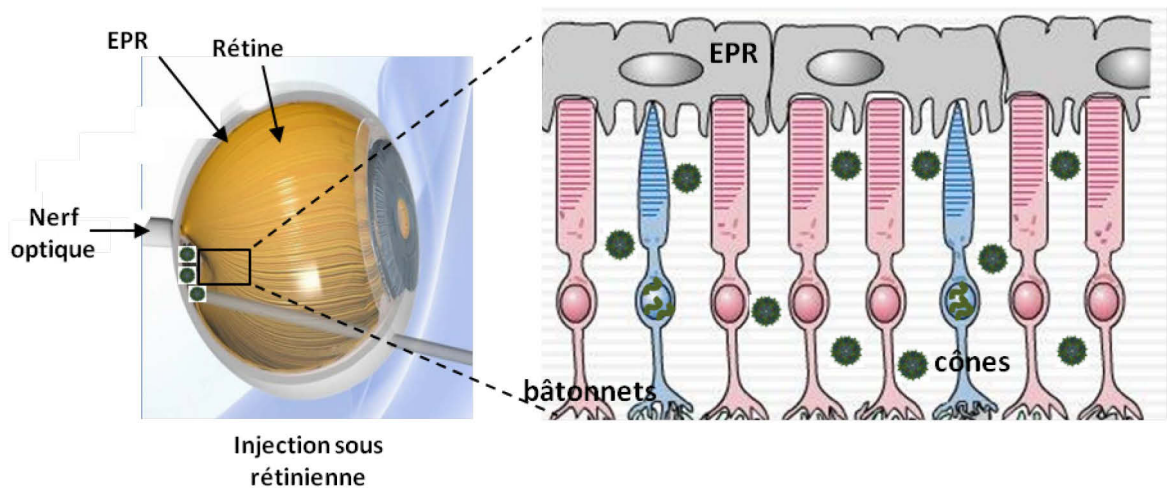


Figure 192: Détails de l'injection sous-rétinienne chez la souris adulte. a) Photo d'une souris à *PN15*. (II) La conjonctive est saisie avec des pinces et le tissu est soigneusement coupé jusqu'à la sclère avec une paire de ciseaux. (III) Une lame de la paire de ciseau est introduit dans l'incision pour en élargir l'ouverture. (IV) l'œil est saisi par la conjonctive près de la cornée et tournée du côté nasale exposant ainsi la sclère temporale. Une aiguille de 30 gauges est insérée obliquement dans l'espace intra-vitréen, à travers la sclère, la choroïde et la rétine, en évitant de toucher la lentille. (V) L'aiguille d'injection est introduite dans l'incision précédemment réalisée dans une orientation tangentielle à la surface du globe. L'injection est réalisée et la suspension délivrée. Adapté de Fong-Qi Liang *et al.* 2000. **b)** Schéma représentatif d'une injection sous-rétinienne et distribution des particules virales dans la couche des photorécepteurs dans la rétine.

Quinze jours plus tard, des fonds d'œil ont été réalisés afin de contrôler l'injection et la distribution des particules dans la rétine des souris. Les résultats des fonds d'œil des souris indiquent que hormis la souris n°3, les rétines de toutes les souris auxquels ont été injectées les particules virales AAV-CMV/CBA-hRdCVF-GFP-Intron 1 sont parfaitement infectées (**Fig. 193**).

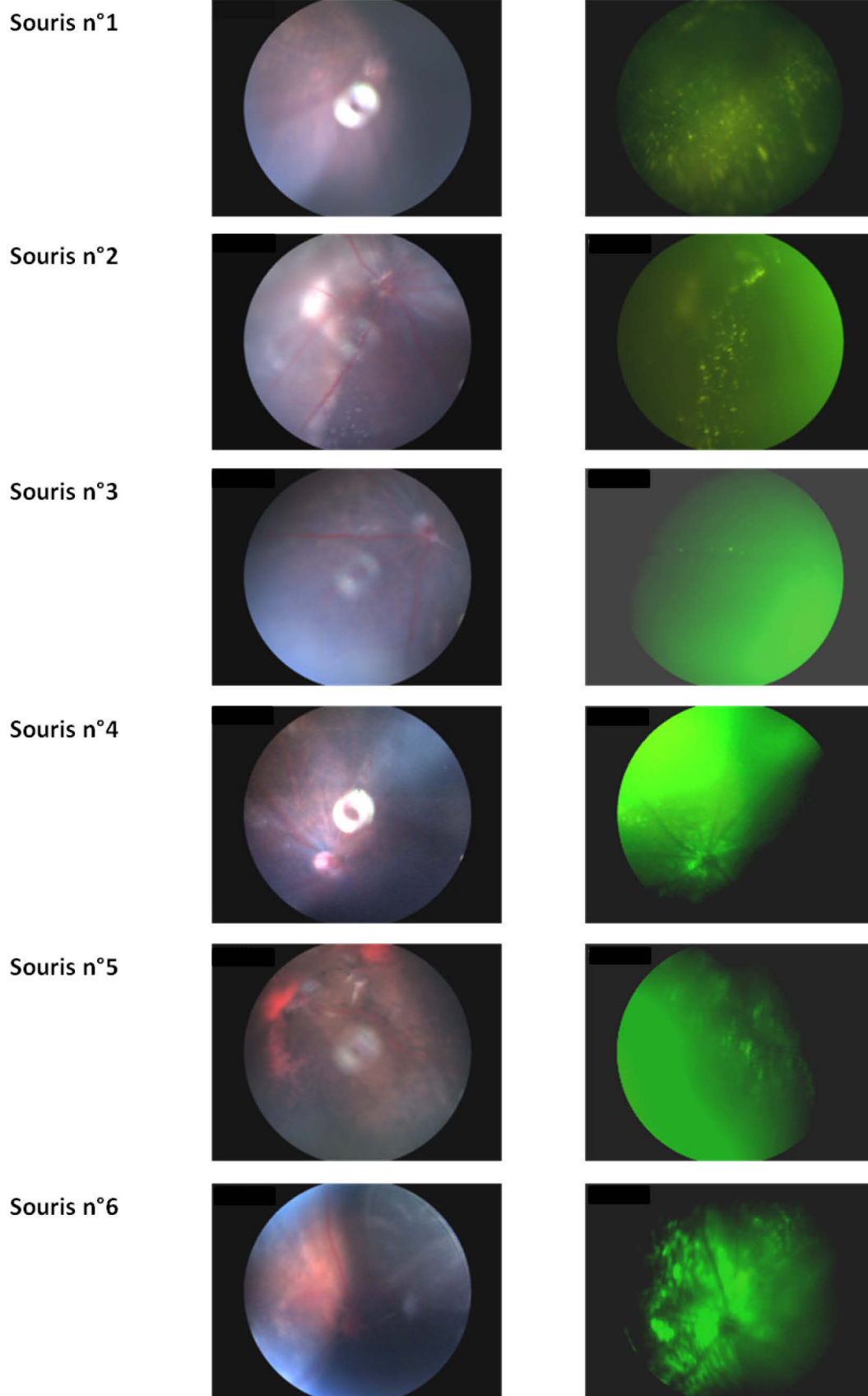


Figure 193: Fonds d'œil à gauche sous lumière blanche et à droite sous fluorescence réalisés sur des souris une semaine après avoir été injectées par les suspensions virales AAV-hRdCVF-GFP-Intron 1 sous le promoteur LCR.

Un mois après l'injection, les souris sont récupérées, sacrifiées, énucléées et les rétines sont disséquées puis congelées et conservées à -80°C. Après la vérification et la confirmation que l'expression du transgène a bien eu lieu dans les cônes des souris injectées, l'analyse de l'épissage de *NXNLI* dans ces cellules sera réalisée à partir de ces rétines et à l'aide des amorces utilisées pour étudier l'épissage dans l'essai réalisé *in vitro*. Toutes ces expériences qui nous permettront d'identifier la ou les séquence(s) intronique(s) impliquée(s) dans l'épissage alternatif du gène *NXNLI* seront menées à terme au delà de ma thèse.

La séquence NRE étant fortement conservée, elle doit certainement jouer un rôle majeur dans l'épissage alternatif du gène NXNLI. De plus, il semble qu'en plus de cet élément NRE cis-régulateur de l'épissage de NXNLI, d'autres régions de l'intron soient impliquées dans cet épissage.

4: LES FACTEURS IMPLIQUES DANS L'ÉPISSAGE ALTERNATIF DE *NXNLI*

4.1: IMPLICATION DU FACTEUR NUCLEOLINE

L'analyse et la comparaison des séquences ont un impact important pour la génétique et la biologie moléculaire. Comparer des séquences codantes entre différentes espèces peut permettre par exemple d'estimer l'importance de la fonction des protéines codées. Cette comparaison peut également aider à comprendre l'histoire évolutive de chaque nucléotide conservé ou non du génome et de ce fait à quels degrés de pression de sélection il a été soumis ou pas. La disponibilité des séquences génomiques d'un grand nombre de vertébrés nous a précédemment permis d'explorer plus en détail la conservation de la séquence NRE (**Fig. 175**). Cette partie du génome conservée même sous la pression de la sélection naturelle doit avoir une fonction significative dans

l'expression du gène *NXNLI*. Il est certain que cette séquence joue un rôle via son interaction avec des protéines régulatrices d'épissage. C'est pourquoi nous nous intéressons d'encore plus près ici à cet élément en investiguant et en recherchant les éventuelles protéines qui pourraient interagir avec cette séquence NRE. Pour cela, une sonde oligo a été synthétisée à partir de la séquence d'ARN du NRE à laquelle un cytochrome cyanine 3 (Cy3) a été ajouté en 3'. La même séquence nommée NRE *shuffle*, mais avec les nucléotides disposés de manière à déstabiliser la structure secondaire du NRE a été également synthétisée avec un Cy3 en 3' et utilisée comme contrôle négatif des expériences (**Fig. 194 et 195**).

a

Sequence NRE:

CAGGGAGGGCUUCCUGGAGGAGGGGGCAUGUUCGCUG

Sequence sonde NRE

rCrArGrGrGrArGrGrGrCrUrUrCrCrUrGrGrArGrGrArGrGrGrGrGrCrAr
UrGrUrUrCrGrCrUrG/3' Cy3-Sp

b

Sequence NRE shuffle

CUUGGAGUGGCAGAUUGGUCGGGCUGGUAGGCGAGCCG

Sequence sonde NRE shuffle

rCrUrUrGrGrArGrUrGrGrCrArGrArUrGrGrUrCrGrGrGrCrUrGrGrUrAr
GrGrCrGrArGrCrCrG/3' Cy3-Sp

Figure 194: Séquence nucléotidique des sondes oligo couplées en 3' par un Cy3 de a) NRE et b) NRE *shuffle*.

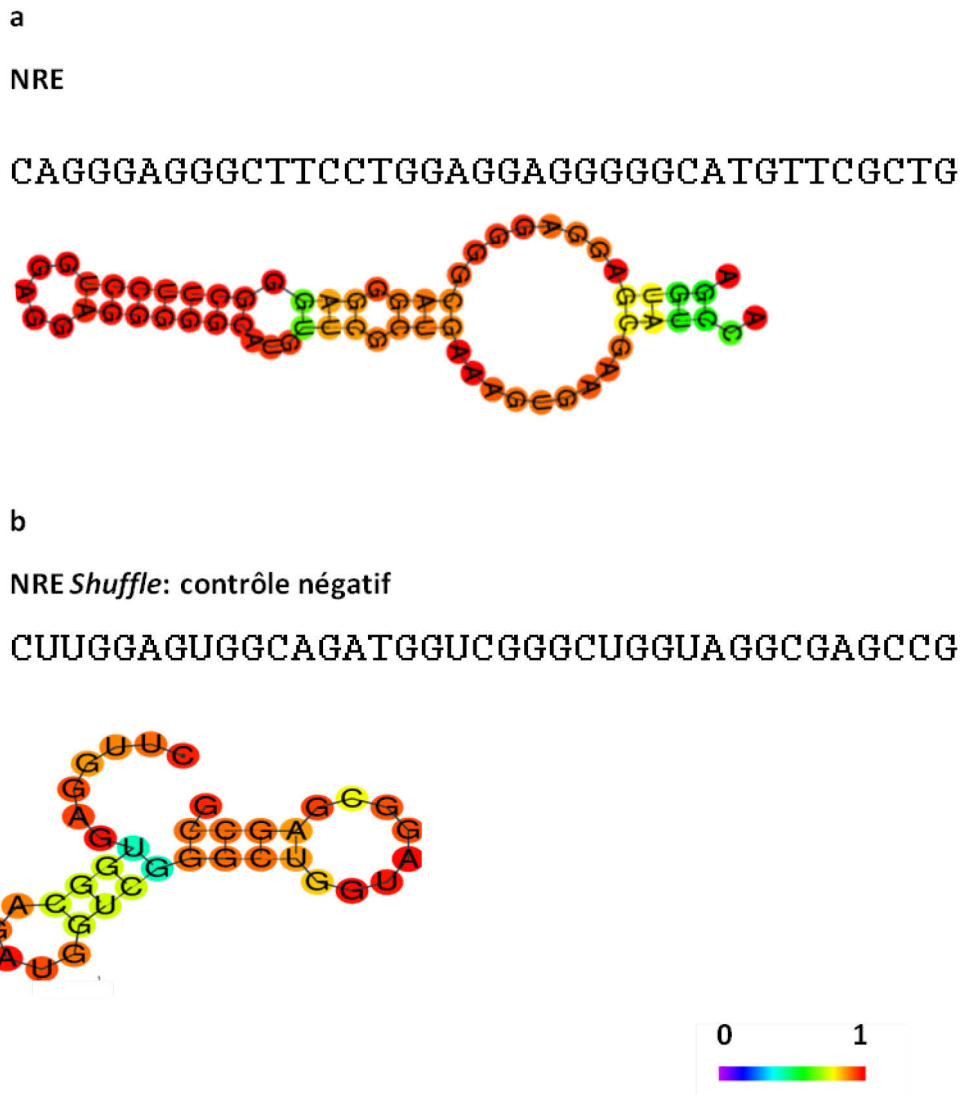


Figure 195: Structure secondaire du, a) NRE et b) NRE *shuffle*. L'énergie des appariement augmente du violet vers le rouge.

Par l'intermédiaire de la compagnie Cambridge Protein Arrays Ltd, ces sondes ont été incubées sur la puce The HuProt™ version 2.0 microarray présentant à sa surface 19 951 protéines distinctes afin d'identifier les protéines susceptibles d'interagir spécifiquement avec le NRE. Toutes les protéines recombinantes purifiées présentes sur cette puce sont couplées à une glutathione-S-transferase (GST) en N-terminal et marquées par un tag poly histidine (His6-tag). Ces protéines sont greffées en duplicat sur une lame de verre préalablement recouverte par un polymère présentant différentes

fonctions permettant le couplage avec les protéines GST telles que des fonctions aldéhyde, époxy, carboxyle ou hydroxyle (**Fig. 196**).

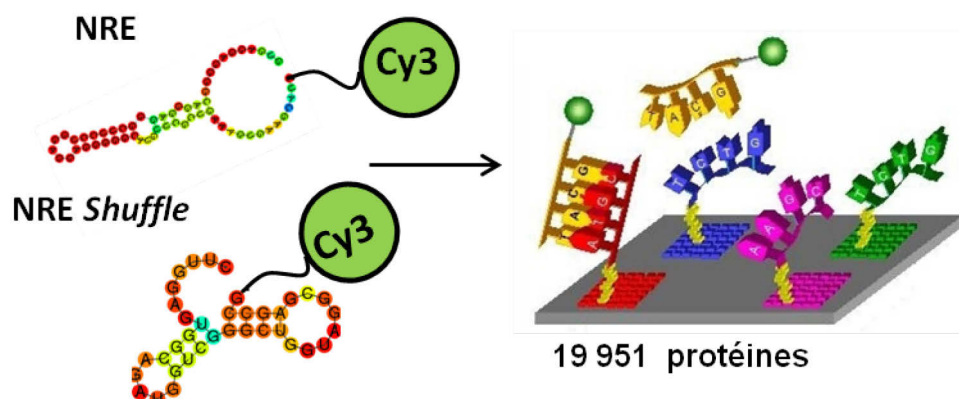


Figure 196: Illustration de l'expérience d'interaction entre la sonde ARN NRE ou NRE *Shuffle* et la puce The HuProt™ version 2.0 microarray .

Ces protéines greffées sont produites chez la levure *S. cerevisiae*. Des protéines utilisées comme contrôles négatifs tels que la GST, la SAB, des histones ou des immunoglobulines sont également présentes sur la puce. Les résultats de cette expérience, indiquent que quarante protéines interagissent spécifiquement avec la séquence NRE (**Table 8**). Ces protéines sont classées selon un score (ou *hit*) qui est corrélé à l'intensité de fluorescence émise suite à l'interaction entre la protéine et la sonde d'ARN. Plus l'interaction est forte, plus l'intensité de la fluorescence est importante et plus le score est important. Les valeurs de scores sont confirmées visuellement et à l'aide du logiciel ImageJ. Après avoir réalisé une recherche bibliographique de chacun des candidates, seules Nucleolin (NCL), RALY , heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 1 (HNRNPUL1), RALYL, serine/arginine-rich splicing factor 2 (SRSF2), histone cluster 1, H1b (HIST1H1B), argonaute 1 (AGO1), family with sequence similarity 98 member A (FAM98A), A-kinase anchoring protein 8 like (AKAP8L), Y-box binding protein 3 (YBX3) et heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C (HNRNPC) sont retenues car connues pour être des protéines qui interagissent avec l'ARN. Notons que deux clones différents

exprimant HNRNPC sont présents sur la puce protéique. Ces 12 protéines sont sélectionnées comme étant des candidats potentiellement impliqués dans l'épissage de *NXNL1*. Pour valider ces candidats, ces résultats sont croisés avec ceux obtenus lors de l'hybridation de contrôle négatif NRE *shuffle*. L'analyse d'interaction entre le contrôle négatif et la puce protéique indique que 42 protéines interagissent avec le NRE *shuffle* (**Table 9**), dont 20 interagissent aussi avec le NRE. Parmi ces 20 protéines, 10 sont des protéines connues pour interagir avec l'ARN. RALY, HNRNPUL1, RALYL, SRSF2, HIST1H1B, AGO1, FAM98A, AKAP8L et HNRNPC. La combinaison de ces résultats indiquent que seules NCL, qui est une protéine qui se lie à l'ARN au niveau du motif 5'-UUAGGG-3', et la protéine YBX3 se lient spécifiquement à la séquence ARN NRE avec un hit score de 6,5 pour la NCL et un hit score de 0,4 pour YBX3 (**Fig. 197 et 198**).

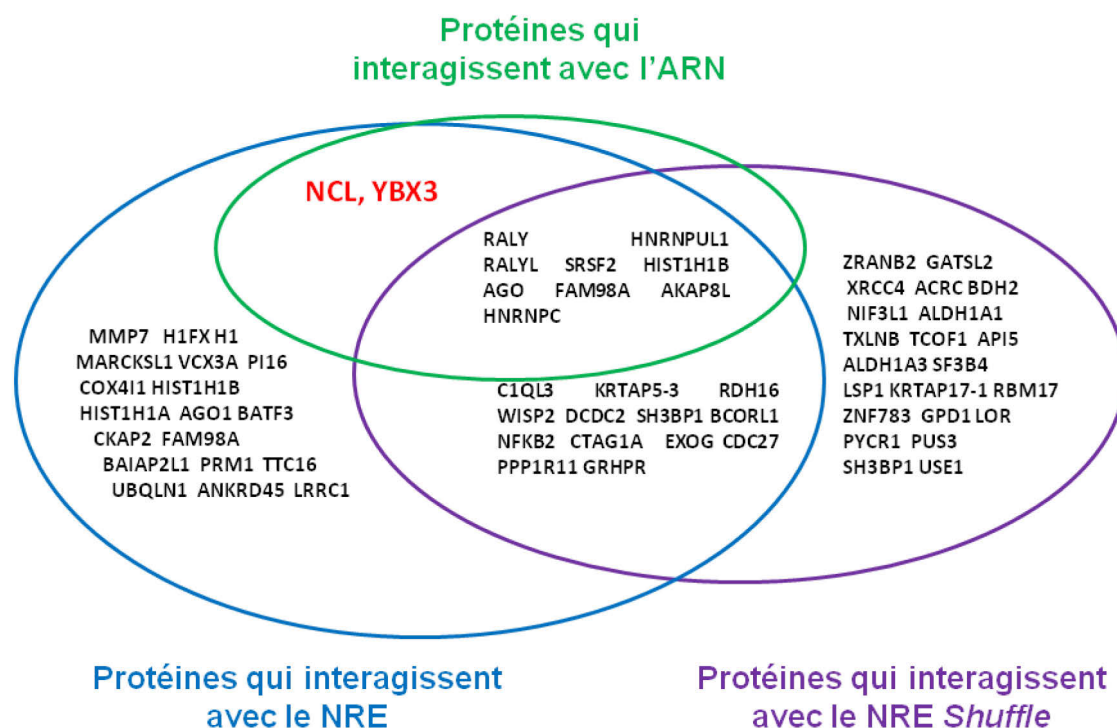


Figure 197: Croisement des protéines présentes dans la puce HuProt™ version 2.0 microarray. Celles qui interagissent avec le NRE, le NRE *shuffle* et qui sont des protéines connues pour interagir avec l'ARN.

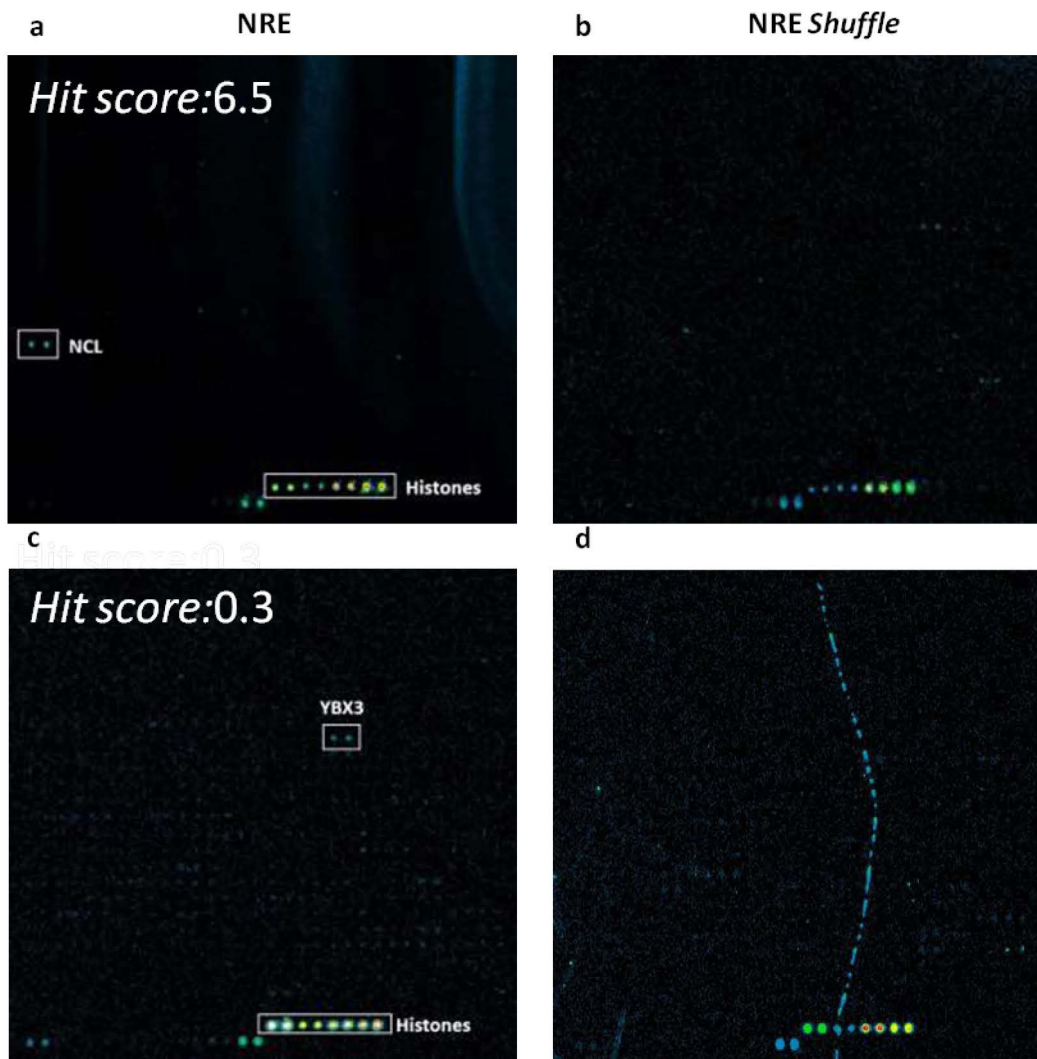


Figure 198: L'interaction spécifique entre la séquence NRE et les protéines NCL et YBX3. **a)** Image de la région de la puce HuProt où est localisée NCL après incubation avec la séquence NRE. **b)** Image de la région de la puce HuProt où est localisée NCL après incubation avec la séquence NRE *shuffle*. **c)** Image de la région de la puce HuProt où est localisée YBX3 après incubation avec la séquence NRE. **d)** Image de la région de la puce HuProt où est localisée YBX3 après incubation avec la séquence NRE *shuffle*. Les histones constituent de contrôles internes.

NCL qui comme son nom l'indique est une protéine identifiée dans le nucléole, est connue pour interagir avec certaines hélicases d'ARN, enzymes permettant de catalyser l'ouverture d'une chaîne d'acides nucléiques. NCL est une protéine aussi connue pour être impliquée dans différentes étapes importante du processus cellulaire comme le remodelage de la chromatine, la réplication et la recombinaison de l'ADN, la régulation

de l'expression des gènes, le métabolisme de l'ARN, la réponse au stress, la prolifération et la croissance cellulaire, la transcription, la transduction des signaux cellulaires et la biogenèse des ribosomes. Il est également connu que NCL peut interagir avec de nombreuses protéines et qu'un grand nombre de ses partenaires peuvent participer aux différentes étapes du métabolisme des pré-ARNm en passant par leur transcription jusqu'à leur export vers le cytoplasme (Salveti et al., 2016). Pour toutes ces raisons et parce qu'elle est la protéine qui interagit avec le NRE avec le plus grand *hit score*, nous avons dans un premier temps décidé de nous intéresser à cette protéine. À partir des ARNs extraits de la fovéa, de la macula et des 3 régions de la périphérie de la rétine de macaque utilisés pour les expériences décrites précédemment, une RT-PCR quantitative à l'aide d'amorces spécifiques amplifiant le gène qui code pour NCL a été réalisée. L'expression du messager de la NCL normalisée par le gène qui code pour la GAPDH est plus importante dans la rétine périphérique moyenne et éloignée que dans la rétine périphérique proche ou le centre de la rétine du macaque (**Fig. 199**).

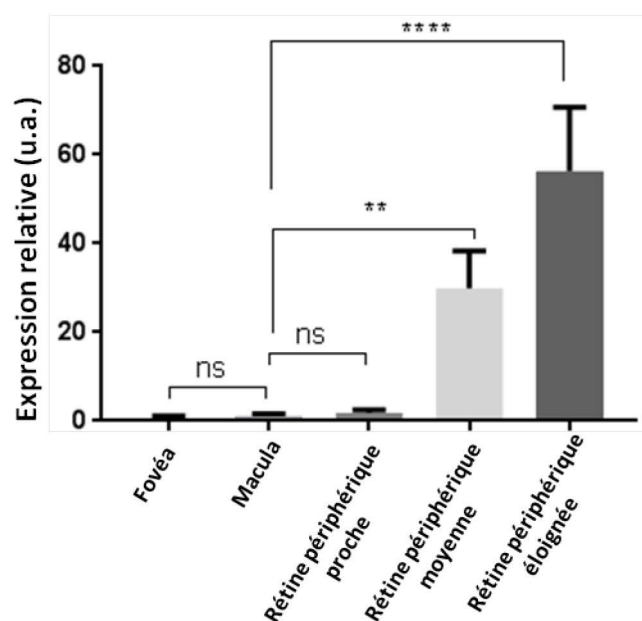


Figure 199: Expression du messager de *NCL* dans les différentes parties de la rétine de macaque. u.a.: unité arbitraire.

Les mêmes résultats sont obtenus à partir d'une rétine humaine, plus nous nous éloignons du centre de la rétine et plus l'expression du messager de NCL augmente (Fig. 200).

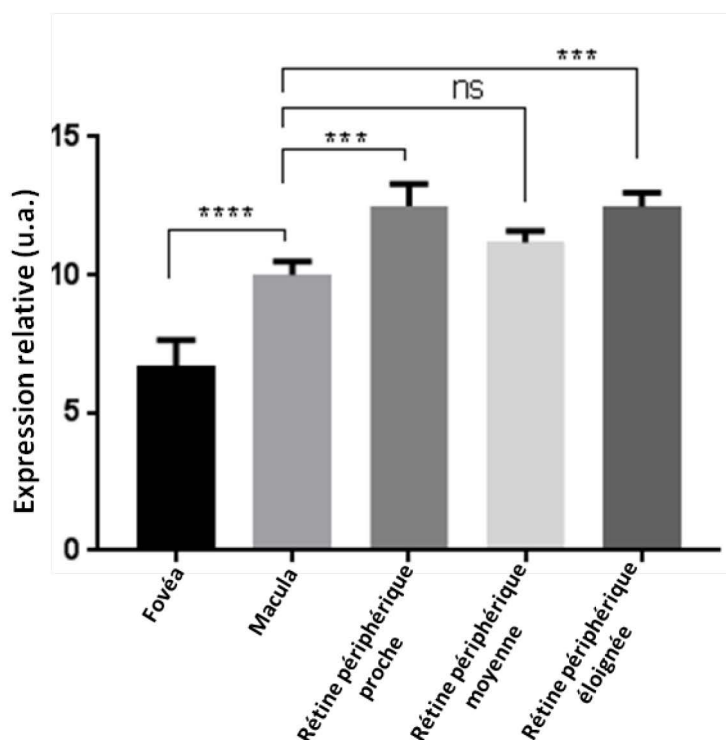


Figure 200: Expression du messager de NCL dans les différentes parties de la rétine humaine. u.a.: unité arbitraire.

À partir d'une autre rétine de macaque, les différentes régions de la rétine sont prélevées comme décrit précédemment afin d'obtenir une section de la macula, de la rétine périphérique proche, moyenne et éloignée. À partir de ces sections, les lysats protéiques ont été extraits et un *western blot* réalisé. Les différentes régions de la rétine sont contrôlées et nous observons que dans la macula, majoritairement composée de cônes, la protéine human cone transducin (GNAT2) est plus exprimée que dans les autres régions plus éloignées du centre de la rétine (Morris et al., 1997). Au contraire, la rhodopsine, protéine spécifique des bâtonnets, est exprimée en périphérie de la rétine de macaque et n'est pas du tout présente dans le centre de la rétine où les bâtonnets sont complètement absents. Ces résultats valident les sections en montrant que les cônes sont plutôt localisés dans la macula de rétine de macaque alors que les bâtonnets sont plutôt présents dans la rétine périphérique (Fig. 201).

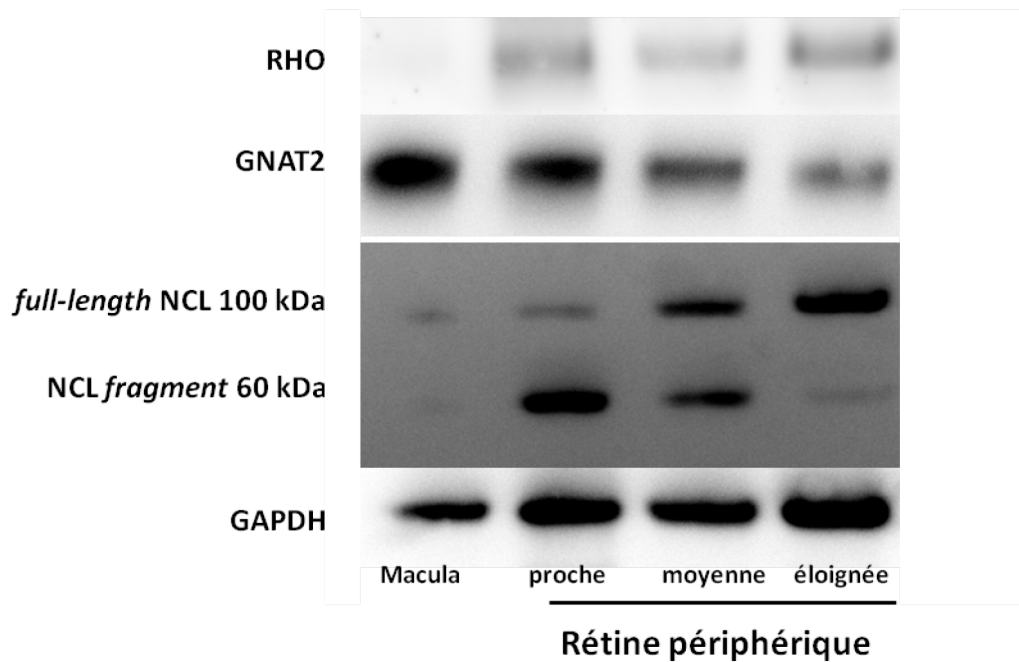


Figure 201: NCL est plus exprimée par la rétine périphérique que par la rétine centrale. *Western blot* de lysats protéiques issus des sections de macula, de rétine périphérique proche, moyenne et éloignée. Les anticorps utilisés sont, un anti-Rhodopsine, un anti-GNAT2, un anti-NCL et un anti-GAPDH. L'anti GNAT2 nous a généreusement été fourni par James Hurley, university of Washington.

NCL est connue pour migrer de manière aberrante sur un gel d'électrophorèse en présence d'agents dénaturants. En effet, NCL peut soit migrer à sa taille théorique attendue c'est à dire 100 kDa, soit à une taille plus petite de 60 kDa. Des hypothèses sur l'existence et la présence de différents sites de phosphorylation ou de clivages dans cette protéine sont avancées pour justifier cette différence de migration. Certains travaux expliquent que NCL qui possède de nombreux sites de phosphorylation peut être partiellement clivée générant différentes protéines NCL de tailles différentes, la NCL *full-length* ou la NCL *fragment* (Gotzmann et al., 1997). Cependant, aucuns travaux n'ont jusqu'aujourd'hui confirmé définitivement ces hypothèses sur la différence de migrations. Cette protéine, en fonction de sa taille, est soit localisées dans le noyau, compartiment où le pre-ARN est traité et épissé ou dans le cytoplasme. Il est connu la NCL *full-length* est retrouvé dans le noyau alors la NCL *fragment* dans le cytoplasme (Fähling et al., 2005; Gotzmann et al., 1997). Les résultats du *western blot* réalisé à l'aide d'un anticorps spécifique de la NCL indiquent que plus nous nous

éloignons du centre de la rétine, plus la NCL full-length est exprimée et que inversement, plus nous nous éloignons du centre de la rétine est moins la NCL fragment est exprimée. Cependant les deux formes sont plus exprimées en périphérie de la rétine que dans le centre. De manière intéressante, il semble que la forme full-length, nucléaire, est d'autant plus recrutée que nous nous trouvons dans la rétine périphérique où sont localisés les bâtonnets, cellules où la rétention de l'intron a lieu. La quantification des intensités des bandes obtenues par *western blot* des différentes formes de la NCL normalisées par l'expression de la GAPDH indique que la NCL *full-length* est 9 fois plus exprimée dans la rétine périphérique moyenne que dans la macula et 8 fois plus exprimée dans la rétine périphérique éloignée que dans la macula. Ces résultats indiquent également que la NCL *full-length* est 8 fois plus exprimée dans la rétine périphérique éloignée que la NCL *fragment* (Fig. 202).

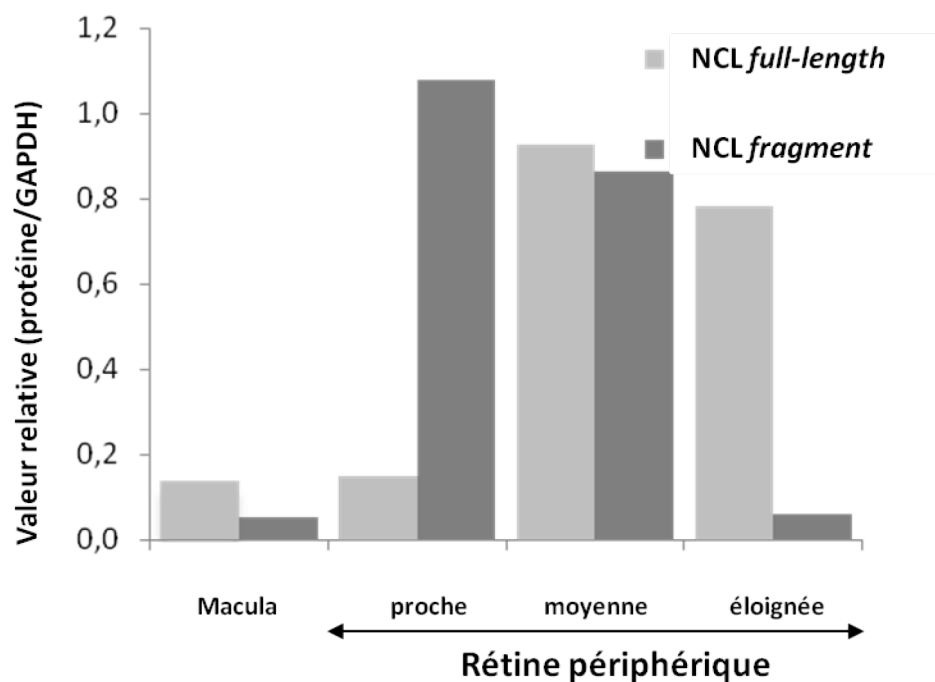


Figure 202: Quantification de l'expression de NCL obtenue par *western blot*.

La NCL *full-length* qui est connue pour être localisée dans le noyau qui correspond au compartiment dans lequel les pre-ARNm de *NXNL1* sont alternativement épissés est plus

exprimé dans la région de la rétine où les bâtonnets sont majoritairement présents. Ces résultats s'accordent avec l'hypothèse qui propose que NCL entrainerait la rétention de l'intron de *NXNL1*, permettant ainsi l'expression du messenger *short NXNL1* qui code pour RdCVF. Une immunofluorescence à l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine CRX qui est un facteur de transcription spécifiquement exprimé par les photorécepteurs est réalisée à partir de rétine de souris sauvage à *PN35* pour vérifier ces résultats (**Fig. 203**).

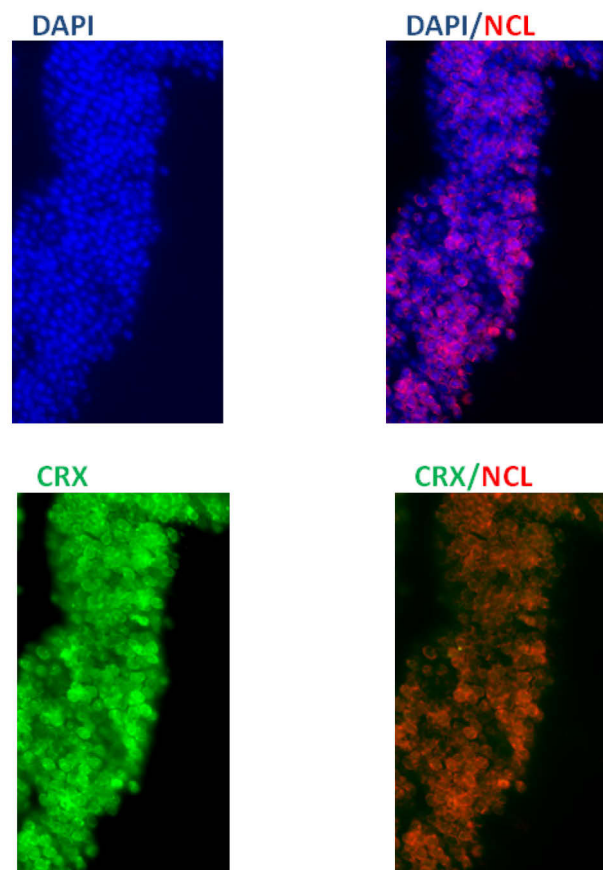


Figure 203: Analyse par Immunofluorescence de l'expression de NCL dans une rétine de souris. DAPI est un marqueur des noyaux. CRX est un marqueur des photorecepteurs.

Le marquage anti-CRX est co-localisé avec le marquage de la NCL et indique que NCL est bien exprimé par les photorécepteurs de la rétine. Des expériences complémentaires permettant de distinguer les bâtonnets des cônes dans ces rétines seront entreprises.

La nucleolin qui interagit avec le NRE est exprimée par les bâtonnets majoritairement présents dans la rétine des animaux chez qui le NRE est conservé.

4.2: IMPLICATION DU FACTEUR HETEROGENEOUS NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN F

Les travaux de Roca *et al.* décrivent les mécanismes de différentes protéines régulatrices susceptibles, via les sites donneur d'épissage 5', de jouer un rôle dans l'épissage alternatif des gènes. Parmi ces protéines décrites il y a les *small nuclear RNA* (snRNA) (Roca et al., 2013). De plus, dans le paragraphe *Trans-Acting Regulators* du chapitre *Alternative Splicing Regulation* du livre *Splicesomal Pre-mRNA Splicing* (Hertel, 2014), sont répertoriés de nombreux autres facteurs que NCL ou de YBX3, susceptibles de jouer un rôle dans l'épissage de nombreux gènes. C'est suite à la lecture de ces deux ouvrages que nous avons décidé de nous intéresser à d'autres facteurs qui pourraient participer à l'épissage alternatif du gène *NXNL1*. À partir d'ARN extraits de souris sauvage (*wt*) et de souris modèle de RP (*rd1*) entre *PN5* et *PN35*, le transcriptome a été établi et les données d'expression des gènes obtenues ont été collectées, traitées, assemblées et organisées dans la base de données KBaSS (<http://kbass.institut-vision.org/KBaSS/>) mise en place par Frédéric Blond. La souris *rd1* est le modèle murin de RP récessive le plus utilisé en recherche et qui présente une mutation spécifique des bâtonnets, entraînant une dégénérescence primaire de ces derniers à partir du 8^{ème} jour post-natal jusqu'à leur perte totale au 35^{ème} jour, suivie de la dégénérescence secondaire des cônes au cours du deuxième mois. Les gènes dont l'expression perdure entre le 8^{ème} et le 35^{ème} chez la souris *rd1* sont des gènes spécifiquement exprimés par les cônes alors que ceux pour lesquels l'expression diminue durant cette période qui correspond à la perte des bâtonnets, par

corrélation avec des gènes majoritairement exprimés par ces cellules. À partir de ces données transcriptomiques représentées sous forme de radar, nous avons comparé le profil d'expression de plusieurs gènes codant pour des ribonucléoprotéines connues pour être impliquées dans l'épissage. Précisons que de part nos capacités innées à analyser plus facilement les formes, la représentation en radar est astucieuse car elle permet sans effort de concentration de cribler le profil d'un grand nombre de gènes. En effet, la signification du profil d'un graphe sous forme de radar est immédiate, alors que celle d'un graphe sous forme de courbe demande plus d'attention. Le profil d'expression radar des gènes exprimés par les bâtonnets ressemble à l'Afrique alors que le profil d'expression des gènes exprimés par les cônes ressemble au sigle/logo des Rolling stones, c'est pourquoi, nous avons décidé de manière ludique de nommer les gènes au profil d'expression spécifique des bâtonnets African-like et les gènes au profil d'expression spécifique des cônes Rolling stones-like. Parmi les 50 gènes que nous avons analysés (**Table 10**), 11 sont African-like, Small Nuclear Ribonucleoprotein U1 Subunit 70 (*Snrnp70*), Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 (*Hnrnp3*), Probable ATP-dependent RNA helicase DDX23 (*Ddx23*), Serine/arginine-rich splicing factor 6 (*Sfrs6*), *Splicing factor arginine/serine-rich 3* (*Sfrs3*), Serine/arginine-rich splicing factor 4 (*Sfrs4*), Muscleblind-like protein 1 (*Mbnl1*), Muscleblind-like protein 2 (*Mbnl2*), Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F (*Hnrnpf*), Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L (*Hnrnpl*) et Poly(rC)-binding protein 2 (*Pcbp2*). Cinq sont Rolling stones-like, Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 (*Hnrnp2*), Polypyrimidine tract-binding protein 3 (*PTBP3/Rod1*), RNA-binding protein Nova-1 (*Nova1*), CUGBP Elav-like family member 4 (*Celf4*), CUGBP Elav-like family member 5 (*Celf5*). Les facteurs qui nous intéressent sont ceux spécifiquement exprimés par les bâtonnets qui représentent les cellules dans lesquelles l'épissage alternatif du gène *NXNLI* a lieu mais qui ne seraient pas exprimés dans les cônes où le gène *NXNLI* est systématiquement épissé. Nous nous intéressons donc plus particulièrement au profil d'expression des gènes African-like (**Fig. 204**).

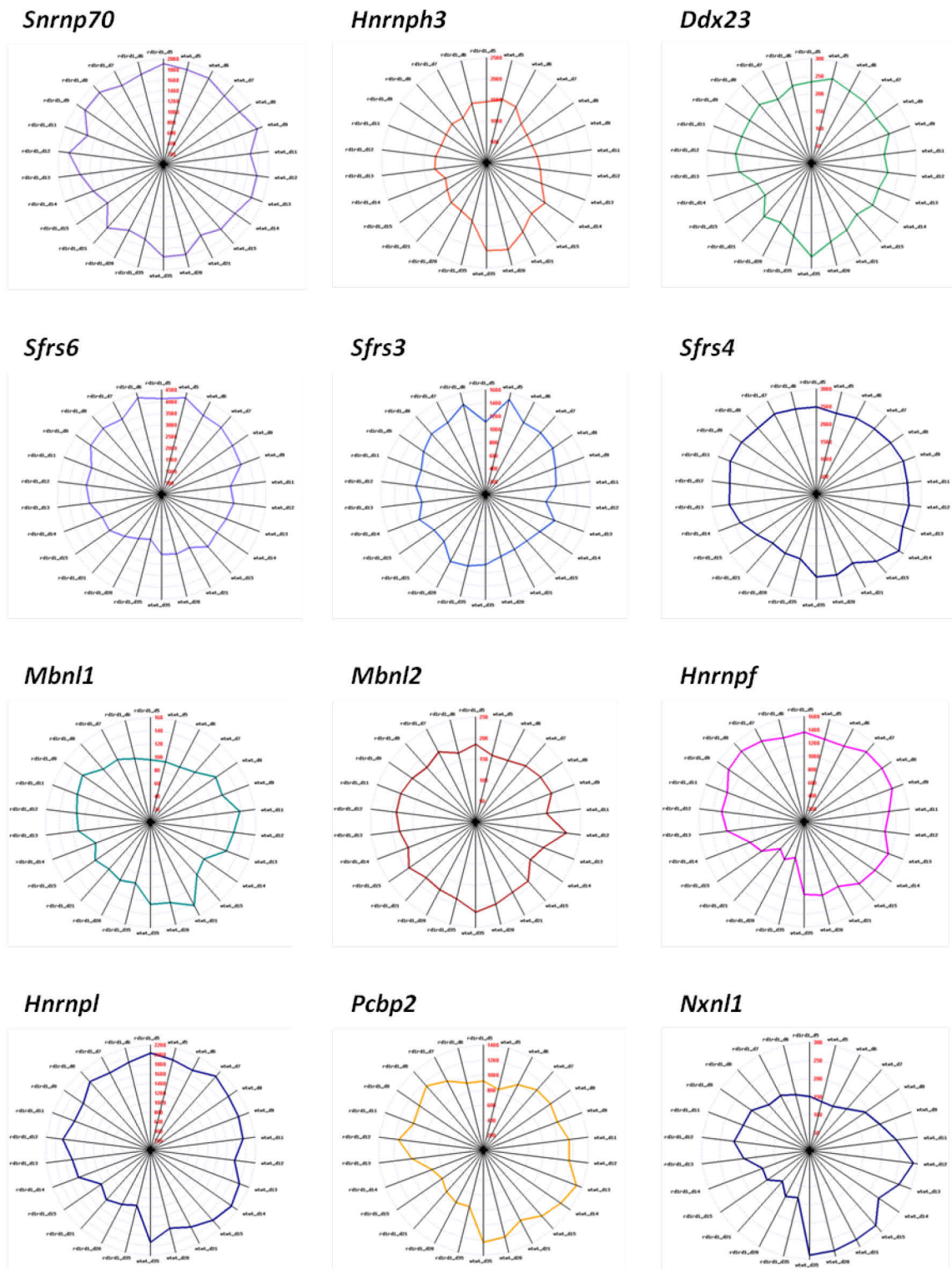


Figure 204: Profil d'expression des gènes African-like. L'expression de *Nxn1* dépend de la présence des bâtonnets. Les unités d'expression sont arbitraires mais normalisées par le protocole *Robust Multichip Average* (RMA).

Parmi ces gènes, 4 semblent avoir un profil d'expression plus intéressant que les autres avec une diminution drastique d'expression chez les souris *rd1* à partir de *PN13* : *Hnrnph3*, *Hnrnpf*, *Hnrnpl* et *Pcbp2*. L'expression de *Hnrnph3* est d'environ 1 700 unités arbitraires chez la souris *wt*, alors qu'elle est d'environ 1 100 chez la souris *rd1* à *PN15* et d'environ 2 100 unités arbitraires chez la souris *wt* et d'environ 1 400 chez la souris *rd1* à *PN35* (**Fig. 205**).

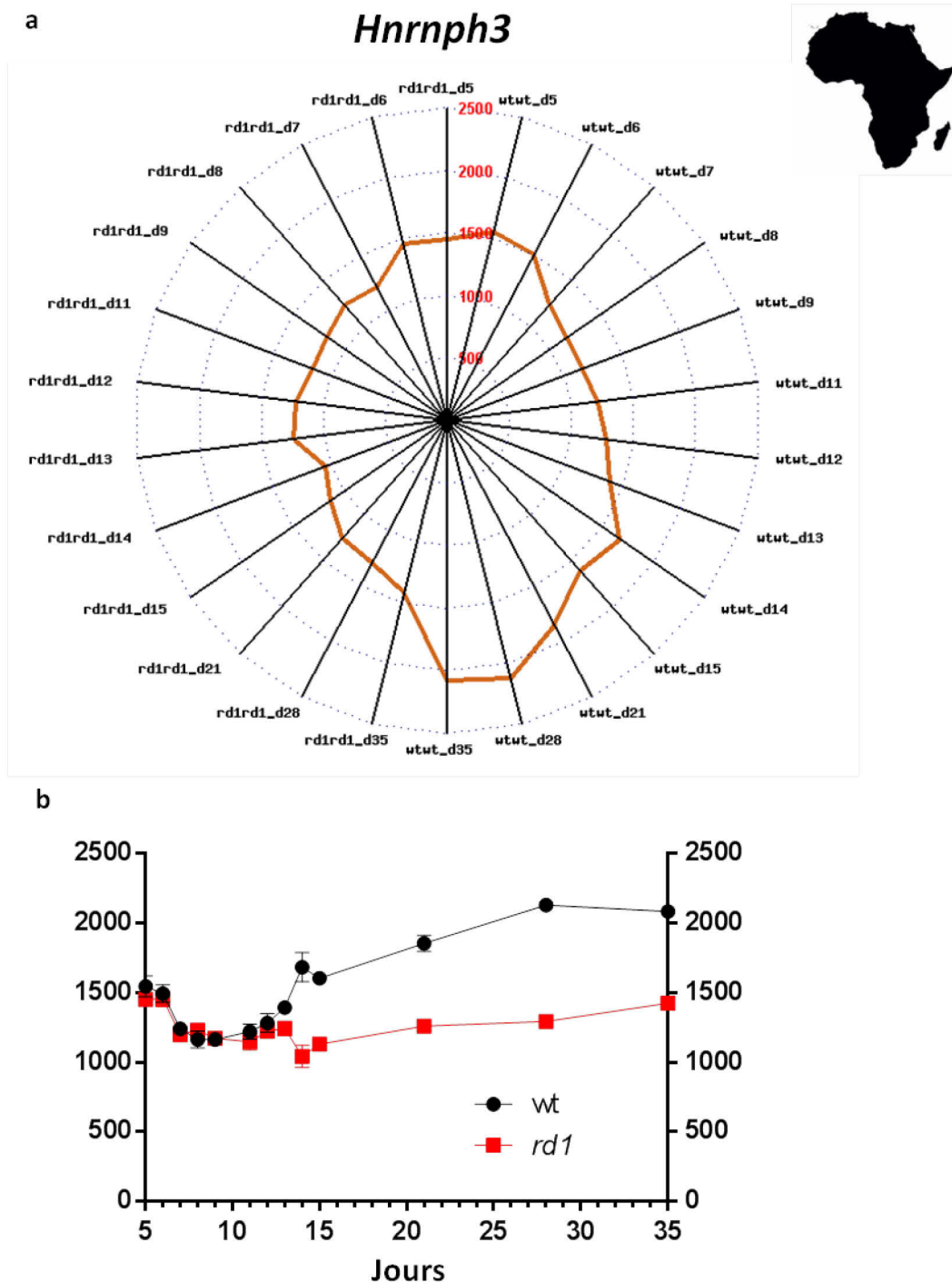


Figure 205: Profil d'expression du gène *Hnrnp3* représenté, a) sous forme de radar, b) sous forme de graphe. L'expression de *Nxn1* dépend de la présence des bâtonnets. Les unités d'expression sont arbitraires mais normalisées par le protocole *Robust Multichip Average* (RMA).

Concernant *Hnrnp3*, son expression est de 1 300 unités arbitraires chez la souris *wt* à PN14 et de 900 unités arbitraires chez la souris *rd1*. À PN35, son expression est

d'environ 1 100 unités arbitraires chez la souris *wt* alors qu'elle est d'environ 550 unités arbitraires chez la souris *rd1* (Fig. 206).

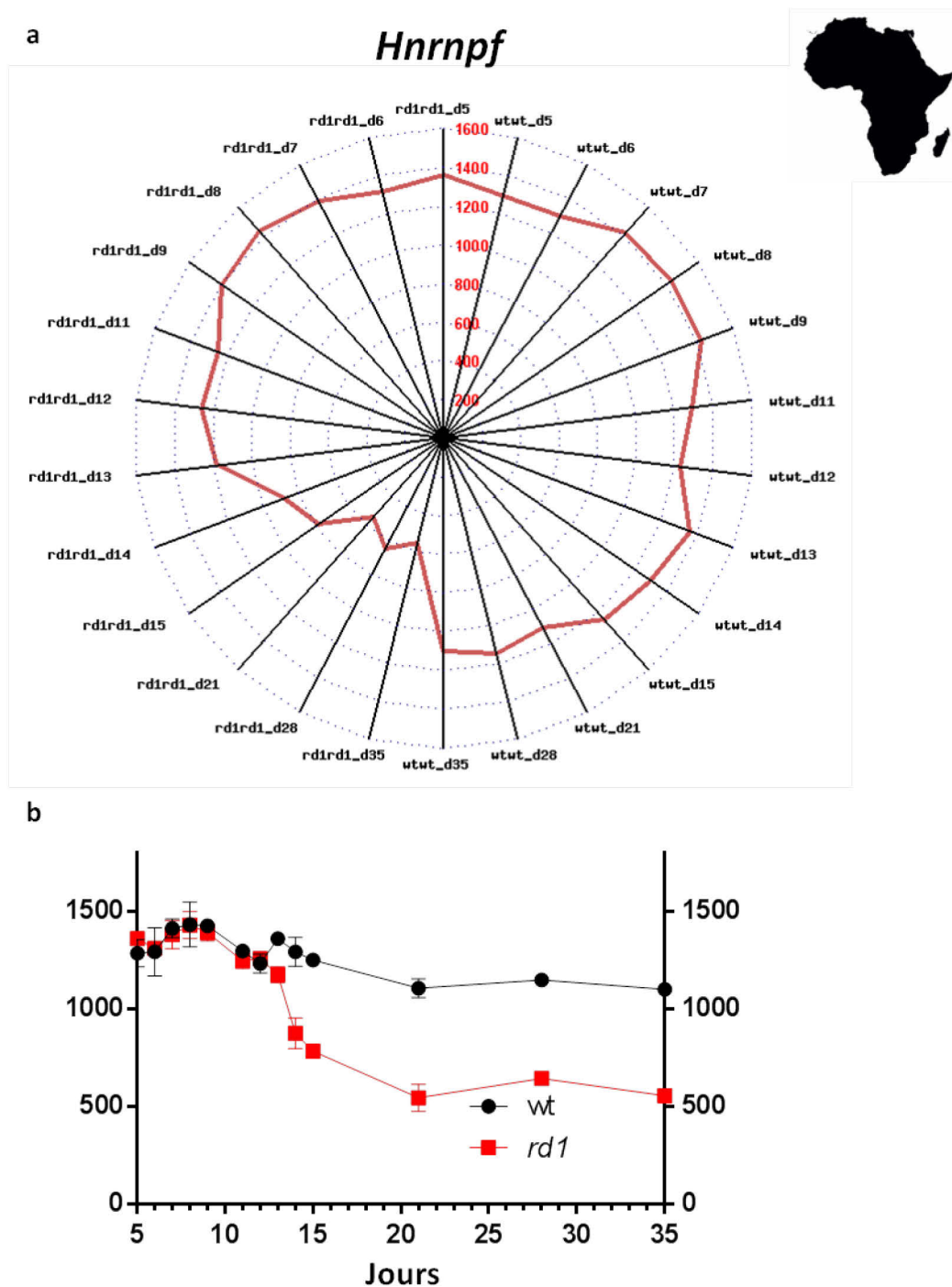


Figure 206: Profil d'expression du gène *Hnrnpf* représenté, a) sous forme de radar, b) sous forme de graphe. L'expression de *Nxn1* dépend de la présence des bâtonnets. Les unités d'expression sont arbitraires mais normalisées par le protocole *Robust Multichip Average* (RMA).

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à ces deux facteurs pour lesquels ces données transcriptomiques ont été vérifiées expérimentalement. Puis les résultats obtenus sont comparés avec l'un des facteurs au profil d'expression de type Rolling stones-like exprimé par conséquent par les cônes. Les facteurs correspondant à ce type de profil d'expression sont Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 (*HnrnpH2*), Polypyrimidine tract-binding protein 3 (*PTBP3/Rod1*), RNA-binding protein Nova-1 (*Nova1*), CUGBP Elav-like family member 4 (*Celf4*) et CUGBP Elav-like family member 5 (*Celf5*) (**Fig. 207**).

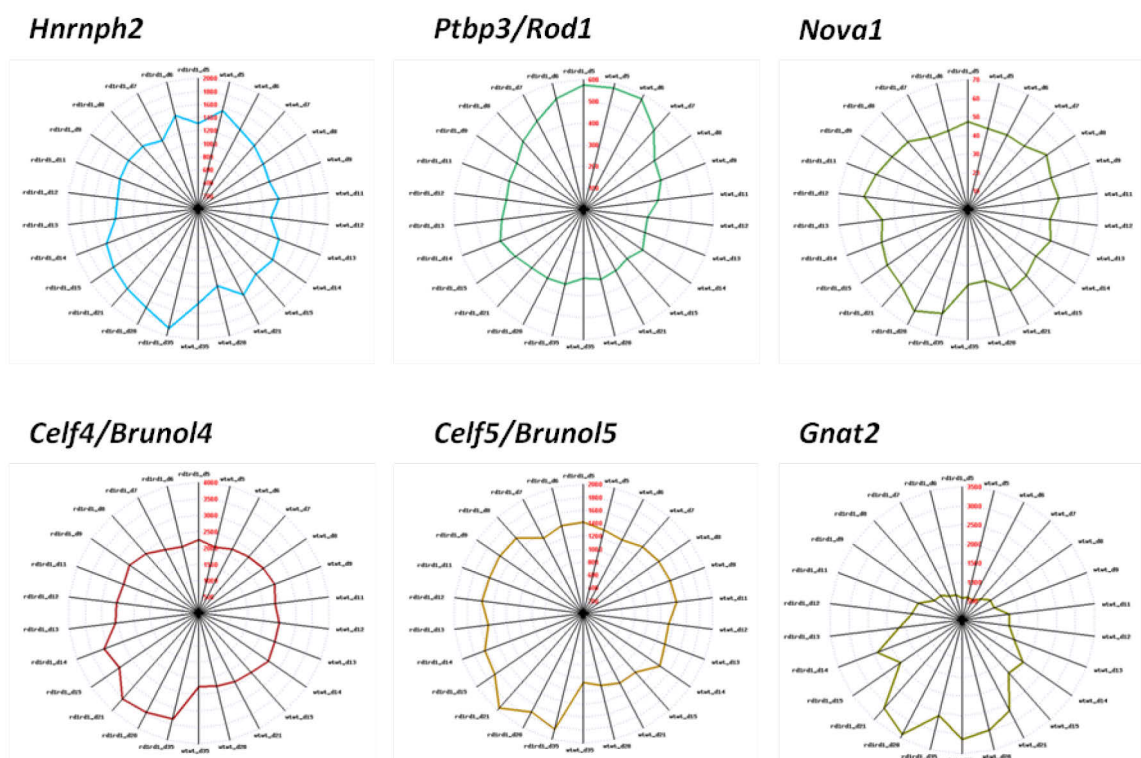


Figure 207: Profil d'expression des gènes Rolling stones-like. L'expression de *Nxn1* dépend de la présence des bâtonnets. Les unités d'expression sont arbitraires mais normalisées par le protocole *Robust Multichip Average* (RMA).

Parmi ces facteurs, *HnrnpH2* dont l'expression est d'environ 1 300 unités arbitraires chez la souris *wt* alors qu'elle est d'environ 1 600 unités arbitraires chez la souris *rd1* à *PN15* et dont l'expression est d'environ 1 450 unités arbitraires chez la souris *wt* et

d'environ 1 690 unités arbitraires chez la souris *rd1* à *PN35* a été choisi comme facteur de comparaison (Fig. 208).

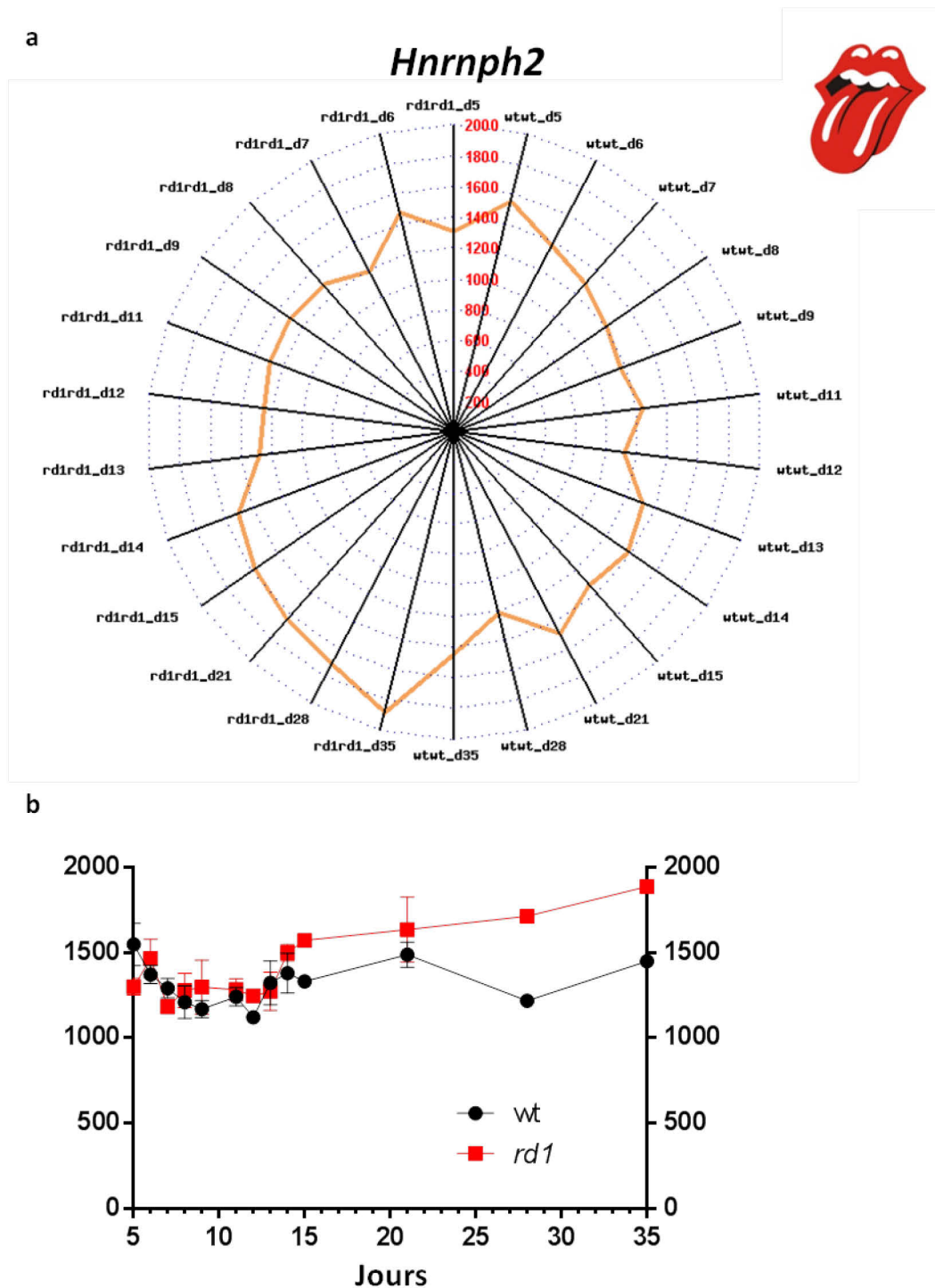


Figure 208: Profil d'expression du gène *Hnrnp2* représenté, a) sous forme de radar, b) sous forme de graphe. L'expression de *Nxn1* dépend de la présence des bâtonnets. Les unités d'expression sont arbitraires mais normalisées par le protocole *Robust Multichip Average* (RMA).

A l'aide d'un *western blot*, nous avons démontré que les trois facteurs, HNRNPF, HNRNPH2 et HNRNPH3 sont exprimés dans la rétine de souris *wt* à PN35. La taille des protéines détectées est en accord avec les données de la base de données Uniprot où HNRNPF à une taille de 45 730 Da, HNRNPH2 de 49 280 Da et HNRNPH3 de 36 869 Da. Cependant, à partir de section au vibratome de rétine de souris (Clérin et al., 2014) qui permettent de séparer la rétine interne, composée des cellules horizontales, bipolaires et amacrines, de la rétine externe composée des photorécepteurs à bâtonnets et à cônes (**Fig. 1**), seul HNRNPF est majoritairement exprimé par les photorécepteurs alors que HNRNPH2 et HNRNPH3 sont plutôt exprimés par les cellules horizontales, bipolaires ou amacrines (**Fig. 209**), c'est pourquoi nous nous focalisons par la suite sur le facteur HNRNPF.

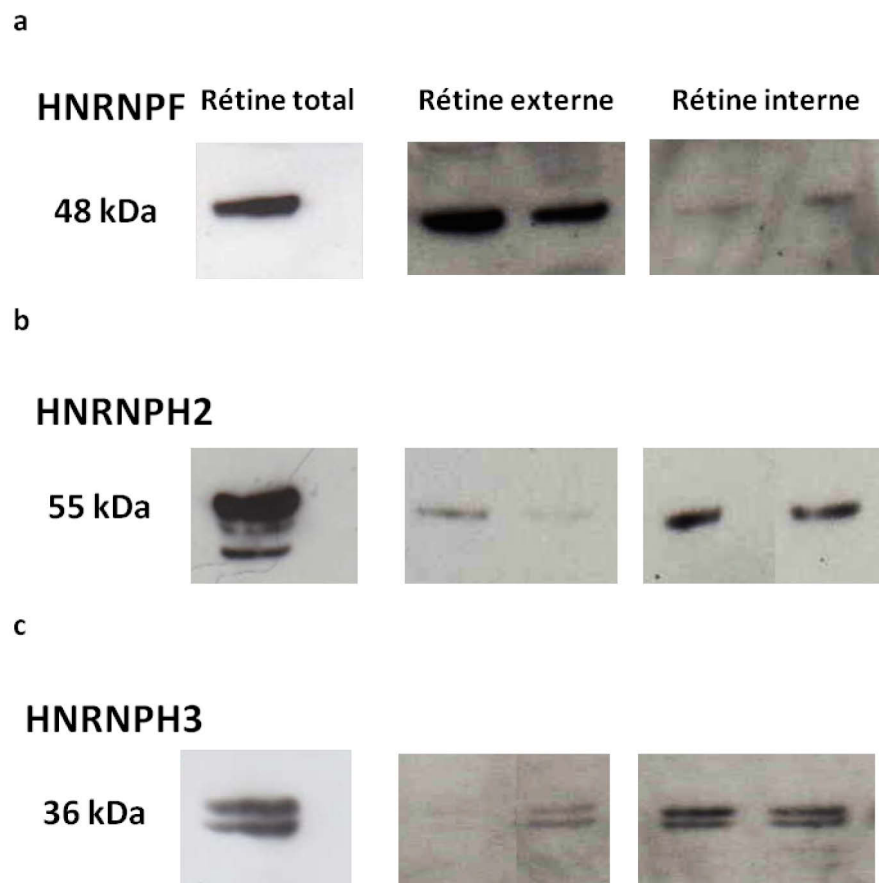


Figure 209: *Western blot* à partir de rétine total de souris *wt* à PN35, de section au vibratome de rétine interne de souris *wt* à PN35, de section au vibratome de rétine externe de souris *wt* à PN35 de a) HNRNPF, b) HNRNPH2 et c) HNRNPH3. Les anticorps utilisés sont, un anti HNRNPF, un anti HNRNPH2 et un anti HNRNPH3.

À partir des mêmes ARNs extraits de la fovéa, de la macula et des 3 régions de la périphérie de la rétine de macaque utilisés pour étudier l'expression du messenger de NCL, nous réalisons une RT-PCR quantitative à l'aide d'amorces spécifiques qui amplifient le gène *Hnrnpf*. L'expression du messenger qui code pour HNRNPF normalisée par le gène qui code pour la GAPDH est plus importante dans la rétine périphérique moyenne et éloignée que dans la rétine périphérique proche ou le centre de la rétine du macaque (**Fig. 210**).

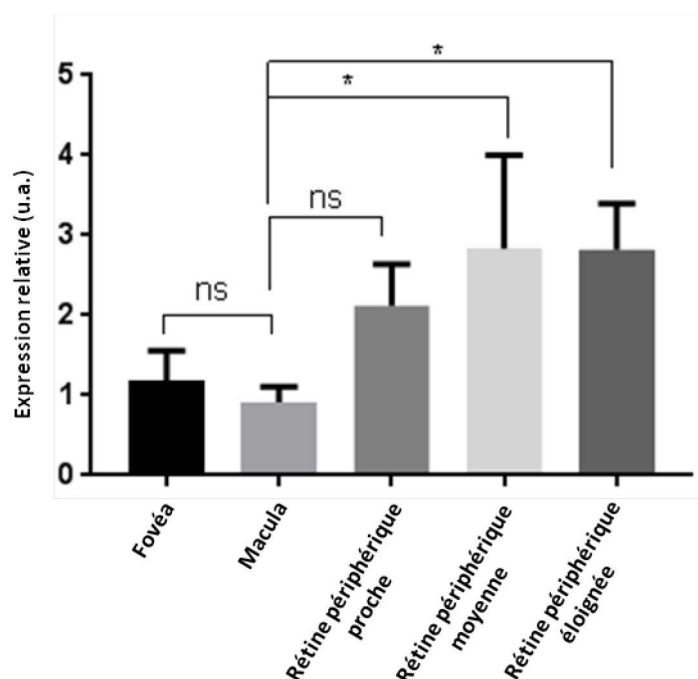


Figure 210: Expression du messenger qui code pour le facteur d'épissage HNRNPF dans les différentes parties de la rétine de macaque. RT-PCR quantitative de l'expression de HNRNPF dans la fovéa, la macula, la rétine périphérique proche, la rétine périphérique moyenne et la rétine périphérique éloignée. u.a.: unité arbitraire.

De la même manière des études d'expressions de *Hnrnpf* sont réalisées à partir des ARN purifiés à partir des sections d'une rétine humaine utilisées pour analyser l'expression du messenger de NCL. Les résultats de cette expérience confirment ceux obtenus à partir de la rétine de macaque, plus nous nous éloignons du centre de la rétine et plus l'expression du messenger de HNRNPF augmente (**Fig. 211**).

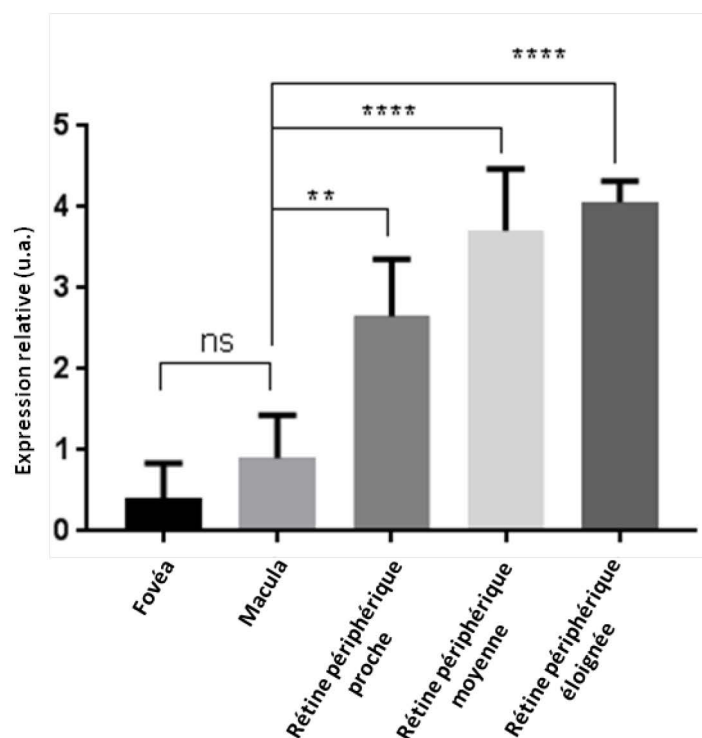


Figure 211: Expression du messenger qui code pour le facteur d'épissage HNRNPF dans les différentes parties de la rétine de l'homme. RT-PCR quantitative de l'expression de HNRNPF dans la fovéa, la macula, la rétine périphérique proche, la rétine périphérique moyenne et la rétine périphérique éloignée. u.a.: unité arbitraire.

Toujours de la même manière, à partir des lysats protéiques extraits de la macula, la rétine périphérique proche, moyenne et éloignée de la rétine de macaque utilisés pour étudier l'expression de NCL, l'expression de HNRNPF est analysée par *western blot*. À partir de ses sections, pour lesquelles nous avons validé et confirmé par *western blot* que la macula était majoritairement composée de cônes alors que les bâtonnets sont présents en périphérie de la rétine de macaque et pas du tout dans le centre, nous montrons que le facteur HNRNPF est plus exprimé par la rétine périphérique proche, moyenne et éloignée que par la macula (**Fig. 212**).

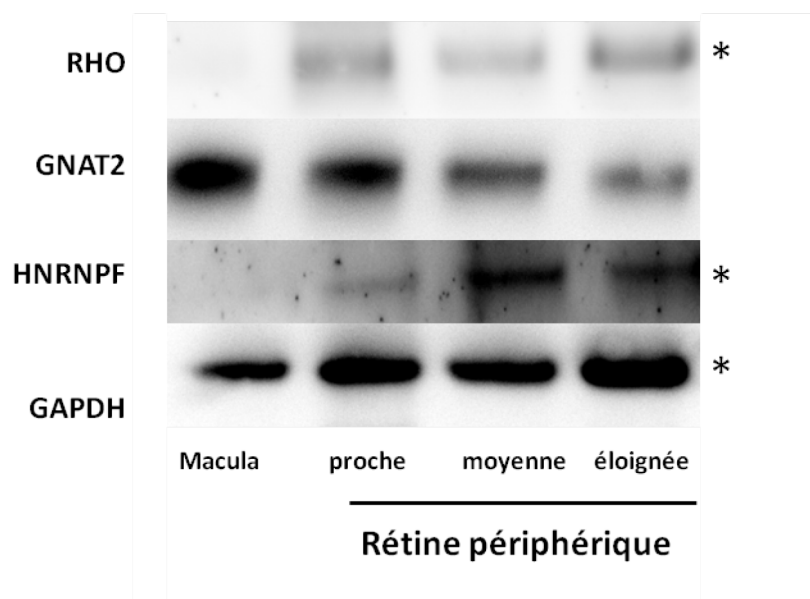


Figure 212: NCL est plus exprimée par la rétine périphérique que par la rétine centrale chez le macaque. *Western blot* de lysats protéiques issus des sections de macula, de rétine périphérique proche, proche moyenne et éloignée. Les anticorps utilisés sont, un anti-Rhodopsine, un anti GNAT2, un anti HNRNPF et un anti GAPDH. * Reproduction de la figure 201.

Les intensités des bandes obtenues par *western blot* relatives à l'expression de HNRNPF ont été quantifiées et normalisées par celles de la GAPDH. Ces résultats indiquent que HNRNPF est 40 fois plus exprimé dans la rétine périphérique moyenne que dans la macula et 20 fois plus exprimé dans la rétine périphérique éloignée que dans la macula (**Fig. 213**).

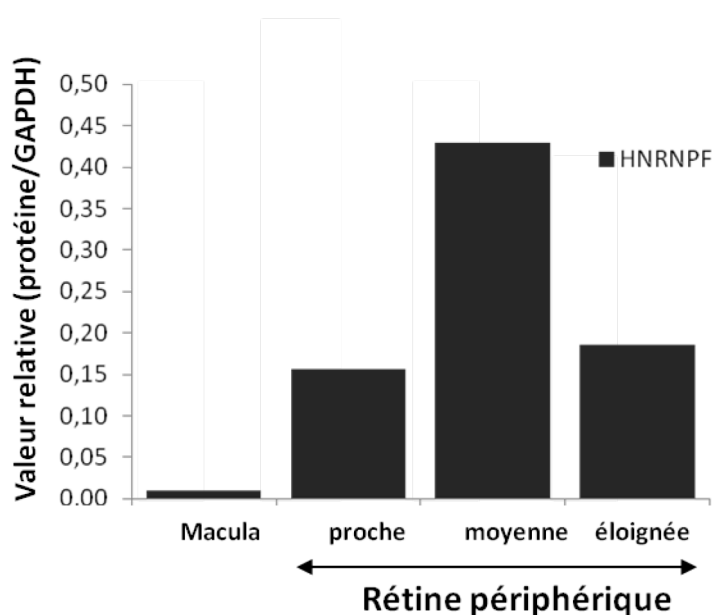


Figure 213: Quantification de l'expression de HNRNPF obtenue en *western blot*.

Ces résultats confirment que HNRNPF est un facteur d'épissage plutôt exprimé par les bâtonnets que par les cônes. *L'ensemble de ces données s'accordent avec un modèle pour lequel le facteur d'inhibition de l'épissage HNRNPF exprimé spécifiquement par les bâtonnets et pas par les cônes, serait directement lié au mécanisme d'épissage alternatif qui par rétention de l'intron permet la production du facteur trophique RdCVF à partir du gène NXNLI. Les cônes exprimeraient uniquement la thiorédoxine RdCVFL du fait du niveau insuffisant d'expression de HNRNPF*

Les deux facteurs RNA-binding proteins (RBPs) NCL et HNRNPF connus pour contrôler les processus post-transcriptionnels comme l'épissage des pré-ARNm, sont essentiellement exprimés par les bâtonnets, cellules dans lesquels l'intron du gène NXNLI est retenu.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1: QUEL EST LA FONCTION DE RDCVF CHEZ L'HYDRE?

Le point commun de toutes les cellules rétiniennes chez les animaux est la présence de l'opsine. Alors que cette molécule photosensible peut être exprimée chez des organismes très simple tel que les archées (ou Archaea qui signifie en grec originel, primitif) (Peck et al., 2017), la détection de la lumière ne signifie pas forcément vision. En effet, la notion de perception est distincte de celle de vision. Une cellule photosensible qui n'est pas connectée à un système nerveux ne permet pas la vision qui correspond à la formation d'une image par un système visuel tel qu'un œil et qui sera ensuite interprétée par un système nerveux. L'hydre avec les méduses, les coraux et les anémones des mers appartient à l'embranchement ou phylum des cnidaires. Cet embranchement avec celui des éponges et des cténophores est plus primitif (ou en terme d'évolution ancestrale) dans l'arbre phylogénétique des animaux que celui des bilatériens (Fig. 214) auquel appartiennent les vertébrés.

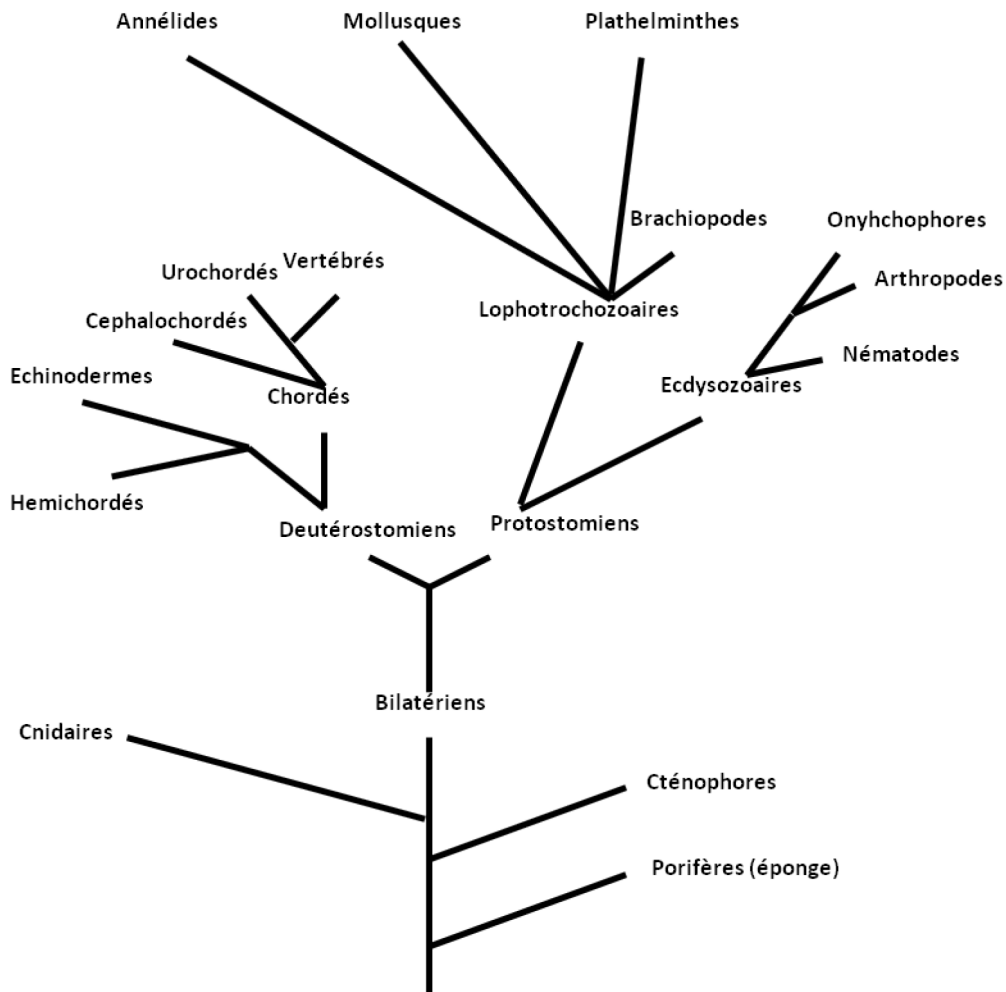


Figure 214: Arbre phylogénétique des animaux. Sont représentés uniquement les principaux embranchements. Adapté du livre la méduse qui fait de l'œil de J.Deutsch; 2017.

Nous avons démontré qu'*Hydra vulgaris* exprime les deux messagers qui codent pour les protéines tronquées RdCVF des deux gènes *hydra Nxnla* et *b*. L'étude de l'expression des messagers *short hydra Nxnla* et *b* indique qu'ils sont plus exprimés dans la tête des hydres que dans leurs pied tout comme l'une des opsine de l'hydre, HmOps2. De manière très intéressante, ces résultats montrent que déjà chez l'hydre qui ne possède pas d'œil les messagers qui codent pour RdCVF suivent un patron d'expression semblable à celui des molécules impliquées dans la vision. Toutefois, les messagers *short hydra Nxnla* et *short hydra Nxnlb* sont significativement moins

exprimé dans l'hydre totale que les messagers *long hydra Nxnla* et *long hydra Nxnla*. C'est pourquoi pour valider ces données clés, d'importance capitale pour la compréhension de l'origine de RdCVF et de sa signalisation, nous avons en complément réalisé des analyses mais pour lesquelles nous n'avons pas encore obtenues les résultats définitifs de *digital PCR* ou PCR numérique. Cette technologie développée récemment permet une quantification ultrasensible et absolue des acides nucléiques et est particulièrement utile pour les cibles de faible abondance. En fonction des résultats de la digitale PCR et si cette dernière confirme l'expression majoritaire des messages *short hydra Nxnla* et *b* dans la tête des hydres, nous prévoyons également de réaliser des hybridations *in situ*. Ces hybridations *in situ* réalisée à l'aide de sondes qui s'hybrideraient spécifiquement dans la région 3' de l'exon n° 4 (dans l'intron n°4) permettront de comparer l'expression de des messages *short hydra Nxnla* et *b* et *long hydra Nxnla* et *b* avec celui qui code pour la HmOps2. Chez l'Homme, *NXNL1* qui est composé de deux exons et d'un intron et code par un épissage alternatif pour deux protéines dont l'une ne possède pas de domaine thiorédoxine entier du fait de la présence d'un codon stop dans son message. En effet, cette enzyme non active est codée par l'intron de ce gène qui est retenu et qui présente un codon stop en phase de lecture. C'est probablement parce que seul un exon est présent en 3' de l'intron retenu que cet ARNm qui comporte un codon stop prématuré n'est pas dégradé par le mécanisme de dégradation des ARNm non-sens plus connue sous le terme *nonsense-mediated decay* (NMD) (Ge and Porse, 2014). Chez *Hydra vulgaris*, les deux gènes *hydra Nxnla* et *b* sont composés chacun de 6 exons et de 5 introns dont le numéro 4 qui est retenu. Cet intron étant suivi de deux exons, l'ARNm transcrit à partir de cet intron devrait être dégradé par le NMD et aucune protéine ne serait traduite. Toutefois, la détection des messagers *short hydraNxnla* et *b* par RT-PCR indique que ces messagers ne sont pas totalement dégradés. RdCVF est exprimé uniquement dans la rétine et joue un rôle de survie des photorécepteurs à cônes chez la souris. Plus précisément, ce facteur trophique est exprimé et secrété par les bâtonnets, pour interagir avec son récepteur BSG1, localisé à la surface des cônes. Dans le cas où les 2 protéines *hydraRdCVFa* et *b* seraient traduites chez l'hydre, quel aurait été leurs rôles ancestraux chez cet organisme qui ne possède pas de système visuel tel que l'œil? A ce stade de mon travail de thèse deux principales hypothèses se dégagent concernant la fonction de ces protéines chez l'hydre. La première s'oriente vers l'idée que RdCVF remplirait une

fonction différente chez cet organisme de celle connue chez les espèces plus développées avec un système visuel plus complexe que celui des hydres. Peut être même une fonction sans lien direct avec la vision ni même la perception. La deuxième hypothèse, certainement la plus probable est que RdCVF chez l'hydre, même si elle est exprimée n'a pas de fonction biologique. Nos résultats qui indiquent qu'*Hydra vulgaris* exprime uniquement une protéine Basigin avec un domaine différent du domaine Ig0 présent dans le récepteur BSG1 et essentiel pour l'interaction avec RdCVF appuie cette deuxième hypothèse. De plus le protéome de l'hydre ne contient aucune protéine avec 3 domaines immunoglobulines dont un qui ressemblerait à un Ig0. Dans les deux cas, il s'agirait d'un exemple d'exaptation moléculaire dont le terme est attribuée au biologiste paléontologue américain Stephen Gould qui insistait sur le rôle du hasard dans l'évolution (Gould, 1972). Dans les études de l'évolution du développement des organismes, aussi nommé Evo-Devo, qui consistent à combiner l'identification, le développement, l'expression et la reconstruction phylogénétique des gènes, l'exaptation moléculaire est un changement imprévu de fonction d'un gène. Gould cite pour exemple le cas de l'aldéhyde déshydrogénase qui selon Montgomery et McFall-Ngai jouait un rôle dans les muscles et qui par la suite a été recrutée pour jouer un rôle essentiellement structural dans le cristallin oculaire du calmar *Euprymna scolopes* (Montgomery and McFall-Ngai, 1992). Cependant, avant de connaître la fonction de ces protéines RdCVF chez l'hydre, il serait intéressant de pouvoir contourner la difficulté rencontrée en spectrométrie de masse qui ne nous a pas permis de conclure sur l'expression de ces protéines. Les messages transcrits par les gènes *hydra Nxnla* et *hydra Nxnlb* après l'épissage des introns n°1, n°2, n°3 coderaient pour des protéines de 102 acides aminés présentant chacune un site catalytique CPPC avec des cystéines en position 38 et 41. RdCVF chez l'Homme est une protéine composée de 109 acides aminés présentant un site catalytique CPQC avec des cystéines en position 44 et 47. Cette intrigante ressemblance entre ces deux protéines chez deux organismes séparés de plus de 600 millions d'années, nous pousse à croire que tout comme RdCVF chez l'Homme cette protéine est également exprimée chez l'Hydre. C'est pourquoi, alors que la première production d'anticorps permettant d'identifier les protéines RdCVF et RdCVFL par *western blot* s'est avérée inefficace et comme la production d'anticorps est connue pour être difficile (Baker, 2015), nous avons décidé d'en faire produire d'autres par une autre entreprise. Ces anticorps qui sont actuellement en cours de production permettraient

également d'identifier les éventuels partenaires de RdCVF par co-immunoprécipitation et ainsi accéder à la fonction de RdCVF chez l'hydre.

2: LA SIGNALISATION DE RdCVF ETAIT-ELLE DEJA EN PLACE CHEZ LA LAMPROIE ?

2.1: LE PATRON D'EXPRESSION DE *NXNL1* ETAIT-IL DEJA RESTREINT A LA RETINE CHEZ LA LAMPROIE?

La lamproie appartient à une ancienne lignée qui a divergée de l'embranchement des vertébrés il y a environ 550 millions d'années. En vertu de cette propriété évolutive intéressante, la lamproie sert de modèle approprié pour étudier et comprendre l'évolution de différentes caractéristiques conservées et dérivées qui sont pertinentes pour de vastes domaines de la biologie. Des résultats de notre équipe publiés en 2004 indiquent que *Nxn11* est uniquement exprimé par la rétine (Fig. 215).

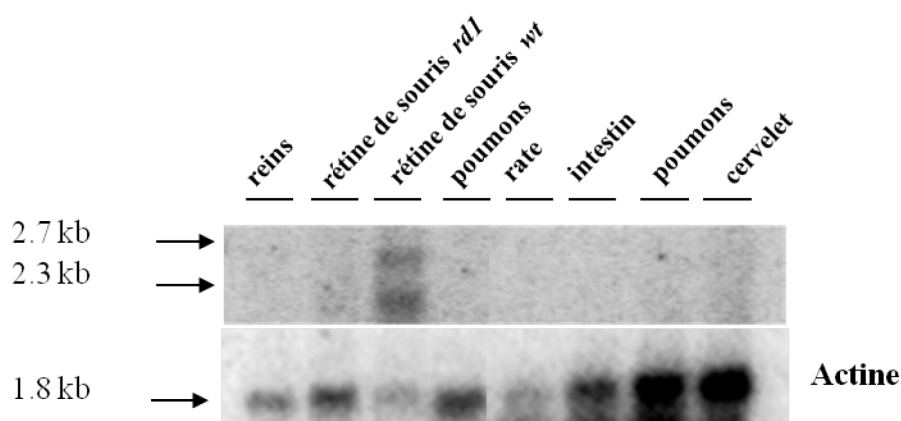


Figure 215: Expression des messagers de *Nxn11* dans différents tissus de souris adulte par *northern-blot*. L'intensité des deux bandes en regard des messagers *short Nxn11* et *long Nxn11* n'a pas été établie.

Ce northern blot indiquent que deux messagers du gène *Nxn1* de souris sont retrouvés dans la rétine de souris sauvage adulte wt alors qu'ils ne le sont pas dans la rétine de souris adulte rd1 qui est un modèle de souris pour laquelle les photorécepteurs à bâtonnets et à cônes ont dégénéré, dans le rein, dans la rate, dans l'intestin, dans les poumons et dans le cervelet de souris. Dans mon travail de thèse, j'ai démontré que tout comme chez la souris, la rétine de lamproie exprime les deux messagers de *Nxn1* et plus précisément que les bâtonnets expriment les deux isoformes alors que les cônes expriment uniquement l'isoforme qui code pour RdCVFL. Est-ce que la restriction de l'expression de ce gène à la rétine est apparue avec la lamproie ou est-ce que chez cet organisme le patron de ce gène n'est pas si restrictif et est retrouvé dans d'autres tissus ? Pour répondre à cette question, j'ai disséqué et récupéré un échantillon du cerveau, du cœur, du muscle et de l'EPR de lamproie lorsque je me suis rendue pour la deuxième reprise à UCLA dans le laboratoire de Gordon Fain. À l'aide des amorces utilisées pour étudier l'expression de l'isoforme short *Nxn1* et long *Nxn1* dans la rétine de lamproie, je vais ainsi étudier l'expression de ces mêmes isoformes dans les tissus collectés.

2.2: LE GÈNE *BASIGIN* CODAIT-IL DÉJÀ POUR DEUX ISOFORMES CHEZ LA LAMPROIE ?

Depuis 2009, il est connu que le génome de la lamproie subit une restructuration physique durant son développement appelé réarrangement programmé du génome ou programmed genome rearrangement (PGR) qui peut entraîner l'élimination physique d'environ 0,5 Gb d'ADN de son génome de 2,3 Gb. Les événements d'élimination qui interviennent dans la PGR sont initiés à partir de la 7^{ème} division cellulaire embryonnaire et se terminent essentiellement 3 jours après la fécondation. En conséquence, les cellules germinales des lamproies possèdent l'ensemble complet des gènes alors que toutes les autres cellules ne possèdent qu'une fraction plus petite du génome. Avant la découverte du PGR chez la lamproie, tous les efforts de séquençage se sont concentrés sur les tissus somatiques, c'est pourquoi le génome de ces cellules est relativement bien caractérisé alors que seule une fraction du génome de la lignée

germinale a été séquencée. Depuis, de plus en plus d'études, dont la dernière date de 2018 (Smith et al., 2018), s'intéressent au séquençage de ces cellules dans le but d'établir l'assemblage du génome germinale de la lamproie marine afin d'apporter des améliorations significatives dans la compréhension de l'évolution des génomes des vertébrés et des aspects fondamentaux de la neurobiologie, de l'immunité et du développement des vertébrés. Malheureusement ces nouvelles données générées n'apportent aucune information complémentaire concernant la région 5'UTR du gène basigin qui nous permettrait d'étudier l'éventuelle expression de l'autre isoforme de ce gène, BSG2 qui n'est pas le récepteur de RdCVF. Ces données ne fournissent pas non plus d'information complémentaire concernant le gène *Nxn1* chez la lamproie. De plus, sachant que les analyses de séquençage nouvelle génération tel que le séquençage Illumina s'avèrent particulièrement coûteuses, la solution la moins onéreuse pour contourner nos difficultés à obtenir un recouvrement complet du gène basigin et *Nxn1* chez la lamproie est certainement de réaliser un séquençage partiel du génome de lamproie en nous focalisant sur les seules régions de ces gènes. Nous envisageons donc d'élaborer un plan d'action avec l'institut de biologie François Jacob. Le gène *Nxn1* est exprimé chez la lamproie sous forme de deux messagers par un épissage alternatif. Le messager qui code pour RdCVF est exprimé lorsque l'intron du gène est retenu et celui qui code pour RdCVFL est exprimé lorsque l'intron est retiré par épissage. L'épissage de ce gène est alternatif dans les bâtonnets de rétine de lamproie alors qu'il est constitutif dans les cônes. Le récepteur BSG1 est exprimé dans la rétine de lamproie et nous avons démontré par un essai fonctionnel que RdCVF de lamproie peut interagir avec ce récepteur. Il semble donc que de nombreux acteurs de la signalisation de RdCVF soient déjà présents chez cet organisme. Est-ce que la signalisation de RdCVF étant déjà en place chez cette espèce il y a plus de 450 millions d'années ? Des travaux qui datent de 1979 indiquent que les segments externes des cônes de lamproie sont phagocytés par l'EPR (Dickson and Graves, 1979). Comment ces segments externes sont ils renouvelés chez la lamproie? Est-ce que le mécanisme d'action de RdCVF chez la lamproie est semblable à celui de RdCVF chez la souris ? RdCVF de lamproie est-il exprimé, secrété par les bâtonnets dans la rétine pour interagir avec son récepteur à la surface des cônes pour les maintenir en vie? Est-ce que le complexe formé RdCVF/BSG1 interagit avec un transporteur du glucose pour encourager le

renouvellement des segments externes des cônes et ainsi favoriser leur maintien ? En l'état actuel des travaux de ma thèse, nous pouvons simplement proposer un modèle.

3. *NXNLI* EST-IL SPECIFIQUEMENT EXPRIME PAR LES PHOTORECEPTEURS CILIAIRES?

3.1 : *NXNLI* EST-IL EXPRIME SPECIFIQUEMENT PAR LA RETINE DISTALE DES SAINT-JACQUES, RETINE COMPOSEE DE PHOTORECEPTEURS CILIAIRES ?

Selon Eakin, il existe deux types de photorécepteurs, les ciliaires, pour lesquels le segment externe est issu du cil et les rhabdomériques pour lesquels le segment externe est issu de microvillosités apicales (Eakin, 1965; RM Eakin and JL Brandenberger, 1980). De manière générale, les deutérostomiens possèdent des photorécepteurs de type ciliaires alors que les protostomiens sont plutôt dotés de photorécepteurs rhabdomériques (**Fig. 216**).

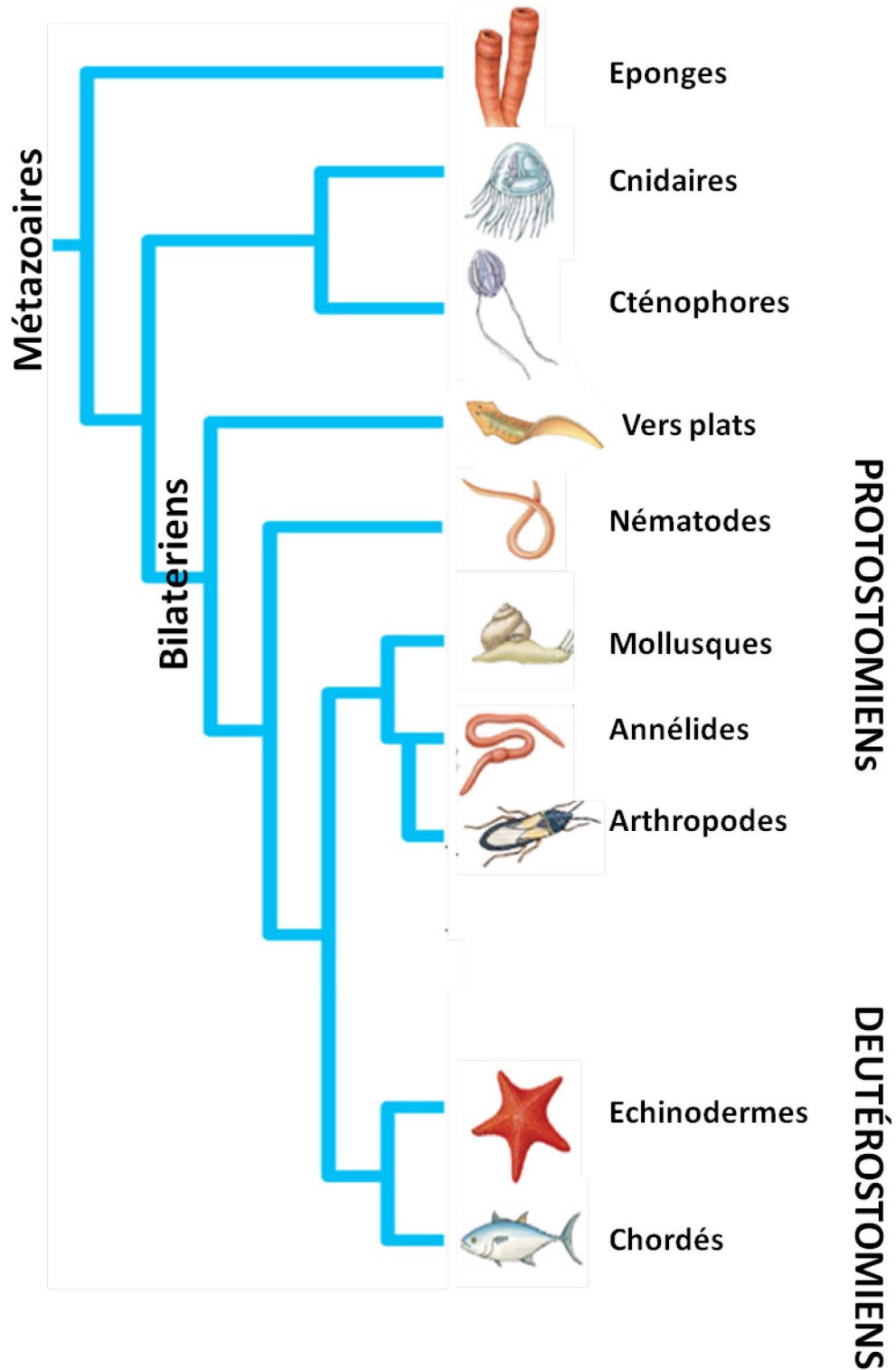


Figure 216: Protostomien et deutérostomien

Cependant il existe de rares organismes chez lesquels les deux types de photorécepteurs sont retrouvés tel que l'amphioxus (Lacalli, 2004) qui appartient aux deutérostomiens et

la coquille Saint-Jacques (V. C. Barber, 1966; McReynolds and Gorman, 1970b) qui appartient aux protostomiens. La drosophile qui fait parti des arthropodes (animaux à cuticule dure et membres articulés) qui est le plus grand des embranchements car il est celui qui contient le plus grand nombre et la plus grande diversité des espèces, possède deux types de photorécepteurs rhabdomériques qui expriment des molécules d'opsines distinctes. La première catégorie de photorécepteurs R7/R8 sont entourés par la deuxième catégorie de photorécepteurs R1, R2, R3 R4, R5 et R6 qui expriment l'opsine RH1 dans l'ommatidie constituant la structure unitaire de l'œil de drosophile et typique des yeux des arthropodes (Fig. 217).

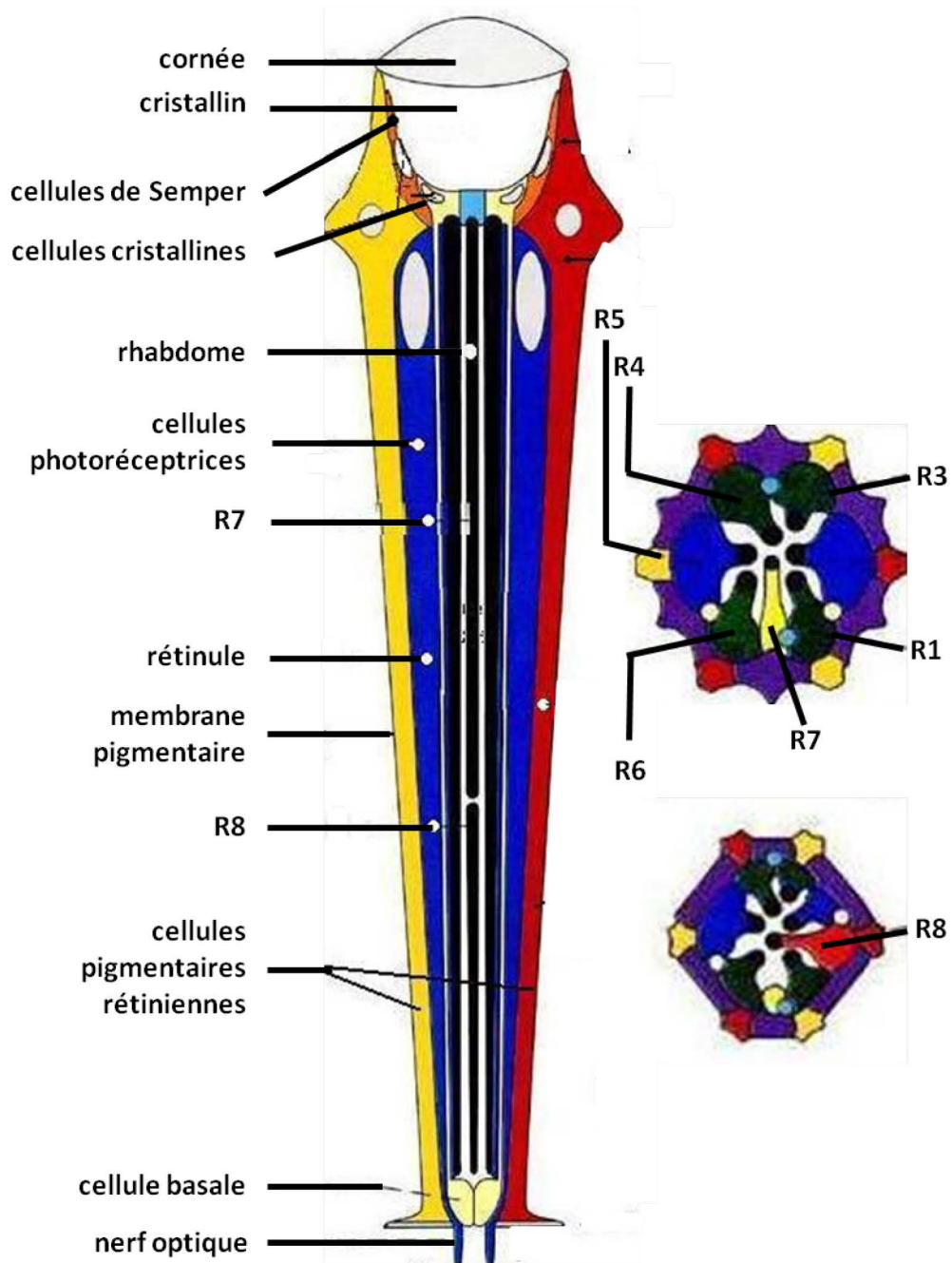


Figure 217: Schéma en coupe d'une ommatidie.

Chez le model transgénique de rétinopathie pigmentaire de la drosophile, les photorécepteurs R1 à R6 dégènèrent suite aux effets de la mutation dominantes du gène *Rhl* alors que les photorécepteurs R7 et R8 restent vivants (Galy et al., 2005). Cela implique qu'il n'existe pas de molécules produites par R1 à R6 pour maintenir en vie R7 et R8, tel que le facteur trophique RdCVF produit par les bâtonnets pour maintenir

les cônes en vie chez les mammifères. De plus, des recherches dans les bases de données de l'existence d'un tel gène chez cet organisme ne donnent aucune réponse. Enfin, les études de Yosuke Funato et Hiroaki Miki ont démontrées la présence du gène *Nucleoredoxin* chez de nombreuses espèces mais pas chez la drosophile (Funato and Miki, 2007). En conséquence, RdCVF n'est pas produit par les photorécepteurs rhabdomériques et *Nxn11* n'est pas exprimé dans les rétines composées de ce type de photorécepteurs. Dans mon étude j'ai analysé l'expression de *Nxn11* chez l'hydre, un métazoaire de la famille des cnidaires et chez la lamproie, chordé appartenant à l'embranchement des deutérostomiens. Nous souhaitons pour la suite étudier l'expression de ce gène chez un organisme appartenant à la famille des protostomiens et pour cela nous décidons de nous intéresser à la coquille Saint-Jacques. De plus, cet organisme connu pour posséder les deux types de photorécepteurs, ciliaires et rhabdomériques nous permettra de réaliser une étude comparative et peut être de confirmer l'hypothèse selon laquelle le gène *Nxn11* n'est pas exprimé par les photorécepteurs rhabdomériques. La coquille Saint-Jacques possède environ 200 yeux de 1 mm de diamètre (**Fig. 218**), chacun composé d'une cornée, d'une lentille faiblement réfractive, de miroirs concaves et de manière très originale d'une double couche de rétine.

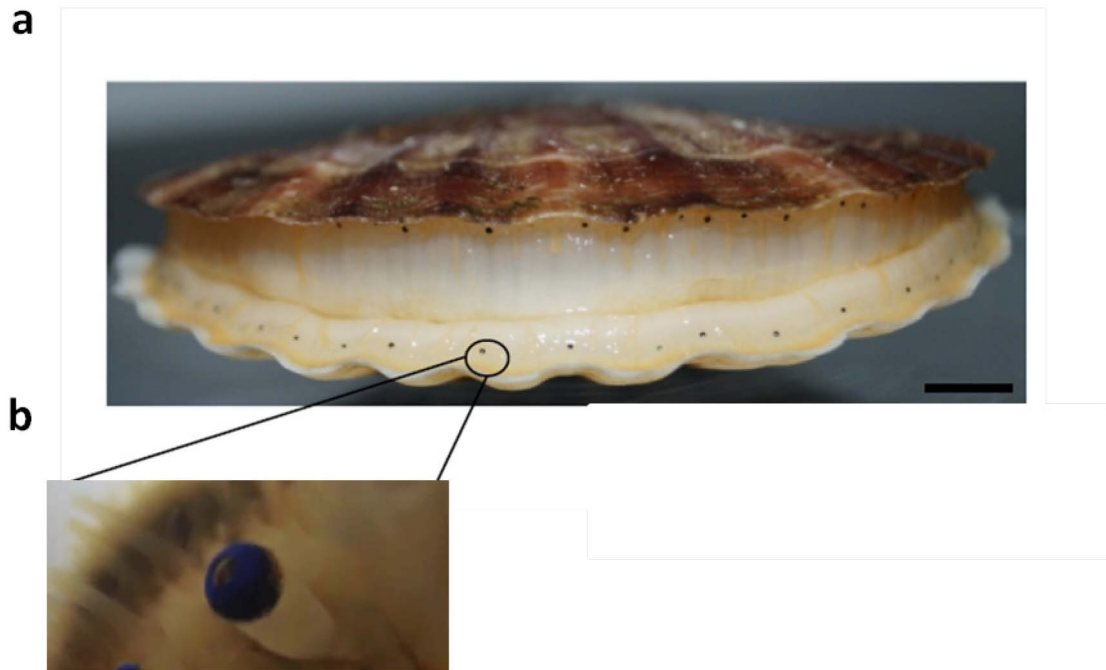


Figure 218: Coquille Saint Jacques. a) Coquille Saint Jacques entière où les yeux sont clairement identifiables. b) Oeil de Saint Jacques agrandie 40 fois.

La partie supérieure dite rétine distale est composée de photorécepteurs ciliés présentant une morphologie similaire à celle des vertébrés tandis que la rétine inférieure dite proximale est composée de photorécepteurs rhabdomériques similaires à ceux des protostomiens telle que la drosophile (Palmer et al., 2017). En réalisant des recherches, nous avons identifié un seul projet d'étude pour l'espèce *Patinopecten yessoensis* et 3 projets d'analyse de transcriptome pour l'espèce *Pecten maximus*, dont un à l'université de Brest. Nous sommes donc entrés en contact dans un premier temps avec Sébastien Artigaud du laboratoire des sciences et de l'environnement marin à l'université de Bretagne Occidentale afin de rechercher bio-informatiquement des informations concernant *Nxn11* dans le transcriptome de cette espèce. Malheureusement, les animaux utilisés pour réaliser le transcriptome étant jeunes, âgés de moins d'un an, les yeux n'ont pas été isolés. Le manteau entier de cet animal a été utilisé pour cette analyse. Nous n'avons obtenus aucune information intéressante concernant l'expression de *Nxn11* chez *Pecten maximus*. Une autre équipe italienne a également réalisé des études plus

approfondies de transcriptomique à partir de coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* (Pauletto et al., 2014) dont les données de ce travail sont analysables sur la base de données du NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA222492>). Mais encore une fois, aucune information concernant *Nxn11* n'est retrouvée à partir de ces données d'expression. Toutefois, les analyses des données issues du séquençage du génome de la coquille Saint-Jacques *Patinopecten yessoensis* réalisé par une équipe chinoise (Wang et al., 2017) nous a cette fois permis d'identifier le gène *Nxn11* chez cette espèce. C'est parce que de nombreuses données génomiques d'espèces appartenant aux deutérostomiens et à la grande famille des protostomes tels que les arthropodes sont disponibles et que au contraire très peu de génome sont séquencés pour les mollusques et annélides que cette équipe a pu établir le transcriptome de *Patinopecten yessoensis*. Cette analyse a permis de mettre en évidence la cascade de phototransduction et l'existence d'une grande diversité d'opsines chez cet organisme. Alors que les coquilles Saint-Jacques sont retrouvées partout dans les océans, *Patinopecten yessoensis* vie dans les fonds des océans stables et froids au nord ouest du Pacifique. Après une longue et laborieuse recherche, nous les avons finalement trouvées dans un marché au poisson de Tokyo au Japon. L'étude de l'expression du gène *Nxn11* et plus spécifiquement la comparaison de l'expression de ce gène par hybridation *in situ* dans les deux rétines des yeux de Saint-Jacques pourrait nous confirmer l'hypothèse que nous avons émise suite aux études menées chez la drosophile. En effet William Miller, un biologiste américain a découvert en 1958 que les cellules photoréceptrices de la rétine distale de la Saint-Jacques étaient de type ciliaire alors que celle de la rétine proximale étaient de type rhabdomériques (Miller, 1958). Afin d'obtenir des yeux de ces Saint-Jacques nous sommes alors entré en contact avec Masayo Takahashi du Riken Center for Developmental Biology à Kobe pour obtenir des échantillons et établir une collaboration. Cette dernière, nous a alors dirigé vers Akihisa Terakita du Department of Biology and Geosciences à Osaka qui nous a fournit des coupes d'œil fixé ainsi que des tissus pour réaliser en parallèle des analyses de RT-PCR.

3.2: EXISTE-IL UNE INTERACTION ENTRE RdCVF ET LE RECEPTEUR BSG 1 DE LA SAINT-JACQUES?

De manière très intéressante, l'analyse des données issues du génome de la coquille Saint-Jacques *Patinopecten yessoensis* réalisée par Wang et al. indique également que cet organisme exprime une isoforme de Basigin qui présente trois domaines immunoglobulines. Est-ce que le troisième domaine Ig de cette protéine correspond au domaine Ig0 qui permet l'interaction entre RdCVF et son récepteur BSG1? Est-ce que l'existence d'une protéine réceptrice de RdCVF (BSG1) a précédé l'apparition de la lamproie et qu'il n'est pas contemporain de l'apparition des batonnets? Pour répondre à ces questions des études d'interaction entre RdCVF et BSG1 de Saint-Jacques vont être réalisées. Une construction plasmidique qui code pour la protéine de fusion AP-GFP-Pecten RdCVF de Saint-Jacques est construite ainsi qu'une construction plasmidique qui code pour BSG de Saint-Jacques (Fig. 219).



Figure 219: Représentation schématique de l'insert qui code pour AP-GFP-Pecten RdCVF.

4. LE FACTEUR D'ÉPISSAGE HNRNPF ET NCL SONT-ILS IMPLIQUÉS DANS L'ÉPISSAGE DE *NXNL1*?

4.1 : LE FACTEUR HNRNPF EST-IL IMPLIQUÉ DANS L'ÉPISSAGE D'AUTRES GENES ?

L'isoforme *Bsg1* code pour la protéine BSG1 qui présente un domaine additionnel extracellulaire Ig0 qui est le récepteur de RdCVF est spécifiquement exprimée par les photorécepteurs alors que l'isoforme *Bsg2* code pour la protéine BSG2 qui ne possède pas de domaine Ig0 et dont l'expression n'est pas restreinte à la rétine. Dans le but d'étudier les effets sur la vision de la délétion de l'isoforme *Bsg1* chez la souris et sachant que la souris *Bsg*^{-/-} n'est pas viable, nous avons construit la souris *Bsg1*^{-/-}. Le gène *Basigin* est composé de 8 exons et de 7 introns (**Fig. 220a**).

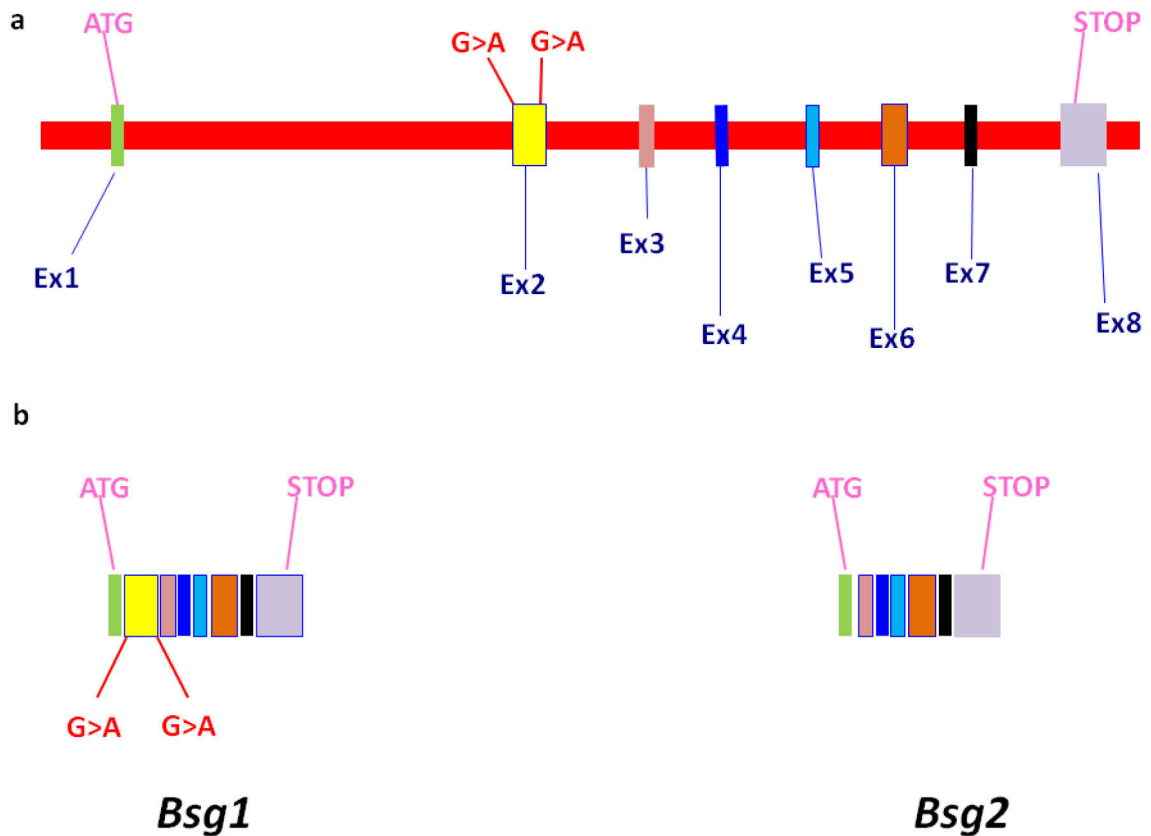


Figure 220: Epissage alternatif du gène *basigin* chez la souris. **a)** Représentation schématique du gène *basigin*. **b)** Représentation schématique des deux isoformes *Bsg1* et *Bsg2*.

Lorsque l'épissage permet le retrait de tous les introns et la jonction des 8 exons, alors c'est l'isoforme *Bsg1* qui est exprimé et lorsque l'épissage permet le retrait de l'exon n°2 et la jonction de tous les autres exons alors c'est l'isoforme *Bsg2* qui est exprimée (Fig. 220b). La stratégie que nous avons adoptée pour construire cette souris est d'introduire deux codons stop en phase de lecture dans l'exon n°2 qui code spécifiquement pour le domaine Ig0 de BSG1 dans le but d'empêcher l'expression de la protéine BSG1. Dans les deux cas, les mutations consistent à remplacer un G par un A, remplaçant ainsi les codons TGG par les codons stop TGA. L'épissage alternatif de ce gène entraîne l'expression de l'isoforme *Bsg1* de l'isoforme *Bsg2*, cependant, l'isoforme *Bsg1* ne peut être traduite en protéine fonctionnelle de part la présence des deux codons dans son message. Des expériences préliminaires d'immunohistochimies à

partir de coupes de rétine indiquent que les souris *Bsg1*^{-/-} présentent un amincissement de la couche des photorécepteurs (Fig. 221).

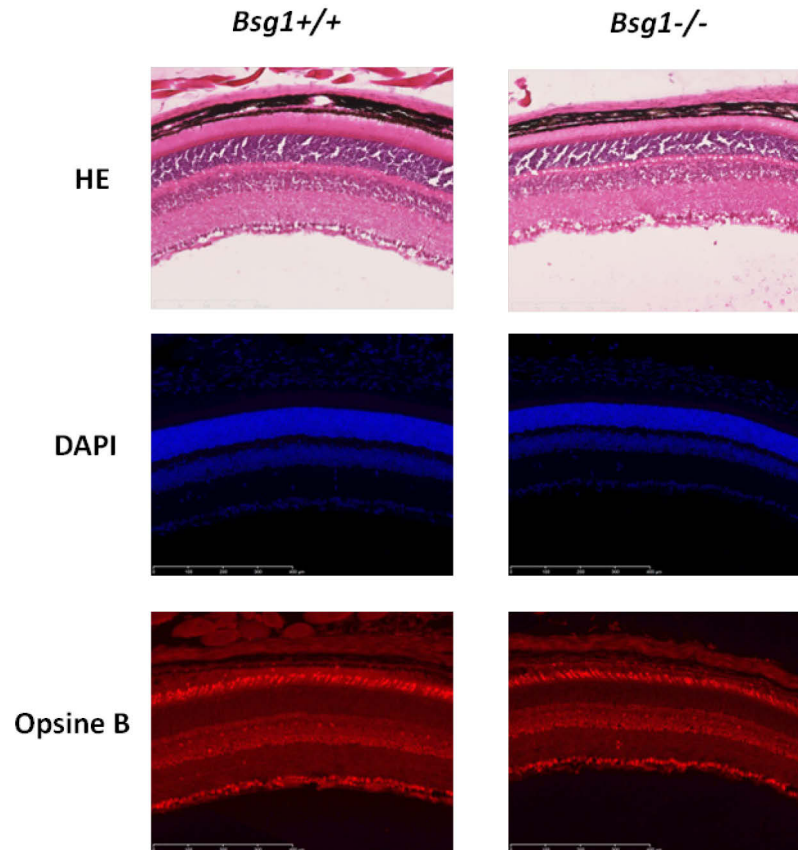


Figure 221: Immunohistochimies à partir de coupes de rétine de souris *Bsg1*^{+/+} et *Bsg1*^{-/-}. HE: hématoxyline éosine, colorant nucléaire qui permet de distinguer les cellules d'un tissu. DAPI: marqueur des noyaux. Opsine B: marquer des cônes.

Avant de débiter ce nouveau projet financé par un grant européen INFRAFRONTIER-I3 qui consiste à étudier le phénotype visuel de cette souris *Bsg1*^{-/-}, des premières expériences de western blot à partir de lysats protéiques issues de rétines des souris *Bsg1*^{-/-} ont été réalisées. Alors que nous attendions à ce que seul le produit BSG2 soit traduit, nous observons que ni BSG1 ni BSG2 ne sont exprimées chez cette souris *Bsg1*^{-/-} (Fig. 222).

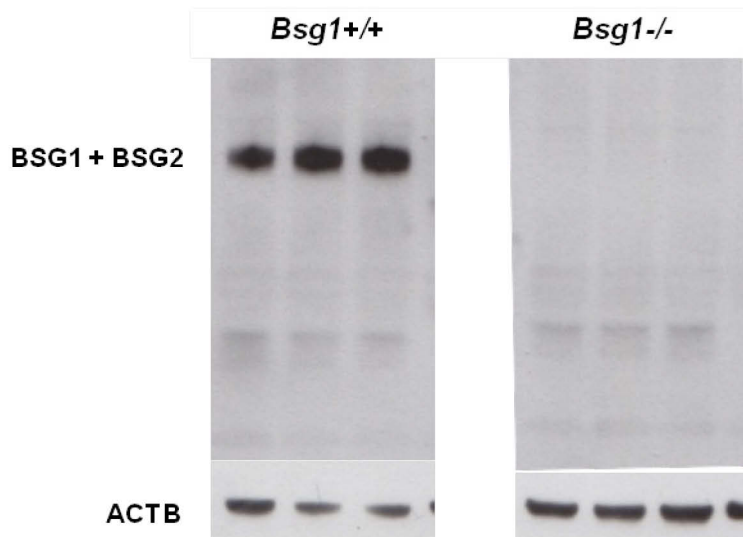


Figure 222: Expression des protéines BSG1 et BSG2 chez les souris *Bsg1*^{+/+} et *Bsg1*^{-/-}.

Pour tenter de comprendre ces résultats surprenants j'ai vérifié l'expression des deux isoformes Bsg1 et Bsg2 dans la rétine de ces souris *Bsg1*^{-/-} et effectivement de manière très surprenante, alors que nous nous attendons au même niveau d'expression des deux isoformes dans ce tissu, nos résultats indiquent que l'isoforme Bsg1 est plus exprimée dans la rétine des souris *Bsg1*^{-/-} que l'isoforme Bsg2 (Fig. 223).

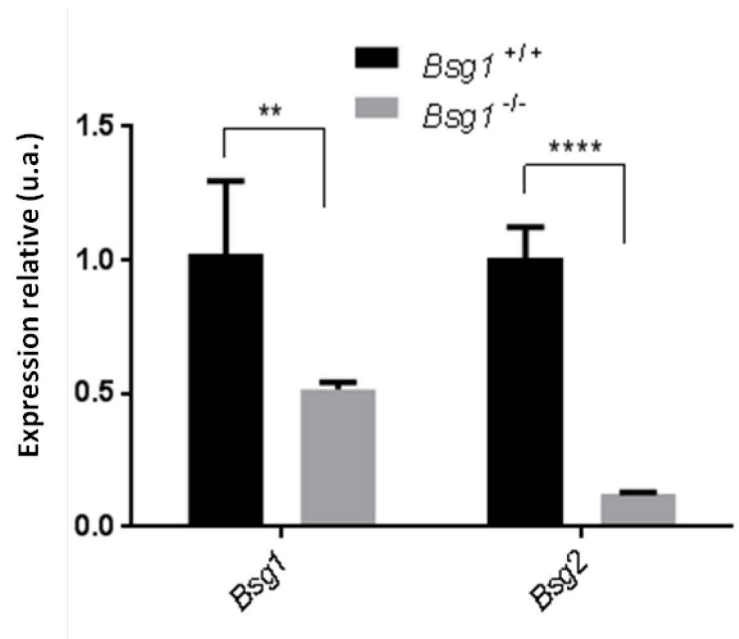


Figure 223: Expression relative de l'isoforme l'isoforme *Bsg1* et de l'isoforme *Bsg2* dans la rétine de souris *Bsg1*^{-/-}.

Nous avons alors étudié l'expression de ces deux isoformes dans l'EPR de ces souris dans lesquels l'isoforme *Bsg1* n'est normalement pas exprimée. De manière tout aussi surprenante les résultats obtenus sont complètement en contradiction avec ceux attendus. L'isoforme *Bsg1* dans le EPR de ces souris *Bsg1*^{-/-} est exprimée alors que l'isoforme *Bsg2* ne l'est plus (**Fig. 224**).

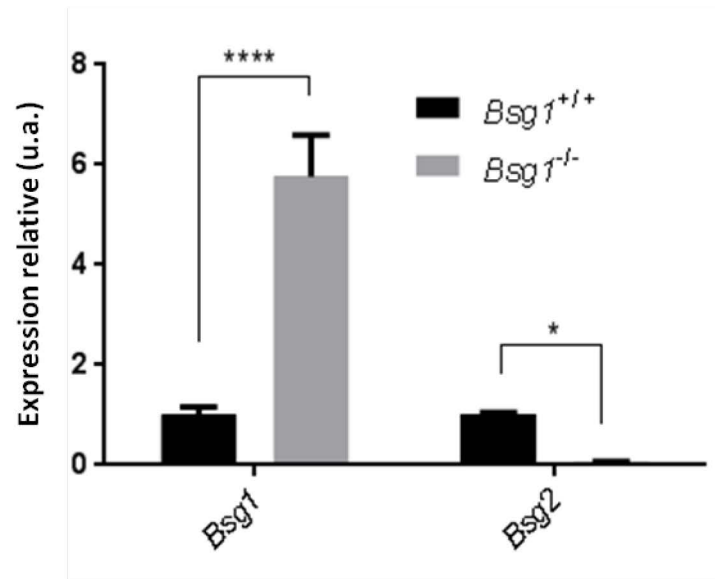


Figure 224: Expression relative de l'isoforme l'isoforme *Bsg1* et de l'isoforme *Bsg2* dans la l'EPR de souris *Bsg1*^{-/-}.

L'analyse de la séquence de l'exon n°2 du gène Basigin par le logiciel SpliceAid 2 qui permet d'identifier les sites cibles de facteurs d'épissage localisés dans une séquence d'ARN, indique que le premier codon stop a été introduit juste dans un site de fixation du facteur d'inhibition d'épissage HNRNPF, alors que le deuxième codon stop a été introduit dans le site de fixation du facteur d'inhibition d'épissage HNRNPH3 (**Fig.**

225).

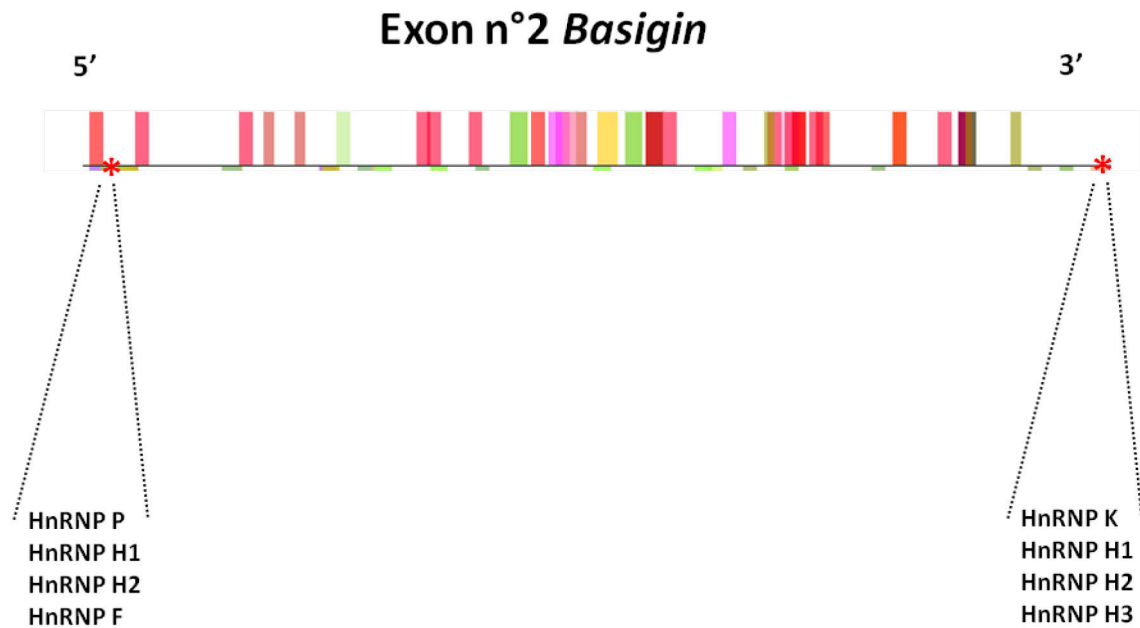


Figure 225: Site de fixation des facteurs d'épissage sur l'exon 2 du gène *Basigin*. Les * en rouge représentent les deux mutations introduites pour générer des codons stop. Les rectangles colorés représentent les motifs cibles des facteurs d'épissage. Les facteurs localisés au dessus de la ligne sont les activateurs et en dessous les inhibiteurs.

Les codons stop avaient levés l'inhibition de l'épissage alternatif, conduisant principalement à l'expression du messenger Bsg1 par destruction des sites de liaison des facteurs d'épissage HNRNPF et H3. Plus particulièrement, HNRNPF ne peut plus se fixer, l'épissage du gène *Basigin* a lieu systématiquement entraînant l'expression unique de l'isoforme Bsg1 au profit de celle de l'isoforme Bsg2. Toutefois, l'absence de déficit sévère de cette souris Bsg1^{-/-}, rapporté par la plateforme de phénotypage MRC (Medical Research Council) Harwell dans un compte rendu complet et détaillé par rapport à celui rapportée pour la souris Bsg^{-/-} (qui est partiellement létale) (Muramatsu, 2016) suggère que la redirection de l'épissage de l'isoforme Bsg2 au profit de l'isoforme Bsg1 ait lieu dans l'EPR mais pas dans d'autres tissus essentiels à la survie de l'animal. A moins que l'expression résiduelle du messenger Bsg2 qui ne porte pas le codon stop produise une quantité suffisante de protéine BSG2 dans les tissus essentiels

à la survie de l'animal. Afin de vérifier cette hypothèse et d'étudier l'expression de ces deux isoformes nous avons récolté des tissus de cerveau, de testicule, de rein, de cœur, de col de l'utérus que nous allons analyser. Il est intéressant de noter que l'inclusion de l'exon 2 ne résulte pas de l'action d'un facteur positif dans les photorécepteurs, mais de l'absence d'action d'un facteur négatif dans l'EPR. De la même manière ce facteur semble être absent dans les cônes, empêchant l'inhibition de l'épissage de NXNL1 et l'expression de l'isoforme short Nxn1 responsable de l'expression de RdCVF. Le facteur HNRNPF peut être impliqué dans l'épissage de basigin.

4.2 : HNRNPF SE LIE T-IL A L'ELEMENT NRE ?

Les plasmides ORFp624 présentant des mutations dans le NRE ont été construits pour étudier l'influence de la perturbation de sa structure secondaire sur l'expression de la protéine RdCVF 17 kDa. Nous avons constaté que les mutations qui perturbent cette structure secondaire du NRE (CU23GA et G38C) inhibent l'expression de la protéine à 17 kDa mais que les mutations compensatoires (GG38UC et U24G) ne restauraient pas son expression. Notre interprétation a donc été que c'est la séquence nucléotidique du NRE qui est importante pour l'expression de RdCVF 17 kDa et non uniquement sa structure secondaire. Nous avons donc analysé *in silico* les éléments de fixation des facteurs d'épissage dans cette région et ce que les mutations pouvaient perturber et nous observons que les mutations perturbent toutes les éléments de fixation des inhibiteurs de l'épissage HNRNPH1, HNRNPH2, HNRNPH3 et HNRNPF (**Fig. 226**).

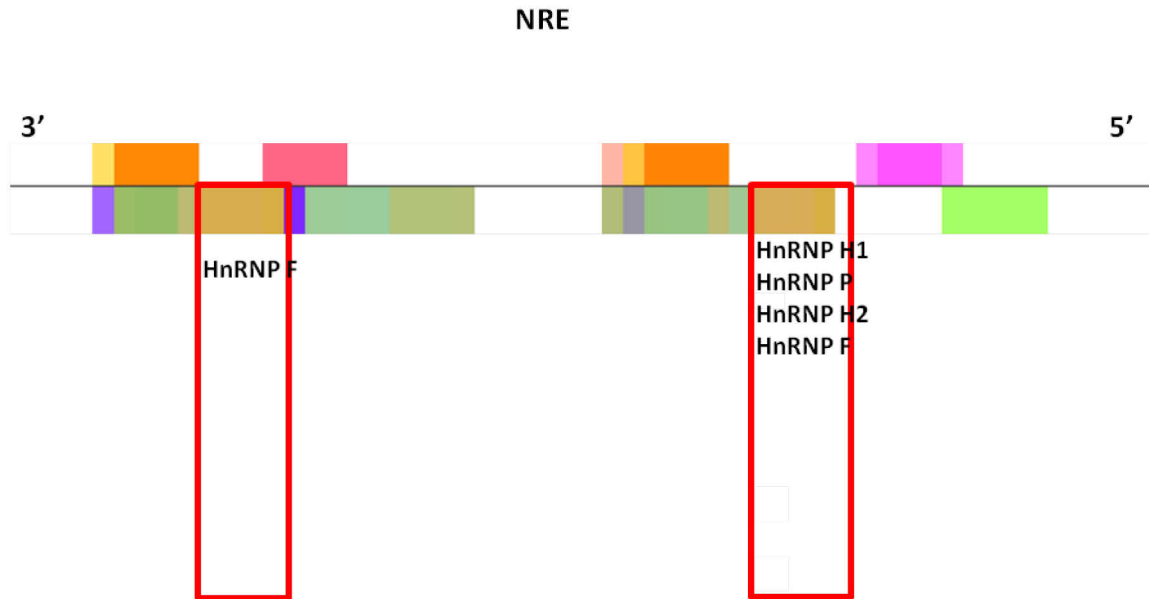


Figure 226: Prédiction des sites de fixation des facteurs d'épissage sur le NRE. La région encadrée représente la région des mutations générées dans le NRE de *NXNLI*. Les rectangles colorés représentent les motifs cibles des facteurs d'épissage. Les facteurs localisés au dessus de la ligne sont les activateurs et en dessous les inhibiteurs.

HNRNPF ne peut donc plus inhiber l'épissage du *NXNLI* en se fixant correctement à l'élément NRE muté, empêchant la rétention de l'intron et l'expression de la protéine RdCVF 17 kDa. Il est donc possible que le mécanisme de translecture de *NXNLI* fasse intervenir des facteurs liant l'ARN tels que HNRNPF et NCL.

4.3 : L'INTERACTION DU FACTEUR NCL AVEC LE NRE A T-ELLE ETE CONFIRME ?

Nos résultats indiquent que NCL qui est majoritairement exprimé par les photorécepteurs à bâtonnets de la rétine de primate interagit spécifiquement avec la structure secondaire sous forme de tige boucle de la séquence NRE présente en 3' de l'exon 1 du gène *NXNLI*. Avec la collaboration d'Alain Lescure de l'Institut de biologie moléculaire et cellulaire du CNRS à Strasbourg, nous avons cherché à confirmer ces résultats par des expériences de retard sur gel ou *electrophoretic mobility shift assay*

(EMSA). Cette expérience consiste dans un premier temps à exprimer par transfection transitoires dans des cellules HEK293 les facteurs protéiques couplés à un *tag* Flag, NCL et HNRNPF. La protéine GFP est utilisée comme contrôle négatif dans cette expérience. Le *western blot* réalisé à partir des lysats protéiques de cellules transfectées indiquent que chacune des protéines est bien exprimées (**Fig. 227**).

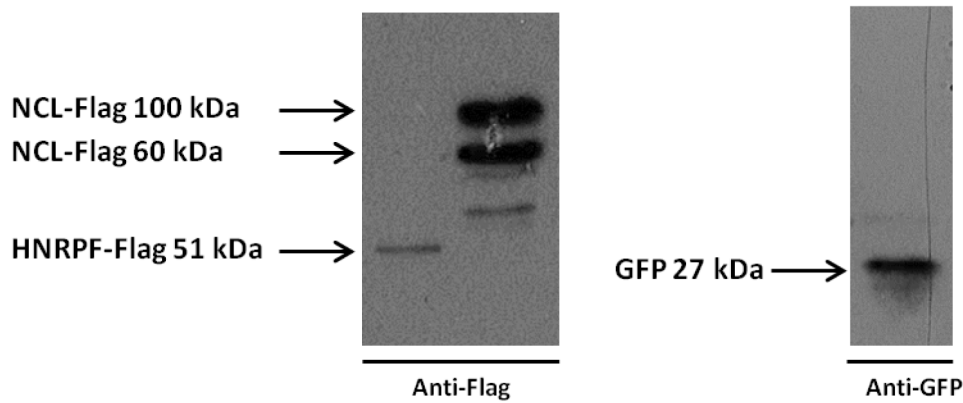


Figure 227: Expression des facteurs protéique surexprimés dans les lysats protéiques a l'aide d'un anticorps, a) *anti Flag* et b) *anti GFP*

Les résultats de cette expérience indiquent que les lysats protéiques expriment bien les facteurs protéiques ainsi que la GFP. Dans un deuxième temps, une sonde ARN qui correspond à la séquence NRE synthétisée puis marquée au ^{32}P . Les lysats protéiques des cellules HEK293 transfectées sont incubés en présence de la sonde NRE marquée. Une électrophorèse de la séquence NRE marquée est réalisée ainsi que celle de la sonde NRE marquée mais non incubée avec les lysats protéiques. L'autoradiographie du gel indique qu'un retard de gel est observé pour la sonde NRE marqué et incubée en présence des lysats protéiques par rapport à la sonde NRE marquée (**Fig. 228**).

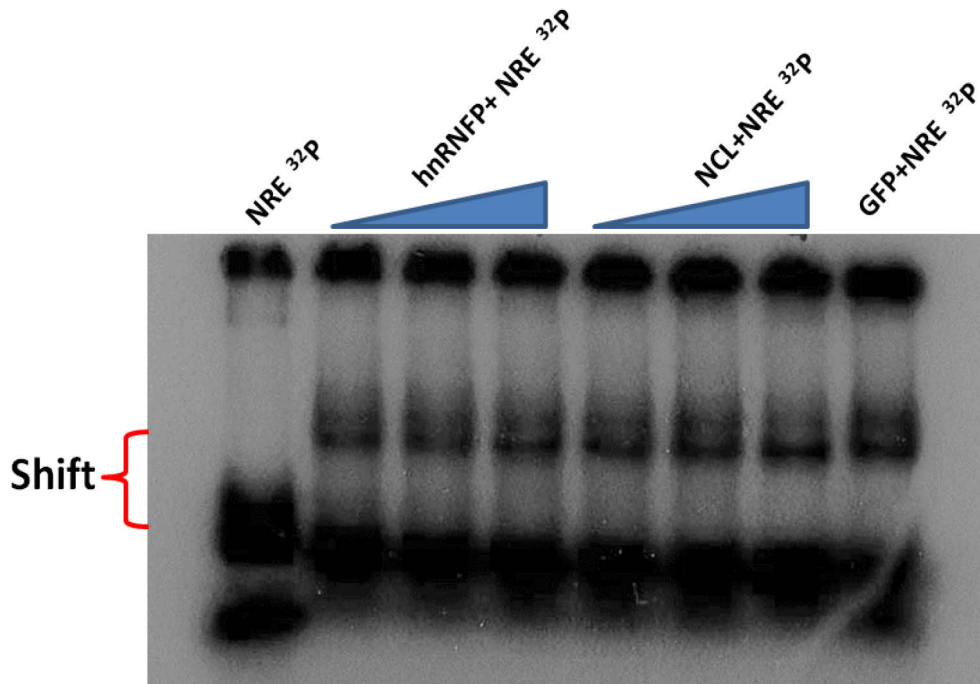


Figure 228: Autoradiographie des sonde NRE marquées au ^{32}P incubées ou non en présence de lysats protéiques enrichies en HNRNPF, en NCL ou GFP.

L'autoradiographie du gel indique qu'il existe bien une interaction entre le NRE et des protéines contenues dans le lysat mais qui n'est pas dose dépendante de la quantité de lysat protéique incubée. L'absence de retard de migration identifié par la séquence NRE non incubé avec les lysats protéiques, indique que le retard sur gel est bien la conséquence d'une interaction entre la séquence NRE avec une ou (des) protéine(s). Cependant, un retard est également observé lorsque la séquence NRE est incubé en présence du contrôle GFP ce qui indique que les protéines qui interagissent avec le NRE ne sont pas celles surexprimées dans les lysats protéiques mais qu'il s'agit d'une autre protéine endogène. Nous pensons que cette autre protéine pourrait être NCL naturellement exprimé par les cellules HEK293. Cette protéine connue pour être abondante dans les cellules masquerait le signal de l'interaction spécifique de NCL surexprimées dans ces essais. Afin de confirmer cette hypothèse, une expérience contrôle est réalisée avec la sonde NRE *shuffle* marquée qui ne présente plus la

séquence secondaire indispensable pour établir une interaction avec les facteurs d'épissage NCL (Fig. 229).

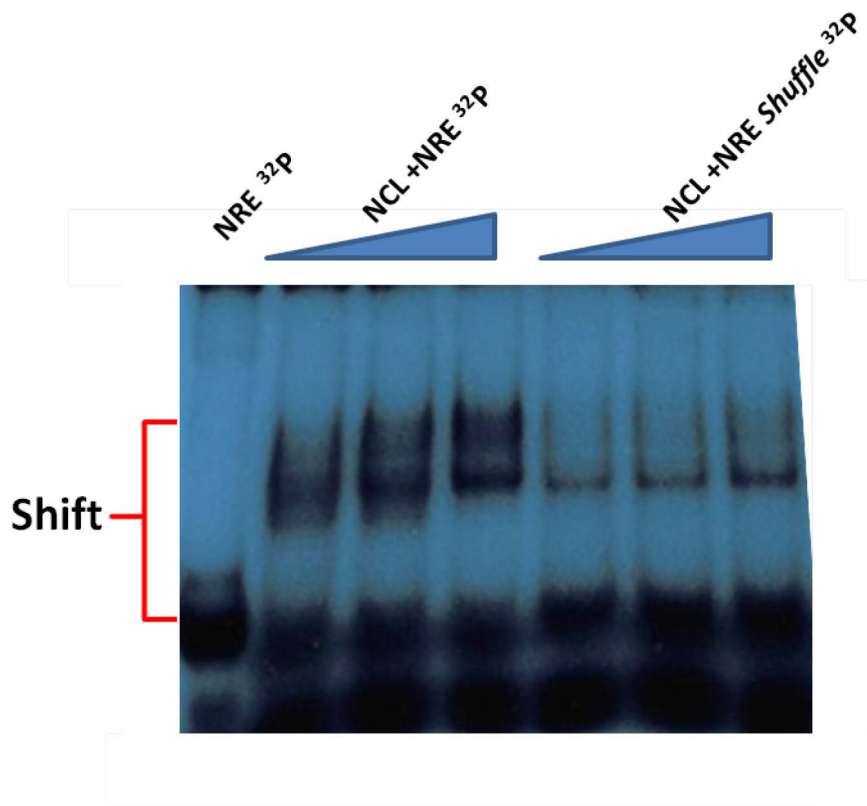


Figure 229: Autoradiographie des sonde NRE et NRE *shuffle* marquées au ³²P incubées en présence de lysats protéiques enrichies en NCL.

Le signal indiquant l'interaction entre NCL et le NRE *shuffle* est beaucoup moins important que celui qui indique l'interaction entre le NCL et le NRE. Ces résultats confirment que la structure secondaire du NRE est primordiale pour établir une interaction avec cette protéine, qui est probablement NCL. Pour confirmer que cette protéine qui interagit avec le NRE est bien NCL, une autre expérience de retard sur gel va également être réalisée à partir de lysats protéiques de cellules HEK293 ou le facteur NCL endogène sera au préalable inhibé par des siARN afin de démontrer un retard dose dépendant de la quantité de NCL endogène non inhibée.

4.4: NCL EST-ELLE LIE A RDCVF 17 kDA ?

NCL s'associe aux ARNm mais aussi au spliceosome pour réguler l'épissage alternatif des gènes. Il est connu que lorsqu'elle se lie à la région 5'UTR des messagers NCL peut inhiber leur traduction alors qu'au contraire lorsqu'elle se fixe à la région 3'UTR elle augmente leur traduction. Il est également connu que NCL se lie aux structures secondaires de type tige boucle (Chen and Xu, 2016). NCL est impliqué dans l'expression de nombreuses sélénoprotéines. En effet c'est en se fixant sur les éléments SECIS localisé dans les régions 3'UTR des gènes qui codent pour ces sélénoprotéines et qui présentent des structures secondaires de tige-boucle que NCL favorise l'expression de ces protéines (Miniard et al., 2010). L'élément SECIS n'est pas retrouvé dans la région 3' de l'exon 1 de *NXNLI*. Cependant il est très proche de l'élément SRE de la sélénoprotéine SEPNI qui lui ressemble au NRE. NCL qui interagit avec le NRE n'influe-t-elle pas l'expression de RDCVF 17 kDa ?

4.5: IDENTIFICATION DU PEPTIDE EN C-TER DE LA PROTEINE RDCVF 17 kDA

Nous avons montré que *NXNLI* code pour une troisième protéine RDCVF d'environ 17 kDa qui n'est pas une sélénoprotéine. De plus, les résultats du *northern blot* réalisé par notre équipe et publié en 2015 (Ait-Ali et al., 2015) à partir de rétine humaine indiquent la présence d'un troisième messenger de *NXNLI* dont la taille est comprise entre celle du messenger qui code pour RDCVF 12 kDa et RDCVFL de 37 kDa (Fig. 230).

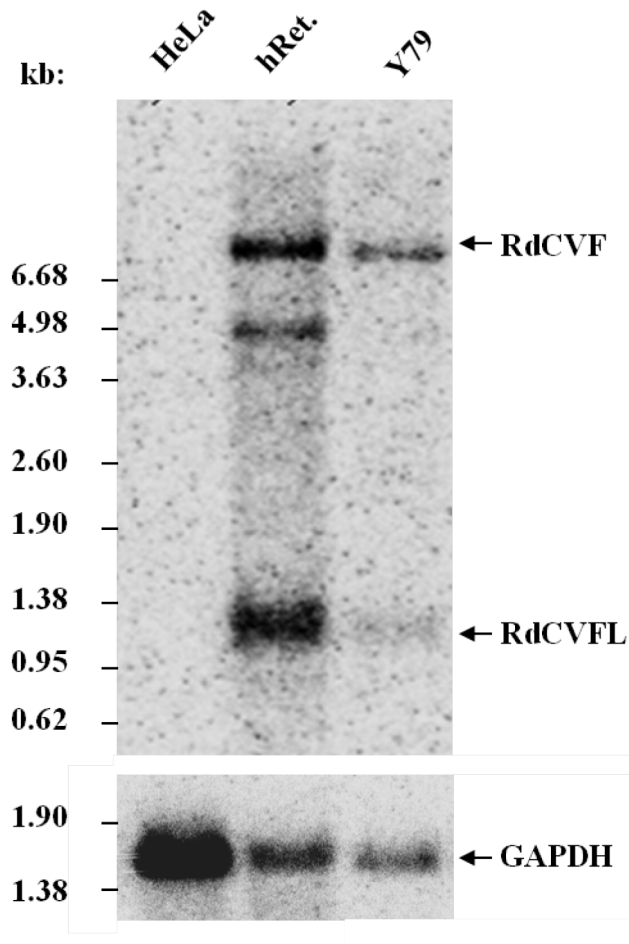


Figure 230: Expression des messagers de *NXNL1* dans la rétine humaine, dans les lignée cellulaire humaine de rétinoblastomes Y79 et dans les cellule humaine HeLa par *northern-blot*. Adapté de Aït-Ali *et al.*, 2015.

Afin d'identifier la séquence complémentaire de cette protéine, des expériences préliminaires d'identification par spectrométrie de masse des peptides localisés en C-terminal de la protéine RdCVF de 17 kDa ont été réalisées. Ces expériences consistent à faire migrer sur un gel d'électrophorèses les protéines qui ont spécifiquement interagi avec l'anticorps anti RdCVF dans réaction une d'immunoprécipitation. Par la suite, ce gel d'électrophorèse est coloré au bleu de Coomassie puis les bandes qui correspondent aux protéines ayant migrées entre 12 et 17 kDa sont découpées puis envoyées à la plateforme LSMBO de Strasbourg (**Fig. 231**).

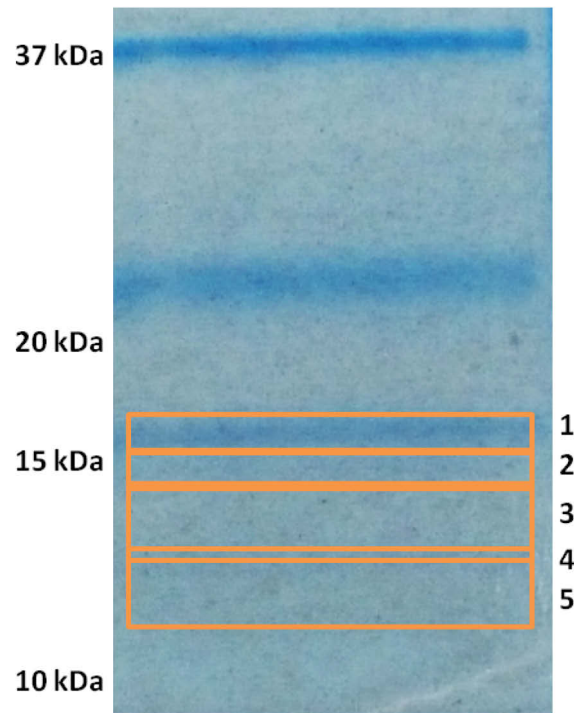


Figure 231: Migration et coloration au bleu de Coomassie des protéines immunoprécipitées par un anti RdCVF humain. Les zones du gel découpées sont encadrées en orange et numérotées.

Les résultats de ces analyses indiquent qu'alors que de nombreuses autres protéines contaminantes sont présentes et identifiées, telles que des histones ou des ribosomes, de nombreux peptides de RdCVF sont identifiés avec un recouvrement d'environ 74% (**Fig. 232**).

**MASLFSGRILIRNNSDQDELDTAEVSRRENRLVLLFFGAGACQCQAFVPILKDFVRLTDEFYV
LRAAQLALVYVSQDSTEEQQDLFKDMPKKWFLPFEDDLRR**

Figure 232: Séquences peptidiques de RdCVF. Les peptides colorés représentent les peptides identifiés.

Deux peptides ont été identifiés à partir de la bande du gel n°1 ainsi qu'à partir de la bande n°2. Aucun peptide n'est identifiés à partir de la bande n° 3 du gel alors que 5

peptides sont identifiés à partir de la bande n°4 et 2 peptides à partir de la bande n°5 (Fig. 233).

n°	Protéine	Bande du gel n°	1	2	3	4	5
1	✓ Histone H4 OS=Homo sapiens GN=HIST1H4A PE=1 SV=2		4	5	6	11	2
2	✓ Histone H2A type 2-C OS=Homo sapiens GN=HIST2H2AC PE=1 SV=4		7	8	6	1	5
3	✓ Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6		10	15		3	8
4	✓ Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=6		12	5		4	12
5	✓ Histone H2B type 1-J OS=Homo sapiens GN=HIST1H2BJ PE=1 SV=3		3	3	2	2	4
6	✓ Trypsin OS=Sus scrofa PE=1 SV=1		3	3	3	4	4
7	✓ Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3		8	11		3	
8	✓ Histone H3.2 OS=Homo sapiens GN=HIST2H3A PE=1 SV=3		6	3	1	2	6
9	✓ Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1		5	1	4	1	6
10	✓ Nucleoredoxin-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=NXNL1 PE=2 SV=1		2	2		5	7
11	✓ Profilin-1 OS=Homo sapiens GN=PFN1 PE=1 SV=2			3	5	1	
12	✓ 40S ribosomal protein S16 OS=Homo sapiens GN=RPS16 PE=1 SV=2		4	2	1		3
13	✓ Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2		2	1	0	0	6
14	✓ Rubber elongation factor protein OS=Hevea brasiliensis PE=1 SV=2		1	1	1	1	4
15	✓ Histone H2AX OS=Homo sapiens GN=H2AFX PE=1 SV=2		2	2	0		2
16	✓ 60S ribosomal protein L23 OS=Homo sapiens GN=RPL23 PE=1 SV=1		1	3			1
17	✓ Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Homo sapiens GN=PPIA PE=1 SV=2		6				2
18	✓ 8-oxoguanine DNA glycosylase (Fragment) OS=Homo sapiens GN=OGG1 PE=4 SV=1		1	1	2	1	1
19	✓ Histone H3.1 OS=Homo sapiens GN=HIST1H3A PE=1 SV=2		1	1	0	0	1
20	✓ 40S ribosomal protein S18 OS=Homo sapiens GN=RPS18 PE=1 SV=3		2				4
21	✓ Myosin light polypeptide 6 OS=Homo sapiens GN=MYL6 PE=1 SV=2			2	4		
22	✓ 60S ribosomal protein L27 OS=Homo sapiens GN=RPL27 PE=1 SV=2		4				1
23	✓ Calmodulin OS=Homo sapiens GN=CALM1 PE=1 SV=2		1				2
24	✓ 40S ribosomal protein S23 OS=Homo sapiens GN=RPS23 PE=1 SV=3		3	1			1
25	✓ Nucleoside diphosphate kinase B OS=Homo sapiens GN=NME2 PE=1 SV=1		3	2			
26	✓ Histone H2A.Z OS=Homo sapiens GN=H2AFZ PE=1 SV=2		1	3	0		0
27	✓ Alternative protein CSF2RB OS=Homo sapiens GN=CSF2RB PE=4 SV=1			1	1	1	
28	✓ 60S acidic ribosomal protein P2 OS=Homo sapiens GN=RPLP2 PE=1 SV=1				5		
29	✓ cDNA FLJ45139 fis, clone BRAWH3039623 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1			1	1	1	1
30	✓ Histone H2B type 1-K OS=Homo sapiens GN=HIST1H2BK PE=1 SV=3		1	1	0	0	2
31	✓ 40S ribosomal protein S14 OS=Homo sapiens GN=RPS14 PE=1 SV=3		3	1			1
32	✓ 60S ribosomal protein L22 OS=Homo sapiens GN=RPL22 PE=1 SV=2		1	2			1
33	✓ 60S ribosomal protein L30 OS=Homo sapiens GN=RPL30 PE=1 SV=2			2	2		
34	✓ Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=SSBP1 PE=...			2	2		
35	✓ 60S ribosomal protein L36 OS=Homo sapiens GN=RPL36 PE=1 SV=3			2	2		
36	✓ 40S ribosomal protein S13 OS=Homo sapiens GN=RPS13 PE=1 SV=2		2				2
37	✓ Histone H3.3 OS=Homo sapiens GN=H3F3A PE=1 SV=2		1	1	0	0	1
38	✓ Histone H2A type 1-B/E OS=Homo sapiens GN=HIST1H2AB PE=1 SV=2		1	1	0		1
39	✓ Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1 OS=Homo sapiens GN=SNRPD1 PE=1 SV=1			1	2		
40	✓ 60S acidic ribosomal protein P1 OS=Homo sapiens GN=RPLP1 PE=1 SV=1			1	1		

Probabilité d'erreur






	<5%
	6% à 20%
	21% à 50%
	51% à 80%
	81% à 100%

Figure 233: Peptides identifiés par spectrométrie de masse suite à une immunoprécipitation à l'aide de l'anticorps anti RdCVF humain.

Cependant, tous ces peptides sont spécifiques de RdCVF 12 kDa et aucun ne semble correspondre à la région C-terminal hypothétiquement décrites dans le cas de translecture du codon stop présent à la fin de l'ORF de l'exon n°1 du gène *NXNLI* ou aux codons stop présent dans la région 3'UTR de cet exon. Même les peptides identifiés dans les bandes n°1 et 2 qui regroupent les protéines d'un poids moléculaire autour de 17 kDa sont spécifiques de RdCVF 12 kDa. La première hypothèse émise pour expliquer ces résultats est que probablement la protéine RdCVF 17 kDa étant peu concentrée, elle pourrait être masquée par le signal de RdCVF 12 kDa qui est plus concentrée. Pour contourner cette difficulté, nous avons décidé de concentrer RdCVF 17 kDa en la séparant de RdCVF 12 kDa sur un gel deux dimensions (2D). Les gels 2D permettent de séparer les protéines selon leur poids moléculaire et selon leur point isoélectrique. A l'aide du logiciel « ExPASy Compute pI/Mw » (http://web.expasy.org/compute_pi/) le point isoélectrique (PI) de la protéine RdCVF 12 kDa et RdCVF 17 kDa est calculé. La protéine RdCVF de 12 kDa a un PI de 4,42 (**Fig. 234a**). Il est très probable que la protéine correspondant au produit pour lequel au moins un des trois codons stop TGA serait recodé et au lieu de terminer la traduction à ce stade, un autre acide aminé serait inséré. Pour ne pas influencer sur le calcul du point isoélectrique nous décidons d'incorporer une alanine connue pour être un acide aminé neutre, sans caractéristique particulière. Dans le cas où le premier codon stop situé juste après celui de fin du ORF serait translus, la protéine nouvellement codée aurait un PI de 5,84 (**Fig. 234b**), dans le cas où les deux codons stop suivant celui de l'ORF seraient translus, la protéine nouvellement codée aurait un PI de 6,58 (**Fig. 234c**) et dans le cas où tous les codon stop seraient translus la protéine aurait un PI de 6,73 (**Fig. 234d**).

- a)
MASLFSGRILIRNNSDQDELDTEAEVSRRLLENRLVLLFFGAGACPQCQAFVPILKDFVRLTDEFYVLR
AAQLALVYVSQDSTEEQQDLFLKDMPPKWLFLPFEDDLRR (pI 4,67)
- b)
MASLFSGRILIRNNSDQDELDTEAEVSRRLLENRLVLLFFGAGACPQCQAFVPILKDFVRLTDEFYVLR
AAQLALVYVSQDSTEEQQDLFLKDMPPKWLFLPFEDDLRR**AGGAGRASWRRGHVR** (pI 5,84)
- c)
MASLFSGRILIRNNSDQDELDTEAEVSRRLLENRLVLLFFGAGACPQCQAFVPILKDFVRLTDEFYVLR
AAQLALVYVSQDSTEEQQDLFLKDMPPKWLFLPFEDDLRR**AGGAGRASWRRGHVRAK** (pI 6,58)
- d)
MASLFSGRILIRNNSDQDELDTEAEVSRRLLENRLVLLFFGAGACPQCQAFVPILKDFVRLTDEFYVLR
AAQLALVYVSQDSTEEQQDLFLKDMPPKWLFLPFEDDLRR**AGGAGRASWRRGHVRAKSIHSN**
(pI 6,73)

Figure 234: Calcul du point isoélectrique après le recodage des codons stop UGA et incorporation d'une alanine à leur place. **a)** Point isoélectrique de la protéine RdCVF de 12 kDa. **b)** Point isoélectrique de la protéine lorsque une alanine est incorporée à la place du premier codon stop. **c)** Point isoélectrique de la protéine lorsque une alanine est incorporée à la place du premier et deuxième codon stop. **e)** Point isoélectrique de la protéine lorsque une alanine est incorporée à la place du premier, du deuxième et troisième codon stop. Les A en rouge représente l'alanine incorporée. La séquence en gras représente le peptide nouvellement traduit.

Les lysats protéiques issus des cellules HEK293 transfectées par le plasmide ORFp624 sont séparés sur un gel d'électrophorèse 2D puis un *western blot* est réalisé à l'aide d'un anticorps anti RdCVF humain (**Fig. 235**).

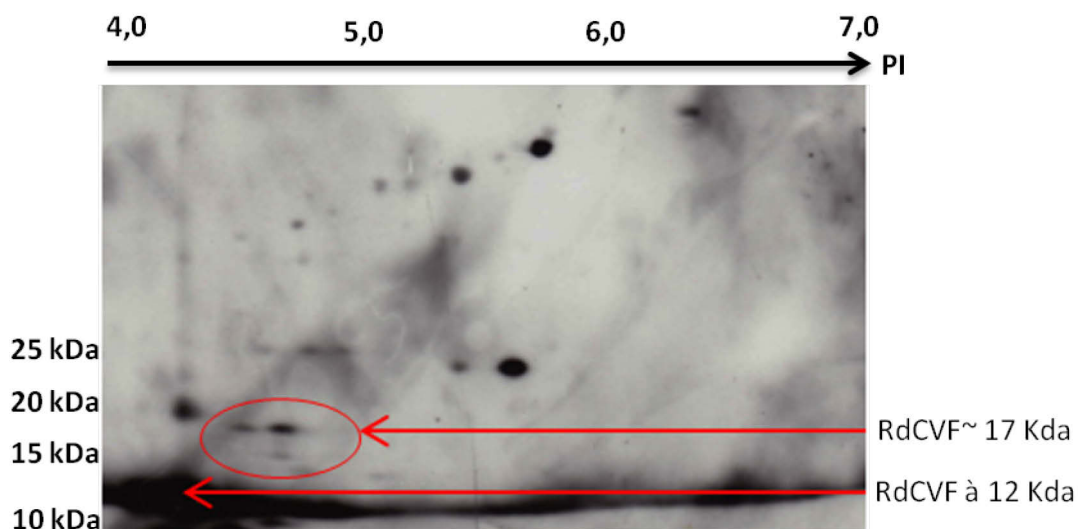


Figure 235: Gel d'électrophorèse deux dimensions. PI: point isoélectrique.

Les résultats de cette expérience, indiquent que RdCVF 12 kDa qui est représenté par l'ensemble des protéines indiqué par la flèche dans la figure 235 a migré dans le gel 2D comme attendu. C'est à dire verticalement jusqu'à 12 kDa et horizontalement selon le PI d'environ 4,42. Tenant compte du poids moléculaire de RdCVF 17 kDa, cette protéine doit se retrouver parmi les protéines entourées par le cercle dans la figure 235 dans le gel 2D. La même expérience doit être renouvelée dans laquelle le gel d'électrophorèse sera coloré au bleu de Coomassie, et où les protéines entourées dans la figure seront prélevées et envoyées au LSMBO afin d'identifier des peptides spécifique de RdCVF 17 kDa. Le profil de migration de RdCVF 17 kDa dans le gel 2D indique que le PI de cette protéine ne semble pas être proche de 5,84, ni de 6,58, ni de 6,73. L'identification de la région C-terminal de cette protéine va donc certainement nécessite plus d'investissement.

4.6 : NCL, LA POSSIBLE CONNEXION ENTRE *NXNL1* ET LE RETINOBLASTOME?

NCL est l'une des protéines majoritairement présente dans le nucleus. Elle est connue pour être impliquée dans la maturation des pre-ARNm et pour jouer de nombreux rôles dans les modifications post-transcriptionnelles. NCL est également connue pour lier le site 5'-UUAGGG-3' et participe à l'épissage des ARN et à leur transport dans le cytoplasme. Une récente étude a montré que NCL est surexprimé dans les tissus de rétinoblastomes (Subramanian et al., 2016). A partir de lignée cellulaire humaine de rétinoblastomes Y79 et WERI-Rb-1 nous avons confirmé que NCL était bien exprimé dans ces cellules (**Fig. 236**).

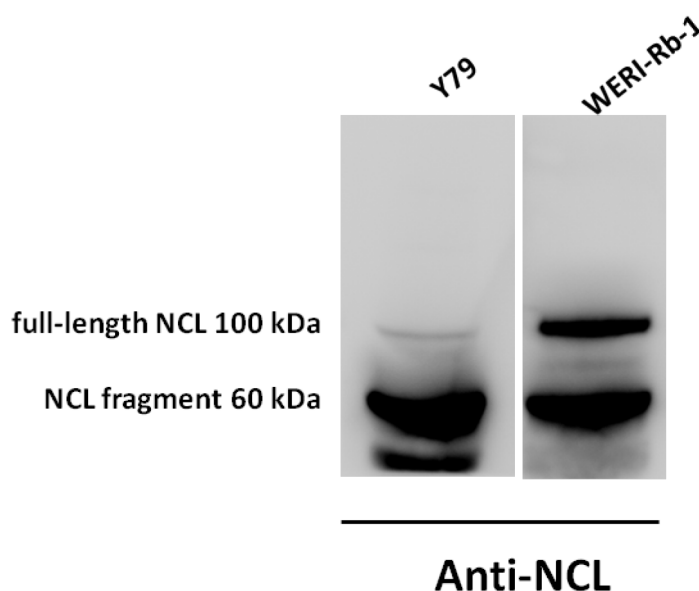


Figure 236: Expression de NCL dans les lysats protéiques des lignées cellulaires humaines de rétinoblastomes Y79 et WERI-Rb-1.

Le rétinoblastome est le cancer intraoculaire le plus répandu chez les l'enfant, qui survient dans la rétine généralement avant l'âge de 5 ans, avec une prévalence de 1/15 000 à 1/20 000 naissances. Le pronostic vital lié au rétinoblastome est maintenant excellent dans les pays industrialisés, mais la survie à long terme est toujours liée au

développement de tumeurs secondaires, principalement des sarcomes secondaires. Le rétinoblastome chez les adultes de plus de 20 ans est extrêmement rare. La progression de la tumeur dans le rétinoblastome est classiquement attribuée à l'inactivation des deux allèles du gène de susceptibilité au rétinoblastome RB1 qui représente le premier gène suppresseur de tumeur identifié (Lee et al., 1986). Le rétinoblastome se présente sous deux formes cliniques distinctes: une forme héréditaire (40% des cas) et une forme sporadique (60% des cas) (Mendoza and Grossniklaus, 2015). Dans le rétinoblastome héréditaire, les patients ont une mutation héréditaire de la lignée germinale sur un des allèle du gène RB1 suivie d'une seconde mutation acquise sur le deuxième allèle au fur et à mesure que leur rétine se développe. Dans le rétinoblastome non héréditaire, il existe deux mutations RB1 distinctes acquises dans les deux allèles du gène du rétinoblastome dans les cellules somatiques de la rétine en développement. Dans ce cancer, la mutation de RB1 entraîne un dysfonctionnement ou l'absence de la protéine rétinoblastome entraîne une activité constante des E2F et une activation continue du cycle cellulaire, entraînant la formation et le développement de la tumeur. Alors que la perte de la fonction de RB1 est nécessaire pour le développement de la tumeur du rétinoblastome, des événements mutationnels supplémentaires sont nécessaires à la progression tumorale. Certaines données indiquent que les tumeurs du rétinoblastome expriment des gènes spécifiques aux cônes mais non spécifiques aux bâtonnets, soulignant un lien avec les précurseur de cône (Xiaoliang L. Xu, 2015). Une grande partie des mécanismes impliqués dans le maintien de la fonction des cônes est également nécessaire pour la prolifération des cellules du rétinoblastome (Léveillard, 2015). Cette caractéristique du métabolisme du cancer a été découverte il y a soixante ans par Otto Warburg qui a montré que la plupart des cellules cancéreuses métabolisent de grandes quantités de glucose secrété ensuite sous forme de lactate même en présence d'oxygène, phénomène appelé glycolyse aérobie (Warburg OH, 1931). Mais la reprogrammation du métabolisme énergétique en tant que caractéristique des cellules cancéreuses a été récemment revue par Heiden et al, (Heiden et al., 2009). Le résultat d'un northern blot de la figure 230 réalisé par notre équipe et publié en 2015 (Ait-Ali et al., 2015) à partir de la lignée cellulaire humaine Y79 indique que ces cellules expriment bien un messager qui correspond short NXNL1 et un autre qui correspond à long NXNL1 tout comme les cellules de la rétine humaine .Ces résultats suggèrent que le gène NXNL1 est alternativement épissé et que l'intron de ce gène doit aussi être

retenu dans les cellules Y79. Ces données, nous ont conduit à émettre l'hypothèse que la surexpression de la nucléoline dans les précurseurs de cônes avec une disruption des deux allèles du gène RB1 conduit à l'expression de l'isoforme short NXNL1 de RdCVF, comme dans les bâtonnets. RdCVF est exprimé et sécrété par ces cellules qui va stimuler la glycolyse aérobie de manière autocrine à travers le complexe BSG1/GLUT1. Cette boucle autocrine serait impliquée dans la prolifération précoce des précurseurs de cônes où le contrôle du cycle cellulaire est levé par les mutations de RB1 (**Fig. 237**).

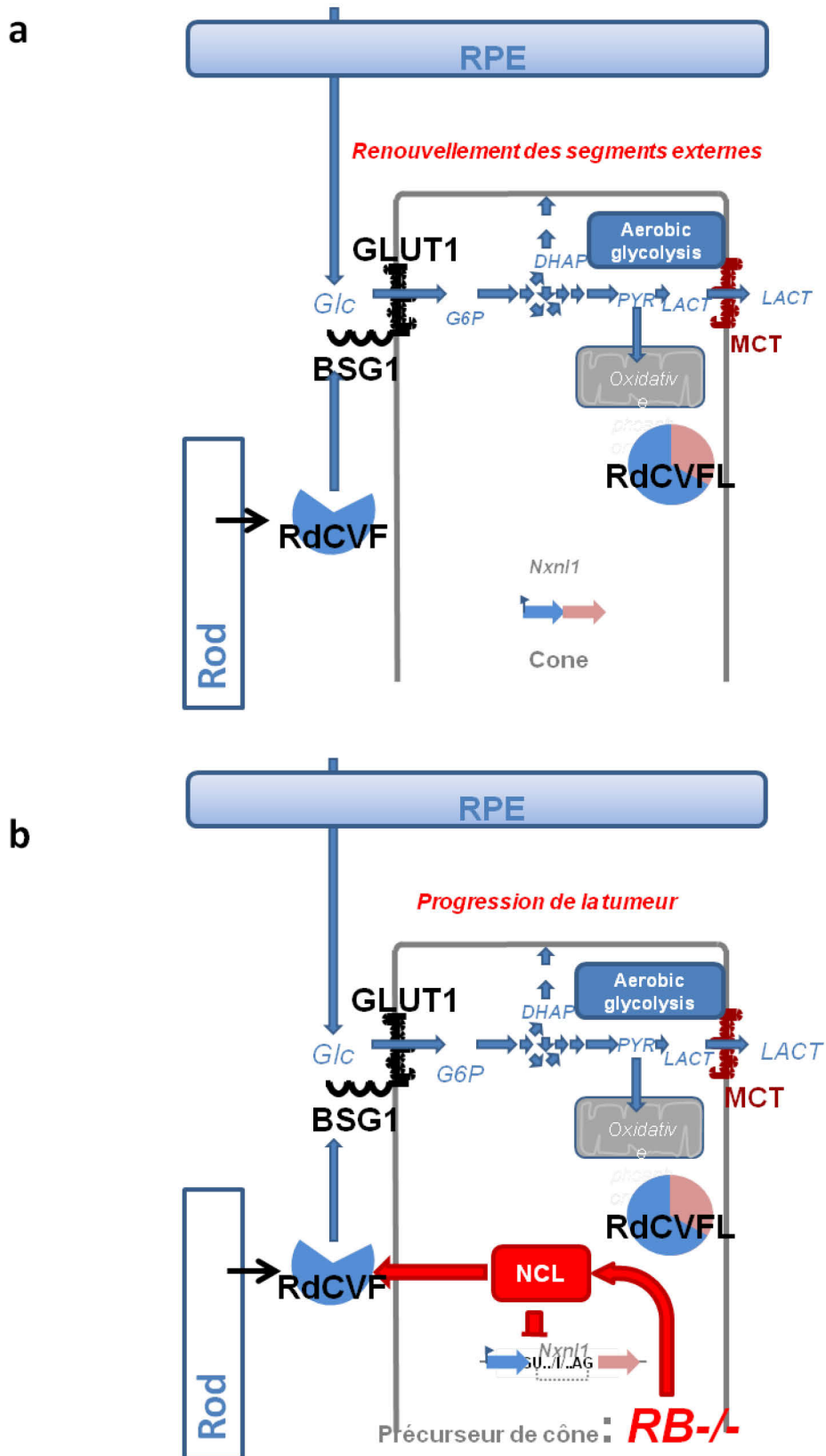


Figure 237: Mécanisme d'action de RdCVF a) dans les cônes de rétine humaine, b) dans les cellules tumorales de rétinoblastome.

Une collaboration a été mise en place avec François Radvanyi de l'équipe d'Oncologie Moléculaire de l'institut Curie pour quantifier l'expression de RdCVF chez des patients atteint de rétinoblastome afin d'identifier une corrélation entre l'expression de des deux messagers qui code pour RdCVF et NCL. Une deuxième collaboration dans le même but afin de collecter d'autres échantillon et pour ainsi développer plus amplement ce projet a également été mis en place avec David Cobrinick du Vision Center at Children's Hospital Los Angeles. Précisons que David Cobrinick est à l'origine du travail qui a démontré que les rétinoblastomes proviennent des précurseurs des cônes (Xiaoliang L. Xu, 2015). Pour cette collaboration, un Grant du RPB/SNF International Research Collaborators Award a été demandé et accepté. Ainsi la plasticité génique de NXNL1 est peut être détourné dans le rétinoblastome.

5. L'ORIGINE DE *NXNL1*: DEPUIS L'HYDRE SANS ORGANE VISUEL JUSQU'A L'ŒIL PARFAIT DE L'HOMME.

L'origine de l'œil reste pour Darwin aussi complexe à expliquer que l'origine de la vie car selon lui, il semble difficile d'admettre que seules des modifications naturelles puissent aboutir à un organe aussi merveilleux, aussi parfait et aussi complexe que l'œil. C'est certainement la raison pour laquelle la description de cette organe figure dans le chapitre VI intitulé « Difficultés de la théorie » de son livre *L'Origine des Espèces* (Darwin, 1859). En effet, la question qui consiste à savoir comment l'œil a évolué reste encore aujourd'hui très compliqué à étudier pour les biologistes. Les premières hypothèses étaient en faveur de l'apparition indépendante des yeux différents au cours de l'évolution. Mais petit à petit cette idée fut remise en question, notamment depuis la mis en évidence de caractéristiques moléculaires et génétique communes entre les yeux de différents espèces très éloignées. La conservation de la fonction du gène *Pax6* impliqués dans le développement de l'œil par exemple en est un argument (Gehring, Walter; Ikeo, 1999). Darwin a finalement accepté l'idée qu'il ait existé un précurseur

commun de l'œil très simple et imparfait uniquement composé d'un neurone de type photorécepteur et d'une cellule pigmenté. Ce prototype est appelé proto-eye et ressemble à l'œil composé de deux cellules présent dans les cils des larves de trochophore d'annélide polychète (**Fig. 238**).



Figure 238: Larve de trochophore d'annélide polychète âgée de 11 jours. Adapté de Trochophore larva of the polychaete Sabellaria; Mai 2010.

Dans leur livre in *On the Evolution of Photoreceptors and Eyes* publié en 1977, Salvini-Plawen et Mayr (Salvini-Plawen and Mayer, 1977) décrivent que chez les bivalves tels que la palourde les trois types d'yeux sont retrouvés. Elle possède un œil de type caméra comme celui du hibou, un œil à facette tel que celui du taon et l'œil de type miroir présent chez la coquille Saint-Jacques (**Fig. 239**) réfutant ainsi leur propre théorie selon laquelle les photorécepteurs proviendraient indépendamment de 40 à 60 espèces différentes.

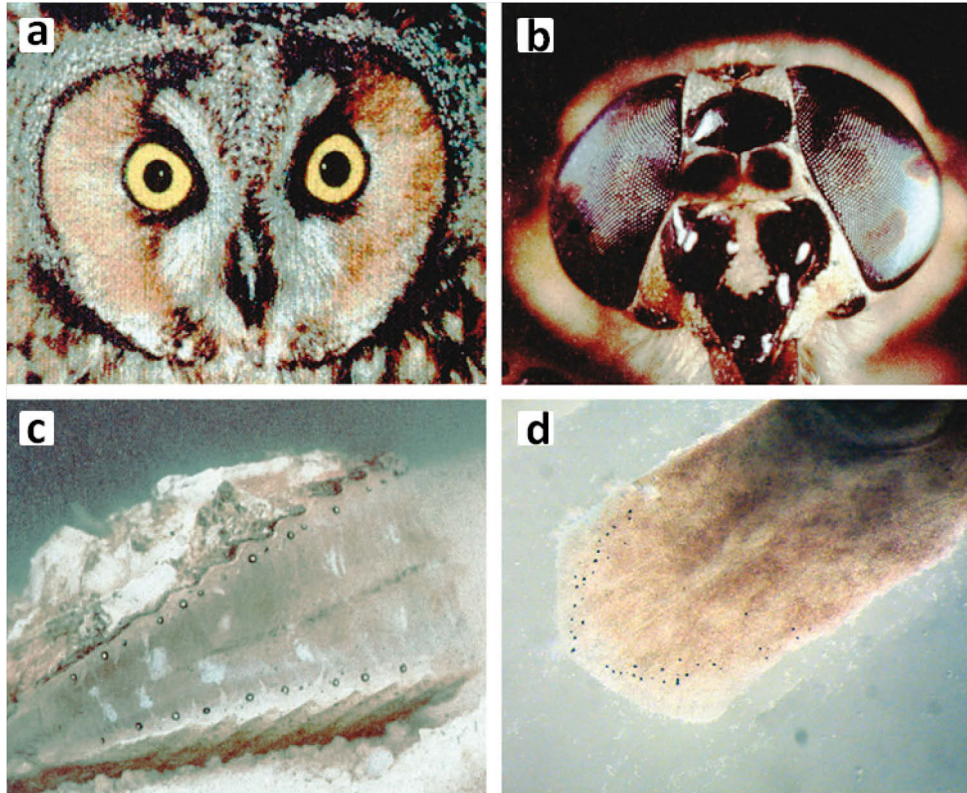


Figure 239: Différents types de yeux. a) l'œil de type caméra du hibou. b) l'œil à facette du taon. c) l'œil de type miroir de la coquille Saint-Jacques. d) Proto-eye composé d'un neurone de type photorécepteur et une cellule pigmenté du planaire *Polycelis auricularia*.

Ernst Mayr a finalement admis dans l'un de ces derniers livres, *What evolution is* (Mayr, 2001) que cette théorie n'était pas correcte et que l'œil aussi complexe soit il est issue d'un photorécepteur unique. L'étude des relations phylogénétiques est primordiale pour la compréhension de l'évolution des gènes, la régulation des voies de signalisations et l'évolution des traits morphologiques. Ces connaissances permettent également de générer et de tester des hypothèses d'évolution expliquant les transitions majeures de la vie. Cependant, l'origine des animaux qui représente l'une des plus grandes questions de l'évolution reste toujours un mystère. La plus grande controverse concerne les relations évolutives entre trois lignées qui représenteraient la base de l'arbre phylogénétique des animaux (métazoaires). La première lignée comprend la grande majorité des animaux, les placozoaires (un groupe énigmatique d'organismes

multicellulaires avec une organisation très simple), les cnidaires (comme les méduses, anémones de mer ou les hydres) et les bilatériens, animaux à symétrie bilatérale (tels que l'Homme, la drosophile ou le ver). Il reste les principaux acteurs de la controverse chez lesquels on ne retrouve pas d'yeux, les deux autres lignées représentées par les éponges qui sont des organismes morphologiquement simples et les cténophores qui sont des organismes transparents carnivores à la structure complexe (**Fig. 240**).

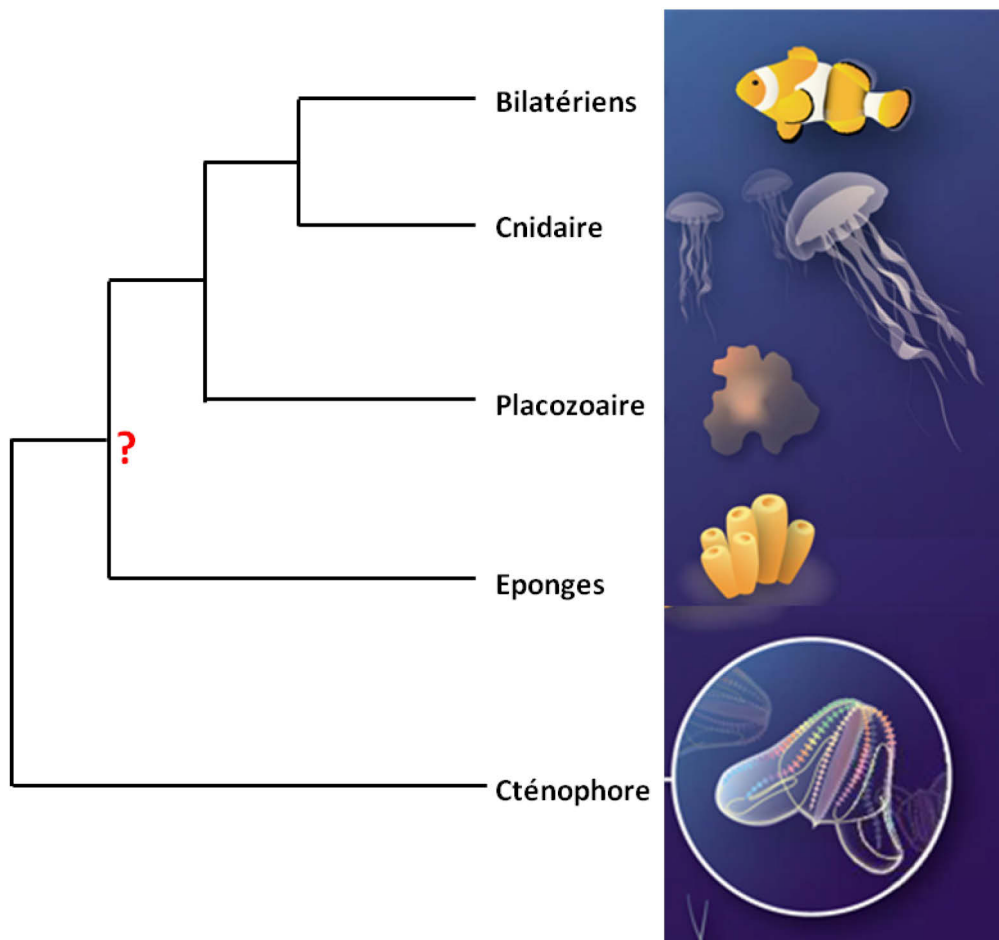


Figure 240: Le règne animal.

Le premier séquençage du génome complet de cténophore réalisé par l'équipe américaine dirigée par Joseph Ryan a permis de conclure que les cténophores seraient la première lignée à avoir divergé (Ryan et al., 2010). Plus tard en 2017, une autre équipe

revient sur cette conclusion et indique que la question de l'ancienneté entre ces deux organismes reste toujours ouverte (King and Rokas, 2017). Finalement, de récentes études menées par le professeur David Pisani de la faculté des sciences biologiques et de la Terre de l'Université de Bristol au Royaume-Uni démontrent que les éponges de mer sont plus anciennes que les cténophores (Feuda et al., 2017). Nous avons démontré que *Hydra vulgaris* qui appartient à la famille des cnidaires exprime deux gènes ancestraux de *NXNL1*, *hydra Nxnla* et *hydra Nxnlb*. Cette découverte intéressante pose la question de l'origine de *NXNL1* et de son paralogue *NXNL2*. Plusieurs *scenarii* sont possibles. Le premier propose l'évolution de chacun des gènes ancestraux de l'hydre en *NXNL1* ou en *NXNL2* en introduisant des variations à partir d'un gène ancestrale proche de *NXNL2*. La fonction d'un des gènes peut évoluer, lui permettant d'acquérir une nouvelle activité, tout simplement parce que la première fonction est déjà assurée par l'autre copie. Le deuxième scénario proposerait que l'un des deux gènes ancestraux disparaisse au cours de l'évolution et que seul un des paralogues soit issu du gène restant. Une autre question reste ouverte, à savoir est ce que ces deux copies présentent chez l'hydre ont un ancêtre commun ou pas ? Qu'en est-il de l'expression de ce gène ancestral chez des animaux plus anciens comme le cténophore et l'éponge ? (**Fig. 241**).

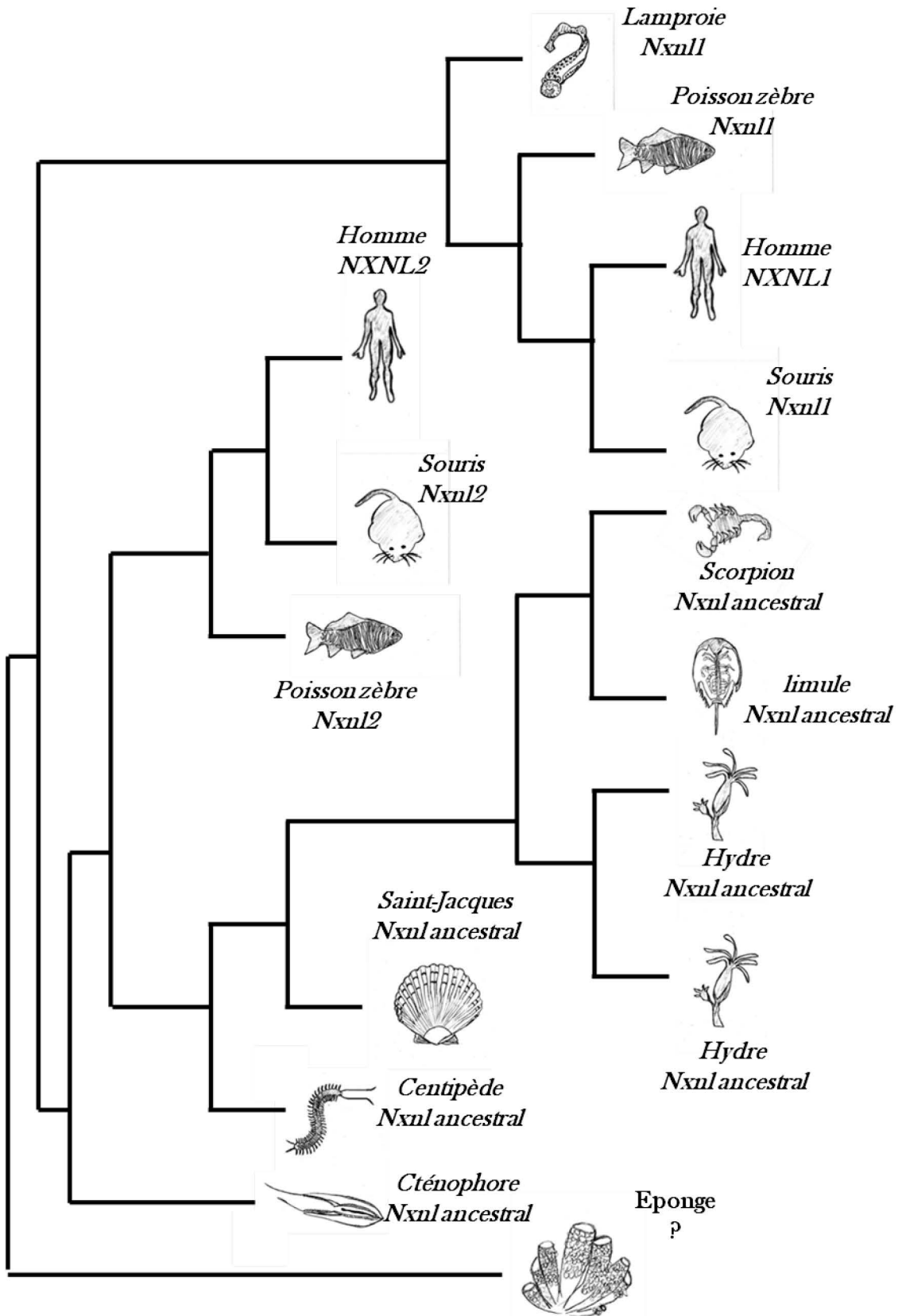


Figure 241: Arbre phylogénétique des gènes *Nxn*.

Des analyses bioinformatiques indiquent que le cténophore, le centipède, la Saint-Jacques, l'hydre, la limule et le scorpion expriment un gène *Nxnl* ancestral. Le zébrafish, la souris et l'Homme expriment en plus de *Nxnl1*, le gène *Nxnl2* alors que la lampoïre n'exprime que *Nxnl1*. Aucune information concernant ce gène n'est disponible pour l'éponge.

6. MODEL PROPOSE DES MECANISMES D'ÉPISSAGE DU GENE *NXNL1*

A la suite des résultats préliminaires obtenus dont ceux discutés et qui restent à confirmer, nous proposons un modèle illustrant les mécanismes moléculaires intervenant dans l'épissage du gène *NXNL1*. HNRNPF qui est exprimé uniquement dans les bâtonnets ne va pas se fixer sur le NRE 3 fois sur 4 et ne pas inhiber l'épissage de *NXNL1*, l'intron ne sera pas retenu et les deux exons du pre-ARNm vont se rejoindre et traduire la protéine RdCVFL de 37 kDa. HNRNPF va se fixer 1 fois sur 4 sur le NRE présent dans le pre-ARNm de *NXNL1* et retenir son intron. En 3' de l'exon 1 cet intron retenu présente 3 codons stop en phase de lecture. Ensuite, NCL qui est également exprimée uniquement dans les bâtonnets va 1 fois sur 6 se fixer sur le NRE et encourager la translecture des 3 codons stop présents dans l'intron est favoriser l'expression d'une protéine RdCVF d'environ 17 kDa qui aura la même fonction que RdCVF 12 kDa (Ait-Ali et al., 2015) mais qui serait plus stable ou plus soluble (Chalmel et al., 2007). Les 5 autres fois NCL ne va pas se fixer sur le NRE, le ribosome se détachera du transcrit à la rencontre du premier codon stop en phase de lecture dans l'intron de *NXNL1* et encourager sa traduction en une protéine de RdCVF de 12 kDa. Dans les cônes ni HNRNPF, ni NCL ne sont exprimées, le pre-ARNm de *NXNL1* est systématiquement épissé et code uniquement pour la thiorédoxine RdCVFL de 34 kDa (**Fig. 242**).

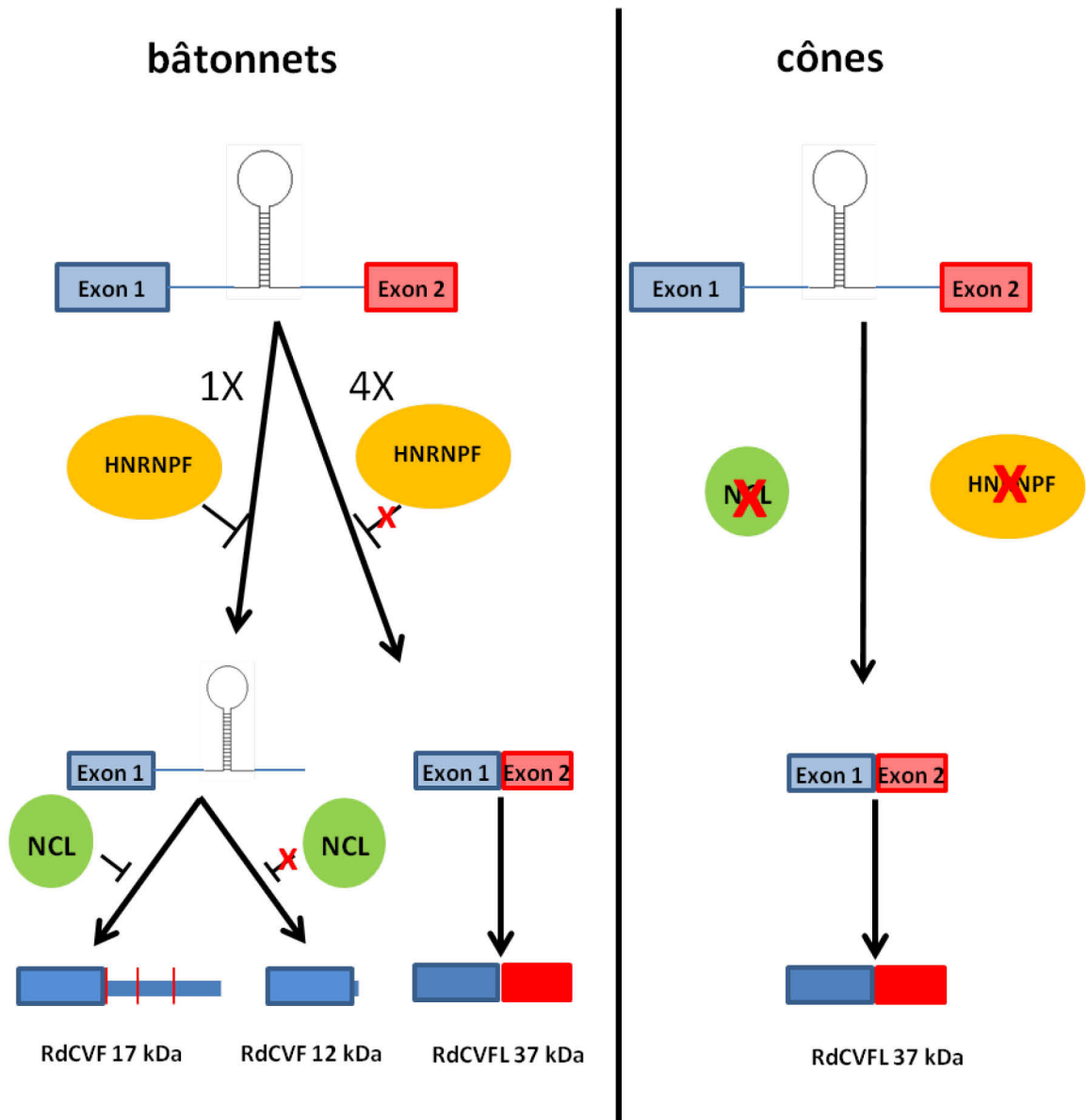


Figure 242: Model proposé des mécanismes d'épissage du gène *NXNL1*.

CONCLUSION

Le gène *NXNLI* chez l'Homme est exprimé par la rétine et code par un épissage alternatif pour deux isoformes protéiques, Rod derived Cone Viability Factor (RdCVF) un facteur trophique de 17 kDa et une protéine thioredoxin-like RdCVFL de 34 kDa. RdCVF est une isoforme courte de 109 acides aminés qui présente une extrémité C-terminale tronquée au niveau du site thioredoxine conduisant à une perte de l'activité enzymatique. L'isoforme longue est composée de 212 acides aminés chez l'Homme avec un domaine thioredoxine entier. Cette isoforme est largement conservée (Chalmel et al., 2007a; Funato and Miki, 2007). L'homologie de RdCVF avec les thioredoxines suggère que *NXNLI* participe au mécanisme d'homéostasie de la signalisation redox cellulaire. Les photorécepteurs à bâtonnets secrètent RdCVF qui maintient la fonction des cônes en stimulant la croissance et le renouvellement de leur segment externe. RdCVF est un traitement prometteur pour la rétinopathie pigmentaire qui se caractérise par la dégénérescence progressive des photorécepteurs à bâtonnet de la rétine, suivie plus tardivement par celle des cônes (Léveillard and Sahel, 2010; Léveillard et al., 2014). De manière intéressante, l'administration de RdCVFL qui possède l'entière séquence de RdCVF ne protège pas les cônes (Byrne et al., 2015) ce qui implique que la structure tertiaire de RdCVF diffère de celle de RdCVFL. RdCVF stimule la glycolyse aérobie dans les cônes via son récepteur de surface basigin-1 (BSG1) et le transporteur de glucose GLUT1 (Ait-Ali et al., 2015; Léveillard, 2015). BSG1 est une protéine transmembranaire qui représente le variant d'épissage du gène *basigin* (*Bsg*) avec un domaine additionnel immunoglobuline extracellulaire Ig0 spécifiquement exprimé par les photorécepteurs. En aval de cette signalisation métabolique, RdCVFL est impliquée dans l'homéostasie redox (Mei et al., 2016). Le potentiel redox de RdCVFL lui est conféré par le métabolisme du glucose via la voie des pentoses phosphate qui produit le cofacteur NADPH responsable de l'activité des thioredoxine réductases (TXNRD) (Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; and Stryer, 2002). RdCVFL protège les cônes contre les dommages causés par l'oxydation des cystéines. Par conséquent, les deux produits du gène *NXNLI* protègent les cônes par deux mécanismes différents où RdCVF agit en amont de RdCVFL. Nous avons confirmé que chez les primates tout comme chez la souris, l'épissage alternatif de *NXNLI* est spécifique des bâtonnets. Ce gène est alternativement épissé dans les bâtonnets

entraînant l'expression des deux produits RdCVF et RdCVFL dans ces cellules alors qu'il est systématiquement épissé dans les cônes où seule RdCVFL est exprimée. Les cônes sont les ancêtres des bâtonnets, ces derniers sont apparus au cours de l'évolution pour des raisons d'économie d'énergie par la rétine duplexe (constituée de cônes et de bâtonnets) (Fain et al., 2010; Morshedian and Fain, 2015, 2017). C'est pourquoi nous pensons que la pression de sélection s'est dans un premier temps exercée sur la thiorédoxine RdCVFL qui est l'ancêtre du facteur trophique RdCVF (**Fig. 243**).

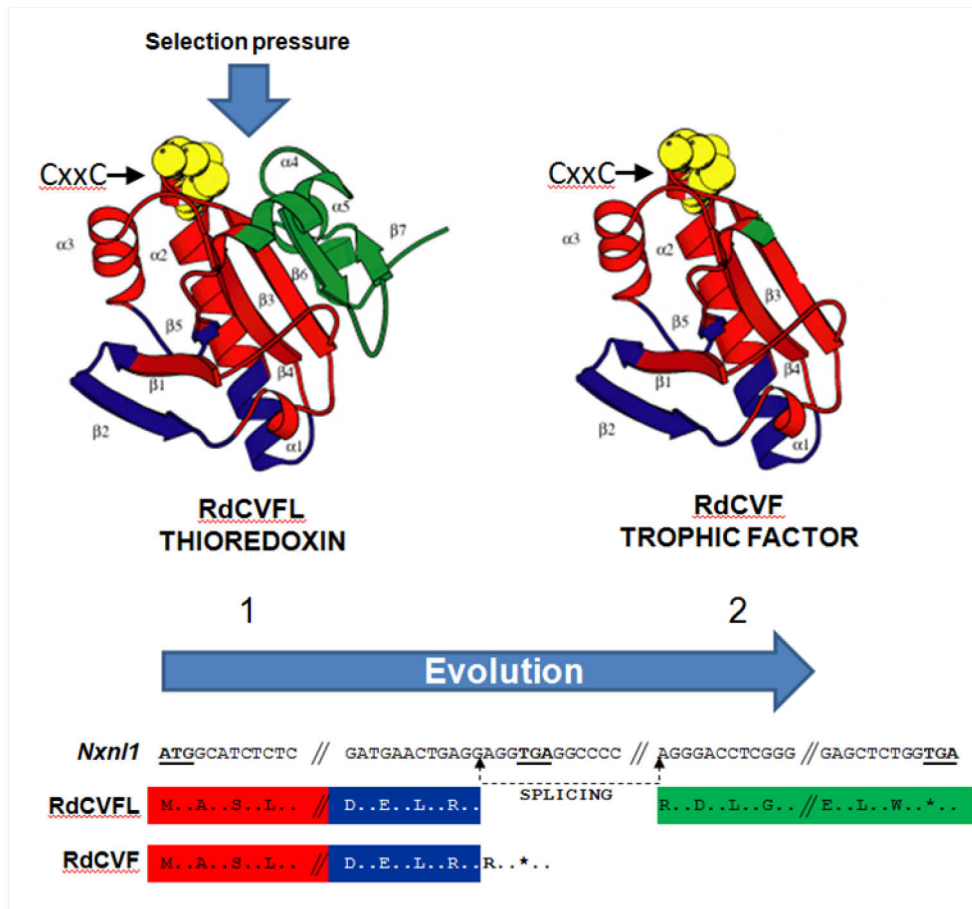


Figure 243: Considération théorique de l'évolution du gène *NXNL1*.

Cela nous amène à nous questionner quant à l'origine d'un point de vue évolutif de la signalisation métabolique de RdCVF (Léveillard and Sahel, 2017). Est-ce que les mécanismes moléculaires qui entraînent l'épissage alternatif et donc la rétention de l'intron de *NXNL1* sont contemporains de l'émergence des bâtonnets ou est-ce qu'ils existaient déjà bien avant cet événement? Pour répondre à cette question nous avons étudié l'expression de ce gène dans un premier modèle d'étude, la lamproie

Petromyzon marinus qui est un vertébré aquatique appartenant à la famille des agnathes et qui possède une bouche ventouse sans mâchoire. Avec les myxines, qui représentent l'autre groupe de cette famille, les agnathes sont séparés des gnathostomes (vertébrés à mâchoires) depuis plus de 500 millions d'années. Les études sur la lamproie qui occupe une position phylogénétique stratégique permettent de mettre en évidence les grandes caractéristiques communes à l'ensemble des vertébrés. De plus l'œil de la lamproie est très similaire à celui des gnathostomes. Il est constitué d'un iris, d'un cristallin et d'une rétine qui présente une organisation laminaire comparable à celle des mammifères. Cette rétine est composée de cellules ganglionnaires, de cellules amacrines, de cellules bipolaires, cellules horizontales et surtout de photorécepteurs (Fritzsche and Collin, 1990; Rubinson and Cain, 1989) qui présentent des caractéristiques de cônes et de bâtonnets. Nos résultats indiquent que le gène *NXNLI* est alternativement épissé dans la rétine de lamproie, indiquant que le phénomène d'inhibition de l'épissage entraînant la rétention de l'intron de ce gène est antérieur à l'apparition de la lamproie. De plus, comme chez les primates et la souris, cet épissage a lieu uniquement dans les bâtonnets alors que dans les cônes le gène est toujours épissé. RdCVF de lamproie interagit avec son récepteur BSG1 qui possède le domaine Ig0 et qui est également exprimé dans la rétine. Le mode d'action de RdCVF et sa signalisation sont déjà en place chez la lamproie et date donc d'au moins 450 millions d'années. Le deuxième modèle d'étude dans ce travail de thèse est *Hydra vulgaris* qui appartient à la famille des cnidaires qui est un groupe frère des bilatériens auquel appartiennent les primates. De nombreuses opsines sont exprimées chez l'hydre, organisme qui présente la particularité de ne pas posséder d'œil mais une photosensibilité dermique (McCullough, 1962; Musio et al., 2001b). Nous avons démontré que l'hydre exprime deux gènes ancestraux de *NXNLI*, localisés en tandem sur le même chromosome et présentant des séquences très similaires. Ces deux gènes expriment les deux messagers qui coderaient pour les protéines RdCVF et RdCVFL. Alors que la fonction ancestrale de thiorédoxine de RdCVFL chez l'hydre a été mise en évidence, aucune fonction de RdCVF n'a été démontrée, d'autant plus que l'hydre n'exprime pas de récepteur BSG1 avec un domaine Ig0. Même si le profil d'expression des messagers *short hydra NxnlA* et *short hydra NxnlB* suivent celui du messager qui code pour Hmops2, qui est une opsine impliquée dans la photosensibilité de l'hydre, il semble que la fonction de facteur trophique de RdCVF chez l'hydre ne

soit pas remplie. En admettant que les messagers qui codent pour RdCVFa et de b de l'hydre ne soient pas dégradés suite au phénomène de NMD, ces protéines qui présentent un patron d'expression en lien avec la vision auraient une fonction autre que celle connue chez les mammifères de facteur trophique, ou encore pas de fonction chez l'hydre. Ce genre d'exemple est appelé dans les études d'Evo-Devo, un phénomène d'exaptation moléculaire. La combinaison de nos résultats indique que l'inhibition de l'épissage du gène *NXNLI* qui entraîne la rétention de son intron et l'expression de RdCVF a précédé l'émergence des bâtonnets et existe depuis au moins 600 millions d'années. Cependant, il semble que ce soit l'épissage alternatif du gène *Basigin* qui code pour BSG1 et l'apparition du domaine d'interaction avec RdCVF, Ig0 qui est apparu au cours de l'évolution avec les bâtonnets (**Fig. 244**).

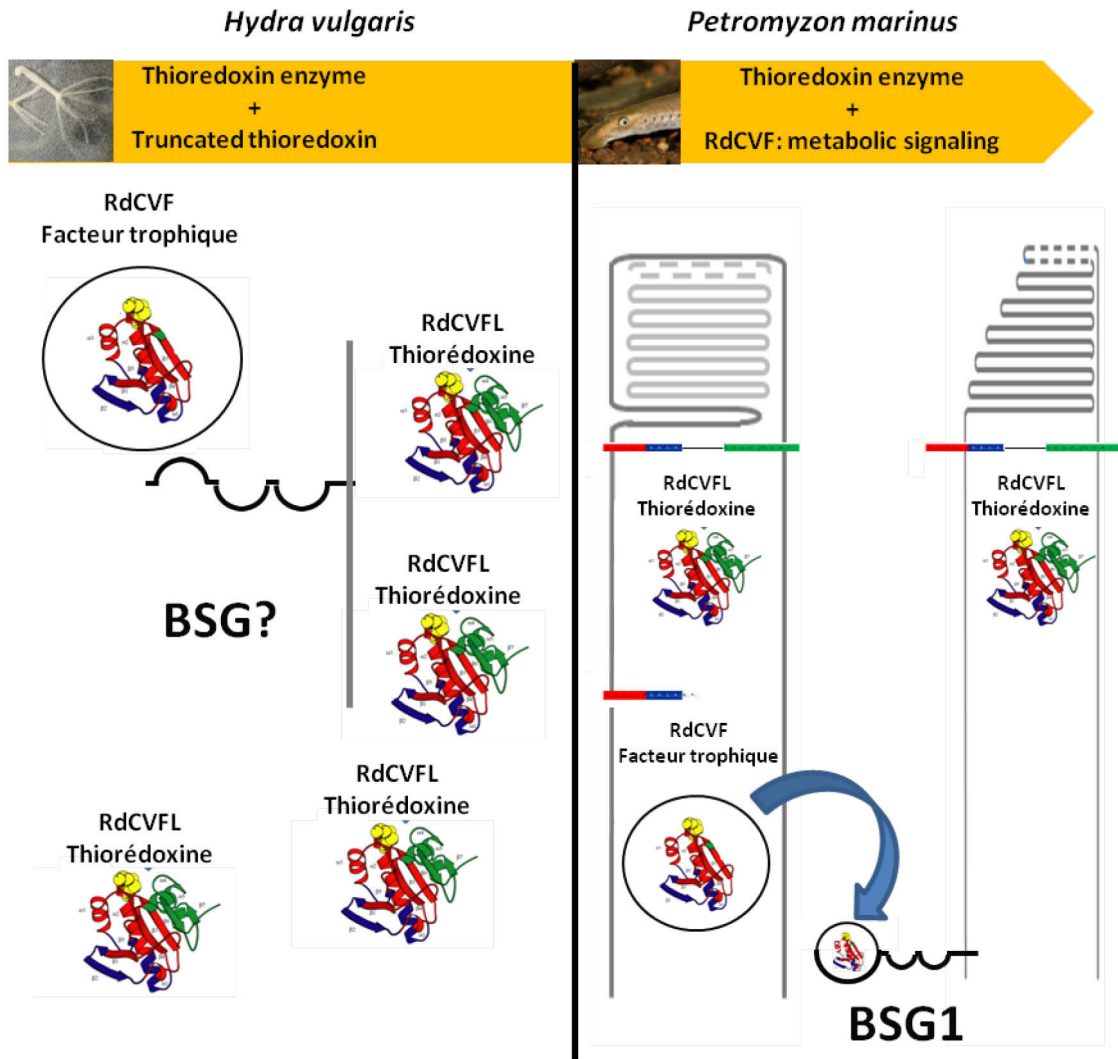


Figure 244: Schéma récapitulatif de la fonction de RdCVF, RdCVFL et BSG1 chez l'hydre et la lamproie.

Les thiorédoxines telles que RdCVFL ne possèdent pas de séquence signal en N-terminal et ne sont donc pas secrétées via l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique. Elles sont connues pour être secrétées de manière non conventionnelle mais ce mécanisme reste inconnu (Rubartelli et al., 1992). RdCVF qui est une thiorédoxine inactive car tronquée dans son domaine thioredoxine en C-terminal, possède tout de même le site catalytique (CPQC) qui peut être oxydé. Ces caractéristiques rendent RdCVF pro-oxydante et toxique pour les bâtonnets qui pour la rejeter la sécrète, c'est ainsi que cette protéine peut jouer son rôle de facteur trophique pour les cônes. La combinaison de tous ces événements a facilité la transition entre la

fonction d'homéostasie de RdCVFL vers la signalisation métabolique de RdCVF au cours de l'évolution. En conclusion, la nouvelle fonction de RdCVF est apparue après la perte de son domaine thiorédoxine à la suite d'un accident entraînant un « défaut » d'épissage du gène *NXNLI*. Les bâtonnets moins énergivores sont apparus au cours de l'évolution pour permettre à la rétine de consommer moins d'énergie. Cependant, étant plus nombreux, ils ont tendance à mobiliser et à consommer plus de glucose au dépend des cônes minoritaires chez les mammifères. Afin de compenser ce déséquilibre, les bâtonnets par une sorte d'altruisme secrètent RdCVF qui via le complexe BSG1/GLUT1 augmente la consommation du glucose par les cônes (Léveillard et al., 2015). Il semble donc raisonnable de proposer que l'évolution du gène *NXNLI* est un singulier exemple de système super-thiorédoxine où un gène qui codait pour une protéine RdCVFL, suite à un accident, code pour une deuxième protéine, RdCVF. RdCVF, sans fonction première mais qui au cours de l'évolution vient appuyer la fonction de RdCVFL via le métabolisme du glucose par la voie des pentoses phosphates. L'évolution du gène *NXNLI* est un formidable exemple d'illustration de la théorie du hasard et la nécessité défendue par Jacques Monod (Monod, 1970). En effet, dans ses essais sur la philosophie naturelle de la biologie moderne, Jacques Monod explique que toute nouvelle protéine issue d'une altération structurale sera testée pour sa compatibilité avec l'ensemble d'un système qui commande l'exécution d'un projet d'un organisme. Que par la sélection, l'évolution irréversible permet de mettre en évidence des fonctions de protéines ancestrales qui n'en avaient pas et qu'alors que ces phénomènes ont toujours existés, c'est seulement avec la découverte et la compréhension du code génétique que ces nombreuses théories du système vivant ont été élucidées. Le gène *NXNLI* code pour deux protéines aux fonctions complètement différentes mais qui ont le même but, à savoir protéger et maintenir les cônes en vie, maintenant la vision utile à l'organisme (Thierry Léveillard and Najate Aït-Ali, 2017) (**Fig.245**).

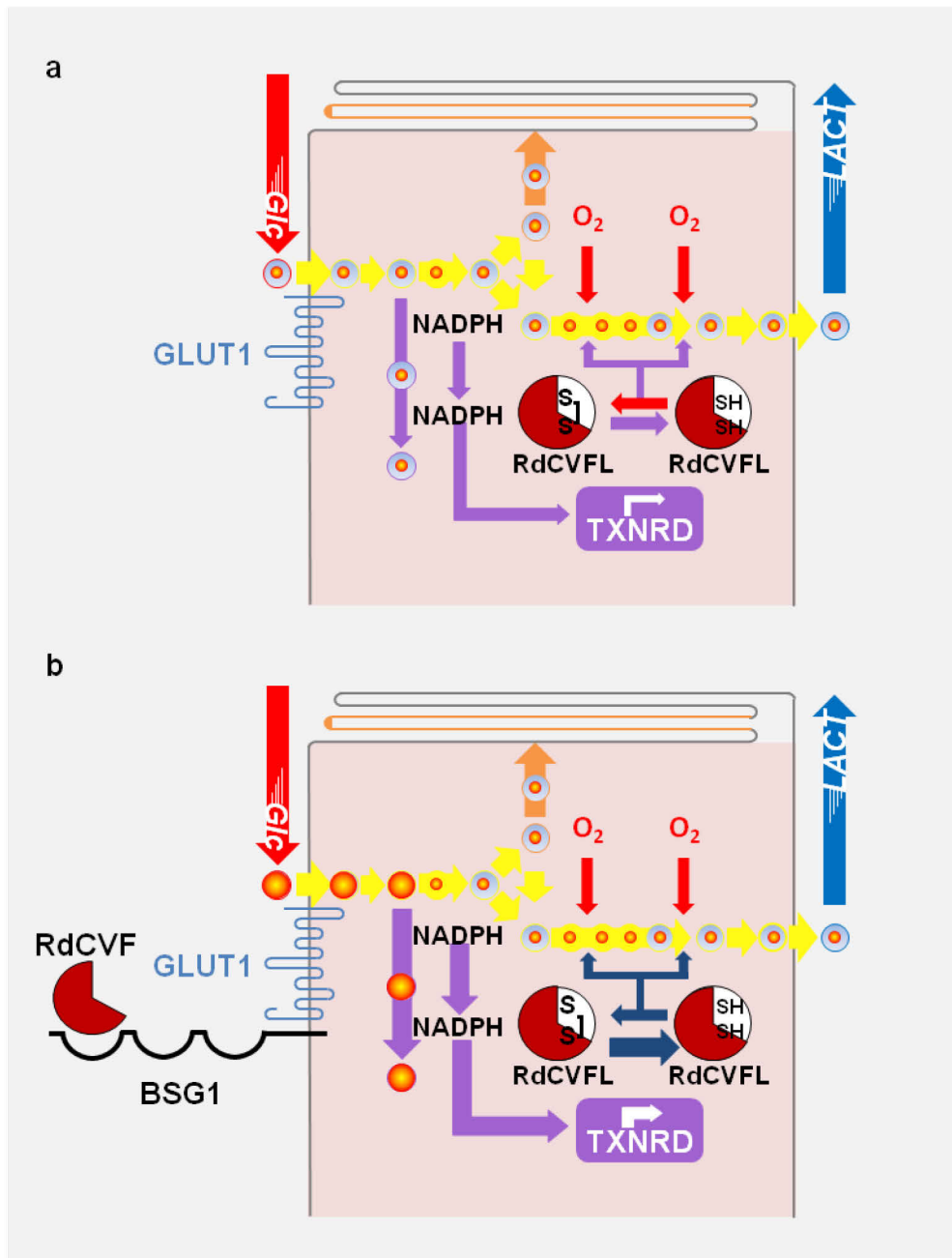


Figure 245: Le gène *NXNL1* code pour un système super-thiorédoxine. **a)** En absence de RdCVF, sa signalisation via le complexe BSG1/GLUT1, la réduction de RdCVFL oxydée dans les cônes par la thiorédoxine réductase (TXNRD) et le NADPH sont limités par l'absorption du glucose. **b)** La thiorédoxine tronquée extracellulaire RdCVF accélère l'absorption du glucose suite à son interaction avec le complexe BSG1/GLUT1 à la surface des cônes. La concentration du NADPH produit par la voie des pentose phosphate est augmentée. Cela a pour conséquence d'améliorer la réduction de RdCVFL. Glc: glucose, lact: lactate et ROS: reactive oxygen species. Les cercles représentent les métabolites et leurs diamètres sont proportionnels à leurs concentrations. Les flèches jaunes représentent la glycolyse, Les flèches violettes représentent la voie des pentose phosphate et la flèche orange représente la synthèse des triglycérides.

BIBLIOGRAPHIE

(1958a). System of ophthalmology / edited by Sir Stewart Duke-Elder (London: Kimpton).

(1958b). The vertebrate visual system. *AMA Archives of Ophthalmology* 59, 981-982.
<<http://dx.doi.org/10.1001/archopht.1958.00940070195028>>

(1990). In *Advances in Photoreception: Proceedings of a Symposium on Frontiers of Visual Science* (Washington (DC)).
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25144079>>

(1999). Financial analyst sees cooperative efforts of MoDo and SCA in the production of bond paper as the first step in a new market structure. *Sven Papperstidn* 102, 54-54.
<<Go to ISI>://WOS:000080964700011>

Ait-Ali, N. (2011). Identification du recepteur de Rod-Derived Cone Viability Factor (EPHE Ecole pratique des hautes études).

Ait-Ali, N., Fridlich, R., Millet-Puel, G., Clerin, E., Delalande, F., Jaillard, C., Blond, F., Perrocheau, L., Reichman, S., Byrne, L.C., Olivier-Bandini, A., Bellalou, J., Moyse, E., Bouillaud, F., Nicol, X., Dalkara, D., van Dorsselaer, A., Sahel, J.A., and Leveillard, T. (2015). Rod-derived cone viability factor promotes cone survival by stimulating aerobic glycolysis. *Cell* 161, 817-832.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25957687>>

Akimoto, M., Cheng, H., Zhu, D., Brzezinski, J.A., Khanna, R., Filippova, E., Oh, E.C., Jing, Y., Linares, J.L., Brooks, M., Zarepari, S., Mears, A.J., Hero, A., Glaser, T., and Swaroop, A. (2006). Targeting of GFP to newborn rods by Nrl promoter and temporal expression profiling of flow-sorted photoreceptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 3890-3895.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16505381>>

Ambrosone, A., Marchesano, V., Tino, A., Hobmayer, B., and Tortiglione, C. (2012). Hymc1 downregulation promotes stem cell proliferation in *Hydra vulgaris*. *PloS one* 7, e30660.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22292012>>

Ambrosone, A., Roopin, M., Pelaz, B., Abdelmonem, A.M., Ackermann, L.M., Mattera, L., Allocca, M., Tino, A., Klapper, M., Parak, W.J., Levy, O., and Tortiglione, C. (2017). Dissecting common and divergent molecular pathways elicited by CdSe/ZnS quantum dots in freshwater and marine sentinel invertebrates. *Nanotoxicology* 11, 289-303.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28248594>>

Applebury, M.L. (1990). Molecular-Genetics - Insight into Blindness. *Nature* 343, 316-317.
<<Go to ISI>://WOS:A1990CK91800034>

Arner, E.S., and Holmgren, A. (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European journal of biochemistry / FEBS* 267, 6102-6109.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11012661>>

Arner, E.S.J. (2017). Targeting the Selenoprotein Thioredoxin Reductase 1 for Anticancer Therapy. *Adv Cancer Res* 136, 139-151.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29054416>>

Artero, R., Prokop, A., Paricio, N., Begemann, G., Pueyo, I., Mlodzik, M., Perez-Alonso, M., and Baylies, M.K. (1998). The muscleblind gene participates in the organization of Z-bands and epidermal attachments of *Drosophila* muscles and is regulated by Dmef2. *Developmental biology* 195, 131-143.

<<Go to ISI>://WOS:000072869700004>

Baker, M. (2015). Reproducibility crisis: Blame it on the antibodies. *Nature* 521, 274-276.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25993940>>

Beach, M.J., and Pascoe, D. (1998). The role of *Hydra vulgaris* (Pallas) in assessing the toxicity of freshwater pollutants. *Water research* 32, 101-106.

<<Go to ISI>://WOS:000071108600014>

Begemann, G., Paricio, N., Artero, R., Kiss, I., Perez-Alonso, M., and Mlodzik, M. (1997). muscleblind, a gene required for photoreceptor differentiation in *Drosophila*, encodes novel nuclear Cys3His-type zinc-finger-containing proteins. *Development* 124, 4321-4331.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9334280>>

Beltran, W.A., Wen, R., Acland, G.M., and Aguirre, G.D. (2007). Intravitreal injection of ciliary neurotrophic factor (CNTF) causes peripheral remodeling and does not prevent photoreceptor loss in canine RPGR mutant retina. *Experimental eye research* 84, 753-771.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17320077>>

Bennett, J. (2005). Strategies for delivery of rod-derived cone viability factor. *Retina* 25, S47.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16374333>>

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., and Stryer, L. (2002). *Biochemistry, Fifth Edition* (W.H. Freeman).

<<https://books.google.fr/books?id=uDFqAAAAMAAJ>>

Biamonti, G., and Caceres, J.F. (2009). Cellular stress and RNA splicing. *Trends in biochemical sciences* 34, 146-153.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19208481>>

Birch, D.G., Weleber, R.G., Duncan, J.L., Jaffe, G.J., Tao, W., and Ciliary Neurotrophic Factor Retinitis Pigmentosa Study, G. (2013). Randomized trial of ciliary neurotrophic factor delivered by encapsulated cell intraocular implants for retinitis pigmentosa. *American journal of ophthalmology* 156, 283-292 e281.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23668681>>

Blom, N., Sicheritz-Ponten, T., Gupta, R., Gammeltoft, S., and Brunak, S. (2004). Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* 4, 1633-1649.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15174133>>

Burge CB, Tuschl T, Sharp PA 1999. Splicing of Precursors to mRNAs by the Spliceosomes. In *The RNA world* Second edition (ed. Gesteland RF et al.), pp. 525–560 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Byrne, L.C., Dalkara, D., Luna, G., Fisher, S.K., Clerin, E., Sahel, J.A., Leveillard, T., and Flannery, J.G. (2015). Viral-mediated RdCVF and RdCVFL expression protects cone and rod photoreceptors in retinal degeneration. *The Journal of clinical investigation* 125, 105-116.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25415434>>

Carter-Dawson, L.D., LaVail, M.M., and Sidman, R.L. (1978). Differential effect of the rd mutation on rods and cones in the mouse retina. *Investigative ophthalmology & visual science* 17, 489-498.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/659071>>

Cepko, C., and Punzo, C. (2015). Cell metabolism: Sugar for sight. *Nature* 522, 428-429.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26108850>>

Chalmel, F., Leveillard, T., Jaillard, C., Lardenois, A., Berdugo, N., Morel, E., Koehl, P., Lambrou, G., Holmgren, A., Sahel, J.A., and Poch, O. (2007). Rod-derived Cone Viability Factor-2 is a novel bifunctional-thioredoxin-like protein with therapeutic potential. *BMC molecular biology* 8.
<<Go to ISI>://WOS:000250755800001>

Chang, B., Hawes, N.L., Pardue, M.T., German, A.M., Hurd, R.E., Davisson, M.T., Nusinowitz, S., Rengarajan, K., Boyd, A.P., Sidney, S.S., Phillips, M.J., Stewart, R.E., Chaudhury, R., Nickerson, J.M., Heckenlively, J.R., and Boatright, J.H. (2007). Two mouse retinal degenerations caused by missense mutations in the beta-subunit of rod cGMP phosphodiesterase gene. *Vision research* 47, 624-633.
<<Go to ISI>://WOS:000244947000005>

Chapman, J.A., Kirkness, E.F., Simakov, O., Hampson, S.E., Mitros, T., Weinmaier, T., Rattei, T., Balasubramanian, P.G., Borman, J., Busam, D., Disbennett, K., Pfannkoch, C., Sumin, N., Sutton, G.G., Viswanathan, L.D., Walenz, B., Goodstein, D.M., Hellsten, U., Kawashima, T., Prochnik, S.E., Putnam, N.H., Shu, S., Blumberg, B., Dana, C.E., Gee, L., Kibler, D.F., Law, L., Lindgens, D., Martinez, D.E., Peng, J., Wigge, P.A., Bertulat, B., Guder, C., Nakamura, Y., Ozbek, S., Watanabe, H., Khalturin, K., Hemmrich, G., Franke, A., Augustin, R., Fraune, S., Hayakawa, E., Hayakawa, S., Hirose, M., Hwang, J.S., Ikeo, K., Nishimiya-Fujisawa, C., Ogura, A., Takahashi, T., Steinmetz, P.R., Zhang, X., Aufschnaiter, R., Eder, M.K., Gorny, A.K., Salvenmoser, W., Heimberg, A.M., Wheeler, B.M., Peterson, K.J., Bottger, A., Tischler, P., Wolf, A., Gojobori, T., Remington, K.A., Strausberg, R.L., Venter, J.C., Technau, U., Hobmayer, B., Bosch, T.C., Holstein, T.W., Fujisawa, T., Bode, H.R., David, C.N., Rokhsar, D.S., and Steele, R.E. (2010). The dynamic genome of Hydra. *Nature* 464, 592-596.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20228792>>

Chen, Z., and Xu, X. (2016). Roles of nucleolin. Focus on cancer and anti-cancer therapy. *Saudi Med J* 37, 1312-1318.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27874146>>

Chittka, L., and Raine, N.E. (2006). Recognition of flowers by pollinators. *Current opinion in plant biology* 9, 428-435.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16713328>>

Chuang, J.Z., Zhao, Y., and Sung, C.H. (2007). SARA-regulated vesicular targeting underlies formation of the light-sensing organelle in mammalian rods. *Cell* 130, 535-547.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17693260>>

Cideciyan, A.V., Aleman, T.S., Boye, S.L., Schwartz, S.B., Kaushal, S., Roman, A.J., Pang, J.J., Sumaroka, A., Windsor, E.A., Wilson, J.M., Flotte, T.R., Fishman, G.A., Heon, E., Stone, E.M., Byrne, B.J., Jacobson, S.G., and Hauswirth, W.W. (2008). Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 15112-15117.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18809924>>

Clerin, E., Yang, Y., Forster, V., Fontaine, V., Sahel, J.A., and Leveillard, T. (2014). Vibratome sectioning mouse retina to prepare photoreceptor cultures. *Journal of visualized experiments : JoVE*.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25548881>>

Collin, S.P., Hart, N.S., Shand, J., and Potter, I.C. (2003). Morphology and spectral absorption characteristics of retinal photoreceptors in the southern hemisphere lamprey (*Geotria australis*). *Visual neuroscience* 20, 119-130.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12916734>>

Cowper, A.E., Caceres, J.F., Mayeda, A., and Sreaton, G.R. (2001). Serine-arginine (SR) protein-like factors that antagonize authentic SR proteins and regulate alternative splicing. *Journal of Biological Chemistry* 276, 48908-48914.

<<Go to ISI>://WOS:000173922100038>

Crick, F. (1979). Split genes and RNA splicing. *Science* 204, 264-271.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/373120>>

Cronin, T., Raffelsberger, W., Lee-Rivera, I., Jaillard, C., Niepon, M.L., Kinzel, B., Clerin, E., Petrosian, A., Picaud, S., Poch, O., Sahel, J.A., and Leveillard, T. (2010). The disruption of the rod-derived cone viability gene leads to photoreceptor dysfunction and susceptibility to oxidative stress. *Cell death and differentiation* 17, 1199-1210.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20139892>>

Daiger, S.P., Humphries, M.M., Giesenschlag, N., Sharp, E., McWilliam, P., Farrer, J., Bradley, D., Kenna, P., McConnell, D.J., Sparkes, R.S., and et al. (1989). Linkage analysis of human chromosome 4: exclusion of autosomal dominant retinitis pigmentosa (ADRP) and detection of new linkage groups. *Cytogenetics and cell genetics* 50, 181-187.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2572401>>

Darwin, C. (1859). *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, Or, The Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life* (J. Murray).

<<https://books.google.fr/books?id=jTZbAAAAQAAJ>>

Darwin, C. (1871). *The Descent of Man, and Selection in Relation to Sex: And Selection in Relation to Sex*.

Daum, J.M., Keles, O., Holwerda, S.J., Kohler, H., Rijli, F.M., Stadler, M., and Roska, B. (2017). The formation of the light-sensing compartment of cone photoreceptors coincides with a transcriptional switch. *eLife* 6.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29106373>>

Delyfer, M.N., Ait-Ali, N., Camara, H., Clerin, E., Korobelnik, J.F., Sahel, J.A., and Leveillard, T. (2013). Transcriptomic Analysis of Human Retinal Surgical Specimens Using jouRNAI. *Jove-Journal of Visualized Experiments*.

<<Go to ISI>://WOS:000209228000016>

Dias, M.F., Joo, K., Kemp, J.A., Fialho, S.L., da Silva Cunha, A., Jr., Woo, S.J., and Kwon, Y.J. (2017). Molecular genetics and emerging therapies for retinitis pigmentosa: Basic research and clinical perspectives. *Progress in retinal and eye research*.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29097191>>

Dickson, D.H., and Graves, D.A. (1979). Fine structure of the lamprey photoreceptors and retinal pigment epithelium (*Petromyzon marinus* L.). *Experimental eye research* 29, 45-60.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/228957>>

Donders FC(1853). *Annales d'oculistique* (Doin.).

<<https://books.google.fr/books?id=eRwCAAAAYAAJ>>

Dryja, T.P., Hahn, L.B., Reboul, T., and Arnaud, B. (1996). Missense mutation in the gene encoding the alpha subunit of rod transducin in the Nougaret form of congenital stationary night blindness. *Nature genetics* 13, 358-360.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8673138>>

Eakin, R.M. (1965). Evolution of photoreceptors. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 30, 363-370.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5219487>>

Eakin, R.M., and Brandenberger, J.L. (1981). Unique eye of probable evolutionary significance. *Science* 211, 1189-1190.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7466394>>

Ebashi, S. (1972). Calcium ions and muscle contraction. *Nature* 240, 217-218.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4574297>>

Evangelista, D., Tripathi, K.P., and Guarracino, M.R. (2016). An Atlas of annotations of *Hydra vulgaris* transcriptome. *BMC bioinformatics* 17, 360.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28185543>>

Fahling, M., Steege, A., Perlewitz, A., Nafz, B., Mrowka, R., Persson, P.B., and Thiele, B.J. (2005). Role of nucleolin in posttranscriptional control of MMP-9 expression. *Biochimica et biophysica acta* 1731, 32-40.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16153722>>

Fain, G.L., Hardie, R., and Laughlin, S.B. (2010). Phototransduction and the evolution of photoreceptors. *Current biology : CB* 20, R114-124.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20144772>>

Faktorovich, E.G., Steinberg, R.H., Yasumura, D., Matthes, M.T., and LaVail, M.M. (1990). Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor. *Nature* 347, 83-86.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2168521>>

Feuda, R., Dohrmann, M., Pett, W., Philippe, H., Rota-Stabelli, O., Lartillot, N., Worheide, G., and Pisani, D. (2017). Improved Modeling of Compositional Heterogeneity Supports Sponges as Sister to All Other Animals. *Current Biology* 27, 3864-+.

<<Go to ISI>://WOS:000418285000030>

Fintz, A.C., Audo, I., Hicks, D., Mohand-Said, S., Leveillard, T., and Sahel, J. (2003). Partial characterization of retina-derived cone neuroprotection in two culture models of photoreceptor degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science* 44, 818-825.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12556418>>

Fradot, M. (2007). ETUDE FONCTIONNELLE DE NR2E3 UN RECEPTEUR NUCLEAIRE ORPHELIN IMPLIQUE DANS LA DIFFERENCIATION DES PHOTORECEPTEURS.

Fritsch, B., and Collin, S.P. (1990). Dendritic distribution of two populations of ganglion cells and the retinopetal fibers in the retina of the silver lamprey (*Ichthyomyzon unicuspis*). *Visual neuroscience* 4, 533-545.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2278933>>

Funato, Y., and Miki, H. (2007). Nucleoredoxin, a novel thioredoxin family member involved in cell growth and differentiation. *Antioxidants & redox signaling* 9, 1035-1057.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17567240>>

Galy, A., Roux, M.J., Sahel, J.A., Leveillard, T., and Giangrande, A. (2005). Rhodopsin maturation defects induce photoreceptor death by apoptosis: a fly model for RhodopsinPro23His human retinitis pigmentosa. *Human molecular genetics* 14, 2547-2557.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16049034>>

Ge, Y., and Porse, B.T. (2014). The functional consequences of intron retention: Alternative splicing coupled to NMD as a regulator of gene expression. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 36, 236-243.

<<Go to ISI>://WOS:000331953500003>

Gehring, W.J., and Ikeo, K. (1999). Pax 6: mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet* 15, 371-377.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10461206>>

Gerkema, M.P., Davies, W.I., Foster, R.G., Menaker, M., and Hut, R.A. (2013). The nocturnal bottleneck and the evolution of activity patterns in mammals. *Proceedings Biological sciences / The Royal Society* 280, 20130508.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23825205>>

Gierer, A., Berking, S., Bode, H., David, C.N., Flick, K., Hansmann, G., Schaller, H., and Trenkner, E. (1972). Regeneration of hydra from reaggregated cells. *Nature: New biology* 239, 98-101.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4507522>>

Glisin, V., Crkvenjakov, R., and Byus, C. (1974). Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. *Biochemistry* 13, 2633-2637.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4831907>>

Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23, 175-182.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6260373>>

Gotzmann, J., Eger, A., Meissner, M., Grimm, R., Gerner, C., Sauermann, G., and Foisner, R. (1997). Two-dimensional electrophoresis reveals a nuclear matrix-associated nucleolin complex of basic isoelectric point. *Electrophoresis* 18, 2645-2653.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9527495>>

Guertin, S., and Kass-Simon, G. (2015). Extraocular spectral photosensitivity in the tentacles of *Hydra vulgaris*. *Comparative biochemistry and physiology Part A, Molecular & integrative physiology* 184, 163-170.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25724097>>

Gupta, N., Brown, K.E., and Milam, A.H. (2003). Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Experimental eye research* 76, 463-471.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12634111>>

Haider, N.B., Jacobson, S.G., Cideciyan, A.V., Swiderski, R., Streb, L.M., Searby, C., Beck, G., Hockey, R., Hanna, D.B., Gorman, S., Duhl, D., Carmi, R., Bennett, J., Weleber, R.G., Fishman, G.A., Wright, A.F., Stone, E.M., and Sheffield, V.C. (2000). Mutation of a nuclear receptor gene, NR2E3, causes enhanced S cone syndrome, a disorder of retinal cell fate. *Nature genetics* 24, 127-131.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10655056>>

Hatfield, D.L., and Gladyshev, V.N. (2002). How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Molecular and cellular biology* 22, 3565-3576.

<<Go to ISI>://WOS:000175557600001>

Hertel, K.J.E. (2014). Spliceosomal Pre-mRNA Splicing.

Ho, T.H., Charlet, B.N., Poulos, M.G., Singh, G., Swanson, M.S., and Cooper, T.A. (2004). Muscleblind proteins regulate alternative splicing. *The EMBO journal* 23, 3103-3112.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15257297>>

Hofhuis, J., Schueren, F., Notzel, C., Lingner, T., Gartner, J., Jahn, O., and Thoms, S. (2016). The functional readthrough extension of malate dehydrogenase reveals a modification of the genetic code. *Open Biol* 6.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27881739>>

Holmgren, A. (1985). Thioredoxin. *Annual review of biochemistry* 54, 237-271.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3896121>>

Howard, M.T., Aggarwal, G., Anderson, C.B., Khatri, S., Flanigan, K.M., and Atkins, J.F. (2005). Recoding elements located adjacent to a subset of eukaryal selenocysteine-specifying UGA codons. *The EMBO journal* 24, 1596-1607.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15791204>>

Hunter, R.J. (1981). Chapter 1 - Introduction. In *Zeta Potential in Colloid Science* (Academic Press), pp. 1-10.
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123619617500055>>

Jaillard, C., Mouret, A., Niepon, M.L., Clerin, E., Yang, Y., Lee-Rivera, I., Ait-Ali, N., Millet-Puel, G., Cronin, T., Sedmak, T., Raffelsberger, W., Kinzel, B., Trembleau, A., Poch, O., Bennett, J., Wolfrum, U., Lledo, P.M., Sahel, J.A., and Leveillard, T. (2012). Nxn2 splicing results in dual functions in neuronal cell survival and maintenance of cell integrity. *Human molecular genetics* 21, 2298-2311.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22343139>>

Justice, M.J., and Dhillon, P. (2016). Using the mouse to model human disease: increasing validity and reproducibility. *Disease models & mechanisms* 9, 101-103.
<<Go to ISI>://WOS:000371438400002>

Kahn, J. (2014). Lessons learned: challenges in applying current constraints on research on chimpanzees to other animals. *Theor Med Bioeth* 35, 97-104.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24566663>>

Kaiser, J. (2011). Clinical research. Gene therapists celebrate a decade of progress. *Science* 334, 29-30.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21980087>>

Kajiwara, K., Hahn, L.B., Mukai, S., Travis, G.H., Berson, E.L., and Dryja, T.P. (1991). Mutations in the human retinal degeneration slow gene in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nature* 354, 480-483.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1684223>>

Karntanut, W., and Pascoe, D. (2000). A comparison of methods for measuring acute toxicity to *Hydra vulgaris*. *Chemosphere* 41, 1543-1548.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11057679>>

- Keeler, C.E. (1924). The Inheritance of a Retinal Abnormality in White Mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *10*, 329-333.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16576828>>
- Keeling, K.M., and Bedwell, D.M. (2011). Suppression of nonsense mutations as a therapeutic approach to treat genetic diseases. *Wires Rna* *2*, 837-852.
<<Go to ISI>://WOS:000301865100006>
- King, N., and Rokas, A. (2017). Embracing Uncertainty in Reconstructing Early Animal Evolution. *Current biology : CB* *27*, R1081-R1088.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29017048>>
- Kirk, P., Wilson, M.C., Heddle, C., Brown, M.H., Barclay, A.N., and Halestrap, A.P. (2000). CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. *Embo Journal* *19*, 3896-3904.
<<Go to ISI>://WOS:000088681800007>
- Koizumi, O. (2007). Nerve ring of the hypostome in hydra: is it an origin of the central nervous system of bilaterian animals? *Brain, behavior and evolution* *69*, 151-159.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17230023>>
- Komeima, K., Rogers, B.S., Lu, L., and Campochiaro, P.A. (2006). Antioxidants reduce cone cell death in a model of retinitis pigmentosa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 11300-11305.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16849425>>
- Koyanagi, M., Takano, K., Tsukamoto, H., Ohtsu, K., Tokunaga, F., and Terakita, A. (2008). Jellyfish vision starts with cAMP signaling mediated by opsin-G(s) cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 15576-15580.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18832159>>
- Krebs, H.A. (1972). The Pasteur effect and the relations between respiration and fermentation. *Essays in biochemistry* *8*, 1-34.
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4265190>>
- Krishnapati, L.S., and Ghaskadbi, S. (2013). Identification and characterization of VEGF and FGF from Hydra. *The International journal of developmental biology* *57*, 897-906.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24623082>>
- Krol, J., and Roska, B. (2015). Rods Feed Cones to Keep them Alive. *Cell* *161*, 706-708.
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25957678>>
- Kryger, Z., Galli-Resta, L., Jacobs, G.H., and Reese, B.E. (1998). The topography of rod and cone photoreceptors in the retina of the ground squirrel. *Visual neuroscience* *15*, 685-691.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9682870>>
- Lacalli, T.C. (2004). Sensory systems in amphioxus: a window on the ancestral chordate condition. *Brain, behavior and evolution* *64*, 148-162.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15353907>>

- Lamb, T.D., and Hunt, D.M. (2017). Evolution of the vertebrate phototransduction cascade activation steps. *Developmental biology* 431, 77-92.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28347645>>
- Lambowitz, A.M., Caprara, M.G., Zimmerly, S., and Perlman, P.S. (1999). 18 Group I and Group II Ribozymes as RNPs: Clues to the Past and Guides to the Future.
<<https://cshmonographs.org/index.php/monographs/article/view/5121>>
- Le Bris, M. (2002). *Le défi romantique* (Paris: Flammarion).
- Lentini, L., Melfi, R., Di Leonardo, A., Spinello, A., Barone, G., Pace, A., Palumbo Piccionello, A., and Pibiri, I. (2014). Toward a rationale for the PTC124 (Ataluren) promoted readthrough of premature stop codons: a computational approach and GFP-reporter cell-based assay. *Molecular pharmaceutics* 11, 653-664.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24483936>>
- Leveillard, T. (2015). Cancer metabolism of cone photoreceptors. *Oncotarget* 6, 32285-32286.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26450906>>
- Leveillard, T., and Ait-Ali, N. (2017). Cell Signaling with Extracellular Thioredoxin and Thioredoxin-Like Proteins: Insight into Their Mechanisms of Action. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017, 8475125.
- Leveillard, T., Fridlich, R., Clerin, E., Ait-Ali, N., Millet-Puel, G., Jaillard, C., Yang, Y., Zack, D., van-Dorselaer, A., and Sahel, J.A. (2014). Therapeutic strategy for handling inherited retinal degenerations in a gene-independent manner using rod-derived cone viability factors. *Comptes rendus biologies* 337, 207-213.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24702847>>
- Leveillard, T., Mohand-Said, S., Lorentz, O., Hicks, D., Fintz, A.C., Clerin, E., Simonutti, M., Forster, V., Cavusoglu, N., Chalmel, F., Dolle, P., Poch, O., Lambrou, G., and Sahel, J.A. (2004). Identification and characterization of rod-derived cone viability factor. *Nature genetics* 36, 755-759.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15220920>>
- Leveillard, T., and Sahel, J.A. (2010). Rod-derived cone viability factor for treating blinding diseases: from clinic to redox signaling. *Science translational medicine* 2, 26ps16.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20375363>>
- Leveillard, T., and Sahel, J.A. (2017). Metabolic and redox signaling in the retina. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 74, 3649-3665.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27543457>>
- Livesey, F.J., and Cepko, C.L. (2001). Vertebrate neural cell-fate determination: lessons from the retina. *Nature reviews Neuroscience* 2, 109-118.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11252990>>

Long, J.C., and Caceres, J.F. (2009). The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *The Biochemical journal* 417, 15-27.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19061484>>

Maiti, B., Arbogast, S., Allamand, V., Moyle, M.W., Anderson, C.B., Richard, P., Guicheney, P., Ferreira, A., Flanigan, K.M., and Howard, M.T. (2009). A mutation in the SEPN1 selenocysteine redefinition element (SRE) reduces selenocysteine incorporation and leads to SEPN1-related myopathy. *Human mutation* 30, 411-416.

Marchiq, I., Albregues, J., Granja, S., Gaggioli, C., Pouyssegur, J., and Simon, M.P. (2015). Knock out of the BASIGIN/CD147 chaperone of lactate/H⁺ symporters disproves its pro-tumour action via extracellular matrix metalloproteases (MMPs) induction. *Oncotarget* 6, 24636-24648.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26284589>>

Martinez, D.E. (1998). Mortality patterns suggest lack of senescence in hydra. *Experimental gerontology* 33, 217-225.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9615920>>

Mason, V.C., Li, G., Minx, P., Schmitz, J., Churakov, G., Doronina, L., Melin, A.D., Dominy, N.J., Lim, N.T.L., Springer, M.S., Wilson, R.K., Warren, W.C., Helgen, K.M., and Murphy, W.J. (2016). Genomic analysis reveals hidden biodiversity within colugos, the sister group to primates. *Science Advances* 2.

<<Go to ISI>://WOS:000383734300025>

Mayr, E. (2009). What is Darwinism? (a,b). *Fund Desafios Evol* 2, 37-61.

<<Go to ISI>://WOS:000339640400003>

McLaughlin, M.E., Sandberg, M.A., Berson, E.L., and Dryja, T.P. (1993). Recessive mutations in the gene encoding the beta-subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa. *Nature genetics* 4, 130-134.

McReynolds, J.S., and Gorman, A.L. (1970). Membrane conductances and spectral sensitivities of Pecten photoreceptors. *The Journal of general physiology* 56, 392-406.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5476389>>

Mei, X., Chaffiol, A., Kole, C., Yang, Y., Millet-Puel, G., Clerin, E., Ait-Ali, N., Bennett, J., Dalkara, D., Sahel, J.A., Duebel, J., and Leveillard, T. (2016). The Thioredoxin Encoded by the Rod-Derived Cone Viability Factor Gene Protects Cone Photoreceptors Against Oxidative Stress. *Antioxidants & redox signaling* 24, 909-923.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27025156>>

Miller, W.H. (1958). Derivatives of cilia in the distal sense cells of the retina of Pecten. *J Biophys Biochem Cytol* 4, 227-228.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13525437>>

Miniard, A.C., Middleton, L.M., Budiman, M.E., Gerber, C.A., and Driscoll, D.M. (2010). Nucleolin binds to a subset of selenoprotein mRNAs and regulates their expression. *Nucleic acids research* 38, 4807-4820.

<<Go to ISI>://WOS:000280922400031>

Mohand-Said, S., Deudon-Combe, A., Hicks, D., Simonutti, M., Forster, V., Fintz, A.C., Leveillard, T., Dreyfus, H., and Sahel, J.A. (1998). Normal retina releases a diffusible factor stimulating cone survival in the retinal degeneration mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 8357-8362.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9653191>>

Mohand-Said, S., Hicks, D., Dreyfus, H., and Sahel, J.A. (2000). Selective transplantation of rods delays cone loss in a retinitis pigmentosa model. *Archives of ophthalmology* 118, 807-811.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10865319>>

Mohand-Said, S., Hicks, D., Simonutti, M., Tran-Minh, D., Deudon-Combe, A., Dreyfus, H., Silverman, M.S., Ogilvie, J.M., Tenkova, T., and Sahel, J. (1997). Photoreceptor transplants increase host cone survival in the retinal degeneration (rd) mouse. *Ophthalmic research* 29, 290-297.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9323720>>

Monod, J. (1970). *Le hasard et la nécessité essai sur la philosophie naturelle de la biologie moderne* (Paris: Éditions du Seuil).

Montgomery, M.K., and Mcfallngai, M.J. (1992). The Muscle-Derived Lens of a Squid Bioluminescent Organ Is Biochemically Convergent with the Ocular Lens - Evidence for Recruitment of Aldehyde Dehydrogenase as a Predominant Structural Protein. *Journal of Biological Chemistry* 267, 20999-21003.

<<Go to ISI>://WOS:A1992JT97800077>

Morshedian, A., and Fain, G.L. (2015). Single-photon sensitivity of lamprey rods with cone-like outer segments. *Current biology : CB* 25, 484-487.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25660538>>

Muramatsu, T. (2016). Basigin (CD147), a multifunctional transmembrane glycoprotein with various binding partners. *Journal of biochemistry* 159, 481-490.

<<Go to ISI>://WOS:000376157800001>

Musio, C., Santillo, S., Taddei-Ferretti, C., Robles, L.J., Vismara, R., Barsanti, L., and Gualtieri, P. (2001). First identification and localization of a visual pigment in Hydra (Cnidaria, Hydrozoa). *Journal of comparative physiology A, Sensory, neural, and behavioral physiology* 187, 79-81.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11318381>>

Norianne T. Ingram¹, A.P.S.a.G.L.F. (2016). Why are rods more sensitive than cones? *The Journal of physiology* 594.

Ochrietor, J.D., Moroz, T.P., van Ekeris, L., Clamp, M.F., Jefferson, S.C., deCarvalho, A.C., Fadool, J.M., Wistow, G., Muramatsu, T., and Linser, P.J. (2003). Retina-specific expression of 5A11/Basigin-2, a member of the immunoglobulin gene superfamily. *Investigative ophthalmology & visual science* 44, 4086-4096.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12939332>>

- Okawa, H., Sampath, A.P., Laughlin, S.B., and Fain, G.L. (2008). ATP consumption by mammalian rod photoreceptors in darkness and in light. *Current biology : CB* 18, 1917-1921.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19084410>>
- Osterberg, G. (1935). Topography of the Layer of Rods and Cones in the Human Retina (A. Busck).
<<https://books.google.fr/books?id=oNEVQgAACAAJ>>
- Ovelgün (1744). Nyctalopia hereditaria. *Acta Physico-Med .* 7, Obs. 28, 76.
- Palmer, B.A., Taylor, G.J., Brumfeld, V., Gur, D., Shemesh, M., Elad, N., Osherov, A., Oron, D., Weiner, S., and Addadi, L. (2017). The image-forming mirror in the eye of the scallop. *Science* 358, 1172-1175.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29191905>>
- Pancer, Z., Amemiya, C.T., Ehrhardt, G.R., Ceitlin, J., Gartland, G.L., and Cooper, M.D. (2004a). Somatic diversification of variable lymphocyte receptors in the agnathan sea lamprey. *Nature* 430, 174-180.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15241406>>
- Pancer, Z., Mayer, W.E., Klein, J., and Cooper, M.D. (2004b). Prototypic T cell receptor and CD4-like coreceptor are expressed by lymphocytes in the agnathan sea lamprey. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 13273-13278.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15328402>>
- Pascual, M., Vicente, M., Monferrer, L., and Artero, R. (2006). The Muscleblind family of proteins: an emerging class of regulators of developmentally programmed alternative splicing. *Differentiation; research in biological diversity* 74, 65-80.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16533306>>
- Passano, L.M., and McCullough, C.B. (1962). The Light Response and the Rhythmic Potentials of Hydra. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 48, 1376-1382.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16590985>>
- Passano, L.M., and McCullough, C.B. (1965). Co-Ordinating Systems and Behaviour in Hydra. Ii. The Rhythmic Potential System. *The Journal of experimental biology* 42, 205-231.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14328679>>
- Pauletto, M., Milan, M., Moreira, R., Novoa, B., Figueras, A., Babbucci, M., Patarnello, T., and Bargelloni, L. (2014). Deep transcriptome sequencing of *Pecten maximus* hemocytes: a genomic resource for bivalve immunology. *Fish & shellfish immunology* 37, 154-165.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24486903>>
- Phelan, J.K., and Bok, D. (2000). A brief review of retinitis pigmentosa and the identified retinitis pigmentosa genes. *Molecular vision* 6, 116-124.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10889272>>

Phillips, K.A., Bales, K.L., Capitanio, J.P., Conley, A., Czoty, P.W., Hart, B.A., Hopkins, W.D., Hu, S.L., Miller, L.A., Nader, M.A., Nathanielsz, P.W., Rogers, J., Shively, C.A., and Voytko, M.L. (2014). Why primate models matter. *American journal of primatology* 76, 801-827.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24723482>>

Plachetzki, D.C., Fong, C.R., and Oakley, T.H. (2012). Cnidocyte discharge is regulated by light and opsin-mediated phototransduction. *BMC biology* 10.

<<Go to ISI>://WOS:000302938900001>

Planul, A., and Dalkara, D. (2017). Vectors and Gene Delivery to the Retina. *Annu Rev Vis Sci* 3, 121-140.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28937950>>

Punzo, C., Kornacker, K., and Cepko, C.L. (2009). Stimulation of the insulin/mTOR pathway delays cone death in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Nature neuroscience* 12, 44-52.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19060896>>

Ramachandran, P.S., Lee, V., Wei, Z., Song, J.Y., Casal, G., Cronin, T., Willett, K., Huckfeldt, R., Morgan, J.I., Aleman, T.S., Maguire, A.M., and Bennett, J. (2017). Evaluation of Dose and Safety of AAV7m8 and AAV8BP2 in the Non-Human Primate Retina. *Human gene therapy* 28, 154-167.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27750461>>

Ripps, H. (2002). Cell death in retinitis pigmentosa: gap junctions and the 'bystander' effect. *Experimental eye research* 74, 327-336.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12014914>>

Roberts, M.R., Hendrickson, A., McGuire, C.R., and Reh, T.A. (2005). Retinoid X receptor gamma is necessary to establish the S-opsin gradient in cone photoreceptors of the developing mouse retina. *Investigative ophthalmology & visual science* 46, 2897-2904.

<<Go to ISI>://WOS:000230756100034>

Roca, X., Krainer, A.R., and Eperon, I.C. (2013). Pick one, but be quick: 5' splice sites and the problems of too many choices. *Genes & development* 27, 129-144.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23348838>>

Rocancourt, C. (2011). Caractérisation moléculaire de la rétine embryonnaire et larvaire de la lamproie *Petromyzon marinus*.

Rosenfeld, P.J., Hahn, L.B., Sandberg, M.A., Dryja, T.P., and Berson, E.L. (1995). Low Incidence of Retinitis-Pigmentosa among Heterozygous Carriers of a Specific Rhodopsin Splice-Site Mutation. *Investigative ophthalmology & visual science* 36, 2186-2192.

<<Go to ISI>://WOS:A1995RY89100008>

Rosenthal, N., and Brown, S. (2007). The mouse ascending: perspectives for human-disease models. *Nature cell biology* 9, 993-999.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17762889>>

Rubartelli, A., Bajetto, A., Allavena, G., Wollman, E., and Sitia, R. (1992). Secretion of Thioredoxin by Normal and Neoplastic-Cells through a Leaderless Secretory Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 267, 24161-24164.

<<Go to ISI>://WOS:A1992KA26300004>

Rubinson, K., and Cain, H. (1989). Neural differentiation in the retina of the larval sea lamprey (*Petromyzon marinus*). *Visual neuroscience* 3, 241-248.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2487105>>

Ruete, C.G.T. (1860). *Bildliche Darstellung der Krankheiten des menschlichen Auges* (Teubner).

<https://books.google.fr/books?id=4OJZZ1X_HCwC>

Russell, S., Bennett, J., Wellman, J.A., Chung, D.C., Yu, Z.F., Tillman, A., Wittes, J., Pappas, J., Elci, O., McCague, S., Cross, D., Marshall, K.A., Walshire, J., Kehoe, T.L., Reichert, H., Davis, M., Raffini, L., George, L.A., Hudson, F.P., Dingfield, L., Zhu, X., Haller, J.A., Sohn, E.H., Mahajan, V.B., Pfeifer, W., Weckmann, M., Johnson, C., Gewaily, D., Drack, A., Stone, E., Wachtel, K., Simonelli, F., Leroy, B.P., Wright, J.F., High, K.A., and Maguire, A.M. (2017). Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 390, 849-860.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28712537>>

Ryan, J.F., Pang, K., Mullikin, J.C., Martindale, M.Q., Baxevanis, A.D., and Progra, N.C.S. (2010). The homeodomain complement of the ctenophore *Mnemiopsis leidyi* suggests that Ctenophora and Porifera diverged prior to the ParaHoxozoa. *Evodevo* 1.

<<Go to ISI>://WOS:000208517600009>

Salveti, A., Coute, Y., Epstein, A., Arata, L., Kraut, A., Navratil, V., Bouvet, P., and Greco, A. (2016). Nuclear Functions of Nucleolin through Global Proteomics and Interactomic Approaches. *Journal of proteome research* 15, 1659-1669.

<<Go to ISI>://WOS:000375891200025>

Salvini-Plawen, and Mayer, E. (1977). *On the Evolution of Photoreceptors and Eyes*, Vol 10.

Salz, H.K. (2011). Sex determination in insects: a binary decision based on alternative splicing. *Current opinion in genetics & development* 21, 395-400.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21474300>>

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1992). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology (Reading, Mass)* 24, 104-108.

Santillo, S., Orlando, P., De Petrocellis, L., Cristino, L., Guglielmotti, V., and Musio, C. (2006). Evolving visual pigments: hints from the opsin-based proteins in a phylogenetically old "eyeless" invertebrate. *Bio Systems* 86, 3-17.

Schultze, M. (1866). *Zur Anatomie und Physiologie der Retina*. *Archiv für Mikroskopische Anatomie* 2, 175-286.

<<http://dx.doi.org/10.1007/BF02962033>>

Sharp, P.A. (1994). Split genes and RNA splicing. *Cell* 77, 805-815.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7516265>>

Sharpe, L.T., Stockman, A., Jagle, H., Knau, H., and Nathans, J. (1999). L, M and L-M hybrid cone photopigments in man: deriving lambda max from flicker photometric spectral sensitivities. *Vision research* 39, 3513-3525.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10746123>>

Sieving, P.A., Caruso, R.C., Tao, W., Coleman, H.R., Thompson, D.J., Fullmer, K.R., and Bush, R.A. (2006). Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for human retinal degeneration: phase I trial of CNTF delivered by encapsulated cell intraocular implants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 3896-3901.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16505355>>

Smallwood, P.M., Wang, Y., and Nathans, J. (2002). Role of a locus control region in the mutually exclusive expression of human red and green cone pigment genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 1008-1011.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11773636>>

Smith, J.J., Antonacci, F., Eichler, E.E., and Amemiya, C.T. (2009). Programmed loss of millions of base pairs from a vertebrate genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 11212-11217.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19561299>>

Subramanian, N., Srimany, A., Kanwar, J.R., Kanwar, R.K., Akilandeswari, B., Rishi, P., Khetan, V., Vasudevan, M., Pradeep, T., and Krishnakumar, S. (2016). Nucleolin-aptamer therapy in retinoblastoma: molecular changes and mass spectrometry-based imaging. *Molecular therapy Nucleic acids* 5, e358.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27574784>>

Swain, P.K., Hicks, D., Mears, A.J., Apel, I.J., Smith, J.E., John, S.K., Hendrickson, A., Milam, A.H., and Swaroop, A. (2001). Multiple phosphorylated isoforms of NRL are expressed in rod photoreceptors. *The Journal of biological chemistry* 276, 36824-36830.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11477108>>

Swaroop, A., Xu, J.Z., Pawar, H., Jackson, A., Skolnick, C., and Agarwal, N. (1992). A conserved retina-specific gene encodes a basic motif/leucine zipper domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 266-270.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1729696>>

Taddeiferretti, C., and Cotugno, A. (1991). Interaction between the Effects of Light-Pulses of Different Chromatic Content on Hydra-Attenuata and H-Magnipapillata. *Hydrobiologia* 216, 589-593.

<<Go to ISI>://WOS:A1991GP24400086>

Takahashi, K., Maruyama, M., Tokuzawa, Y., Murakami, M., Oda, Y., Yoshikane, N., Makabe, K.W., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2005). Evolutionarily conserved non-AUG translation initiation in NAT1/p97/DAP5 (EIF4G2). *Genomics* 85, 360-371.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15718103>>

Tanaka, G., Parker, A.R., Hasegawa, Y., Siveter, D.J., Yamamoto, R., Miyashita, K., Takahashi, Y., Ito, S., Wakamatsu, K., Mukuda, T., Matsuura, M., Tomikawa, K., Furutani, M., Suzuki, K., and Maeda, H. (2014). Mineralized rods and cones suggest colour vision in a 300 Myr-old fossil fish. *Nature communications* 5, 5920.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25536302>>

Tanino, T., and Ohba, N. (1976). Studies on Pigmentary Retinal Dystrophy .1. Age of Onset of Subjective Symptom and Mode of Inheritance. *Japanese journal of ophthalmology* 20, 474-481.

<<Go to ISI>://WOS:A1976CZ99400008>

Thierry Lèveillard¹⁻³, A.V.D., José-Alain Sahel (2015). Altruisme dans la rétine : les bâtonnets nourrissent les cônes. *medsci* 31.

Thompson, D.A., Khan, N.W., Othman, M.I., Chang, B., Jia, L., Grahek, G., Wu, Z.J., Hiriyanna, S., Nellissery, J., Li, T.S., Khanna, H., Colosi, P., Swaroop, A., and Heckenlively, J.R. (2012). Rd9 Is a Naturally Occurring Mouse Model of a Common Form of Retinitis Pigmentosa Caused by Mutations in RPGR-ORF15. *PloS one* 7.

<<Go to ISI>://WOS:000305340700021>

Tino, A., Ambrosone, A., Mattera, L., Marchesano, V., Susa, A., Rogach, A., and Tortiglione, C. (2011). A new in vivo model system to assess the toxicity of semiconductor nanocrystals. *Int J Biomater* 2011, 792854.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21822433>>

Tonissen, K.F., and Di Trapani, G. (2009). Thioredoxin system inhibitors as mediators of apoptosis for cancer therapy. *Molecular nutrition & food research* 53, 87-103.

<<Go to ISI>://WOS:000262869400008>

Trembley, A., Pronk, C., van der Schley, J., and Lyonnet, P. (1744). Mémoires pour servir à l'histoire d'un genre de polypes d'eau douce, à bras en forme de cornes (chez Jean & Herman Verbeek).

<<https://books.google.fr/books?id=uR4OAAAAQAAJ>>

Van Trigt (1853). De oogspiegel. *Ned. Lancet's Gravenhage 3rd Series*, 417–509.

Verma, B., Akinyi, M.V., Norppa, A.J., and Frilander, M.J. (2017). Minor spliceosome and disease. *Seminars in cell & developmental biology*.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28965864>>

Volland, S., Esteve-Rudd, J., Hoo, J., Yee, C., and Williams, D.S. (2015). A Comparison of Some Organizational Characteristics of the Mouse Central Retina and the Human Macula. *PloS one* 10.

<<Go to ISI>://WOS:000353711600156>

Vosseberg, J., and Snel, B. (2017). Domestication of self-splicing introns during eukaryogenesis: the rise of the complex spliceosomal machinery. *Biol Direct* 12, 30.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29191215>>

Wahl, M.C., Will, C.L., and Luhrmann, R. (2009). The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* 136, 701-718.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19239890>>

Wang, J.F., Liu, Z.Y., and Groopman, J.E. (1998). The alpha-chemokine receptor CXCR4 is expressed on the megakaryocytic lineage from progenitor to platelets and modulates migration and adhesion. *Blood* 92, 756-764.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9680341>>

Wang, S., Zhang, J.B., Jiao, W.Q., Li, J., Xun, X.G., Sun, Y., Guo, X.M., Huan, P., Dong, B., Zhang, L.L., Hu, X.L., Sun, X.Q., Wang, J., Zhao, C.T., Wang, Y.F., Wang, D.W., Huang, X.T., Wang, R.J., Lv, J., Li, Y.L., Zhang, Z.F., Liu, B.Z., Lu, W., Hui, Y.Y., Liang, J., Zhou, Z.C., Hou, R., Li, X., Liu, Y.C., Li, H.D., Ning, X.H., Lin, Y., Zhao, L., Xing, Q., Dou, J.Z., Li, Y.P., Mao, J.X., Guo, H.B., Dou, H.Q., Li, T.Q., Mu, C., Jiang, W.K., Fu, Q., Fu, X.T., Miao, Y., Liu, J., Yu, Q., Li, R.J., Liao, H., Li, X., Kong, Y.F., Jiang, Z., Chourrout, D., Li, R.Q., and Bao, Z.M. (2017). Scallop genome provides insights into evolution of bilaterian karyotype and development. *Nat Ecol Evol* 1.

<<Go to ISI>://WOS:000417173100010>

Wang, Y., Macke, J.P., Merbs, S.L., Zack, D.J., Klaunberg, B., Bennett, J., Gearhart, J., and Nathans, J. (1992). A locus control region adjacent to the human red and green visual pigment genes. *Neuron* 9, 429-440.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1524826>>

Warrant, E.J. (2009). Mammalian vision: rods are a bargain. *Current biology : CB* 19, R69-71.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19174142>>

Welch, E.M., Barton, E.R., Zhuo, J., Tomizawa, Y., Friesen, W.J., Trifillis, P., Paushkin, S., Patel, M., Trotta, C.R., Hwang, S., Wilde, R.G., Karp, G., Takasugi, J., Chen, G., Jones, S., Ren, H., Moon, Y.C., Corson, D., Turpoff, A.A., Campbell, J.A., Conn, M.M., Khan, A., Almstead, N.G., Hedrick, J., Mollin, A., Risher, N., Weetall, M., Yeh, S., Branstrom, A.A., Colacino, J.M., Babiak, J., Ju, W.D., Hirawat, S., Northcutt, V.J., Miller, L.L., Spatrack, P., He, F., Kawana, M., Feng, H., Jacobson, A., Peltz, S.W., and Sweeney, H.L. (2007). PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 447, 87-91.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17450125>>

Wenger, Y., and Galliot, B. (2013). RNAseq versus genome-predicted transcriptomes: a large population of novel transcripts identified in an Illumina-454 Hydra transcriptome. *BMC genomics* 14, 204.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23530871>>

Wilby, O.K., Tesh, J.M., and Shore, P.R. (1990). Application of the Hydra regeneration assay: Assessment of the potential teratogenic activity of engine exhaust emissions. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 4, 612-613.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20702240>>

Wilschanski, M., Miller, L.L., Shoseyov, D., Blau, H., Rivlin, J., Aviram, M., Cohen, M., Armoni, S., Yaakov, Y., Pugatsch, T., Cohen-Cymerknoh, M., Miller, N.L., Reha, A.,

Northcutt, V.J., Hirawat, S., Donnelly, K., Elfring, G.L., Ajayi, T., and Kerem, E. (2011). Chronic ataluren (PTC124) treatment of nonsense mutation cystic fibrosis. *The European respiratory journal* 38, 59-69.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21233271>>

Wilson, E.B. (1891). The Heliotropism of Hydra. *The American naturalist* 25, 413-433.

<<http://www.jstor.org/stable/2452392>>

Wright, A.F., Teague, P.W., Bruford, E., and Carothers, A. (1997). Problems in dealing with linkage heterogeneity in autosomal recessive forms of retinitis pigmentosa. *Genetic Mapping of Disease Genes*, 255-272.

<<Go to ISI>://WOS:A1997BJ69D00020>

Xu, X.T., Wei, Y.H., Wang, S.D., Luo, M., and Zeng, H. (2017). Serine-arginine protein kinase 1 (SRPK1) is elevated in gastric cancer and plays oncogenic functions. *Oncotarget* 8, 61944-61957.

<<Go to ISI>://WOS:000409254200097>

Yang, Y., Mohand-Said, S., Danan, A., Simonutti, M., Fontaine, V., Clerin, E., Picaud, S., Leveillard, T., and Sahel, J.A. (2009). Functional cone rescue by RdCVF protein in a dominant model of retinitis pigmentosa. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 17, 787-795.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19277021>>

Ye, G.J., Budzynski, E., Sonnentag, P., Nork, T.M., Sheibani, N., Gurel, Z., Boye, S.L., Peterson, J.J., Boye, S.E., Hauswirth, W.W., and Chulay, J.D. (2016). Cone-Specific Promoters for Gene Therapy of Achromatopsia and Other Retinal Diseases. *Human gene therapy* 27, 72-82.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26603570>>

Young, R.W. (1967). The renewal of photoreceptor cell outer segments. *The Journal of cell biology* 33, 61-72.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6033942>>

Young, R.W. (1985). Cell proliferation during postnatal development of the retina in the mouse. *Brain research* 353, 229-239.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4041905>>

Yuan, Y., Compton, S.A., Sobczak, K., Stenberg, M.G., Thornton, C.A., Griffith, J.D., and Swanson, M.S. (2007). Muscleblind-like 1 interacts with RNA hairpins in splicing target and pathogenic RNAs. *Nucleic acids research* 35, 5474-5486.

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17702765>>

ANNEXES

TABLES

**ARTICLES PUBLIES DURANT LE DOCTORAT EN
RAPPORT AVEC LE SUJET DE THESE**

RESUME

L'étude des mécanismes moléculaires de l'épissage alternatif du gène *NXNLI* et celle de l'origine de la signalisation métabolique de RdCVF

Chez les vertébrés, les photorécepteurs à bâtonnets impliqués dans la vision nocturne secrètent la protéine Rod-derived Cone Viability Factor (RdCVF) qui maintient la fonction des photorécepteurs à cônes responsables de la vision de jour. Le gène nucleoredoxin-like 1 (*NXNLI*), qui est composé de deux exons et d'un intron, code pour deux protéines: RdCVF lorsque l'intron qui présente un codon-stop en phase de lecture est retenu et RdCVF-long (RdCVFL), une thiorédoxine active, lorsque l'intron est excisé. RdCVFL est une enzyme qui protège les photorécepteurs contre le stress oxydatif en réduisant les ponts disulfures des protéines oxydées. Dans la rétine, le facteur RdCVF est uniquement exprimé et sécrété par les bâtonnets. Il interagit avec son récepteur basigin 1 (BSG1), exprimé à la surface des cônes ce qui stimule l'entrée du glucose. Le métabolisme du glucose par la glycolyse aérobie produit des triglycérides nécessaires pour le renouvellement des segments externes des cônes qui portent les molécules d'opsines qui captent la lumière, maintenant les cônes fonctionnels. Ceci explique le fait que dans le cas de la rétinopathie pigmentaire, caractérisée par une dégénérescence progressive des bâtonnets, RdCVF n'est plus exprimé et les cônes rendus non fonctionnels meurent. RdCVF est tronqué dans le motif thiorédoxine et ne possède pas d'activité enzymatique thiol-oxydoréductase. Selon les connaissances de l'évolution de la rétine, les cônes sont les ancêtres des bâtonnets. Puisque le domaine thiorédoxine tronqué n'est probablement pas le substrat sur lequel la sélection naturelle a pu originellement agir, le gène *NXNLI* devait à l'origine coder pour la thiorédoxine RdCVFL, ce qui peut expliquer que les cônes des mammifères n'expriment aujourd'hui que cette protéine.

Mon objectif est d'identifier quel était l'événement de régulation fondateur qui a conduit à l'expression de RdCVF suite à l'inhibition de l'épissage de *NXNLI*, entraînant la rétention de son unique intron. Mon travail de thèse est divisé en deux objectifs :

- L'étude de l'origine de la signalisation métabolique de RdCVF au cours de l'évolution.
- L'identification des mécanismes moléculaires responsables de l'épissage alternatif de *NXNLI* entraînant la rétention de son intron.

Les espèces étudiées comprennent l'hydre, espèce chez laquelle le gène *NXNL* le plus ancestral a pu être retrouvé, et la lamproie, qui est la première espèce chez laquelle les bâtonnets ont pu être mis en évidence au cours de l'évolution. Les deux gènes (*Nxnla* et *Nxnlb*) en tandem dans le génome de l'hydre sont exprimés par toutes les cellules de l'organisme et la réduction de leur expression par ARN interférence aggrave l'atteinte des radicaux libres exercée sur cet organisme. Ceci confirme que la protéine codée à l'origine par *NXNL* est bien la thiorédoxine RdCVFL. De manière particulièrement surprenante, l'épissage alternatif produisant RdCVF existait déjà chez cet animal apparu il y a 600 millions d'années. Par contre son récepteur basigin ne possède pas la séquence nécessaire pour son interaction avec RdCVF, un des acteurs manque donc à la signalisation métabolique de RdCVF chez l'hydre. J'ai pu montrer par RT-PCR sur cellule unique que chez la lamproie, apparue il y a 400 millions d'années, dans la rétine seuls les bâtonnets produisent RdCVF comme chez les mammifères. J'ai montré aussi que le récepteur BSG1 de la lamproie se lie à RdCVF aussi bien de la lamproie que de l'hydre; les acteurs de la signalisation étaient donc en place chez le vertébré le plus ancien connu pour présenter des bâtonnets fonctionnels. À ce stade de l'évolution, l'augmentation de l'entrée du glucose dans les cônes pouvait contribuer au renouvellement de leurs segments externes. Le glucose peut aussi renforcer le potentiel redox de RdCVFL via la voie des pentoses phosphates. Celle-ci produit le NADPH, le co-facteur de la thiorédoxine réductase par oxydation du glucose-6-phosphate. Le bénéfice pour la vision par l'addition d'une nouvelle fonction portée par le gène *NXNLI* a sans doute joué un rôle durant l'évolution de ce système.

Pour ce qui concerne le deuxième objectif, j'ai identifié une séquence conservée présentant une structure secondaire au niveau de son ARN en 3' du premier exon du gène *NXNLI* qui lie la protéine nucléoline impliquée dans l'épissage et exprimée par les bâtonnets mais pas par les cônes. Ces résultats suggèrent que cette protéine régule l'épissage alternatif du gène *NXNLI*. Des travaux au-delà de ma thèse devraient déboucher sur une description détaillée de ce mécanisme.

Molecular mechanisms of *NXNLI* splicing and metabolic signaling at the origin of RdCVF signaling

In vertebrates, rod photoreceptors involved in night vision secrete Rod-derived Cone Viability Factor protein (RdCVF) which maintains cones photoreceptors responsible for day vision. The nucleoredoxin-like 1 gene (*NXNLI*), which is composed by two exons and one intron, encodes for two proteins. RdCVF is translation product made from an unspliced mRNA encoding the exon 1 with an in-frame stop codon in the *NXNLI* intron and RdCVF-long (RdCVFL), an active thioredoxin, when the intron is excised. RdCVFL is an enzyme that protects photoreceptors against oxidative stress by reducing the disulfide bonds of oxidized proteins. In the retina, the factor RdCVF is only expressed and secreted by the rods. It interacts with its receptor basigin 1 (BSG1), expressed by cones and stimulates glucose entry. The metabolism of glucose by aerobic glycolysis produces triglycerides necessary for cone outer segments renewal which contains opsin molecules that capture light. That is why in retinitis pigmentosa, characterized by progressive rods degeneration, RdCVF is no longer expressed and the cones become unfunctional and die. RdCVF corresponds to a truncated thioredoxin-like protein with no thiol-oxidoreductase activity. According to the knowledge of retina evolution, the cones are rods ancestors. Since the truncated thioredoxin domain is probably not the substrate on which natural selection could have originally acted, the *NXNLI* gene must originally encode for the RdCVFL thioredoxin, which may explain why today, mammalian cones only express this protein.

My goal is to identify what are the regulatory event that led to splicing inhibition of *NXNLI* resulting to its unique intron retention and RdCVF expression. My thesis work is divided into two objectives:

- The study of the emergence of RdCVF metabolic signaling origin during evolution.
- The investigation of *NXNLI* alternative splicing molecular mechanisms leading to intron retention.

The species analyzed are hydra, in which the most ancestral *NXNL* gene was found, and lamprey, which is the first species harboring rod during evolution. Two genes (*Nxnla* and *Nxnlb*) localized in tandem in the hydra genome are expressed by all the body cells. The RNA interference reduction of their expression increases free radicals attack on hydra organism. This confirms that originally, *NXNL* encoded for the thioredoxin protein RdCVFL. Surprisingly, the alternative splicing producing RdCVF already existed in this animal appeared 600 million years ago. On the other hand, its receptor basigin doesn't possess the sequence necessary for its interaction with RdCVF, so it lacks one of the metabolic signaling actors of RdCVF in hydra. I demonstrated by single-cell RT-PCR that in lamprey, which appeared 400 million years ago, only rods produce RdCVF as in mammals. I also showed that the lamprey receptor BSG1 binds both lamprey and hydra RdCVF meaning that signaling actors were present in oldest vertebrate known to present functional rods. At this stage of evolution, the glucose uptake in cones could contribute to the renewal of their outer segments. Glucose can also enhance the potential redox of RdCVFL via the pentose phosphate pathway. In this pathway the co-factor of thioredoxin reductase NADPH is produced by oxidation of glucose-6-phosphate. This original alternative splicing system has certainly played a role during evolution by adding a new function of *NXNLI* gene leading to a benefit in vision.

Concerning the second objective, I identified a sequence with a secondary conserved structure localized in 3' RNA of exon n°1 of *NXNLI* gene that binds the nucleolin protein involved in splicing and expressed by the rods but not by the cones. These preliminary results suggest that this protein regulates the *NXNLI* alternative splicing. Additional experiments beyond my thesis should lead to a more definitive description of this mechanism.

