



Université de Montréal

Criblage génétique et caractérisation fonctionnelle des mutations dans le gène  
*CHD2* associé à l'épilepsie dans un modèle de poisson zèbre

par Véronique Cloutier

Département de neurosciences  
Faculté de médecine

Mémoire présenté  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise  
en neurosciences

Avril, 2018

© Véronique Cloutier, 2018

## Résumé

L'épilepsie est une des maladies neurologiques les plus fréquentes à travers le monde avec plus de 50 millions de personnes atteintes. Même si la recherche a permis d'expliquer de nombreux cas d'épilepsies génétiques, bien souvent les causes sous-jacentes restent encore indéterminées. Une classe particulière d'encéphalopathies épileptiques avec photosensibilité a récemment été associée au gène *CHD2*. Dans le but d'améliorer nos connaissances sur ce gène, nous avons criblé génétiquement des cohortes de patients épileptiques, dont 95 photosensibles, avant de caractériser l'effet fonctionnel des nouvelles variations génétiques, dans un modèle de poisson zèbre. Nous avons séquencé le gène *CHD2* chez un total de 1959 patients épileptiques, et nous rapportons 37 nouvelles variations génétiques potentiellement dommageables dans divers types d'épilepsies. Nous avons démontré *in vitro*, qu'une mutation silencieuse découverte chez un patient épileptique photosensible, affecte l'épissage du gène et mène à l'introduction prématurée d'un codon d'arrêt, suggérant une perte partielle de fonction de la protéine. Nous avons ensuite montré *in situ* que le gène *chd2* est exprimé dans le cerveau des poissons zèbres, puis nous avons diminué son expression dans ce modèle à l'aide d'un Morpholino (MO). Nous avons observé un phénotype morphologique courbé et une durée de vie réduite chez les poissons injectés avec le MO, puis l'injection du gène humain sauvage *CHD2* a permis de sauver de manière significative ce phénotype. Par la suite, afin de caractériser certaines variations génétiques identifiées dans notre cohorte, nous avons injecté chez le poisson zèbre différentes copies mutantes du gène humain *CHD2* et nous avons démontré que l'une d'elles ne permet pas de sauver significativement le phénotype. Afin d'étudier l'effet d'une inactivation complète de *chd2*, nous avons finalement établi une lignée stable de poissons zèbre n'exprimant pas ce gène, à l'aide de la technique CRISPR-Cas9. Nous sommes les premiers à inactiver complètement *chd2* chez les poissons zèbres, et cette lignée permettra de mieux comprendre le rôle de ce gène dans l'épilepsie. Bien que nos résultats soient préliminaires, nous avons montré chez le poisson zèbre qu'une nouvelle variation génétique dans le gène *CHD2* pourrait causer l'épilepsie.

**Mots-clés** : épilepsie, encéphalopathie épileptique, photosensibilité, *CHD2*, poisson zèbre, criblage génétique, Morpholino, CRISPR-Cas9

## Abstract

Epilepsy is one of the most common neurological diseases worldwide affecting more than 50 million people. Although medical research unravelled the genetic basis of some epilepsies, the majority of cases remains unexplained. A particular form of epileptic encephalopathies with photosensitivity has recently been associated with the *CHD2* gene. In order to better understand the role of *CHD2* in epilepsy, we screened epileptic patients for pathogenic variants and we characterized the functional effect of newly discovered genetic variations in a zebrafish model. Overall, we sequenced the *CHD2* gene in a total of 1959 epileptic patients, including 95 photosensitive, and reported 37 new genetic variations potentially damaging in various types of epilepsy. We demonstrated *in vitro* that a silent mutation found in a photosensitive epileptic patient affects the splicing of the gene and leads to the introduction of a premature stop codon, suggesting a partial loss of function of the protein. We then showed *in situ* that the *chd2* gene is expressed in the brain of zebrafish, and could be knocked down in this model using a Morpholino (MO). Zebrafish injected with MO presented a curved morphological phenotype, as well as a reduced lifetime. Then we showed that injection of the wild-type human *CHD2* gene resulted in a significant rescue of this abnormal phenotype. Subsequently, we injected different mutant copies of the human *CHD2* gene to characterize genetic variations identified in our cohort. Only one of these did not significantly save the phenotype. In order to study the effect of a complete inactivation of *chd2*, we established a stable line of zebrafish that do not express this gene, using the CRISPR-Cas9 technique. We are the first to knockout *chd2* in zebrafish, and will continue using this transgenic line to better understand the role of this gene in epilepsy. Although our results are preliminary, we showed in a zebrafish model that a new genetic variation in *CHD2* could cause epilepsy.

**Keywords:** epilepsy, epileptic encephalopathy, photosensitivity, *CHD2*, zebrafish, genetic screening, Morpholino, CRISPR-Cas9

# Table des matières

<b>Résumé</b> .....	i
<b>Abstract</b> .....	ii
<b>Table des matières</b> .....	iii
<b>Liste des tableaux</b> .....	vi
<b>Liste des figures</b> .....	vii
<b>Liste des sigles et abréviations</b> .....	viii
<b>Chapitre 1 : Introduction</b> .....	1
1.1 Épilepsie : présentation clinique.....	2
1.1.1 Définition.....	2
1.1.2 Diagnostic.....	3
1.1.3 Classification des épilepsies.....	3
1.1.4 Traitements.....	6
1.1.5 Étiologie.....	7
1.2 Étiologie génétique.....	8
1.2.1 Études de liaison.....	9
1.2.2 Études d'association génomique (GWAS).....	11
1.2.3 Séquençage.....	11
1.2.4 Études de variations structurelles.....	12
1.3 Les épilepsies génétiques.....	13
1.3.1 Encéphalopathie épileptique.....	13
1.3.2 Épilepsie avec photosensibilité.....	15
1.4 <i>CHD2</i> .....	16
1.5 Le poisson zèbre, un organisme modèle de choix.....	18
1.5.1 Répression de l'expression génique par l'approche Morpholino.....	20
1.5.2 Inactivation génique par la méthode CRISPR-Cas9.....	21
1.6 Objectif et plan expérimental.....	23

<b>Chapitre 2 : Procédures expérimentales</b> .....	25
2.1 Séquençage du génome entier (WGS).....	25
2.1.1 Extraction d'ADN.....	25
2.1.2 Préparation des bibliothèques et séquençage du génome.....	25
2.1.3 Analyse bioinformatique et sélection des variations génétiques .....	26
2.2 Séquençage de l'exome (WES).....	26
2.3 Séquençage du gène <i>CHD2</i> par la méthode de Sanger.....	26
2.4 Électrophorèse sur gel d'agarose .....	27
2.5 Technique Mini-gène .....	27
2.5.1 Transfection .....	28
2.5.2 Culture des cellules HEK-293T .....	29
2.6 Élevage des poissons-zèbres.....	29
2.7 Hybridation <i>in situ</i> .....	29
2.8 Clonage et mutagenèse du gène <i>CHD2</i> .....	30
2.9 Expériences d'injection du MO E212 <i>chd2</i> , de la copie sauvage du gène humain et des variations génétiques.....	31
2.10 Validation de l'effet du MO.....	32
2.11 Préparation et micro-injection des solutions d'ARN guide et de Cas9 .....	33
2.12 Génotypage des poissons zèbres adultes et extraction d'ADN génomique.....	33
2.13 Technique d'analyse des courbes de fusion à haute résolution (HRM).....	34
2.14 Statistiques .....	35
<b>Chapitre 3 : Résultats</b> .....	36
3.1 Séquençage du gène <i>CHD2</i> dans une cohorte de patients avec épilepsie photosensible	36
3.2 Recherche de variations génétiques dans le gène <i>CHD2</i> , chez les patients épileptiques	38
3.3 Expression <i>in situ</i> du gène <i>chd2</i> chez le poisson zèbre .....	44
3.4 Diminution d'expression du gène <i>chd2</i> chez le poisson zèbre .....	45
3.5 Expériences de sauvetage du phénotype.....	48
3.6 Inactivation du gène <i>chd2</i> , par la méthode CRISPR-Cas9 .....	51
<b>Chapitre 4 : Discussion et perspectives</b> .....	54
4.1 Le gène <i>CHD2</i> et la photosensibilité chez les épileptiques .....	54

4.2 Le gène <i>CHD2</i> et l'épilepsie.....	55
4.3 L'expression du gène <i>chd2</i> chez le poisson zèbre .....	57
4.4 Diminution d'expression de <i>chd2</i> chez le poisson zèbre .....	58
4.5 Sauvetage du phénotype avec une copie humaine du gène <i>CHD2</i> .....	60
4.6 Inactivation du gène <i>chd2</i> chez le poisson zèbre .....	62
<b>Chapitre 5 : Conclusion</b> .....	65
<b>Bibliographie</b> .....	67
<b>Annexe 1 : Différents protocoles de PCR utilisés pour amplifier toutes les régions codantes du gène <i>CHD2</i></b> .....	i
<b>Annexe 2 : Amorces utilisées pour amplifier toutes les régions codantes du gène humain <i>CHD2</i></b> .....	iii

## Liste des tableaux

<b>Tableau I.</b> Variation génétique dans le gène <i>CHD2</i> trouvée chez un patient épileptique photosensible de notre cohorte.....	36
<b>Tableau II.</b> Caractéristiques cliniques et génétiques des patients de notre cohorte, porteurs d'une mutation dans le gène <i>CHD2</i> .....	39
<b>Tableau III.</b> Recension des mutations trouvées dans le gène <i>CHD2</i> parmi toutes les données de séquençage de patients épileptiques disponibles.....	41



## Liste des figures

<b>Figure 1.1.3.1</b> Classification des épilepsies, modifiée de [9]. .....	5
<b>Figure 1.2.1.1</b> Ères de découverte des gènes associés à l'épilepsie, modifiée de [33]. .....	10
<b>Figure 1.4.1</b> Domaines fonctionnels et variations génétiques identifiées dans le gène <i>CHD2</i> , modifiée de [59]. .....	16
<b>Figure 1.4.2</b> Différents isoformes du gène <i>CHD2</i> , selon la version 37 du génome humain (Hg37) de la base de données de l'université de Californie à Santa Cruz (UCSC). .....	18
<b>Figure 1.5.1</b> Injection d'acides nucléiques dans un embryon de poisson zèbre au stade unicellulaire, afin de modifier génétiquement un gène cible, modifiée de [72]. .....	19
<b>Figure 1.5.2.1</b> Principe du fonctionnement de la méthode CRISPR-Cas9, modifiée de [83]. ..	22
<b>Figure 3.1.1</b> Analyse <i>in vitro</i> de l'impact d'une mutation silencieuse dans le gène <i>CHD2</i> par la technique de mini-gène. ....	37
<b>Figure 3.3.1</b> Observation de l'expression du gène <i>chd2</i> par une hybridation <i>in situ</i> à différents stades du développement chez le poisson zèbre. ....	44
<b>Figure 3.4.1</b> Phénotype morphologique observé lors de la diminution de l'expression du gène <i>chd2</i> dans le poisson zèbre par l'injection d'un MO. ....	46
<b>Figure 3.4.2</b> Effet de l'injection d'un MO dans le poisson zèbre sur l'épissage du gène <i>chd2</i> . ....	47
<b>Figure 3.5.1</b> Phénotypes observés chez le poisson zèbre lors des différentes expériences d'injection d'un MO contrôle, d'un MO <i>chd2</i> , d'un MO <i>chd2</i> avec une copie saine du gène humain et d'un MO <i>chd2</i> avec une copie mutante du gène humain <i>CHD2</i> . ....	50
<b>Figure 3.6.1</b> Étapes menant à la création d'une lignée homozygote de poissons zèbres n'exprimant pas le gène <i>chd2</i> , par la méthode CRISPR. ....	52

## Liste des sigles et abréviations

a.a : Acide aminé

ADN : Acide désoxyribonucléique

AE : Absence épileptique

AFD : Activité dans l'aire frontale droite

ARN : Acide ribonucléique

AT : Activité thêta

ATP : Adénosine triphosphate

Cas9 : Protéine 9 associée à CRISPR

CDE : Crise déclenchée par l'effort

cDNA : ADN complémentaire

CF : Convulsion fébrile

CGTC : Crise généralisée tonico-clonique

CHD2 : Chromodomain helicase DNA Binding Protein 2

CM : Crise myoclonique

CNV : Variation du nombre de copies

CPC : Crise partielle complexe

CPF : Crise partielle frontale

CPO : Complexe de pointes-ondes

CPS : Crise partielle simple

CPSG : Crise partielle secondairement généralisée

CPT : Crise partielle temporale

CRISPR : Courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées

DIG : Dioxygénine

DNTP : Mélange de désoxyribonucléotides

Dpf : Jours post-fertilisation

EAE : Épilepsie absence de l'enfant

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique

EEG : Électroencéphalogramme  
EFNAD : Épilepsie frontale nocturne autosomique dominante  
EMJ : Épilepsie myoclonique juvénile  
FAM : Fréquence allélique mineure  
GEFS+ : Épilepsie généralisée avec crises fébriles plus  
gnomAD : Genome Aggregation Database  
GWAS : Étude d'association pangénomique  
HCl : Hydroxyde de chlorure  
Hg 37 : Version 37 du génome humain  
HM : Homozygote  
Hpf : Heures post-fertilisation  
HRM : Technique d'analyse des courbes de fusion à haute résolution  
HT : Hétérozygote  
ILAE : Ligue internationale contre l'épilepsie  
IRM : Résonance magnétique  
kb : Kilobase  
L : Litre  
M : Molaire  
ME : Myoclonie d'endormissement  
mg : Milligramme  
MgCl<sub>2</sub> : Chlorure de magnésium  
mM : Millimolaire  
MO : Morpholino  
NaCl : Chlorure de sodium  
NaOH : Hydroxyde de sodium  
ng : Nanogramme  
nL : Nanolitre  
OMS : Organisation mondiale de la santé  
PAM : Motif adjacent espaceur  
PBL : Pointe bilatérale  
PC : Perte de conscience

PCD : Pointe centrale droite  
PCR : Technique d'amplification en chaine par polymérase  
PFA : Paraformaldéhyde  
pg : Picogramme  
pM : Picomolaire  
POG : Pointes-ondes généralisées  
PTZ : Pentylenetetrazole  
REST : Répresseur de transcription RE1  
SEM : Erreur standard de la moyenne  
SJ : Syndrome de Jeavons  
SNP : Polymorphisme de nucléotide unique  
TALEN : Nucléases effectrices de type activateur de transcription  
TBE : Tampon composé de Tris, d'acide borique et d'EDTA  
TDM : Tomodensitométrie  
UCSC : Université de Californie à Santa Cruz  
 $\mu\text{L}$  : Microlitre  
 $\mu\text{M}$  : Micromolaire  
WES : Séquençage complet de l'exome  
WGS : Séquençage du génome entier  
WT : Sains/Sauvages  
ZFN : Nucléases à doigts de zinc

# Chapitre 1 : Introduction

L'épilepsie est une maladie neurologique très fréquente qui touche 1-3 % de la population. Selon les récentes données de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), plus de 50 millions de personnes en sont atteintes à travers le monde, ce qui en fait une des maladies chroniques du système nerveux central les plus fréquentes [1][2]. L'épilepsie, qui touche autant les hommes que les femmes de tous âges et de toutes classes sociales ou groupes ethniques, est caractérisée par des épisodes de dysfonction neuronale, causés par des décharges électriques anormales [3]. Les nombreuses conséquences socioéconomiques engendrées par l'épilepsie et le fait qu'elle soit associée à une stigmatisation, en font un réel problème de santé publique. Des 300 000 Canadiens atteints de cette maladie, un nombre significatif d'entre eux est résistant aux traitements et d'autres souffrent de troubles dépressifs ou cognitifs, ce qui diminue leur qualité de vie [4]. Globalement, cette maladie peut être causée par une anomalie structurale cérébrale, qui peut être acquise des suites d'un traumatisme ou qui peut être génétique, comme dans le cas d'une malformation corticale. Elle peut aussi être causée par une infection, un trouble métabolique ou une réponse immunitaire excessive du système nerveux. Dans tous les cas, ces épilepsies symptomatiques peuvent résulter de plus d'une cause [5].

Contrairement à ces dernières, les épilepsies génétiques ne présentent aucune lésion visible en imagerie par résonance magnétique (IRM) et elles sont causées par des mutations génétiques. Étant donné l'hétérogénéité génétique, ces épilepsies sont beaucoup plus complexes à expliquer. Même si les récentes avancées dans le domaine de la génomique ont permis d'améliorer les connaissances actuelles sur les épilepsies génétiques, la majorité des cas reste non résolue. Il est donc primordial de poursuivre la recherche de nouveaux gènes et de nouvelles mutations causant la maladie.

Ce mémoire portera sur l'identification et la caractérisation de nouvelles variations génétiques dans le gène *CHD2*, qui a été récemment associé à différentes formes d'épilepsie.

# 1.1 Épilepsie : présentation clinique

## 1.1.1 Définition

La ligue internationale contre l'épilepsie (ILAE) définit conceptuellement l'épilepsie comme étant « un trouble cérébral caractérisé par une prédisposition à générer des crises épileptiques et par les conséquences neurobiologiques, cognitives, psychologiques et sociales de cette affection »[6]. Depuis 2005, selon la définition clinique de l'ILAE, un individu sera déclaré épileptique s'il présente l'une des trois manifestations suivantes : [6]

- 1- Avoir subi au moins deux crises non-provoquées ou réflexes dans un délai de plus de 24 heures
- 2- Avoir souffert d'une crise non-provoquée ou réflexe et présenter un risque similaire au risque de récurrence observé après deux crises, qui est d'au moins 60%, de subir une crise ultérieure dans les 10 années suivantes
- 3- Avoir reçu un diagnostic de syndrome épileptique

Le terme « non provoquée » implique l'absence d'un facteur temporaire ou réversible qui pourrait abaisser le seuil et entraîner une crise à un moment précis.

L'épilepsie est aussi définie comme étant une famille de maladies ou de troubles neurologiques ayant tous en commun la survenue de crises épileptiques. Ces crises sont pour leur part caractérisées par « la présence transitoire de signes et de symptômes causés par une activité neuronale excessive dans le cerveau »[6].

La définition de l'épilepsie est d'une grande importance puisqu'elle influence directement le diagnostic, la prise en charge et le traitement des patients.

## **1.1.2 Diagnostic**

Globalement, un diagnostic d'épilepsie s'établit en plusieurs étapes. Premièrement, le clinicien se base sur une évaluation clinique complète du patient : sa condition médicale, ses antécédents familiaux, et les informations concernant sa prise de médicaments ou de drogues. Ensuite une analyse approfondie de la crise, incluant les détails précis de celle-ci, les circonstances qui l'entourent et les signaux d'alarmes ressentis avant la crise, plus précisément les auras, sont nécessaires [7]. Finalement, des tests supplémentaires, tel un électroencéphalogramme (EEG), une tomodensitométrie (TDM), une imagerie par résonance magnétique (IRM), et des tests sanguins sont souvent nécessaires afin de poser un diagnostic.

## **1.1.3 Classification des épilepsies**

La classification des épilepsies a beaucoup évolué au cours des dernières années. Effectivement, celle-ci était construite sur des concepts qui ne correspondent plus à notre connaissance de la maladie. Dans ce sens, la terminologie a été révisée et propose une nouvelle façon de classer les épilepsies en trois phases; soit le type de crises, le type d'épilepsie, et lorsque cela s'applique le syndrome épileptique [5]. Tel qu'illustré à la figure 1.1.3.1, la détermination en premier lieu du type de crises du patient mène au diagnostic du type d'épilepsie.

### **1.1.3.1 Type de crises**

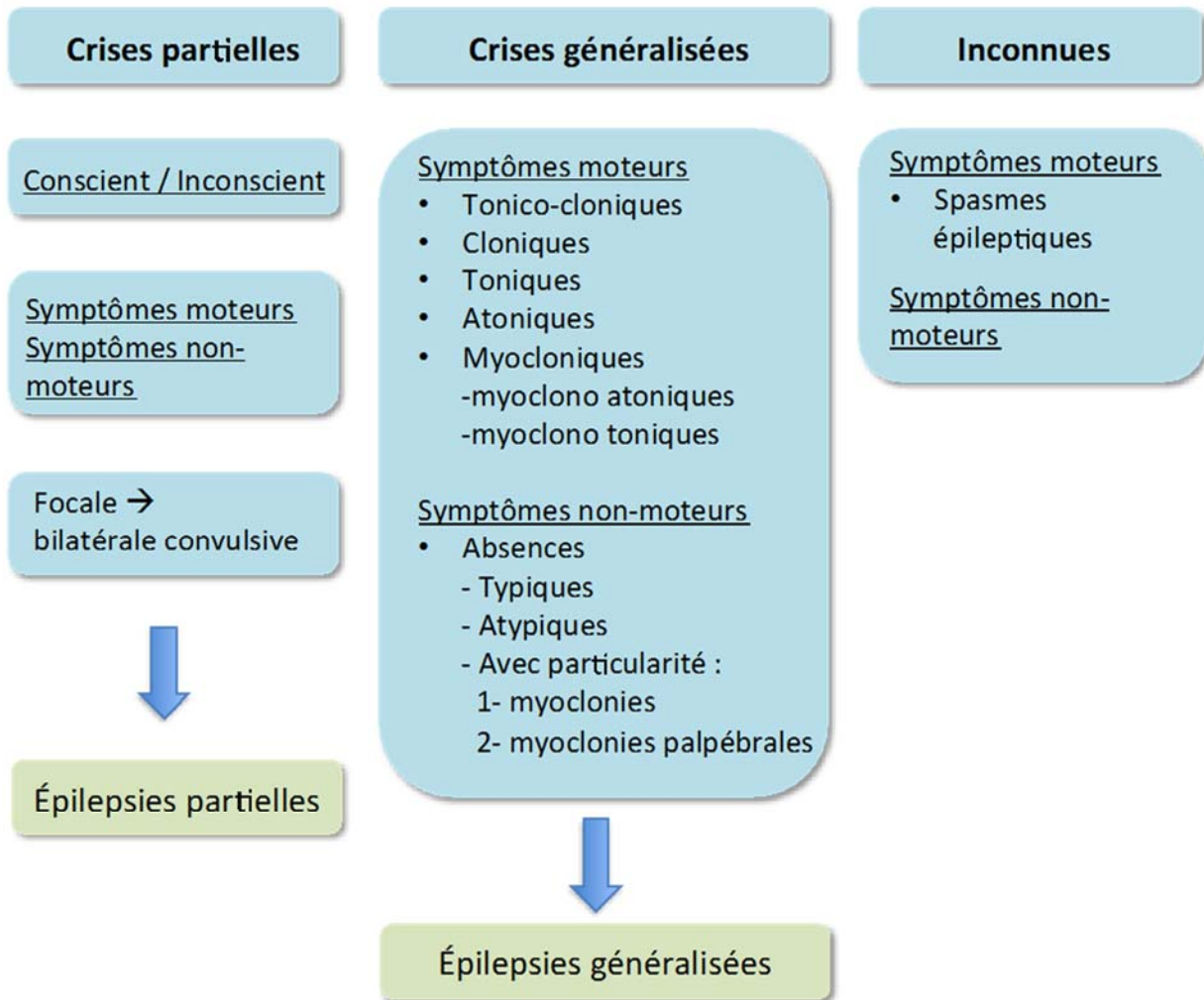
Bien que la classification des épilepsies dépend des ressources mises à la disposition du médecin effectuant le diagnostic, le point de départ commun repose sur la caractérisation des différentes crises épileptiques. Tout d'abord, elles se classent en deux grandes catégories, soit les crises partielles et les crises généralisées, selon l'origine cérébrale du début de la crise.

Dans une crise partielle, aussi nommée focale, les manifestations affectent un ou plusieurs réseaux neuronaux au sein d'un seul hémisphère du cerveau. Ces crises peuvent s'accompagner ou non de pertes de conscience et inclure des symptômes moteurs ou végétatifs. Selon l'ancienne nomenclature, les crises partielles qui altèrent l'état de conscience du patient étaient dites complexes tandis que celles qui ne l'affectent pas étaient appelées crises partielles simples. Certaines crises focales peuvent aussi évoluer vers une crise que l'on nomme aujourd'hui bilatérale convulsive, anciennement appelée crise secondairement généralisée [8]. De façon générale dans les crises partielles, la localisation du foyer épileptique, de même que le patron de propagation de l'activité électrique sont conservés et déterminent les manifestations cliniques observées chez le patient. Par exemple, une zone épileptogène située dans une région du cerveau qui contrôle le mouvement, cause des symptômes moteurs.

De manière différente, dans une crise généralisée, l'activité électrique anormale prend origine dans un réseau neuronal et s'engage rapidement de façon bilatérale dans l'ensemble des réseaux neuronaux des deux hémisphères [9]. Dans ce type de crises, le point d'origine et la latéralisation ne sont pas toujours identiques. De plus, il arrive que l'activité se propage de façon asymétrique, ce qui rend le diagnostic plus difficile. Dans la récente classification de l'ILAE, les crises généralisées sont séparées selon leurs symptômes moteurs ou non-moteurs, puis divisées en plusieurs sous-catégories tel qu'indiqué à la figure 1.1.3.1 [9], [10].

Pour leur part, certaines crises comme les spasmes épileptiques sont classées dans la catégorie « inconnue », lorsque pour une raison quelconque le clinicien ne peut déterminer avec certitude le point d'origine des crises [9].





**Figure 1.1.3.1 Classification des épilepsies, modifiée de [9].**

### 1.1.3.2 Type d'épilepsie

Le second niveau de classification repose sur le type d'épilepsie diagnostiqué par le clinicien, en fonction de la définition officielle de la maladie citée dans la section 1.1.1. [6]. Les deux grandes catégories, basées sur le type de crises du patient, sont les épilepsies généralisées et les épilepsies focales. De manière générale, le diagnostic s'effectue à l'aide des résultats de l'EEG, soit l'enregistrement de l'activité électrique du cerveau, tel que mentionné dans la section 1.1.2. Une nouvelle catégorie, celle des épilepsies généralisées et focales combinées,

est désormais incluse dans la classification actuelle. En effet, certains patients subissent à la fois des crises partielles et des crises généralisées, comme c'est le cas dans le syndrome de Dravet, et peuvent dorénavant être classés dans cette catégorie d'épilepsie.

### **1.1.3.3 Syndromes épileptiques**

Finale­ment, lorsque cela s'applique, un diagnostic de syndrome épileptique peut être établi. En effet, les syndromes épileptiques concernent les cas cliniques qui présentent un ensemble de symptômes particuliers et qui sont généralement identifiés de manière fiable, selon le type de crises, le profil de l'EEG et plusieurs autres caractéristiques, tel l'âge de début des crises [11]. Bien qu'il y ait continuellement de nouveaux syndromes reconnus, à l'heure actuelle, il en existe plusieurs qui sont classés selon l'âge d'apparition des symptômes ou selon une étape de développement du cerveau durant l'enfance. Certains syndromes sont aussi caractérisés par une comorbidité précise comme un retard intellectuel. Dans la mesure du possible, lorsqu'un diagnostic précis de syndrome épileptique est rendu, la prise en charge du patient est favorisée en ce qui a trait au contrôle des crises et à la médication à prendre.

### **1.1.4 Traitements**

Les différents symptômes de l'épilepsie peuvent être contrôlés pharmacologiquement dans plus de 70% des cas [12]. En effet, les patients épileptiques voient généralement leurs crises diminuer ou même disparaître avec une médication appropriée. De nos jours, plus de vingt médicaments différents peuvent être utilisés en monothérapie [13]. Ceci-dit, bien que le traitement pharmacologique représente le premier choix pour contrôler la maladie, trouver le bon médicament avec le moins d'effets secondaires pour chaque patient, s'avère être un défi de taille. De plus, environ 20-30% des épileptiques sont pharmaco-résistants, c'est-à-dire qu'après l'essai d'au moins deux antiépileptiques, leurs crises ne sont toujours pas contrôlées [12]. Pour ces patients réfractaires, d'autres options peuvent être envisagées telles la diète

cétogène, la stimulation du nerf vague ou encore l'ablation du foyer épileptique. Toutefois, comme l'approche chirurgicale est très invasive et comporte des risques, elle n'est pas privilégiée lorsque d'autres traitements peuvent être envisagés [14], [15], [16].

### 1.1.5 Étiologie

Étant donné que l'étiologie de l'épilepsie détermine en grande partie le pronostic et la réponse au traitement, il est important de déterminer pour chaque patient, la cause exacte de la maladie. Selon la nouvelle nomenclature, plusieurs groupes étiologiques sont reconnus.

- La première catégorie est celle de l'étiologie structurelle. Dans ce groupe, une anomalie structurelle visible en neuro-imagerie augmente considérablement le risque d'être atteint d'épilepsie [17]. Ces lésions structurelles peuvent être causées par une malformation développementale du cortex, telle une dysplasie corticale, ou être acquises d'un traumatisme ou d'un accident vasculaire cérébral [18]. Les tumeurs cérébrales sont aussi incluses dans cette catégorie. Toutes ces anomalies, qui peuvent être acquises ou d'origine génétique, causent 28 % des épilepsies [19].
- La seconde catégorie englobe les épilepsies causées par un trouble métabolique. Dans cette section, les crises épileptiques sont liées directement à un désordre métabolique comme par exemple un défaut du cycle de l'urée [20]. La plupart du temps, ces épilepsies sont d'origine génétique, mais il arrive qu'elles soient acquises. Elles représentent une très faible proportion des épilepsies.
- La troisième catégorie concerne les crises épileptiques liées à un trouble immunitaire. Dans cette classe étiologique, l'épileptogénèse est la conséquence d'une réponse auto-immune et d'une inflammation du système nerveux central [21]. Cette catégorie correspond à un faible pourcentage des épilepsies.

- La quatrième catégorie est celle des épilepsies d'origine infectieuse. Cette classe étiologique, dans laquelle les crises épileptiques sont issues d'une infection, est très répandue. L'infection du système nerveux central en cause dans ce type d'épilepsie peut être d'origine bactérienne, parasitaire ou encore fongique [22]. Le risque de développer des crises des suites d'une infection dépend entre autres de l'agent infectieux, mais aussi de l'âge du patient, de la sévérité de l'atteinte cérébrale et de divers facteurs [23]. Cette catégorie représente 3% des épilepsies.
- La cinquième catégorie englobe les épilepsies causées par une affection dégénérative. Dans cette catégorie, qui cause 4% de toutes les épilepsies, c'est le vieillissement cérébral qui augmente la susceptibilité à développer cette maladie [19].
- La sixième catégorie est associée aux épilepsies de cause inconnue. Dans 65% des cas, l'épilepsie d'un patient est d'origine inconnue car un diagnostic clair d'étiologie ne peut être rendu [19]. Toutefois, le nombre de cas diminue de façon constante étant donné l'évolution des connaissances sur les bases de cette maladie.
- La dernière catégorie concerne les épilepsies d'origine génétique, c'est à dire celles qui sont liées à une mutation génétique connue ou présumée. Ces épilepsies ne sont dues à aucune anomalie anatomique ni pathologique. L'emphase sera mise sur cette catégorie étiologique car les épilepsies génétiques seront étudiées dans ce mémoire.

## 1.2 Étiologie génétique

Grâce à de nombreuses études, plusieurs gènes ont été associés à l'épilepsie dans les dernières années, et ainsi la génétique de l'épilepsie a été démontrée. Pour arriver à prouver l'apport de la composante héréditaire dans le développement de cette maladie, des études épidémiologiques sur de grandes familles d'épileptiques ainsi que sur des jumeaux ont été réalisées à maintes reprises, et démontrent que le risque d'être atteint d'épilepsie est nettement

supérieur lorsqu'un membre de la famille l'est. En effet, plus le patrimoine génétique est rapproché entre 2 individus, plus le risque est élevé [24], [25]. Globalement, les vingt dernières années de recherche ont grandement amélioré notre connaissance de l'épilepsie et ont permis d'expliquer plusieurs formes monogéniques de la maladie, c'est-à-dire qui est causée par une mutation dans un seul gène. La figure 1.2.1.1 expose bien l'histoire de la découverte des gènes en épilepsie, allant de l'identification des canalopathies jusqu'à l'ère du séquençage massif. La présente section se voit donc être un survol des diverses méthodes utilisées afin d'expliquer l'étiologie génétique de ces épilepsies, de même que les mécanismes en cause.

### **1.2.1 Études de liaison**

Les études de liaison génétique peuvent être mises à profit pour localiser ou cartographier des gènes liés à des maladies. La base de ces études repose sur la recombinaison génétique des homologues maternels et paternels qui résulte de l'enjambement chromosomique pendant la méiose. Les études de liaison testent si le gène de la maladie segrègue de façon indépendante ou s'il est en association avec des marqueurs génétiques [26]. Les polymorphismes de nucléotides uniques (SNPs) ou les microsatellites peuvent être utilisés comme marqueurs de fragments d'ADN. Quand une association est observée, les études de liaison définissent par probabilité statistique si l'association se produit par chance ou parce que la distance physique entre le gène de la maladie et les marqueurs génétiques testés est faible [27]. Ces études déterminent un intervalle où se trouve le gène causatif de la maladie étudiée. Le nombre de gènes candidats dépend de la taille de la région chromosomique identifiée ainsi que de la densité des gènes retrouvés dans cet intervalle. Par la suite, les gènes peuvent être séquencés afin de trouver des mutations causant l'épilepsie.

Les études de liaison ont permis de confirmer l'implication de nombreux gènes dans les épilepsies de type monogénique. Entre autres, l'étude de grandes familles présentant différentes formes d'épilepsies généralisées avec crises fébriles (GEFS+) a permis de découvrir l'implication des gènes *SCN1A* et *SCN1B*, qui codent respectivement pour les sous-

unités  $\alpha 1$  et  $\beta 1$  du canal sodique voltage dépendant [28]. Plus précisément, les mutations dans le gène *SCN1A* expliquent environ 10-15% de ce groupe de syndromes épileptiques, avec une transmission autosomique dominante [29],[30]. Suivant la même approche, le gène *GABRA1*, codant pour la sous-unité  $\alpha 1$  du récepteur à l'acide gamma-aminobutyrique, a été associé aux épilepsies génétiques généralisées. Ces récepteurs  $GABA_A$  à canaux chloriques sont impliqués dans l'inhibition neuronale. Ainsi, le dysfonctionnement de ces récepteurs provoque une crise épileptique en affectant l'activité électrique, via une diminution des courants inhibiteurs [31]. La découverte de mutations associées à la maladie, dans des canaux sodiques ou potassiques, a connu un réel essor dans les dernières années, et a mené à l'ère des canalopathies. Plusieurs gènes impliqués dans des syndromes d'épilepsies génétiques, tels *CACNA1H*, *SCN1A*, *CHRNA4* et *KCNQ2* sont exposés à la figure 1.2.1.1 et soulignent clairement l'importance des canaux ioniques dans l'étiologie génétique des épilepsies [32], [33].

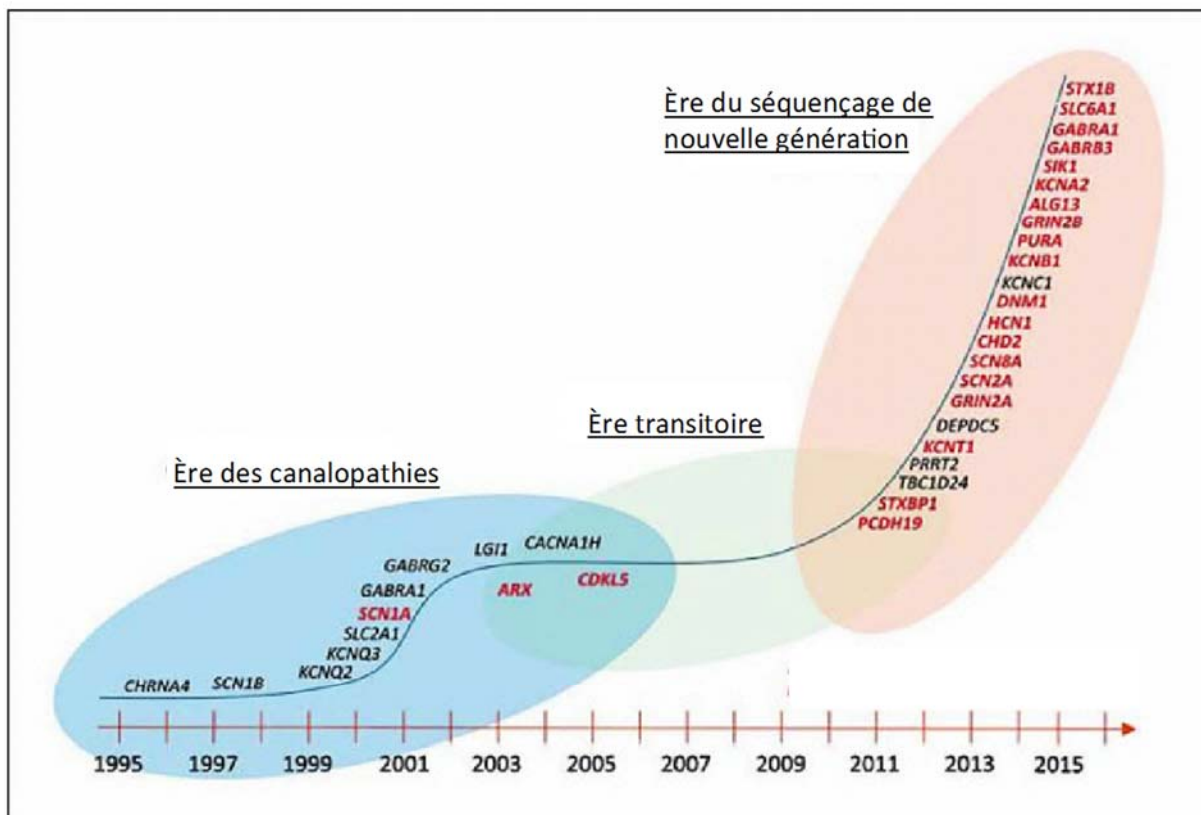


Figure 1.2.1.1 Ères de découverte des gènes associés à l'épilepsie, modifiée de [34].

## 1.2.2 Études d'association génomique (GWAS)

Ces études d'association pangénomiques (GWAS) permettent d'évaluer de façon statistique s'il existe un lien entre une variation génétique commune, qui est présente dans plus de 5% de la population, et un phénotype particulier de la maladie. Dans cette méthode d'analyse, la différence de fréquence allélique des marqueurs génétiques entre les cohortes de malades et les cohortes contrôles est observée afin d'orienter les chercheurs vers les variations génétiques causales. Bien que cette méthode possède une grande densité de couverture, elle a toutefois ses limites. En effet, il faut prendre en considération que les variations génétiques sont différentes d'un groupe ethnique à un autre, ainsi les cohortes doivent provenir d'une même population [35]. Cette approche est basée sur le principe « common disease, common variant » selon lequel les maladies multifactorielles à transmission complexe sont causées par un ensemble de variations génétiques communes [36]. Même si plusieurs types d'épilepsie présentent une transmission de type complexe, seulement quelques études d'associations du génome ont permis la découverte de gènes liés à cette maladie.

## 1.2.3 Séquençage

De nombreux gènes aujourd'hui associés à l'épilepsie, présentés à la figure 1.2.1.1, ont été découverts grâce à l'approche des gènes candidats et au séquençage conventionnel de type Sanger. Ce type de séquençage est très utile lorsqu'il est question de séquencer une région précise d'un génome afin de détecter des variations génétiques. Par contre, cette méthode est de plus en plus remplacée par le séquençage à haut-débit. En effet, les technologies de séquençage évoluent à un rythme fulminant et plusieurs raisons expliquent cet engouement pour les séquenceurs de nouvelle génération. Tout d'abord, cette méthode permet de séquencer à un coût relativement bas, et avec une très grande sensibilité, des millions de fragments en même temps. De plus, seule une petite quantité d'ADN est nécessaire et une grande couverture de l'information génétique est procurée par un re-séquençage des mêmes fragments [37]. Toutefois, ces technologies nécessitent l'instauration de plates-formes d'analyse

bioinformatique étant donné l'importante quantité de données générées [38]. Pour cette raison, et puisque 85% des variations causales identifiées dans les maladies monogéniques se trouvent dans la région codante du génome, c'est-à-dire dans les exons, le séquençage complet de l'exome (WES) est souvent priorisé [39]. Cette dernière technique, qui consiste à séquencer uniquement les différents exons du génome, permet donc de réduire considérablement les analyses informatiques, par rapport au séquençage du génome entier (WGS). D'ailleurs, le gène *DEPDC5* a été découvert suite au séquençage de l'exome de patients atteints d'épilepsie focale et d'une forme rare d'épilepsie à foyers variables, avec l'aide de notre laboratoire [40] [41]. Par contre le WGS possède l'avantage de détecter les variations structurelles pouvant causer la maladie, qui ne sont pas visibles avec la méthode de WES.

#### **1.2.4 Études de variations structurelles**

Le génome humain comporte une très grande variance interindividuelle. En effet, il est composé d'environ 10% de variations structurelles, plus communément appelées variations du nombre de copie (CNV), qui peuvent être de taille très variable, allant de 1000 paires de bases à quelques millions de paires de bases [42]. Ainsi, au cours des dernières années, la recherche de ces anomalies chromosomiques de structure, telles des délétions, des insertions, des translocations ou des duplications de fragments d'acide désoxyribonucléique (ADN), a permis d'enrichir nos connaissances de la génétique des épilepsies. Notamment, des CNVs dans le bras long du chromosome 15 (15q11,2, 15q11-q13, 15q13,3) ont été associées aux épilepsies généralisées, de même qu'à d'autres troubles neurologiques comme l'autisme ou la schizophrénie [43], [44]. De plus, environ 3-5% des cas d'encéphalopathie épileptique, une forme sévère d'épilepsie avec déficience intellectuelle, peuvent désormais être expliqués par des réarrangements génomiques récurrents [45]. Quelques gènes se trouvant dans ces variations structurelles ont donc été associés à ces épilepsies, comme c'est le cas de *CHD2*.

Même si ces récentes avancées ont permis d'améliorer grandement notre compréhension de l'étiologie génétique de l'épilepsie, et de confirmer l'héritabilité, il faut savoir que les formes monogéniques de la maladie ne représentent qu'une minorité. En effet, dans la majorité des



cas, une transmission plus complexe de type polygénique est suspectée [46]. Des mutations dans différents gènes peuvent causer le même syndrome épileptique et à l'inverse, un gène peut causer des manifestations cliniques différentes et être associé à plus d'un phénotype. Aussi, il faut considérer l'interaction entre les facteurs environnementaux et les gènes. Bref, la complexité de l'étiologie génétique de la maladie fait en sorte qu'il reste encore beaucoup à découvrir. D'autres approches peuvent être utilisées afin de valider certaines hypothèses, dont l'utilisation d'un modèle animal. Cette méthode sera vue plus en détails dans une section subséquente.

## **1.3 Les épilepsies génétiques**

Il est maintenant estimé qu'environ 47% des toutes les épilepsies, sont d'origine génétique [47]. Parmi celles-ci, certaines formes sévères ont une comorbidité de déficience intellectuelle et sont regroupées dans la catégorie d'encéphalopathie épileptique. D'autres présentent des caractéristiques bien précises comme par exemple la photosensibilité. Cette section vise à décrire respectivement ces épilepsies de façon plus précise étant donné leur importance dans ce mémoire.

### **1.3.1 Encéphalopathies épileptiques**

Le concept d'encéphalopathie épileptique a récemment été redéfini comme étant la survenue de troubles cognitifs et comportementaux causés directement par l'activité épileptique. Ces troubles peuvent présenter un niveau de sévérité variable et sont susceptibles de se détériorer avec le temps [17]. Dans ce type d'épilepsie, c'est donc l'activité épileptiforme abondante qui interfère avec le développement et qui mène à une diminution des fonctions cognitives.

C'est en 2001, qu'un premier gène a été associé aux encéphalopathies épileptiques avec la découverte d'une mutation *de novo* dans le gène *SCN1A*, chez plusieurs enfants atteints du syndrome de Dravet [48], [29]. Cette découverte était d'autant plus importante vu la forte

corrélation entre le génotype et le phénotype de ce syndrome. Bien que ce gène explique plus de 80% des cas, la proportion restante de patients est inexplicée ou causée par d'autres gènes, ce qui démontre à nouveau l'hétérogénéité génétique de l'épilepsie. Depuis quelques années, la découverte de plusieurs mutations dominantes *de novo* a permis d'associer de nombreux autres gènes aux encéphalopathies épileptiques. Ces mutations dites *de novo*, qui surviennent dans les gamètes ou au début de l'embryogénèse, se retrouvent chez l'enfant, mais ne sont pas présentes chez les parents [49].

### 1.3.1.1 Encéphalopathies *CHD2*

Le terme encéphalopathie épileptique peut aussi s'appliquer à un syndrome précis, causé par un gène connu, comme c'est le cas pour les encéphalopathies *CHD2*. En effet, étant donné que plusieurs études ont rapporté des cas d'encéphalopathie myoclonique, causés par des mutations *de novo* dans le gène *CHD2*, un phénotype précis porte le nom de ce gène. Par ailleurs, une équipe de chercheurs a récemment identifié plus de 6 mutations causales dans le gène *CHD2*, parmi une cohorte de 500 patients atteints d'encéphalopathie épileptique. Ils ont aussi montré que *CHD2* explique 1,2% de tous les cas d'encéphalopathie épileptique et qu'il est le quatrième gène le plus souvent muté dans ce type d'épilepsie, après *SCN1A*, *CDKL5* et *STXBPI* [50], [51].

Les encéphalopathies *CHD2* sont caractérisées par des crises myocloniques, des absences et des crises généralisées de type clonique tonique, qui débutent habituellement dans la deuxième année de vie. Plusieurs patients atteints de ce syndrome épileptique, sont aussi photosensibles (voir section 1.3.2), en plus d'être réfractaires [50]. La prise en charge du patient est grandement améliorée lorsqu'un diagnostic précis de syndrome tel que l'encéphalopathie *CHD2* peut être rendu. Par contre, peu de temps s'est écoulé depuis l'identification de ces épilepsies, ainsi il reste encore beaucoup de choses à découvrir afin de mieux comprendre les mécanismes en causes et d'améliorer leur diagnostic.

### 1.3.2 Épilepsie avec photosensibilité

La photosensibilité en soi est une réponse anormale photoparoxystique induite par des stimuli lumineux, qui peut être observée par un électroencéphalogramme, et qui serait causée par une hyperactivité du cortex occipital [52], [53]. Ce phénomène est présent dans la population générale, de même que dans certains syndromes épileptiques, avec une forte prépondérance chez les jeunes adolescentes. Ce trait génétique est associé dans 95% des cas à l'épilepsie et touche entre 2 et 5% de tous les patients épileptiques [54]. Certains épileptiques sont purement photosensibles, c'est-à-dire que leurs crises sont exclusivement déclenchées par la lumière, tandis que d'autres subissent des crises qui peuvent survenir dans un contexte de stimulation lumineuse mais également dans un contexte différent [55], [56]. Les crises photosensibles, qui peuvent être occasionnées par une lumière naturelle ou encore artificielle comme celle de la télévision et des jeux vidéo, disparaissent vers l'âge de 15 ans chez environ le tiers des patients [57], [58].

Parmi les épilepsies avec photosensibilité, on trouve entre autres le syndrome de Jeavons. Cette forme d'épilepsie généralisée débute durant l'enfance, et est caractérisée par une hypersensibilité visuelle. Plus particulièrement, les patients atteints de ce syndrome subissent fréquemment des myoclonies palpébrales accompagnées ou non par des crises d'absences. Il est aussi possible d'observer à l'électroencéphalogramme du patient, une activité épileptiforme déclenchée par l'ouverture des yeux et une réponse photoparoxystique. [59].

La photosensibilité est une caractéristique qui est aussi souvent associée aux encéphalopathies épileptiques, entre autres celles causées par des mutations dans le gène *CHD2*. L'équipe de Carvill a d'ailleurs exposé que sur six patients atteints d'encéphalopathie épileptique causée par le gène *CHD2*, trois étaient photosensibles [51]. De plus, un autre groupe a montré que la diminution d'expression du gène *CHD2* engendrait une photosensibilité innée chez le poisson zèbre [60]. Ces récentes découvertes ouvrent donc de nouvelles avenues à la recherche sur ces types précis d'épilepsie.

## 1.4 CHD2

Le gène *CHD2* (Chromodomain helicase DNA Binding Protein 2) code pour une protéine hélicase qui se lie à l'ADN, et qui possède entre autres des chromo-domaines. Cette protéine est connue pour réguler l'assemblage et le remodelage de la chromatine en utilisant l'énergie d'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) [61]. *CHD2* aurait donc un effet sur la transcription de nombreux gènes en altérant la structure de l'ADN. Globalement, un groupe de chercheurs a montré que la région N-terminale de cette protéine auto-inhibe son activité en diminuant son affinité à l'ADN et en conférant une spécificité à la chromatine, tandis que la région C-terminale, qui est indispensable au remodelage de la chromatine, est responsable de la forte liaison à l'ADN et de la stimulation de l'activité liée à l'ATP [62]. La figure 1.4.1 illustre bien les différents domaines de la protéine, de même que les variations génétiques répertoriées dans ce gène.

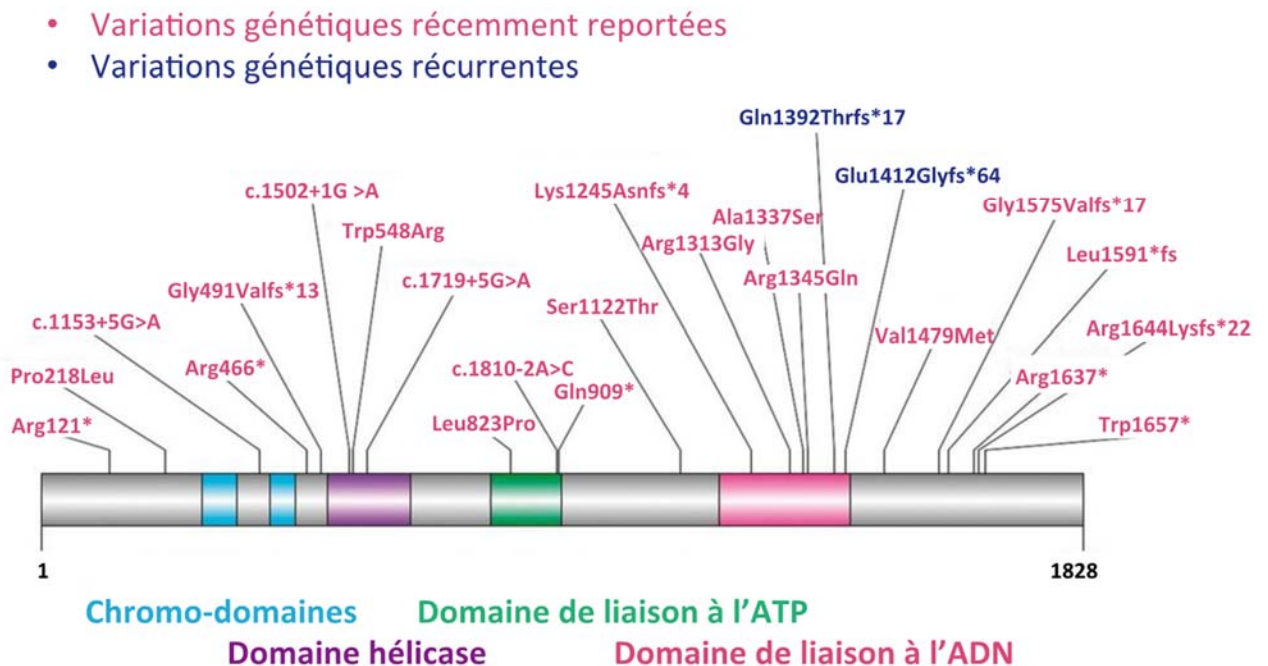


Figure 1.4.1 Domaines fonctionnels et variations génétiques identifiées dans le gène *CHD2*, modifiée de [60].

Selon diverses études, l'haploinsuffisance de *CHD2* cause un retard de croissance et une mort précoce chez la souris, de même qu'une forme sévère d'épilepsie accompagnée de déficience intellectuelle chez l'humain. Ces résultats suggèrent l'implication de ce gène dans les premières phases de développement du cortex [63], [64]. Récemment, l'équipe de Shen a montré l'implication de *CHD2* dans la neurogénèse embryonnaire via la stimulation du répresseur de transcription RE1 (REST). Une diminution d'expression de *CHD2* mène donc à une diminution de REST, et par conséquent à une augmentation de l'expression de divers gènes impliqués dans la neurogénèse. Ils ont aussi montré que l'absence de *CHD2* altère la composition des cellules progénitrices neuronales en favorisant une différenciation précoce en neurones, et donc une diminution du bassin de cellules souches [61]. Ainsi, une anomalie durant la neurogénèse due à une mutation du gène *CHD2*, peut directement causer un trouble du développement cérébral.

En seulement quelques années, *CHD2* est devenu un gène d'intérêt pour les chercheurs et il a permis d'expliquer plusieurs cas d'encéphalopathie épileptique, en plus d'être associé à la photosensibilité [65], [60]. Des mutations dans ce gène ont aussi été retrouvées dans d'autres types d'épilepsie, telles des épilepsies généralisées, de même que dans divers troubles neurodéveloppementaux [66], [67]. Les variations génétiques trouvées dans ce gène, ont d'ailleurs de fortes chances d'être pathogéniques étant donné le fait que *CHD2* possède une très faible tolérance aux mutations [68]. En effet, le gène *CHD2* possède un score RVIS (Residual variation intolerance score) négatif de -1,75 car il possède peu de variations fonctionnelles communes et son percentile est de 2,37%, ce qui fait de lui un des gènes humains les plus intolérants [69].

Le gène *CHD2*, qui est un nouveau gène d'épilepsie, est donc au centre de ce projet de maîtrise. Pour faciliter la compréhension de ce mémoire, et puisqu'un seul gène peut générer plusieurs isoformes avec des fonctions biologiques distinctes, les différents transcrits produits par *CHD2*, sont présentés à la figure 1.4.2. En effet, *CHD2* est un long gène qui peut produire plusieurs transcrits par épissage alternatif, dont un petit de 12 exons et un plus grand de 39 exons.

### Chromosome 15, gène *CHD2*

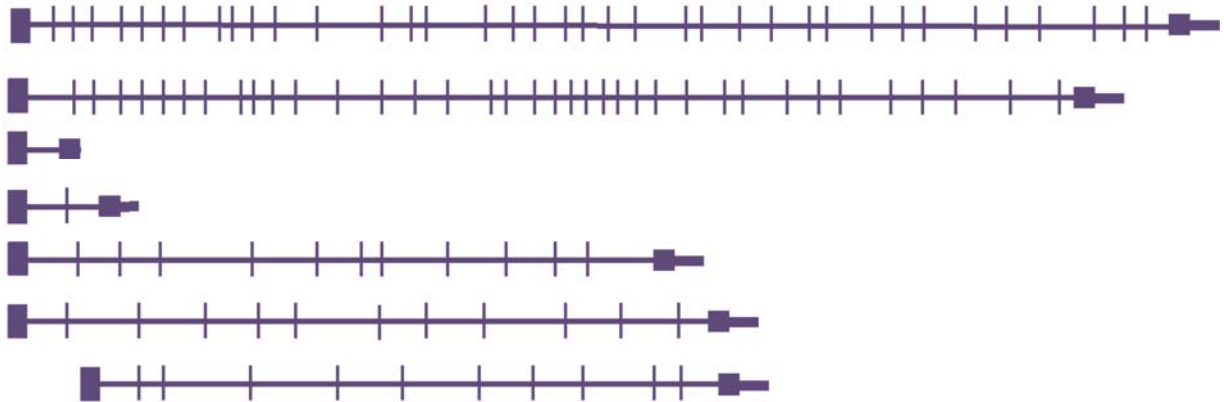


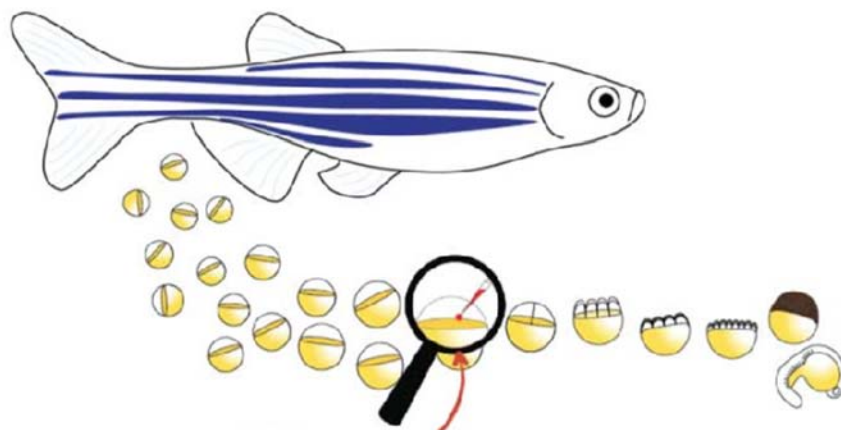
Figure 1.4.2 Différents isoformes du gène *CHD2*, selon la version 37 du génome humain (Hg37) de la base de données de l'université de Californie à Santa Cruz (UCSC).

## 1.5 Le poisson zèbre, un organisme modèle de choix

Tel que mentionné dans la section 1.2, les récentes avancées dans le domaine de la génomique ont permis la découverte de nombreux gènes qui causent l'épilepsie. Afin d'établir un lien fonctionnel entre un génotype et un phénotype particulier, et pour comprendre les mécanismes biologiques qui sous-tendent la maladie, les modèles animaux sont d'une grande utilité. Durant de nombreuses années, le modèle animal de choix en génétique des épilepsies fut le rongeur. En effet, les rats et les souris ont été largement utilisés pour étudier le rôle de gènes candidats, étant donné la grande similarité de leur génome avec celui de l'humain [70]. Toutefois, depuis plusieurs années, les scientifiques tendent à se tourner vers le modèle de poisson zèbre, qui procure de nombreux avantages. Entre autres, en plus de se contenter de peu d'espace, ce modèle est très peu coûteux en comparaison avec les rongeurs. Le poisson zèbre est aussi beaucoup plus près de l'humain dans l'arbre phylogénétique que plusieurs autres modèles, tels les nématodes ou les drosophiles. De plus, environ 85% des gènes connus en épilepsie ont un homologue chez le poisson zèbre, ce qui fait de lui un modèle intéressant. Une autre raison qui explique la popularité de ce modèle, est le fait que les embryons se

développent de façon externe, et qu'ils sont transparents. Cela permet d'observer en détail les structures du système nerveux et de visualiser chaque étape de leur développement. Ce dernier est en plus très rapide puisqu'en 72 heures, les poissons peuvent nager et se nourrir par eux-mêmes. Il est aussi très facile d'élever rapidement et de maintenir plusieurs lignées de poissons zèbres, puisqu'un couple de poisson peut générer à lui seul entre 50 et 200 œufs par semaine [71], [72], [73].

Le poisson zèbre est aussi devenu un modèle très attrayant en épilepsie dû aux nombreuses possibilités en terme de manipulations génétiques. À titre d'exemple, le groupe de Baraban a récemment créé un modèle de poisson zèbre mutant pour le gène *SCN1A*, qui présente un phénotype du syndrome de Dravet, incluant des crises épileptiques et une activité cérébrale anormale [74]. Il est effectivement possible de modifier l'expression d'un gène cible en injectant un ARN ou une construction d'ADN dans la première cellule d'un embryon, tel qu'illustré à la figure 1.5.1. Plusieurs techniques permettent entre autres de diminuer ou d'inactiver l'expression d'un gène, toutefois seules les méthodes utilisées dans ce mémoire seront décrites dans la présente section.



**Manipulation génétique: injection dans la première cellule**

**Figure 1.5.1 Injection d'acides nucléiques dans un embryon de poisson zèbre au stade unicellulaire, afin de modifier génétiquement un gène cible, modifiée de [73].**

### **1.5.1 Répression de l'expression génique par l'approche Morpholino**

Le morpholino (MO) a longtemps été l'outil le plus utilisé chez le poisson zèbre, afin de diminuer l'expression d'un gène spécifique, dans le but d'en étudier la fonction. Cette méthode a d'ailleurs permis d'associer divers phénotypes à des variations génétiques, à travers un modèle de poisson [75],[76]. De manière générale, la micro-injection d'une solution de MO s'effectue dans le sac vitellin des embryons au stade de 1-2 cellules. À ce stade précoce, la solution injectée est répartie dans tout l'organisme, ce qui permet théoriquement de désactiver le gène cible dans chacune des cellules [77], [78]. Le MO est plus précisément un oligonucléotide synthétique anti-sens qui se fixe à un endroit bien précis sur l'ARN par appariement de base, pour diminuer l'expression d'un gène cible. Il existe deux grandes catégories de MO, soit ceux qui agissent en interférant durant l'épissage alternatif de l'ARN pré-messager et ceux qui bloquent l'initiation de la traduction par encombrement stérique [79]. Dans ce projet de recherche, un oligonucléotide synthétisé spécifiquement pour affecter un site précis de l'épissage a été utilisé. Ainsi, avec ce type de MO, l'efficacité de la méthode ainsi que la présence de transcrits alternatifs peuvent être facilement détectées par la technique d'amplification en chaîne par polymérase (PCR).

Les MO, qui comptent environ 25 bases, possèdent de nombreux avantages. En effet, ils sont résistants aux nucléases, en plus d'être structurellement très stables. Ils sont aussi abordables monétairement, et ne causent aucune toxicité à l'organisme [80]. De plus, il est intéressant de considérer la grande rapidité d'exécution de la technique, puisque le phénotype peut être observé dans les 3-5 jours suivant l'injection du MO. Il existe toutefois des inconvénients à cette méthode, entre autres le fait que l'inactivation d'un gène est très souvent incomplète et que l'effet est transitoire. Par conséquent, une quelconque proportion de la protéine peut être exprimée dans l'organisme. De plus, l'injection précise d'un volume constant de la solution de MO dans l'embryon est un enjeu majeur [81]. Bref, bien qu'il existe de nombreuses autres techniques pour modifier l'expression d'un gène, le MO demeure un bon choix. Il peut aussi être utilisé pour valider rapidement l'effet fonctionnel de variations génétiques en procédant à une co-injection du MO et du gène mutant dans le poisson zèbre.

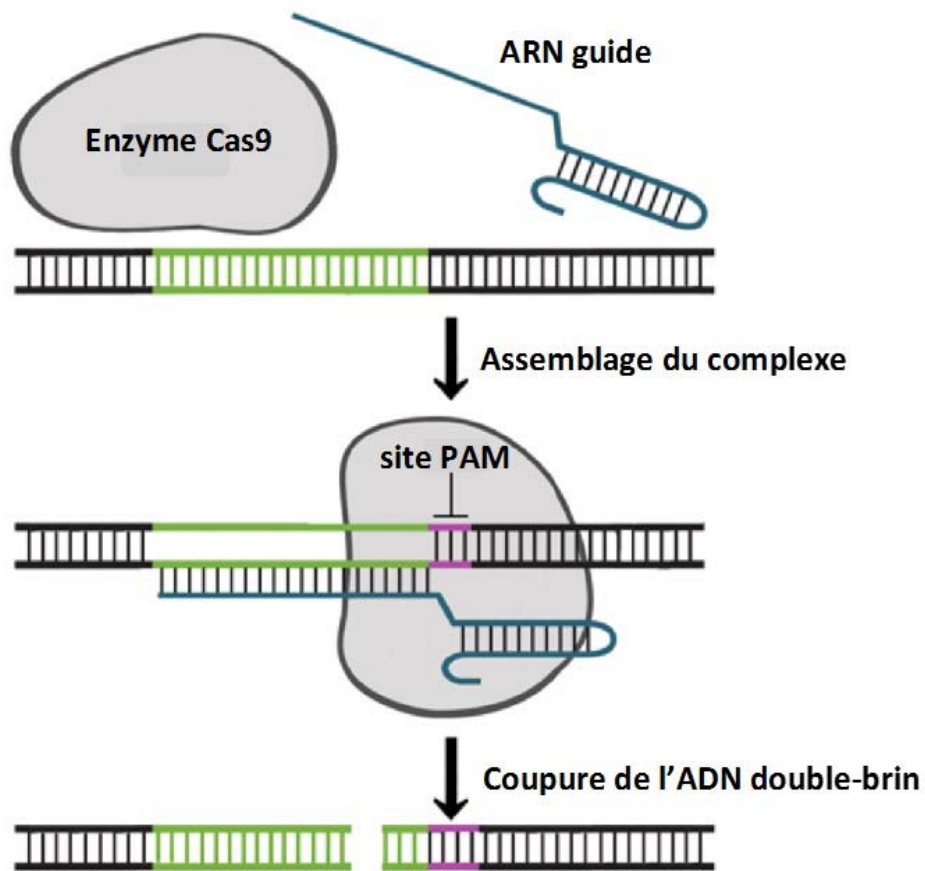


## 1.5.2 Inactivation génique par la méthode CRISPR-Cas9

Une technique émergente en génétique, basée sur une combinaison de courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées (CRISPR) et de la protéine 9 associée à CRISPR (Cas9) est de plus en plus utilisée afin d'éditer le génome. La méthode CRISPR-Cas9 est attrayante puisqu'elle permet de couper les deux brins d'ADN à l'endroit désiré afin d'inactiver un gène cible, ou encore d'introduire une séquence voulue d'ADN dans un organisme. En fait, cette technologie provient du système immunitaire adaptatif des procaryotes, et leur confère une protection contre les bactériophages. Des chercheurs ont découvert de courtes répétitions palindromiques présentes dans le génome des bactéries, qui sont en fait des séquences virales d'ADN, que les bactéries ont elles-mêmes intégrées à leur génome [82]. Ainsi, pour se protéger, les bactéries produisent de petits ARN complémentaires à l'ADN du phage, qui forment un complexe en se liant à l'enzyme Cas9. Lorsque ces complexes détectent la présence de phages à l'intérieur de la bactérie, ils se lient à leur ADN et le coupent dans le but d'entraîner leur mort [83].

Cette technique a donc été adaptée afin que le complexe s'attaque à l'ADN d'une cellule hôte plutôt qu'à celui d'un virus. En effet, des ARN guides, qui sont des sondes artificielles d'ARN complémentaires à l'ADN d'un gène cible, peuvent désormais être synthétisés. De cette façon, toutes les régions du génome peuvent être éditées, pourvu qu'elles soient suivies d'un motif adjacent espaceur (PAM) formé d'un trinucleotide de type « NGG ». Tel qu'illustré à la figure 1.5.2.1, lorsque l'ARN guide reconnaît sa séquence d'ADN, l'enzyme Cas9 vient se lier au site PAM avant de couper les deux brins d'ADN. Suite à la coupure double brin, la cellule hôte tente de réparer le matériel génétique mais elle génère souvent une modification quelconque à l'ADN en tentant de recoller les brins.

Ainsi, en injectant dans la première cellule d'un embryon de poisson zèbre, un ARN guide spécifique accompagné de son endonucléase Cas9, il est possible d'inactiver un gène d'intérêt pour en étudier sa fonction [84].



**Figure 1.5.2.1 Principe du fonctionnement de la méthode CRISPR-Cas9, modifiée de [84].**

Cette méthode est avantageuse puisqu'elle est simple et très flexible. De plus, la technique CRISPR permet de cibler une séquence et de couper l'ADN de façon plus précise et plus rapide que les autres principaux outils de génie génétique, telles les nucléases à doigts de zinc (ZFN) ou les nucléases de types activatrices de transcription (TALEN) [85], [86]. Toutefois, bien que ce soit la méthode privilégiée d'édition du génome à ce jour, il peut arriver que l'ARN guide reconnaisse une séquence autre que celle souhaitée et que l'enzyme coupe l'ADN au mauvais endroit, dû à la redondance du génome.

Globalement, les deux techniques décrites sont efficaces. Le MO est un outil pratique puisqu'il permet de valider rapidement, et à faible coût, l'implication d'un gène dans une

maladie, en diminuant de façon transitoire son expression dans un modèle animal. De manière différente, la méthode CRISPR-Cas9 permet d'étudier la fonction d'un gène précis en l'inactivant complètement et en créant un modèle d'étude d'une maladie.

## 1.6 Objectif et plan expérimental

Les encéphalopathies épileptiques représentent une forme d'épilepsie sévère, où les crises répétées interfèrent avec le développement normal et causent des troubles cognitifs. Parmi cette catégorie d'épilepsie, des chercheurs ont montré que 1,2% des cas peuvent être expliqués par des mutations dans le gène *CHD2*. Ainsi, un syndrome précis caractérisé par des crises généralisées de type myoclonique et par des absences débutant durant l'enfance, porte le nom d'encéphalopathie *CHD2*. Les patients souffrant de ce type d'épilepsie sont aussi souvent réfractaires, en plus d'être photosensibles [50], [51]. La gravité des symptômes associés à ce syndrome et le fait que les mécanismes moléculaires qui sous-tendent les encéphalopathies *CHD2* sont très peu connus, expliquent l'intérêt grandissant des chercheurs pour le gène *CHD2*. En effet, l'équipe de Suls a démontré tout récemment que la diminution d'expression du gène *chd2* à l'aide d'un MO, engendre des anomalies morphologiques chez le poisson zèbre [65].

Comme notre laboratoire s'intéresse à la génétique des épilepsies et qu'il reste beaucoup de choses à découvrir sur *CHD2*, nous avons décidé d'étudier plus en détail le rôle et l'implication de ce gène dans les épilepsies. Ainsi, l'objectif principal de ce projet de maîtrise se résume à caractériser de manière fonctionnelle, dans un modèle de poisson zèbre, les variations génétiques trouvées dans le gène *CHD2* par criblage génétique.

Étant donné l'expertise en génétique de notre laboratoire et le fait que nous ayons accès à de grandes cohortes de patients épileptiques, nous avons établi comme premier objectif de vérifier la contribution du gène *CHD2* dans notre cohorte de patients avec épilepsie photosensible. Après cela, nous avons fait l'inventaire des variations génétiques dans le gène *CHD2* à travers l'ensemble des données de séquençage des patients épileptiques auquel nous

avons accès. Les variations génétiques trouvées ont ensuite été triées selon divers critères, afin de ne conserver que celles qui sont potentiellement pathogéniques.

Par la suite, nous avons voulu vérifier dans un modèle de poisson zèbre, l'impact fonctionnel d'une diminution d'expression du gène *chd2*, à l'aide d'un MO. Suite à la caractérisation du phénotype, nous avons tenté de le renverser en injectant une copie du gène sauvage humain *CHD2* dans ces mêmes poissons. Finalement, nous avons voulu tester l'effet fonctionnel des variations génétiques identifiées chez les patients, en injectant une copie mutante du gène humain *CHD2* dans ces poissons zèbres.

En dernier lieu, nous avons réalisé un nouveau modèle pour l'étude de l'épilepsie causée par *CHD2*, en inactivant complètement ce gène sur les deux allèles du poisson zèbre. En utilisant la méthode CRISPR, nous avons en effet, généré une lignée stable de poissons zèbres qui n'expriment pas le gène *chd2*.

Les résultats obtenus se retrouvent dans le chapitre 3 de ce mémoire.

## **Chapitre 2 : Procédures expérimentales**

### **2.1 Séquençage du génome entier (WGS)**

#### **2.1.1 Extraction d'ADN**

À partir du sang, l'ADN génomique a été extrait en utilisant le kit « ArchivePure DNA Purification Kit » (5 PRIME) en suivant les instructions du manufacturier.

#### **2.1.2 Préparation des librairies et séquençage du génome**

L'ADN génomique a été purifié avec le kit « ZR-96 DNA Clean & Concentrator™-5 » (Zymo) avant d'être quantifié avec le Quanti-TTM PicoGreen dsDNA (Life Technologies) puis déposé sur gel d'agarose afin de vérifier son intégrité. Les librairies ont été générées selon les recommandations du manufacturier avec le kit « TruSeq DNA PCR-Free Library Preparation » (Illumina) et elles ont ensuite été quantifiées avec les kits « Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Assay Kit » (Life Technologies) et « Kapa Illumina GA with Revised Primers-SYBR Fast Universal » (Kapa Biosystems). La taille approximative des fragments a été déterminée avec un appareil LabChip GX (PerkinElmer). Les librairies ont par la suite été dénaturées dans de l'hydroxyde de sodium 0,05 Molaire (M) et diluées à 8 picomolaires (pM) dans un tampon HT1. Le regroupement des librairies sur la cellule d'écoulement a été effectué à l'aide d'un Illumina cBot, puis la synthèse chimique a été réalisée selon les recommandations du manufacturier avec le kit « HiSeq Cluster Kit v4 », dans un appareil HiSeq2000, ou dans dans un appareil HiSeq 2500 XPE pour 2x150 cycles, et ce, en mode jumelé jusqu'à une couverture minimale de 30X. Une librairie contrôle phiX a été utilisée et mélangée avec les autres librairies au niveau 0,01. Le séquençage a été effectué au centre d'innovation Génome Québec.

### **2.1.3 Analyse bioinformatique et sélection des variations génétiques**

Le programme d'analyse en temps réel qui a servi à générer des séquences en format fastq est bcl2fastq v-1-8,4 et le logiciel Trimmomatic v0.32 a servi à détecter les séquences de mauvaise qualité. Les séquences ont ensuite été alignées avec la séquence de référence du génome humain 37 de UCSC. Chaque ensemble de séquences a été aligné pour créer un document cartésien d'alignement binaire (.bam) avec le logiciel BWA-mem v0-7,10. Par la suite, ces dossiers ont été combinés dans un seul dossier BAM à l'aide de Picard v.1.123. Les documents gvcf ont été combinés et transformés en dossiers vcf avec le logiciel GATK v-3.3.0. Ces derniers dossiers vcf ont ensuite été calibrés, filtrés et annotés en utilisant GATK, selon les recommandations du logiciel : (<https://software.broadinstitute.org/gatk/best-practices/>). Les variations ont été annotées avec Annovar. Seules les variations génétiques présentes dans les régions codantes de la séquence de référence ont été conservées, avec une couverture minimale de 10X.

## **2.2 Séquençage de l'exome (WES)**

Brièvement, l'ADN génomique a été extrait tel que décrit à la section 2.1.1. Le séquençage a été effectué au centre Applied Genomics de Toronto (TCAG), avec un séquenceur Illumina HiSeq 4000 à l'aide du kit « seqCap exome » (Roche Nimblegen). L'alignement des séquences a ensuite été effectué avec l'algorithme Burroughs–Wheeler BWA, et les variations génétiques ont été sélectionnées à l'aide de l'outil informatique GATK v4. L'annotation des variations génétiques a aussi été faite avec Annovar.

## **2.3 Séquençage du gène *CHD2* par la méthode de Sanger**

Des amorces ont été conçues afin d'amplifier des fragments de 400-600 paires de bases d'ADN génomique et de couvrir l'ensemble des régions codantes du gène humain *CHD2*

(NM\_001271). Les différents fragments du gène ont été amplifiés par une réaction PCR, en utilisant un appareil ProFlex PCR system (Applied Biosystems) avant d'être séquencés au centre d'innovation Génome Québec avec un séquenceur automatique 3730 xl DNA Analyzer (ABI3730; Applied Biosystems). Les réactions PCR ont été produites avec différents protocoles selon les fragments du gène *CHD2* (voir annexe 1). Le programme de PCR « touchdown » utilisé pour tous les fragments est le suivant : une étape de 5 minutes à 94 °C suivie de 14 cycles composés de 30 secondes à 94 °C, 30 secondes à 62°C-55°C (-0,5°C/cycle) et 45 secondes à 72 °C, puis 23 cycles composés de 30 secondes à 94 °C, 30 secondes à 55 °C et 45 secondes à 72 °C et finalement une étape de 7 minutes à 72 °C. Les échantillons ont été migrés par électrophorèse sur gel d'agarose, tel que décrit dans la section 2.4. Les séquences des amorces utilisées sont dans l'annexe 2. La sélection des variations génétiques a été effectuée en conservant uniquement les mutations faux-sens, non-sens et les délétions dans les régions codantes du gène.

## **2.4 Électrophorèse sur gel d'agarose**

Pour toutes les expériences de PCR, un appareil ProFlex PCR system (Applied Biosystems) a été utilisé. Les échantillons ont été migrés dans un tampon TBE composé de Tris, d'acide borique et d'EDTA, sur un gel d'agarose 1,5% avec du bromure d'éthidium. Ils ont ensuite été visualisés à l'aide d'un système d'imagerie par transillumination à rayons ultraviolets (UV) (Alpha Innotech Red) et ils ont été séquencés au centre d'innovation Génome Québec dans un séquenceur automatique 3730 xl DNA Analyzer (ABI3730; Applied Biosystems).

## **2.5 Technique Mini-gène**

Pour synthétiser le mini-gène, le vecteur Exontrap (MoBiTec Molecular Biotechnology, Germany) a été utilisé. Il contient des exons, séparés par une séquence intronique de 600 paires de bases, qui est pourvue d'une zone de clonage multiple avec différents sites de

restrictions uniques. Cette séquence intronique est conçue pour cloner le fragment d'intérêt du gène. Les versions sauvages et mutantes de la section d'intérêt du gène *CHD2* (GRCh37/chr15 :93 486 239-A >G) ont été amplifiées par PCR à partir de l'ADN génomique d'un patient épileptique, avec les amorces respectives suivantes : F : CCGGATCCGCTTCATCCACAAAGGGAGT, R : CGCTCTAGATAGCTGTGATCTCC-ATG et F : CCGGATCCGACAAGTTGATTTTTGGGGGTA, R : CGCTCTAGAAACT-CTGCTCCTGAAGCCTCT. Les réactions PCR ont été produites avec 1 µL de dNTP (2,5 µM), 0,4 µL de chacune des amorces (10 µM), 1,5 µL de tampon à PCR 10X, 0,9 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,06 µL de polymérase Amplitaq Gold (Applied Biosystems), 5 µL d'ADN génomique (50 ng) et de l'eau pour compléter jusqu'à un volume final de 15 µL. Le programme « touchdown » de PCR décrit précédemment a été utilisé. Les échantillons ont été migrés par électrophorèse sur gel d'agarose, tel que décrit dans la section 2.4. Les produits de réactions PCR ont ensuite été purifiés avec le kit « EZ-10 Spin Column » (Bio Basic) et digérés avec les enzymes de restrictions BamH1 et XbaI, avant d'être clonés dans le vecteur Exontrap, préalablement digéré par les mêmes enzymes [87]. Le mini-gène résultant contient un fragment de 434 paires de bases de l'exon 9 du gène *CHD2*. La séquence du mini-gène a par la suite été validée par la technique de séquençage de Sanger.

### 2.5.1 Transfection

Un vecteur vide, un vecteur contenant la version sauvage du fragment d'intérêt du gène *CHD2* et un vecteur contenant un fragment d'intérêt mutant du gène *CHD2* ont été transfectés avec de la lipofectamine-2000 (Invitrogen) dans des cellules rénales embryonnaires humaines 293T (HEK293T). Les cellules ont été récoltées 48 heures post-transfection, et l'ARN total a été extrait avec le kit « RNeasy Minikit » (Qiagen). Par la suite, l'ADN complémentaire (cDNA) a été synthétisé avec les hexamères aléatoires et le kit « SuperScript III reverse transcriptase » (Invitrogen), à partir d'1 µg d'ARN total. Des réactions de PCR ont été réalisées suivant le programme « touchdown » décrit précédemment avec 1 µL de dNTP (2,5 µM), 0,4 µL de chacune des amorces (10 µM) F : GCGAAGTGGAGGATCCACAAG et R : ACCCGGATCCAGTTGTGCCA, 1,5 µL de tampon à PCR 10X avec MgCl<sub>2</sub> (15mM), 0,9 µL



de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0,06 µL de polymérase Amplitaq Gold (Applied Biosystems), 2 µL de cDNA et de l'eau pour compléter jusqu'à un volume final de 15 µL. Les échantillons ont finalement été migrés par électrophorèse sur gel d'agarose, tel que décrit dans la section 2.4.

### **2.5.2 Culture des cellules HEK-293T**

Les cellules ont été maintenues dans le milieu de culture Eagle modifié Dulbecco (DMEM) avec un ajout de sérum de bovin foetal (FBS) 10%. Les cellules ont été conservées dans un environnement humide avec 5% de gaz carbonique (CO<sub>2</sub>).

## **2.6 Élevage des poissons-zèbres**

Les poissons zèbres (*Danio rerio*) sauvages à longues queues (TL) ont été maintenus à une température ambiante de 28,5 °C selon un cycle 12 heures de lumière et 12 heures de noirceur, tel que décrit précédemment [88]. Ils ont été nourris selon les procédures standards [89]. Toutes les expériences ont été réalisées au centre hospitalier de recherche de l'université de Montréal (CRCHUM) en respectant le guide du conseil Canadien pour la protection des animaux. Les protocoles expérimentaux faisant usage de poissons zèbres ont été approuvés le 2015-08-31 par le comité institutionnel pour la protection des animaux (IACUC).

## **2.7 Hybridation *in situ***

Une région du gène *chd2* a été amplifiée à partir du cDNA d'embryons de poissons zèbres avec les amorces suivantes : F : AATGACGACTCGCTGCTGTA et R : CTCCTCCACAGTCCCTTTTG. La séquence résultante de 900 paires de bases a été clonée dans un vecteur pCR<sup>TM</sup>2.1-TOPO® (ThermoFisher). L'hybridation *in situ* dans le poisson zèbre a été réalisée sur des embryons à différents stades de développement, en utilisant des sondes d'ARN *chd2* sens et anti-sens marquées avec la dioxygénine (DIG), en suivant le

protocole décrit précédemment [90], [91]. Brièvement, les embryons ont été fixés dans de la paraformaldéhyde (PFA) 4% durant toute la nuit à 4°C, puis déshydratés et déposés dans du méthanol. Ils ont ensuite été réhydratés dans un tampon salin à base de phosphate et de Tween-20 0,1% (PBSt). Les embryons ont été digérés à la protéinase K avant d'être hybridés avec les sondes d'ARN à 70°C, pour toute la nuit. Le jour suivant, les embryons ont été lavés dans des solutions contenant 25%, 50% ou 75% de tampon de préhybridation (50% formamide, solution saline de citrate de sodium 5X (SSC), 9,2 mM d'acide citrique, 1% Tween-20) dans une solution 2X SSC. Après, ils ont été lavés à nouveau pendant 30 minutes dans une solution SSC 0,2X à 68°C. Ils ont ensuite été incubés dans une solution d'anti-DIG, 1 :2000 (Groupe Roche) pour toute la nuit. Par la suite, les embryons ont été lavés dans un tampon d'acide maléique (100 mM d'acide maléique, 150 mM de chlorure de sodium (NaCl), 0,2M NaOH, 0,1% Tween-20, pH 7,5) puis dans une solution de phosphatase alcaline (60 mM Tris-acide chlorhydrique (HCl) pH 9,5, 60 mM NaCl, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Tween-20). Finalement, ils ont été incubés dans une solution de coloration (mélange de 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate et de nitro bleu de tetrazolium dans la solution de phosphatase alcaline) jusqu'à ce que le marquage soit apparent et déposés dans le glycérol. La visualisation des embryons s'est faite à l'aide d'un microscope Zeiss M2 Bio. Les images ont été captées en utilisant un appareil photo digital Zeiss Axiocam, connecté à un ordinateur, puis elles ont été retravaillées avec le logiciel Photoshop 7,0.

## 2.8 Clonage et mutagenèse du gène *CHD2*

L'ARN a été extrait avec du TRizol à partir de lymphoblastes, selon les instructions du manufacturier, puis le cDNA a été synthétisé avec les hexamères aléatoires et le kit « SuperScript III reverse transcriptase » (Invitrogen). Des amorces ont été conçues afin d'amplifier par PCR la séquence complète du petit transcrit du gène humain *CHD2* (NM\_001271). Un site de restriction BamH1, une étiquette c-Myc ainsi que la séquence Kozak ont été ajoutés aux amorces (F : CCGGATCCCCACCATGGAACAAAACACTCA-TCTCAGAAGAGGATCTGGCTCATAAACAAAGGGAAGATTAT, R : CGCGAATTCC-

TACTTGCACCAGGAATGAGCTAG). La réaction PCR a été réalisée avec 1,6 µL de dNTP (2,5 µM), 1 µL de chacune des amorces (10 µM), 4 µL de tampon à PCR HF 5X avec MgCl<sub>2</sub> (1,5mM), 0,2 µL de polymérase Taq Phusion (Applied Biosystems), 2 µL cDNA et de l'eau pour compléter jusqu'à un volume final de 20 µL. Le programme utilisé est le suivant : une étape de 30 secondes à 98 °C, 35 cycles composés de 10 secondes à 98 °C, 30 secondes à 64 °C et de 6 minutes à 72 °C, puis finalement une étape de 10 minutes à 72 °C. Le produit PCR a ensuite été digéré avec les enzymes de restrictions BamH1 et EcoR1 avant d'être sous-cloné dans le vecteur pCS2+, compatible avec le poisson zèbre. Les versions mutantes du gène (T22A, K204R et P418L) ont été obtenues par mutagenèse dirigée, à partir du cDNA sauvage du gène *CHD2*, selon les conditions PCR suivantes : 4 µL de dNTP (2,5 µM), 1 µL de chacune des amorces (10 µM) T22A F : GCGTTTTTACTTGGTACCGTGCATTTTCTCAGTTGGC-ATTTG, T22A R: CAAATGCCAACTGAGAAAATGCACGGTACCAAGTAAAAACGC, K204R F : CAGCGTGGAAAGAGAAGAAAGCAAGATTCTTC, K204R R: GAAGAA-TCTTGCTTTCTTCTTTCCACGCTG, P418L F: CATAGTCGGAAGCTGGCACCCCT-CAAATG, P418L R: CATTGAGGGTGCCAGCTTCCGACTATG, 10 µL de tampon à PCR Taq Advantage HD 5X avec MgCl<sub>2</sub> (5mM), 1 µL de polymérase Taq Advantage (Clontech), 1,89 µL cDNA et de l'eau pour compléter jusqu'à un volume final de 50 µL. Le programme PCR utilisé est le suivant : une étape de 3 minutes à 95 °C, 20 cycles composés de 30 secondes à 95 °C, 1 minute à 56 °C et de 14 minutes à 68 °C puis finalement une étape de 10 minutes à 68 °C.

## **2.9 Expériences d'injection du MO E2I2 *chd2*, de la copie sauvage du gène humain et des variations génétiques**

Pour diminuer l'expression du gène *chd2* chez le poisson zèbre, un MO synthétisé par Gene Tools (Philomath, OR), visant à bloquer l'épissage de l'ARN pré-messager entre l'exon 2 et l'intron 2, a été utilisé (E2I2 MO 5'-GATCAGACTGGCCTTTTTGTGTACC -3') [65]. Le MO a été injecté dans des embryons unicellulaires de poissons zèbres, à une dose fixe de 10 ng/ embryon. Donc, 2 nL d'un mélange de MO à 600 µM a été injecté. Une réaction de

transcription inverse suivie d'une réaction de PCR a été réalisée afin de valider l'effet du MO sur la transcription, tel que décrit plus en détail à la section 2.10. Pour confirmer la spécificité du MO *chd2*, un MO contrôle avec 5 bases différentes a aussi été utilisé : 5' GATGAGACTCG-CGTTTTTGTCTAGC 3' (Gene Tools, OR). Par la suite, des expériences visant à sauver le phénotype ont été réalisées. Pour toutes ces expériences, un petit transcrit humain du gène *CHD2* possédant 12 exons a été utilisé (NM\_001271). Les petits transcrits humains du gène sauvage et du gène mutant *CHD2* (P418L) ont été sous-clonés dans le vecteur pCS2+, tel que décrit à la section 2.8. Ensuite, des ARN messagers sains et mutants, comportant une coiffe, ont été synthétisés avec le kit « Sp6 promoter and the mMessage mMachine » (Thermofisher). 2 nL d'un mélange d'ARN sain ou mutant à 200 ng/μL avec le MO à 600 μM a été injecté dans les embryons unicellulaires. Après, les poissons injectés et non-injectés ont été placés dans un incubateur maintenu à une température de 28,5°C, pour 48 heures. Par la suite, ils ont été observés, classés en différents groupes et comptés à l'aveugle par deux personnes en utilisant un microscope Olympus SZX12. Les différences morphologiques ont été observées et notées entre les différents groupes.

## 2.10 Validation de l'effet du MO

L'ARN total a été isolé avec du TRIzol (Invitrogen) selon le protocole du manufacturier, à partir d'embryons de poissons zèbres de 2 jours post-fertilisation (dpf). L'ARN a ensuite été quantifié avec un appareil eppendorf Biophotometer plus, puis l'ADN complémentaire (cDNA) a été synthétisé avec les hexamères aléatoires et le kit « SuperScript III reverse transcriptase » (Invitrogen). Une réaction de PCR a ensuite été réalisée afin d'amplifier la région du gène *chd2* modifiée par le MO; soit les exons 1, 2 et 3. Les réactions de PCR ont été produites avec 1 μL de dNTP (2,5 μM), 0,4 μL de chacune des amorces F : AAGACGAAGGCTC-GACTCAA, R : TGCAGGCTCTTGTCTACTGC (10 μM), 1,5 μL de tampon à PCR 10X avec MgCl<sub>2</sub> (15mM), 0,9 μL de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0,06 μL de polymérase Taq (Qiagen), 2 μL de cDNA et de l'eau pour compléter jusqu'à un volume final de 15 μL. Le programme de PCR utilisé est le suivant : une étape de 5 minutes à 94 °C, 45 cycles composés de 30 secondes à 95 °C, 30 secondes à 56 °C et de 30 secondes à 72 °C, puis finalement de 7

minutes à 72 °C. Les échantillons ont finalement été migrés par électrophorèse sur gel d'agarose, tel que décrit dans la section 2.4, puis séquencés au centre d'innovation Génome Québec dans un séquenceur automatique 3730 xl DNA Analyzer (ABI3730; Applied Biosystems).

## **2.11 Préparation et micro-injection des solutions d'ARN guide et de Cas9**

L'ARN guide a été conçu avec le logiciel CRISPRscan (<http://www.crisprscan.org/>) pour s'apparier spécifiquement à une région du gène d'intérêt *chd2* des poissons zèbres. La séquence de l'ARN guide *chd2* qui a été utilisée est la suivante : GgGTCCCCGTTTTCTCAA (TGG), où la lettre minuscule représente une base différente qui ne s'apparie pas à celle du gène, et où les parenthèses montrent le site PAM. La synthèse de l'ARN guide et de l'ARN de la Cas9 a été réalisée tel que décrit précédemment [92]. Des poissons zèbres sauvages TL ont reçu une injection au stade unicellulaire, de 1nL d'un mélange de 100 ng/μL de la Cas9 et de 30 ng/μL de l'ARN guide. Les injections ont été faites en utilisant un appareil d'injection à pression Picospritzer III. Par la suite l'ADN génomique a été extrait de ces embryons pour vérifier leur génotype, en utilisant le kit « Extracta DNA prep » (Quanta Bio) et en suivant le protocole du manufacturier. Un volume de 25 μL de solution d'extraction et de solution de stabilisation a été utilisé.

## **2.12 Génotypage des poissons zèbres adultes et extraction d'ADN génomique**

Les poissons zèbres adultes ont été anesthésiés dans une solution de tricaine méthane-sulfonate (MS222) ayant une concentration finale de 120 mg/L. Pendant ce temps, un très petit morceau de nageoire a été coupé avec une fine lame de rasoir, puis tout de suite après, les poissons ont été remis à l'eau. L'extraction de l'ADN génomique a été réalisée dans un

volume de 20  $\mu\text{L}$  de NaOH (50 mM). Les échantillons ont été bouillis à 100 °C pendant 10 minutes et 1/10 du volume, soit environ 2  $\mu\text{L}$  d'une solution de tris hydroxyde de chlorure pH 8 a été ajouté pour tamponner la solution, tel que décrit précédemment [93]. La réaction de PCR a été réalisée avec 1  $\mu\text{L}$  de dNTP (2,5  $\mu\text{M}$ ), 0,4  $\mu\text{L}$  de chacune des amorces *chd2* F : GATTGGCTGATTGGACAGGT, R : ACCAGCCTTCCACTTGATG (10  $\mu\text{M}$ ), 1,5  $\mu\text{L}$  de tampon à PCR 10X avec  $\text{MgCl}_2$  (15 mM), 0,9  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25mM), 0,06  $\mu\text{L}$  de polymérase Taq (Qiagen), 1  $\mu\text{L}$  d'ADN génomique et de l'eau pour compléter jusqu'à un volume final de 15  $\mu\text{L}$ . Le programme de PCR utilisé est le suivant : une étape de 5 minutes à 94 °C, 45 cycles composés de 30 secondes à 95 °C, 30 secondes à 56 °C et de 30 secondes à 72 °C puis finalement de 7 minutes à 72 °C. Les échantillons ont été migrés par électrophorèse sur gel d'agarose, tel que décrit dans la section 2.4, puis séquencés au centre d'innovation Génome Québec dans un séquenceur automatique 3730 xl DNA Analyzer (ABI3730; Applied Biosystems).

## **2.13 Technique d'analyse des courbes de fusion à haute résolution (HRM)**

Des amorces ont été conçues à l'aide du logiciel Primers3 pour amplifier une région du gène d'intérêt *chd2*. Les réactions de PCR ont été réalisées avec 5  $\mu\text{L}$  du Precision Melt Supermix for HRM analysis (Bio-Rad #172-5 112), 0,5  $\mu\text{L}$  de chacune des amorces F: ACAGCTACTGGAGCTTCCACA et R : TCTTTCTCCGGGTCAAAGTC (10  $\mu\text{M}$ ), 2  $\mu\text{L}$  d'ADN génomique et de l'eau pour compléter jusqu'à 10  $\mu\text{L}$ . Les réactions ont été produites dans des plaques de 96 puits avec un appareil Light Cycler 480 Instrument II (Roche). Le protocole utilisé est le suivant : une étape de 2 minutes à 95 °C, suivie de 45 cycles composés de 10 secondes à 95 °C, 30 secondes à 60 °C, puis de 30 secondes à 95 °C et de 60 secondes à 60 °C où la température augmente de 0,02 °C/seconde jusqu'à 95 °C pendant 10 seconde, avant de refroidir à 40 °C. Les courbes résultantes ont été analysées avec le logiciel Roche LightCycler 480, version 1.5.1.62.

## 2.14 Statistiques

Les valeurs présentées à la figure 3.5.1 représentent les moyennes des résultats obtenus lors des expériences  $\pm$  l'erreur standard de la moyenne (SEM). Les comparaisons statistiques ont été réalisées à l'aide d'un test d'analyse de la variance (ANOVA) avec le logiciel Graphpad Prism7.

## Chapitre 3 : Résultats

### 3.1 Séquençage du gène *CHD2* dans une cohorte de patients avec épilepsie photosensible

Étant donné les récentes découvertes sur le gène *CHD2* et le fait qu'il ait été associé au caractère photosensible par le groupe de Galizia, nous avons décidé d'étudier plus en détail le rôle et l'implication de ce gène dans l'épilepsie photosensible. Notre laboratoire ayant accès à l'ADN de nombreux patients épileptiques, nous avons entrepris le séquençage de l'ensemble des régions codantes du gène *CHD2*, dans une cohorte de 95 patients épileptiques photosensibles, à la recherche de variations génétiques. Suite à l'analyse des données de séquençage, ce premier objectif a mené à la découverte d'une variation génétique intéressante. Tel qu'exposé au tableau I, cette mutation située sur le chromosome 15 à la position 93 486 239 de l'ADN génomique, est de type silencieuse, c'est-à-dire qu'une base nucléique est altérée mais que l'acide aminé traduit est le même. Comme ce changement d'une alanine pour une guanine crée un nouveau site accepteur potentiel d'épissage, nous avons décidé d'investiguer davantage cette mutation.

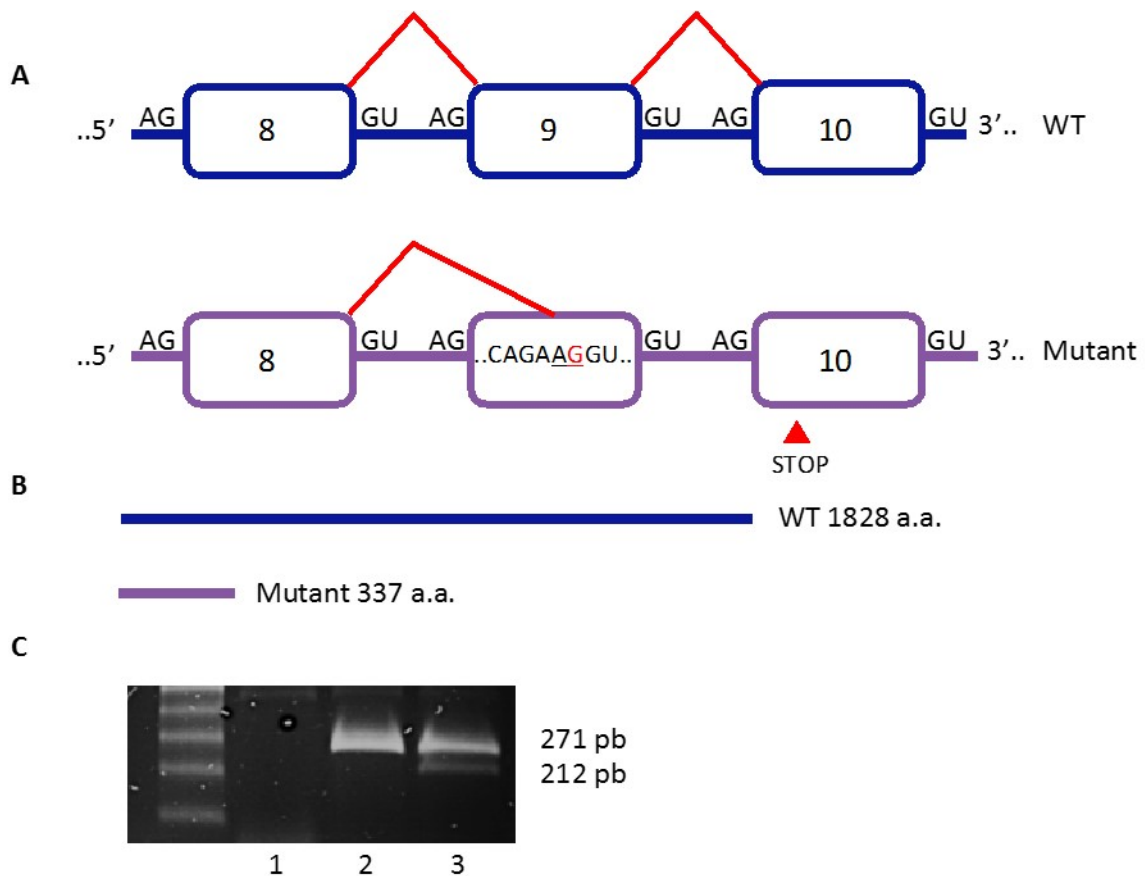
**Tableau I. Variation génétique dans le gène *CHD2* trouvée chez un patient épileptique photosensible de notre cohorte.**

<sup>1</sup> Position UCSC Hg 37	Type de mutation	Changement d'acide aminé	Sexe	Type d'épilepsie	Type de crises	Autres caractéristiques
93 486 239	Silencieuse A/G	-	M	Généralisée EMJ	AE, CM, CGTC	Réfractaire

**Légende :** <sup>1</sup>La position génomique se trouve sur le chromosome 15. EMJ : Épilepsie myoclonique juvénile, AE : Absence épileptique, CM : Crise myoclonique, CGTC : Crise généralisée tonico-clonique.



Pour ce faire, nous avons utilisé la technique de Minigène avec laquelle nous avons pu comparer l'épissage *in vitro* entre les séquences saines et mutantes de l'exon 9 du gène *CHD2*. Nous avons donc cloné les séquences d'ADN génomique de l'exon 9 dans des vecteurs Exontrap, puis transfecté les plasmides résultant dans des cellules HEK293T. L'ARN extrait des cellules a ensuite permis de révéler que l'épissage est altéré dans la version mutante du gène. En effet, la figure 3.1.1C, montre clairement la présence de 2 bandes de 212 et de 271 paires de bases dans la colonne 3, représentant les deux fragments générés suite à l'épissage de la copie mutante du gène. En comparaison, une seule bande de 271 paires de bases est présente dans la colonne 2, correspondant à la séquence saine du gène. La colonne 1 est un contrôle négatif qui représente le vecteur mini-gène vide, donc aucune séquence n'y a été clonée.



**Figure 3.1.1** Analyse *in vitro* de l'impact d'une mutation silencieuse dans le gène *CHD2* par la technique de mini-gène.

**A-B)** Représentation schématisée montrant l'épissage entre les exons 8, 9 et 10 du gène *CHD2* sauvage et l'épissage alternatif de ces exons dans la version mutante du gène, engendré par une mutation qui crée un nouveau site accepteur dans l'exon 9 et qui mène à un codon d'arrêt prématuré. La protéine mutante résultante serait composée de 337 acides aminés (a.a.) en comparaison avec la protéine saine de 1828 acides aminés. **C)** Électrophorèse sur gel d'agarose montrant l'expression des vecteurs mini-gène transfectés dans les cellules HEK293T. L'exon 9 a été amplifié par PCR avec l'ADN complémentaire obtenu à partir de l'ARN, extrait des cellules HEK293T. La colonne 1 montre le vecteur vide contrôle négatif du mini-gène, la colonne 2 montre le transcrit sain de l'exon 9 de *CHD2* et la colonne 3 montre la présence d'un transcrit alternatif d'épissage causé par la mutation dans l'exon 9 du gène *CHD2* en plus du transcrit sain.

De façon schématique, il est possible d'observer à la figure 3.1.1A-B l'épissage de la copie saine du gène en comparaison avec l'épissage alternatif de la copie mutante où le site accepteur AG, créé par la mutation, est utilisé. Par conséquent, le cadre de lecture est modifié ce qui mène à la création d'un codon d'arrêt et à la terminaison prématurée de la protéine. Ainsi, les protéines mutantes traduites ne contiendraient que 337 acides aminés en comparaison avec les protéines saines qui en contiennent 1828. Cela représente une perte de 81,5% du contenu de la protéine *CHD2*.

Ces résultats suggèrent que la variation génétique découverte dans le gène *CHD2* engendre l'utilisation à la fois du site accepteur classique d'épissage, et du site créé par la mutation. Les protéines saines et mutantes seraient donc traduites toutes les deux en proportion inconnue.

### **3.2 Recherche de variations génétiques dans le gène *CHD2*, chez les patients épileptiques**

Comme nous n'avons trouvé qu'une nouvelle mutation dans la cohorte de patients photosensibles, nous avons décidé d'étendre nos recherches et de vérifier si nous pouvions retrouver d'autres variations génétiques dans le gène *CHD2*, à travers tous les patients épileptiques de notre laboratoire. Nous avons donc analysé toutes les données de séquençage obtenues par la capture de l'exome ou du génome entier, à la recherche de variations

généétiques potentiellement dommageables dans ce gène d'intérêt. Le tableau II expose les différentes variations trouvées suite à ces analyses, de même que les caractéristiques cliniques des patients porteurs de ces mutations.

**Tableau II. Caractéristiques cliniques et génétiques des patients de notre cohorte, porteurs d'une mutation dans le gène *CHD2*.**

<sup>1</sup> Position UCSC Hg 37	Type de mutation	Sexe	Type d'épilepsie	Âge au début des crises	Type de crises	EEG	Autres caractéristiques
93 448 173	Faux-sens G/C	F	Généralisée	11	CM, CF, CGTC, ME	-	Présence d'auras
93 448 201	Faux-sens A/G	F	Généralisée SJ	10	CM, CGTC	CPO	-
93 482 864	Faux-sens A/G	M	Généralisée	6	CM, PC, CDE	-	-
93 482 864	Faux-sens A/G	F	Partielle	2	CPC	PCD	-
93 482 864	Faux-sens A/G	F	Partielle	14	CPC, CPSG	PB	Réfractaire
93 482 864	Faux-sens A/G	M	Généralisée EAE	7	AE GCTC	POG	-
93 482 864	Faux-sens A/G	M	Généralisée EMJ	16	CGTC CM	POG	-
93 482 864	Faux-sens A/G	M	Partielle	6	CPC CPT	-	Réfractaire

93 482 864	Faux-sens A/G	F	Généralisée	8	AE CGTC	PBL	Réfractaire
93 489 283	Faux-sens C/T	F	Partielle EFNAD	3	CPF CPSG	AFD	-
93 528 728	Faux-sens A/G	M	Partielle	12	CPS, CPC	AT	Réfractaire
93 567 811	Faux-sens G/A	F	Généralisée EMJ	17	CGTC CM	POG	-

**Légende :** <sup>1</sup>Toutes les positions génomiques mentionnées se trouvent sur le chromosome 15. AE : Absence épileptique, AFD : Activité dans l'aire frontale droite, AT : Activité thêta, EAE : Épilepsie absence de l'enfant, EMJ : Épilepsie myoclonique juvénile, CDE : Crise déclenchée par l'effort, CF : Convulsions fébriles, CGTC : Crise généralisée tonico-clonique, CM : Crise myoclonique, CPC : Crise partielle complexe, CPF : Crise partielle frontale, CPT : Crise partielle temporale, CPO : Complexe de pointes-ondes, CPS : Crise partielle simple, CPSG : Crise partielle secondairement généralisée, EFNAD : Épilepsie frontale nocturne autosomique dominante, ME : Myoclonie d'endormissement, PBL : Pointe bilatérale, PC : Perte de conscience, PCD : Pointe centrale droite, POG : Pointes-ondes généralisées, SJ : Syndrome de Jeavons.

En ce qui concerne le variant 93 448 173, nous avons accès à l'ADN des autres membres de la famille. Nous avons donc séquencé ces individus et confirmé la ségrégation du variant avec le phénotype. Nous avons aussi testé la ségrégation du variant 93 489 283, toutefois aucun autre atteint ne s'est révélé être porteur de cette variation génétique dans la famille. Il est également possible d'observer que la mutation 93 482 864 se retrouve chez 7 patients atteints de différentes formes d'épilepsie. Bien que nous retrouvions un nombre important de variations génétiques dans le gène *CHD2*, nous ne pouvons associer ce gène à un type précis d'épilepsie. Toutefois, ces résultats suggèrent l'implication de *CHD2* dans l'étiologie des épilepsies génétiques.

Afin d'appuyer nos résultats, nous avons décidé de vérifier si nous retrouvions également des variations génétiques dans le gène *CHD2* à travers toutes les données de séquençage de patients épileptiques auxquelles nous avons accès grâce à des collaborateurs, dans le cadre d'un projet Génome Canada. Nous avons donc étudié toutes ces données à la recherche de

mutations possiblement impliquées dans la maladie. Au total, nous avons analysés 1959 patients et les résultats de ces analyses sont présentés dans le tableau III.

**Tableau III. Recension des mutations trouvées dans le gène *CHD2* parmi toutes les données de séquençage de patients épileptiques disponibles.**

Variation génétique UCSC Hg 37	Type de mutation	Changement d'acide aminé	FAM <sup>1</sup> gnomAD (%)	FAM du projet (%)	Score et prédictions <sup>2</sup> SIFT/ <sup>3</sup> Polyphen
93 448 173 G/C	Faux-sens	<sup>4</sup> L12F	2,006 <sup>-3</sup>	2,552 <sup>-4</sup>	Délétère (0)/ Bénin (0)
93 448 201 A/G	Faux-sens	<sup>4</sup> T22A	3,773 <sup>-4</sup>	2,552 <sup>-4</sup>	- Bénin (0,012)
93 467 727 C/T	Faux-sens	P80L	3,224 <sup>-4</sup>	2,552 <sup>-4</sup>	Délétère (0,01)/ P.D (0,713)
93 482 864 A/G	Faux-sens	<sup>5</sup> K204R	6,359 <sup>-3</sup>	4,849 <sup>-3</sup>	Toléré (0,71)/ Bénin (0,003)
93 482 927 G/A	Faux-sens	R224Q	8,962 <sup>-6</sup>	2,552 <sup>-4</sup>	Délétère (0)/ P.D (0,895)
93 485 117 T/C	Faux-sens	V253A	1,794 <sup>-5</sup>	5,105 <sup>-4</sup>	Toléré (0,57)/ Bénin (0,001)
93 486 117 G/A	Faux-sens	D291N	0	2,552 <sup>-4</sup>	Toléré (0,06)/ Bénin (0,097)
93 486 153 G/A	Faux-sens	G303S	0	2,552 <sup>-4</sup>	Toléré (0,22)/ Bénin (0,093)
93 486 239 A/G	Silencieuse	-	-	2,552 <sup>-4</sup>	-

93 489 052	Silencieuse T/A (site épissage)	-	5,719 <sup>-5</sup>	5,105 <sup>-4</sup>	-
93 489 283	Faux-sens C/T	<sup>5</sup> P405L	9,252 <sup>-6</sup>	2,552 <sup>-4</sup>	Toléré (0,07)/ Bénin (0,032)
93 492 257	Non-sens C/T	R485X	-	2,552 <sup>-4</sup>	-
93 510 555	Silencieuse G/A (site épissage)	-	-	2,552 <sup>-4</sup>	-
93 524 052	Faux-sens C/A	P962T	-	2,552 <sup>-4</sup>	Délétère (0,03)/ Bénin (0,316)
93 527 651	Faux-sens A/G	K1053R	0	2,552 <sup>-4</sup>	Toléré (0,57)/ Bénin (0,011)
93 528 728	Faux-sens G/C (site épissage)	A1080P	2,714 <sup>-5</sup>	2,552 <sup>-4</sup>	Toléré (0,34)/ Bénin (0,033)
93 540 632	Faux-sens A/G (site épissage)	K1295R	-	2,552 <sup>-4</sup>	Délétère (0,03)/ Bénin (0,248)
93 543 758	Faux-sens G/A	R1342Q	1,805 <sup>-5</sup>	2,552 <sup>-4</sup>	Délétère (0,04)/ P.D (0,995)
93 543 791	Faux-sens C/T	P1353L	1,702 <sup>-4</sup>	5,105 <sup>-4</sup>	Toléré (0,06)/ P.D (0,981)
93 543 815	Faux-sens T/C	I1361T	-	5,105 <sup>-4</sup>	Toléré (0,59)/ Bénin (0,006)
93 547 874	Faux-sens A/G	S1436G	-	2,552 <sup>-4</sup>	Toléré (0,33)/ Bénin (0,015)
93 552 444	Faux-sens G/A	V1495M	1,791 <sup>-5</sup>	2,552 <sup>-4</sup>	Délétère (0,03)/ P.D (0,599)
93 557 972	Faux-sens G/A	R1580H	-	2,552 <sup>-4</sup>	Délétère (0,03)/ P.D (0,607)
93 557 995	Faux-sens C/T	R1588W	6,267 <sup>-4</sup>	1,787 <sup>-3</sup>	Délétère (0,03)/ Bénin (0,001)

93 563 382	Faux-sens	A1683T	6,267 <sup>-5</sup>	2,552 <sup>-4</sup>	Toléré (0,96)/ Bénin (0,003)
G/A					
93 563 385	Faux-sens	H1684Y	1,074 <sup>-4</sup>	2,552 <sup>-4</sup>	Toléré (0,34)/ Bénin (0,003)
C/T					
93 567 699	Faux-sens	M1751V	-	2,552 <sup>-4</sup>	Toléré (0,49)/ Bénin (0,003)
A/G					
93 567 716	Faux-sens	Q1756H	4,476 <sup>-4</sup>	7,657 <sup>-4</sup>	Toléré (0,33)/ P.D (0,596)
G/C					
93 567 793	Faux-sens	P1782L	2,685 <sup>-5</sup>	2,552 <sup>-4</sup>	Délétère (0,01)/ Bénin (0,018)
C/T					
93 567 811	Faux-sens	R1788H	4,676 <sup>-5</sup>	5,105 <sup>-4</sup>	Délétère (0)/ P.D (0,613)
G/A					
93 567 831	Délétion	SP1795-	2,685 <sup>-5</sup>	2,552 <sup>-4</sup>	-
TCTC/T		1796S			

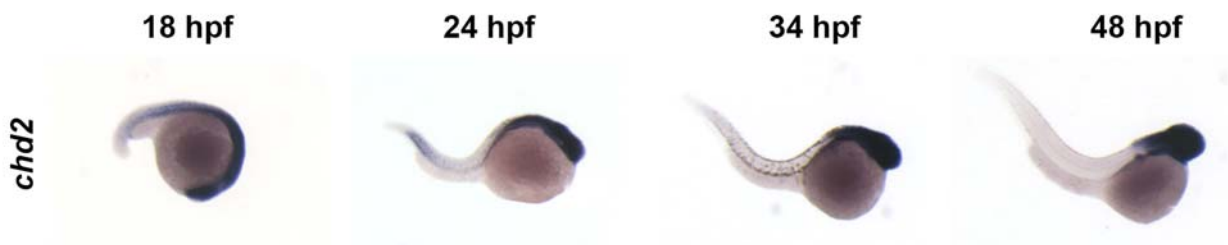
**Légende :** <sup>1</sup> gnomAD (Genome Aggregation Database) est la base de données qui a été utilisée pour déterminer la fréquence allélique mineure (FAM) dans les exomes de la population Européennes non Finlandaise. <sup>2,3</sup> Scores variant entre 0 et 1 calculés par les algorithmes SIFT et Polyphen, utilisés afin de prédire la pathogénicité des variations génétiques. <sup>2</sup> L'algorithme SIFT prédit qu'une variation génétique est délétère avec un score  $\leq 0,05$  et tolérée avec un score  $> 0,05$ . <sup>3</sup> L'algorithme Polyphen prédit qu'une variation génétique est probablement dommageable (P.D) avec un score entre 0,5-1,0 tandis qu'elle est bénigne avec un score entre 0,0-0,5. <sup>4</sup> Variations génétiques retrouvées seulement dans le petit transcrit du gène *CHD2* (NM\_001042572), qui ont été clonées et injectées dans le poisson zèbre. <sup>5</sup> Variations génétiques retrouvées dans le grand et dans le petit transcrit, qui ont aussi été clonées et injectées dans le poisson zèbre. Les autres variations génétiques se trouvent uniquement dans le grand transcrit du gène *CHD2* (NM\_001271).

En somme, 31 variations génétiques dont la fréquence dans gnomAD (Genome Aggregation Database) est inférieure à 1% dans la population Européenne (excluant les Finlandais) y sont décrites. On peut observer que la fréquence allélique mineure est faible pour la grande majorité des variants trouvés, à l'exception de 93 482 864. Ce variant se retrouve chez plusieurs patients, et sa fréquence allélique élevée (4,849<sup>-3</sup>) est comparable à celle de gnomAD (6,359<sup>-3</sup>). Parmi les mutations sélectionnées, nombreuses sont celles qui ont un risque d'être

pathogéniques selon les algorithmes de prédiction SIFT et Polyphen. Ces résultats montrent à nouveau la présence d'une grande quantité de variations génétiques potentiellement dommageables dans le gène *CHD2* des patients épileptiques. Nous n'avons toutefois pas accès aux renseignements cliniques détaillés de ces patients, étant donné le fait que la grande majorité des données de séquençage proviennent de collaborations avec d'autres laboratoires. Par conséquent, nous ne pouvons pas analyser si les variations génétiques trouvées dans le gène *CHD2* se trouvent majoritairement dans un type précis d'épilepsie.

### 3.3 Expression *in situ* du gène *chd2* chez le poisson zèbre

Afin de vérifier si ce modèle animal était approprié pour la suite des expériences, nous avons entrepris une hybridation *in situ* du gène *chd2* dans le poisson zèbre. En plus d'être très peu coûteux par rapport aux traditionnels rongeurs, les poissons zèbres possèdent un gène homologue pour près de 85 % des gènes humains impliqués en épilepsie, dont *CHD2* [71]. La technique utilisée nous a donc permis d'observer à différents stades du développement, l'expression du gène d'intérêt *CHD2* dans des embryons de poissons zèbres, grâce à une sonde d'ARN marquée à la DIG. Les résultats obtenus sont exposés à la figure 3.3.1



**Figure 3.3.1** Observation de l'expression du gène *chd2* par une hybridation *in situ* à différents stades du développement chez le poisson zèbre. Des embryons de poissons zèbres 18, 24, 34 et 48 heures suivant la fertilisation, hybridés à une sonde d'ARN *chd2* marquée à la DIG, tel que décrit à la section 2.9.

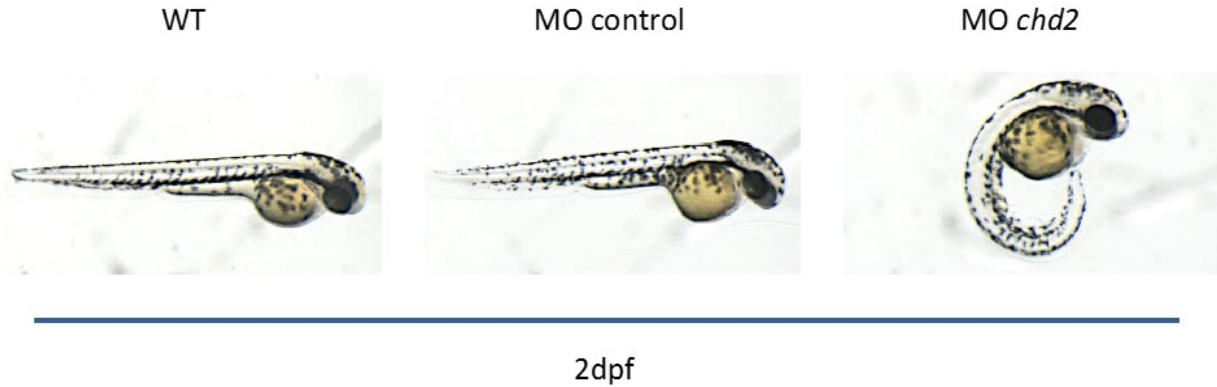


On peut remarquer que le gène *chd2* est bien exprimé dans les embryons aux différents stades de développement soit 18, 24, 34 et 48 heures suivant la fertilisation. De plus, l'expression du gène semble se concentrer progressivement au cerveau de l'animal, pour n'être exprimé qu'à cet endroit après 48 heures.

Ces résultats suggèrent que le poisson zèbre est un modèle d'étude approprié pour caractériser les variations génétiques trouvées dans le gène *CHD2*, puisqu'il exprime le gène d'intérêt au cerveau. Ainsi, les expériences de validation fonctionnelle s'effectueront dans ce modèle animal.

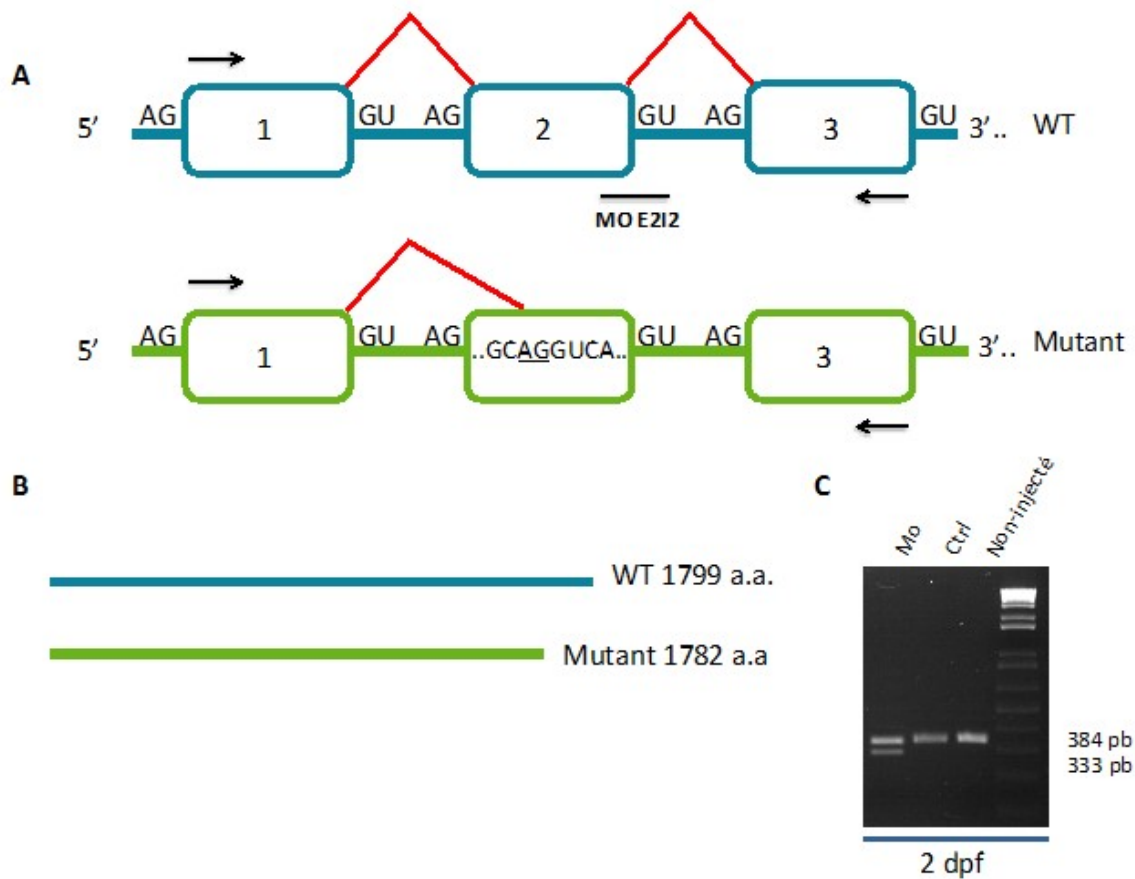
### **3.4 Diminution d'expression du gène *chd2* chez le poisson zèbre**

Comme la majorité des variations génétiques trouvées dans nos cohortes de patients épileptiques sont des modifications d'une base engendrant le changement d'un acide aminé, nous avons tout d'abord voulu tester l'effet d'une diminution partielle de l'expression du gène *chd2*, dans le poisson zèbre. Sachant qu'un groupe de chercheurs a récemment montré un phénotype particulier en abaissant l'expression du gène d'intérêt chez ce modèle, nous avons tenté de reproduire l'expérience [65]. Pour ce faire, nous avons injecté une dizaine de fois, entre 50 et 100 embryons de poissons zèbres au stade unicellulaire, avec un oligonucléotide MO interférant avec l'épissage de l'ARN pré-messager du gène *chd2*. Nous avons aussi injecté des embryons dans les mêmes conditions avec un oligonucléotide MO contrôle. Le phénotype morphologique observé 2 jours suivant la fertilisation est le même que celui observé par l'autre groupe [65]. Tel qu'illustré à la figure 3.4.1, le poisson injecté avec le MO *chd2* présente une forme courbée, en comparaison avec les poissons sauvages et injectés avec le MO contrôle. En plus de sa forme courbée, le poisson injecté avec le MO *chd2* présente des difficultés à nager et une durée de vie très courte. Ces troubles de développement surviennent tôt chez le poisson car ils sont perceptibles dès le premier jour.



**Figure 3.4.1** Phénotype morphologique observé suite à la diminution de l'expression du gène *chd2* dans le poisson zèbre par l'injection d'un MO. Embryons de poissons zèbres 2 jours suivant la fertilisation. À gauche, un embryon sauvage contrôlé non injecté. Au centre un embryon injecté avec 10 ng du MO contrôle et à droite un embryon injecté avec 10 ng du MO (E2I2) *chd2*. Une dizaine d'injections a été effectuée avec environ 50-100 embryons par essai.

L'injection du MO contrôle a permis de s'assurer que le phénotype observé est bel et bien dû à la diminution d'expression du gène d'intérêt et non à l'injection en soi dans le poisson. Par la suite, nous avons voulu vérifier l'efficacité du MO *chd2*, en analysant son effet sur l'épissage de l'ARN. Nous avons donc extrait l'ARN des poissons zèbres non-injectés et des poissons zèbres injectés avec un MO *chd2* ou contrôle. Tel que démontré à la figure 3.4.2C, l'épissage est altéré dans le groupe de poissons injectés avec le MO *chd2*. En effet, la présence de 2 bandes indique que deux transcrits d'ARN messagers sont générés dans des proportions inconnues, suite à l'épissage du pré-ARN. En comparaison, on ne retrouve qu'une bande chez les poissons contrôles et les poissons non-injectés, signifiant la présence d'un seul transcrit.



**Figure 3.4.2 Effet de l'injection d'un MO dans le poisson zèbre sur l'épissage du gène *chd2*.** **A)** Représentation schématisée exposant l'épissage du gène *chd2* chez le poisson zèbre sain et l'épissage alternatif chez le poisson zèbre injecté avec le MO (E2I2) dû à l'utilisation d'un site accepteur cryptique. Le site de liaison du MO ainsi que les amorces utilisées pour valider l'efficacité du MO sont indiqués sur la figure. **B)** De façon schématique, la protéine mutante Chd2 serait composée de 1782 acides aminés en comparaison avec la protéine saine qui en compte 1799. **C)** Électrophorèse sur gel d'agarose montrant l'expression du gène *chd2* (exons 1, 2 et 3) dans des poissons zèbres contrôles non-injectés et dans des poissons zèbres injectés avec 10 ng du MO *chd2* ou avec 10 ng du MO contrôle, 2 jours suivant la fertilisation.

Nous avons par la suite séquencé la bande de 333 paires de bases présente chez les poissons injectés avec le MO *chd2*, afin de connaître exactement l'effet du MO sur l'épissage. Comme le montre de façon schématique la figure 3.4.2A-B, un site accepteur cryptique est utilisé, ce qui occasionne la perte du début de l'exon 2. Toutefois, le cadre de lecture n'étant pas

modifié, la perte globale chez la protéine mutante ne serait que de 17 acides aminés par rapport à la protéine sauvage.

Ces résultats suggèrent que le phénotype courbé observé chez les poissons zèbres injectés avec le MO *chd2*, est bien causé par une diminution partielle de l'expression du gène d'intérêt. En effet, la présence des 2 bandes montre l'utilisation des deux sites accepteurs d'épissage; le site conventionnel et le site cryptique.

### **3.5 Expériences de sauvetage du phénotype**

Suite à la caractérisation morphologique du phénotype obtenu lors d'une diminution d'expression du gène *chd2* par l'injection d'un MO, nous avons décidé de tenter le sauvetage du phénotype avec une copie saine puis avec une copie mutante du gène d'intérêt humain.

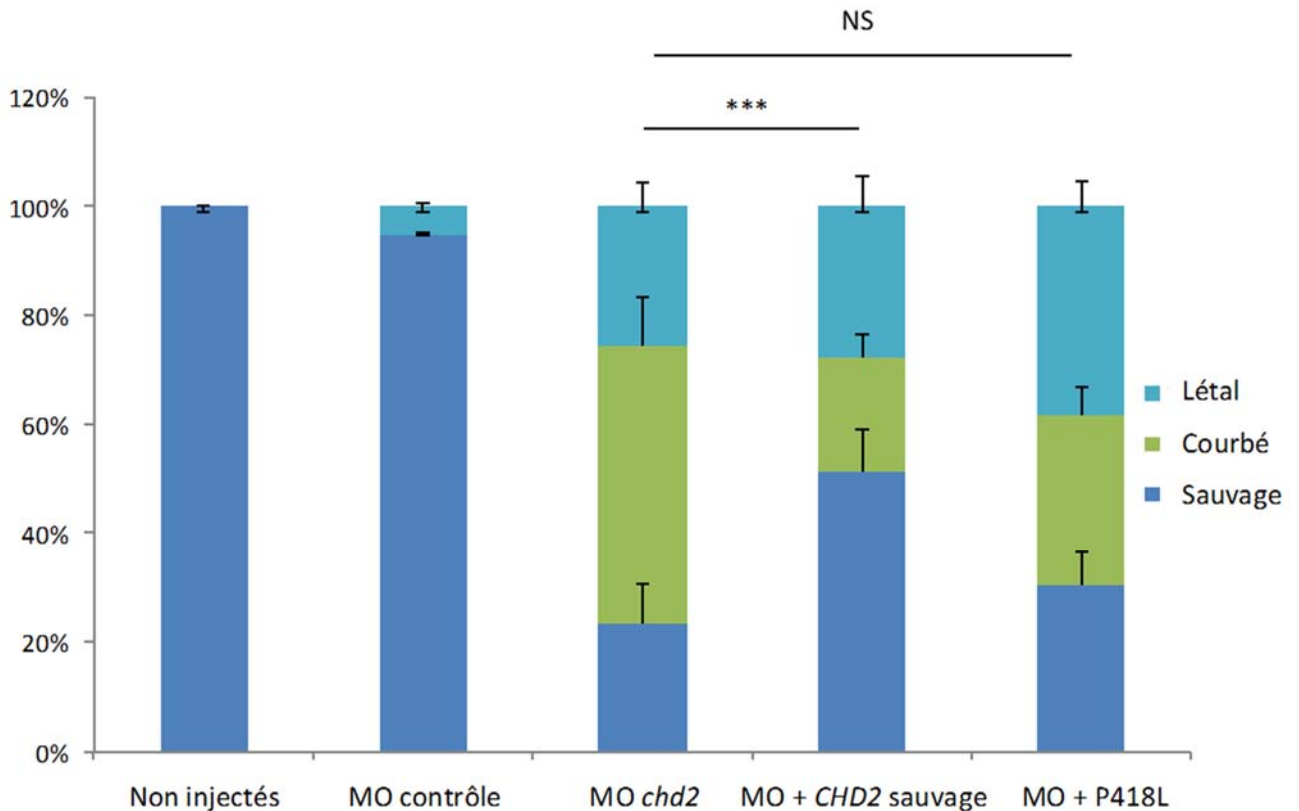
Pour débiter, nous avons entrepris d'amplifier et de cloner le gène sauvage humain *CHD2*. Par contre, comme c'est un très grand gène composé de 39 exons, et qu'il s'avère être très difficile à manipuler, nous avons opté pour un transcrit alternatif du gène, composé de 12 exons. De plus, deux des premières variations génétiques trouvées dans des patients épileptiques sont présentes uniquement dans cette version du gène (tableau II : 93 448 173 et 93 448 201). Par conséquent, nous avons décidé d'amplifier et de cloner la version saine du gène *CHD2* humain de 12 exons, dans le vecteur d'expression PCS2+, compatible avec le poisson zèbre. Par la suite, nous avons choisi les 4 mutations présentées au tableau II, qui se trouvent dans le transcrit court du gène d'intérêt, soit ; 93 448 173, 93 448 201, 93 482 864 et 93 489 283. Toutes les autres variations génétiques trouvées dans notre cohorte se retrouvent seulement dans le grand transcrit du gène *CHD2*. Les différentes versions du gène comprenant les 4 mutations sélectionnées ont donc été obtenues par mutagenèse, à partir de la version sauvage. Des ARN complémentaires pourvus d'une coiffe ont finalement été synthétisés afin d'être injectés dans des embryons de poissons zèbres au stade unicellulaire, de la même manière que le MO.

Nous avons donc procédé, en injectant soit le MO *chd2*, soit le MO *chd2* avec la version saine du gène humain dans la même injection, ou encore le MO *chd2* avec une version mutante du gène humain dans la même injection. Un MO contrôle a aussi été injecté encore une fois, afin de s'assurer que les résultats obtenus ne sont pas causés par l'injection en soi mais bien par la manipulation génétique. Chacune des 4 variations génétiques a été injectée, puis selon nos résultats préliminaires, nous avons concentré nos recherches sur la plus pathogénique (n=4). Pour chacune des injections, les poissons ont été observés, comptés puis classés selon leur phénotype par deux personnes différentes, à l'aveugle.

Les moyennes des phénotypes observés lors des différentes injections sont présentées à la figure 3.5.1. Il est possible de remarquer que lorsque l'on diminue l'expression du gène *chd2* du poisson avec le MO, mais que l'on lui fournit une copie saine du gène humain, le phénotype est significativement sauvé. En effet, les poissons présentant un phénotype courbé sont moins nombreux lorsqu'ils reçoivent la copie saine du gène humain avec le MO que lorsqu'ils reçoivent uniquement le MO. Dans un même ordre d'idées, le nombre de poissons sains est supérieur lorsqu'une copie du gène humain sauvage est injectée avec le MO, que lorsque l'injection ne contient que le MO.

De manière différente, le phénotype n'est pas sauvé de façon significative lorsque l'on diminue l'expression du gène *chd2* du poisson avec un MO mais que l'on lui fournit une copie mutante du gène humain (P418L). En comparant les poissons injectés avec le MO et ceux injectés avec le MO et la copie mutante (P418L) du gène, on peut observer que le pourcentage de poissons sains est sensiblement le même dans les deux groupes tandis que les poissons courbés sont diminués de façon non-significative dans le groupe ayant reçu la copie mutante du gène.

Les poissons morts sont nombreux dans tous les groupes ayant reçu une injection comprenant au moins le MO *chd2*. Un MO contrôle a été injecté encore une fois afin de montrer que les résultats obtenus ne sont pas dus à l'injection en soi. Finalement, des poissons non-injectés servent de contrôle négatif.



**Figure 3.5.1** Phénotypes observés chez le poisson zèbre lors des différentes expériences d’injection d’un MO contrôle, d’un MO *chd2*, d’un MO *chd2* avec une copie saine du gène humain et d’un MO *chd2* avec une copie mutante du gène humain *CHD2*. Les embryons de poissons zèbres ont reçu une dose fixe de 10 ng chacun de MO au stade unicellulaire. Pour les expériences avec le gène sain ou mutant *CHD2* (P418L), 2 nL d’un mélange de 200 ng/μL d’ARN avec le MO à 600 μM a été injecté. Les phénotypes de poissons zèbres létaux, courbés et sains ont été observés 2 jours suivant la fertilisation. Les pourcentages présentés correspondent aux moyennes des expériences effectuées en quadruple, comptant entre 50 et 150 embryons par expérience. L’erreur standard de la moyenne (SEM) a été ajoutée. Les astérisques indiquent une différence significative entre les phénotypes courbés des 2 groupes :  $p < 0.001$  (\*\*\*). NS : différence non statistiquement différente entre les phénotypes courbés des 2 groupes. La mutation P418L correspond à la P405L dans le grand transcrit, présentée dans le tableau III.

Ces résultats démontrent que le phénotype courbé des poissons zèbres, causé par une diminution d’expression du gène *chd2*, peut-être renversé en fournissant aux poissons une copie saine du gène humain. Pour sa part, la caractérisation dans le poisson zèbre des variations génétiques trouvées chez des patients épileptiques, suggère qu’une des mutations

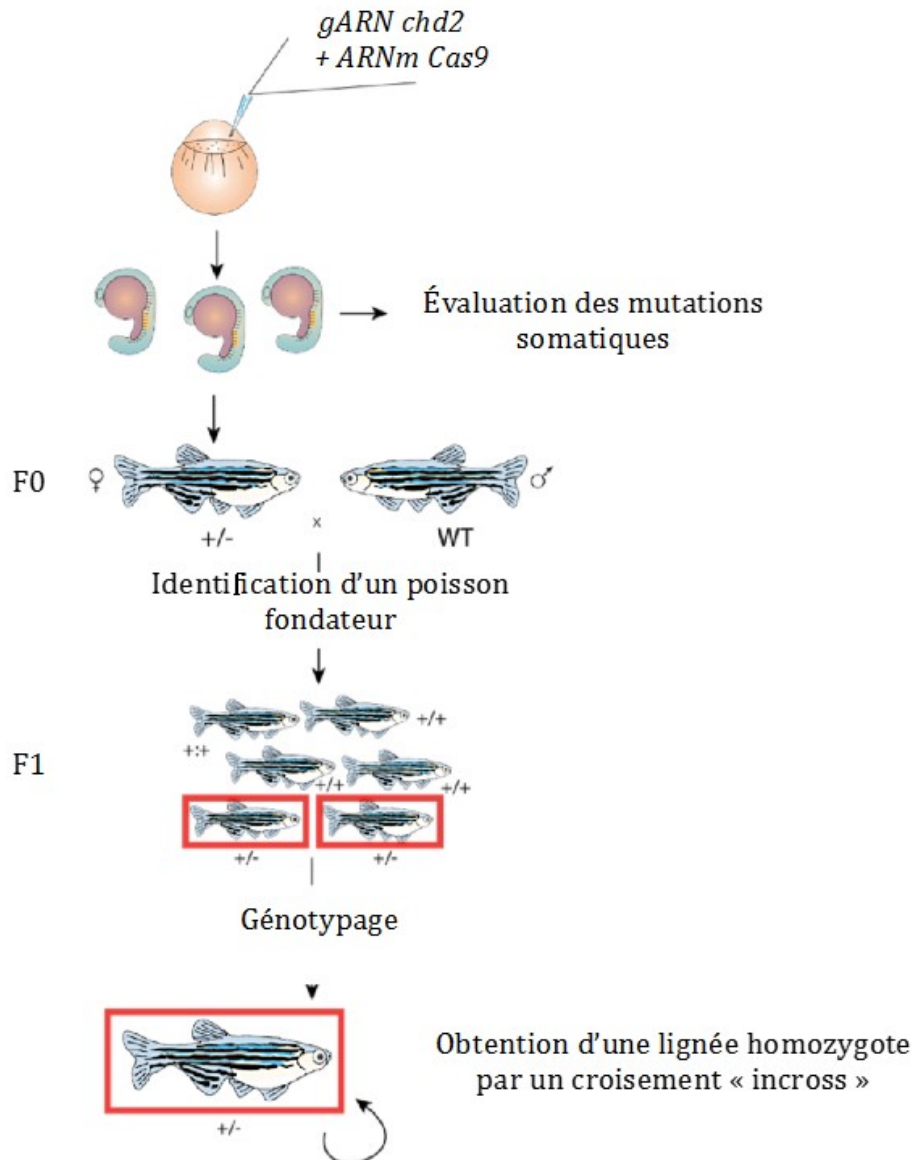
(P418L) puisse avoir un effet dommageable. On ne peut effectivement pas sauver le phénotype de façon significative avec cette version mutante du gène *CHD2*.

### **3.6 Inactivation du gène *chd2*, par la méthode CRISPR-Cas9**

Notre dernier objectif était de créer une lignée stable de poissons zèbres n'exprimant pas *chd2*, afin de pouvoir mieux caractériser le rôle de ce gène. Comme la technique précédente du MO ne diminue que partiellement l'expression du gène d'intérêt et que son effet est transitoire, nous avons voulu étudier l'impact d'une inactivation totale chez le poisson zèbre. De plus, étant donné que plusieurs cas d'encéphalopathies épileptiques *CHD2* répertoriés sont causés par des mutations *de novo* menant à un codon d'arrêt prématuré ou par des délétions, notre lignée de poissons serait un excellent modèle pour étudier plus en détail la maladie [51], [94],[95].

Nous avons donc entrepris, en premier lieu, l'analyse de la protéine et de ses domaines fonctionnels avant de synthétiser une sonde artificielle. Afin de s'assurer d'inactiver complètement *chd2*, nous avons conçu un ARN guide qui s'hybride avec l'ADN complémentaire du gène dans l'exon 8, soit tout juste avant les domaines fonctionnels. De cette façon, lorsque la Cas9 reconnaîtra son site PAM, elle coupera l'ADN sur les deux brins dans l'exon 8, et les mutations délétères introduites par la cellule lors de la réparation du matériel génétique se trouveront avant tous les domaines fonctionnels. Pour que cela soit possible, nous avons dû fournir aux poissons zèbres, l'ARN guide en question ainsi que l'ARN permettant la synthèse de l'endonucléase Cas9. Tel qu'indiqué à la figure 3.6.1, nous avons injecté une solution contenant ces 2 composantes dans la première cellule des embryons de poissons zèbres. Ensuite, afin de vérifier l'efficacité de notre ARN guide, nous avons utilisé la méthode de HRM pour détecter la présence de mutations dans l'ADN génomique des poissons. Cette technique, qui a l'avantage d'être rapide et peu coûteuse, utilise la fluorescence afin d'observer la dénaturation des 2 brins d'ADN en fonction de la température. Comme la cinétique de dénaturation de l'ADN change avec sa composition en bases

nucléiques, cette méthode permet de détecter des mutations dans un échantillon d'ADN en comparant les différents profils de dénaturation [96]. Par la suite, comme différentes mutations peuvent avoir été introduites parmi les poissons injectés, nous avons aussi séquencé les échantillons d'ADN génomique de ces poissons afin de connaître exactement la nature des mutations introduites et de nous assurer que l'ARN guide était en mesure de générer au moins une mutation délétère.



**Figure 3.6.1** Étapes menant à la création d'une lignée homozygote de poissons zèbres n'exprimant pas le gène *chd2*, par la méthode CRISPR.



Sachant que notre ARN guide peut inactiver le gène *chd2*, nous avons injecté à nouveau le mélange d'ARN afin d'établir la lignée F0, que nous avons laissé grandir. Quelques mois plus tard, nous avons génotypé ces poissons en extrayant l'ADN génomique d'un minuscule morceau de nageoire, puis en procédant à nouveau à la méthode HRM, ainsi qu'au séquençage de la région ciblée par l'ARN guide. De cette façon, nous avons sélectionné tous les poissons porteurs d'une délétion de 2 bases qui mène à un arrêt prématuré de la traduction, tout près du site PAM dans l'exon 8. Le moment venu, nous avons croisé ces poissons ayant atteint l'âge adulte, avec des poissons sains à longues queues (TL) afin d'identifier au moins un poisson fondateur, c'est-à-dire un poisson qui transmet la mutation délétère à sa descendance à travers ses gamètes. Les œufs issus de ce croisement, dont 50% sont sains (WT) et 50% sont hétérozygotes (HT), représentent donc la lignée F1, tel qu'illustré à la figure 3.6.1. Quatre mois plus tard, ces poissons d'âges adultes ont été génotypés à leurs tours afin de sélectionner les HT porteurs de la mutation sur un allèle, et de les croiser entre eux. Finalement, parmi les œufs pondus par ces poissons, se trouve la descendance homozygote (HM) dans une proportion d'environ 25%, avec des poissons HT (50%) et des poissons sains (25%).

Après approximativement un an de travail, nous avons donc établi la lignée HM de poissons zèbres n'exprimant pas le gène *chd2*. Suite à l'observation des différentes composantes du poisson HM, nous n'avons observé aucun phénotype morphologique. Toutefois, il est important de mentionner que dû au temps consacré à établir la lignée HM, aucun test comportemental, ni neurologique n'a pu être effectué sur ces poissons. Le caractère photosensible n'a pas pu être étudié non plus, tel que prévu.

## Chapitre 4 : Discussion et perspectives

### 4.1 Le gène *CHD2* et la photosensibilité chez les épileptiques

Depuis quelques années seulement, *CHD2* est devenu un gène d'intérêt pour la communauté scientifique. En effet, de nombreux chercheurs ont voulu découvrir son rôle précis et son implication dans diverses maladies. Un lien de causalité a été établi entre le gène *CHD2* et différentes formes d'épilepsies, de même que des troubles du développement, tel que l'autisme [97], [98]. De plus, *CHD2* a récemment été associé à une classe particulière d'encéphalopathie épileptique avec photosensibilité [95]. Un autre groupe a pour sa part démontré l'implication de ce gène dans le caractère photosensible, en identifiant 11 nouvelles variations génétiques dans une cohorte de 580 patients épileptiques avec photosensibilité [60]. À la lumière de ces résultats, nous avons décidé de procéder au séquençage des 39 exons de ce gène d'intérêt, dans notre cohorte de 95 patients épileptiques photosensibles. Nous avons détecté une nouvelle variation génétique de type silencieuse (93 486 239 A/G) chez un patient souffrant d'épilepsie myoclonique juvénile. Nous avons ensuite démontré *in vitro* que cette mutation crée un nouveau site accepteur qui affecte l'épissage de l'ARN pré-messager. En effet, la présence d'une deuxième bande dans la colonne 3 de la figure 3.1.1C, démontre bien que deux transcrits du gène sont générés suite à l'épissage. Lorsque le nouveau site accepteur est utilisé, le cadre de lecture est décalé, et cela engendre l'apparition prématurée d'un codon d'arrêt dans l'exon 10 du gène. Ainsi, selon la stabilité de cet ARN, il peut être dégradé, non fonctionnel ou traduit en protéine mutante de 337 acides aminés. Advenant la traduction de cette version mutante, les protéines résultantes ne possèderaient que 18,5 % du contenu de la version saine, et ne compteraient aucun domaine fonctionnel étant donné l'arrêt prématuré de la traduction. Par conséquent, il est fort probable que ces protéines soient non fonctionnelles ou encore qu'elles soient dégradées. Il est aussi possible que la protéine mutante empêche la protéine saine de remplir ses fonctions, créant ainsi un effet dominant négatif. Dans un même ordre d'idées, la version mutante du transcrit d'ARN non fonctionnel pourrait séquestrer la protéine saine et mener à un effet délétère.

Nos résultats démontrent que la mutation trouvée modifie l'épissage du gène *CHD2 in vitro*, et que deux transcrits sont générés. Cette mutation a donc un effet potentiellement dommageable. Toutefois, afin de confirmer la présence des protéines saines et mutantes *in vitro*, un immunobuvardage de type Western aurait pu être réalisé, mais aucun anticorps n'était disponible. De plus, il aurait été intéressant de valider les résultats obtenus en vérifiant si le même phénomène se produit chez le patient atteint de la mutation. Malheureusement, il nous a été impossible d'avoir accès aux cellules du patients, nous n'avons donc pas pu investiguer davantage cette mutation.

Pour ce premier objectif, comme une seule mutation dans le gène d'intérêt a été détectée parmi les patients épileptiques photosensibles de notre cohorte, nous ne pouvons établir de lien causal direct entre le caractère photosensible et le gène *CHD2*. En comparaison avec le groupe de Galizia, nous avons tout de même décelé une fréquence de variant unique de 0,53% (1/95 patients; 1/190 allèles) dans notre cohorte de patients photosensibles, contre une fréquence de 0,95% (11/580 patients; 11/1160 allèles) [60]. Nous avons également rapporté 2 mutations : 93 448 201, faux-sens (tableau II) et 93 492 257, non-sens (tableau III) dans des patients atteints du syndrome de Jeavons, une épilepsie généralisée avec photosensibilité. Il n'est pas exclu que d'autres patients épileptiques soient atteints de photosensibilité parmi ceux présentés au tableau III, puisque nous n'avons pas accès à l'ensemble des données cliniques détaillées. Par conséquent, notre fréquence de variant unique pourrait être plus élevée chez les patients photosensibles. D'autre part, un groupe a découvert une nouvelle mutation, menant à un arrêt prématuré de la protéine chez un patient photosensible atteint du syndrome de Lennox-Gastaut, une forme d'encéphalopathie épileptique [99]. Ensembles, tous ces résultats semblent suggérer l'implication du gène *CHD2* dans le caractère photosensible des patients épileptiques.

## 4.2 Le gène *CHD2* et l'épilepsie

Comme ce gène a été associé à plus d'une forme d'épilepsie, nous avons entrepris de chercher des variations génétiques dans *CHD2* parmi tous les patients épileptiques de notre laboratoire.

Nos résultats montrent tout d'abord que de nombreux patients atteints d'épilepsie, peu importe le type, présentent des variations génétiques dans le gène *CHD2* (tableau II). Parmi les variations rares détectées une seule se retrouve chez plus d'un patient (93 482 864), toutefois aucune caractéristique clinique n'est commune à tous les patients porteur de cette variation génétique. Il n'y a pas non plus de caractéristique clinique présente chez tous les sujets étudiés avec des variations génétiques dans le gène d'intérêt. De plus, parmi les patients de notre laboratoire qui présentent une mutation dans le gène *CHD2*, aucun ne souffre de déficience intellectuelle marquée ou n'est atteint d'une forme quelconque d'encéphalopathie épileptique. Même si nous ne pouvons associer les variations génétiques décelées à un type précis d'épilepsie, nos résultats semblent tout de même mettre en évidence un nombre important de mutations dans le gène *CHD2*.

Pour appuyer ces résultats, nous avons analysé toutes les données de séquençage de patients épileptiques auxquelles nous avons accès grâce à des collaborations avec d'autres laboratoires. Nous avons détecté de nombreuses autres variations génétiques, qui sont présentées au tableau III. Toutes ces variations possèdent une fréquence allélique de moins de 0,01 selon la base de données gnomAD, et plusieurs d'entre elles sont possiblement dommageables pour l'organisme selon les algorithmes de prédiction SIFT et Polyphen. Les résultats combinés de tous les patients épileptiques analysés montrent la présence d'un grand nombre de variations génétiques dans le gène *CHD2*, soit 31 variations différentes. En effet, sur un total de 1959 patients épileptiques analysés, 60 sont porteurs d'une variation rare (moins de 1% dans gnomAD) dans *CHD2*. Cela représente 3.06% de notre cohorte, ce qui est comparable aux résultats présentés dans la littérature. En effet, Galizia a rapporté 3.80% de patients porteurs d'une variation rare (22 sur 580) [60]. Pour ce qui est des variants uniques, nous en avons retrouvés chez 10 patients, soit 0.48%. À titre comparatif, un autre chercheur n'a trouvé aucun variant unique dans une cohorte de 118 patients atteints d'épilepsie génétique généralisée [100]. Il a également été montré que de façon générale, les gènes associés à l'épilepsie expliquent environ 1% des cas d'un phénotype particulier, allant jusqu'à 2,6% pour le gène *SCN1A* [51]. Bien que nos résultats soient préliminaires, combinés à ceux de la littérature ils suggèrent fortement l'implication du gène *CHD2* dans l'étiologie des différentes formes d'épilepsies génétiques.

Comme nous n'avons pas accès aux données cliniques détaillées des patients épileptiques des laboratoires avec qui nous avons collaborés, il nous est impossible de vérifier si les patients présentant des nouvelles variations génétiques dans le gène *CHD2* sont atteints du même type d'épilepsie ou s'ils souffrent de déficience intellectuelle, ou encore de photosensibilité. Il serait toutefois intéressant de tenter d'obtenir ces informations auprès de nos collaborateurs afin de pouvoir vérifier ces aspects et de tirer davantage de conclusions. De plus, nous n'avons pas analysé de cohorte contrôle à la recherche de variations génétiques dans le gène *CHD2*. Il serait donc important de procéder à cette analyse afin de pouvoir valider si nous avons un excès de mutations dans le gène d'intérêt.

### **4.3 L'expression du gène *chd2* chez le poisson zèbre**

Notre prochain objectif était la caractérisation fonctionnelle des variations génétiques retrouvées dans le gène *CHD2*. Nous avons tout d'abord voulu nous assurer que le poisson zèbre était un modèle approprié pour ces expériences. Avec un génome similaire à celui de l'humain à 70%, son faible coût et ses embryons transparents, le poisson zèbre est un modèle privilégié d'étude des maladies neurologiques [101]. Notre gène d'intérêt *CHD2* est un facteur de transcription ubiquitaire chez l'humain qui est exprimé dans tous les types cellulaires. Nous devions donc vérifier son expression chez le poisson zèbre et nous assurer que *chd2* est bien exprimé au cerveau pour pouvoir étudier la fonction précise de ce gène, et afin de modéliser l'épilepsie qui est une maladie neurologique.

Nos résultats démontrent que le poisson zèbre âgé de 18 hpf exprime le gène d'intérêt de la colonne vertébrale jusqu'au cerveau, et que l'expression de *chd2* se concentre au cerveau au cours du développement. Il est possible d'observer à la figure 3.3.1 qu'à 48 hpf, *chd2* est clairement exprimé au cerveau. Ces résultats nous confirment donc que le poisson zèbre est un modèle d'étude approprié pour caractériser nos variations génétiques trouvées dans le gène *CHD2*. De plus, nous sommes les premiers à démontrer l'expression de ce gène chez le poisson zèbre.

## 4.4 Diminution d'expression de *chd2* chez le poisson zèbre

*CHD2* étant impliqué dans de nombreux processus telles l'activation et la répression génique, de même que la régulation du cycle cellulaire et de la division cellulaire, son mauvais fonctionnement peut avoir des effets majeurs sur le développement [102]. Récemment, un groupe de chercheurs a montré un phénotype morphologique particulier suite à une diminution de l'expression du gène *chd2* dans le poisson zèbre [65]. Dans l'optique de mimer l'effet des variations génétiques de type faux-sens que nous avons détectées dans ce gène d'intérêt, nous avons décidé de tenter de reproduire le phénotype obtenu par Galizia en diminuant l'expression de *chd2* chez le poisson zèbre. Les résultats morphologiques obtenus sont les mêmes que ceux de Galizia. Tel qu'exposé à la figure 3.4.1, les poissons injectés avec le MO présentent une forme courbée 2 jours suivant la fertilisation. Ces poissons ont aussi des difficultés à nager dû à la courbure de leur corps, et ils ne vivent que quelques jours. En comparaison, la durée de vie moyenne des poissons zèbres sains est de 2-3 ans. Cette expérience a été répétée de nombreuses fois et le même phénotype a été obtenu chaque fois. L'injection d'un MO contrôle a aussi permis de démontrer que le phénotype obtenu n'est pas la cause de l'injection en soi mais bien du MO *chd2*. Comme *CHD2* a été associé à différents troubles de développement, il est raisonnable de croire que le phénotype observé est causé par la diminution de l'expression de ce gène. D'ailleurs, le groupe de Baraban a obtenu un phénotype morphologique très similaire chez le poisson zèbre en inactivant complètement l'expression du gène *stxbp1a*, impliqué dans les épilepsies de l'enfance et dans divers troubles neurodéveloppementaux [103]. Ils n'ont enregistré aucune activité électrique anormale ni observé aucune crise épileptique. Toutefois, ces poissons courbés ont une durée de vie très courte, et la sévérité du phénotype chez un organisme tel que le poisson zèbre empêche possiblement l'observation de symptômes épileptiques.

Afin de vérifier l'efficacité du MO *chd2*, nous avons analysé l'expression du gène d'intérêt *chd2* dans les poissons injectés. Nos résultats sont tels qu'attendus, ainsi l'épissage de l'ARN pré-messager est altéré chez les poissons injectés avec le MO en comparaison avec les poissons non-injectés et ceux injectés avec le MO contrôle. Comme le démontre la figure

3.4.2, la présence de 2 bandes dans la colonne des poissons mutants *chd2* est causée par la génération de 2 différents transcrits du gène. Nous avons aussi démontré que suite à l'utilisation du site accepteur alternatif, dû à l'injection du MO *chd2*, la protéine résultante traduite posséderait 1782 acides aminés. La protéine saine étant composée de 1799 acides aminés, cette perte représente 17 acides aminés. Il est donc possible que la protéine soit traduite et fonctionnelle étant donné que le cadre de lecture est conservé. Toutefois, on ne peut exclure la possibilité que la section perdue dans la protéine mutante soit primordiale pour accomplir ses fonctions ou qu'elle soit impliquée dans le repliement de sa structure tridimensionnelle. Il faut aussi considérer la possible séquestration de la protéine saine par l'ARN messager non fonctionnel de la protéine mutante, tel que décrit dans la section 4.1. Bref, encore une fois, un immunobuvardage de type Western avec un anticorps dirigé contre CHD2 aurait pu être effectué afin de détecter la présence de la protéine saine traduite, mais il n'y avait pas d'anticorps disponible.

Globalement, ces résultats suggèrent un problème majeur dans le développement des poissons, qui est fatal au bout de quelques jours. Des études fonctionnelles ont d'ailleurs été réalisées *in vivo* sur la protéine humaine CHD7, qui fait partie de la même famille que CHD2. Il a été démontré que des mutations faux-sens localisées dans le domaine fonctionnel hélicase de la protéine, diminuent son pouvoir de remodelage de la chromatine et mènent à différents troubles du développement. Cela démontre que les mutations faux-sens trouvées dans le gène *CHD2* sont susceptibles d'occasionner des problèmes similaires en diminuant l'activité hélicase de la protéine [51],[104]. Dans un même ordre d'idées, la diminution d'expression du gène d'intérêt avec le MO *chd2* pourrait avoir un effet similaire. Le poisson zèbre étant un organisme beaucoup plus simple que l'humain, un tel trouble du développement peut être caractérisé par un simple changement morphologique, comme celui observé.

Afin de mieux caractériser le phénotype obtenu et d'établir un lien avec l'épilepsie, il serait intéressant d'éventuellement enregistrer l'activité cérébrale durant les premiers jours de vie des poissons zèbres courbés. Une nouvelle méthode non invasive d'EEG qui utilise des canaux multiples, a récemment été développée et permet de détecter de manière fiable les crises épileptiques chez le poisson zèbre [105]. De plus, nous aurions aimé comparer les

déplacements et les comportements des poissons sains avec ceux des poissons courbés en utilisant une Zebrabox, toutefois les poissons courbés étant incapables de nager correctement, les résultats auraient été faussés. Bien qu'une meilleure caractérisation du phénotype soit nécessaire, ces résultats suggèrent l'implication du gène *chd2*, associé à l'épilepsie, dans une étape du développement chez le poisson zèbre. Cela est cohérent avec les troubles du développement associés aux encéphalopathies épileptiques.

## **4.5 Sauvetage du phénotype avec une copie humaine du gène *CHD2***

Nous avons voulu vérifier la spécificité du MO *chd2*, en tentant de renverser le phénotype obtenu avec une copie saine du gène humain. Puis, nous avons voulu tester si les variations génétiques dans le gène *CHD2*, détectées chez les patients épileptiques de notre laboratoire, sauvaient le phénotype ou si elles causaient le même effet que le MO. Étant donné que *CHD2* est un très long gène comptant 39 exons, et qu'il est difficile à manipuler, nous avons décidé d'utiliser un transcrite court du gène comptant 12 exons pour toutes les expériences de sauvetage du phénotype. Il est aussi important de mentionner que 2 des mutations génétiques détectées dans les patients épileptiques de notre cohorte sont uniquement présentes dans cette version alternative du gène *CHD2*. Afin d'utiliser la même version du gène pour toutes les expériences, nous avons sélectionné les 2 autres variations génétiques trouvées dans les patients de notre cohorte, qui sont présentes dans ce transcrite de 12 exons ainsi que dans le grand transcrite. Ainsi, nous avons débuté par vérifier si cette version du gène était en mesure de sauver le phénotype de poissons courbés en co-injectant le MO *chd2* pour diminuer l'expression du gène du poisson et la copie saine du gène humain *CHD2* de 12 exons. Nos résultats, présentés à la figure 3.5.1, montre clairement que la version saine courte du gène *CHD2* sauve le phénotype, et ce de façon significative. En effet, le pourcentage de poissons courbés passe de 51% chez les poissons injectés avec le MO *chd2*, à près de 21% chez les poissons injectés avec la copie saine du gène et le MO. Dans le même sens, le pourcentage de poissons sains passe de 23% chez les poissons injectés avec le MO, à 51% chez les poissons



injectés avec la copie saine du gène et le MO. Donc, le pourcentage de poissons courbés diminue lorsque l'on fournit une copie humaine saine du gène d'intérêt aux poissons. Par conséquent, le phénotype observé est bel et bien causé par le gène *chd2*. Encore une fois, cela aurait été intéressant de corrélérer avec une étude d'immunobuvardage.

Par la suite, nous avons voulu vérifier si les variations génétiques faux-sens sélectionnées (93 448 173 G/C, 93 448 201 A/G, 93 482 864 A/G et 93 489 283 C/T) engendraient le même phénotype que le MO *chd2* chez le poisson zèbre ou si elles sauvaient le phénotype de la même manière que la version saine du gène. Nous avons donc injecté en même temps, le MO *chd2* et la copie mutante humaine du gène d'intérêt de 12 exons chez le poisson zèbre. Chacune des 4 variations génétiques mentionnées ci-dessus a été injectée à tour de rôle, afin de cerner celle qui semblait être la plus pathogénique. La variation 93 489 283 C/T a donc été sélectionnée puis injectée à nouveau, 3 autres fois, afin d'obtenir des résultats consistants et plus fiables. Tel qu'exposé à la figure 3.5.1, l'injection de la copie mutante du gène *CHD2* ne sauve pas de manière significative le phénotype. Effectivement, de manière moins importante que lors de l'injection de la version saine du gène, le pourcentage de poissons courbés passe de 51% chez les poissons injectés avec le MO à 31% chez les poissons injectés avec la copie mutante du gène et le MO. Puis, le pourcentage de poissons sains passe de 23% chez les poissons injectés avec le MO à 30% chez les poissons injectés avec la copie mutante de *CHD2* et le MO. Ces résultats suggèrent donc que la variation génétique détectée chez un patient épileptique de notre laboratoire puisse être potentiellement dommageable. En effet, en fournissant la copie humaine mutante du gène *CHD2* au poisson zèbre, le phénotype n'est pas sauvé de façon significative, donc il est fort probable que l'effet engendré par cette mutation soit similaire à celui créé par le MO. Ces résultats fort intéressants ont été obtenus suite à plusieurs injections rigoureuses. Toutefois, il ne faut pas négliger le fait qu'il est extrêmement difficile d'injecter un volume précis et constant dans chaque embryon lors des injections [81]. Afin de mener plus loin cette expérience, il serait pertinent de réinjecter les 3 autres variations génétiques présentes dans la version courte du gène, dans le but d'investiguer davantage leur potentiel effet pathogénique chez le poisson zèbre. De plus, étant donné que la version courte du gène sauve le phénotype de manière significative, une nouvelle tentative de sauvetage du phénotype devrait être réalisée avec la version longue du gène. En effet, il est attendu que le

phénotype soit davantage sauvé par la version longue du gène *CHD2* puisqu'elle comprend tous les domaines fonctionnels. Aussi, comme une quantité importante de nouvelles variations génétiques a été détectée chez les patients épileptiques, toutes celles qui n'ont pu être validées dans la version courte du gène, pourraient être testées une par une dans la version longue de *CHD2*.

#### **4.6 Inactivation du gène *chd2* chez le poisson zèbre**

Le dernier objectif de ce projet était de créer une lignée stable de poissons zèbres n'exprimant pas le gène *chd2*, afin de pouvoir mieux étudier l'implication de ce gène dans l'épilepsie. De plus, de nombreuses mutations reliées aux encéphalopathies épileptiques, rapportées dans la littérature, sont des délétions ou des terminaisons prématurées de la traduction en raison de l'introduction d'un codon d'arrêt. En effet, un groupe de chercheurs a rapporté 4 patients souffrant d'épilepsie et de déficience intellectuelle avec des délétions *de novo* variant entre 78 et 237 kb dans le gène *CHD2* [102]. Deux autres groupes ont présenté des cas de patients épileptiques avec des retards mentaux légers, où l'haploinsuffisance du gène *CHD2* est causée par l'introduction d'un codon d'arrêt [51], [106]. De notre côté, tel qu'exposé au tableau III, nous avons identifié une nouvelle variation génétique qui introduit un codon d'arrêt. Ainsi, puisque le MO ne diminue que partiellement l'expression du gène d'intérêt, nous avons décidé d'utiliser la méthode CRISPR-Cas9 afin d'inhiber complètement l'expression de *chd2* dans le poisson zèbre et de caractériser davantage l'effet de cette variation génétique.

Avec beaucoup de temps et d'efforts, nous avons finalement généré des lignées de poissons zèbres mutants hétérozygotes et homozygotes pour le gène *chd2*. Suite à l'analyse morphologique des poissons mutants et des poissons sains, nous n'avons observé aucune différence entre les deux groupes. Le phénotype courbé observé suite à l'injection du MO n'a pas été retrouvé non plus. Il est possible qu'un autre gène de la famille *CHD* compense la perte totale de *CHD2*, et que ce phénomène ne soit pas observé lorsque l'expression du gène n'est que partiellement diminuée. Dans un même ordre d'idées, ces résultats peuvent être expliqués par l'activation d'un réseau compensatoire de gènes en réponse à une inactivation

génétique, qui n'a pas lieu lors d'une diminution partielle de l'expression d'un gène. En effet, un groupe de chercheurs a récemment démontré ce phénomène en étudiant les différences phénotypiques observées entre un modèle de poissons n'exprimant pas le gène *egfl7*, codant pour un facteur de croissance épidermique, et un modèle injecté avec un MO *egfl7*. Ils ont noté un phénotype sévère présentant des défauts vasculaires chez les poissons injectés avec le MO, et un phénotype faible, voire une absence de phénotype chez les poissons mutants pour le gène *egfl7*. Ces chercheurs ont ensuite montré que la surexpression d'autres gènes, avec des fonctions similaires, permet de compenser la perte totale du gène *egfl7*, mais que cela ne se produit pas dans le cas d'une diminution partielle de l'expression de *egfl7* avec un MO [107]. Il est donc tout à fait possible que le même scénario s'applique dans le cas du gène d'intérêt *CHD2*.

Le fait que les phénotypes épileptique et neurodéveloppemental soient difficiles à mettre en évidence dans ce type de modèle peut aussi expliquer ces résultats d'apparence négative. Pour l'instant, nous ne pouvons pas tirer de conclusion puisqu'il reste beaucoup de travail afin de caractériser correctement l'inactivation du gène *chd2* chez les poissons zèbres. En effet, nous avons prévu tester le caractère photosensible des poissons mutants, en laissant de jeunes embryons dans le noir depuis leur naissance, puis en les soumettant à une lumière spontanée. Afin de détecter la présence d'une activité paroxystique, l'enregistrement électrophysiologique du tectum optique des poissons sera effectué. De la même façon, un autre groupe a suggéré un possible lien entre la photosensibilité et le gène *CHD2*. En effet, suite à l'exposition à la lumière, ils ont observé une plus grande activité cérébrale chez des poissons injectés avec un MO *chd2* que chez des poissons sauvages [60]. Nous prévoyons donc observer le même phénomène chez les poissons qui n'expriment aucunement le gène d'intérêt.

Nous avons aussi l'intention de tester l'effet du pentylentétrazole (PTZ) sur les poissons mutants. Cet agent convulsant, qui a la propriété d'induire des crises épileptiques, a été largement utilisé dans les 6 dernières années lors du développement de nombreux médicaments antiépileptiques [108], [109]. Pour sa part, l'équipe de Baraban a démontré l'induction de crises épileptiques chez des poissons sains exposés au PTZ. Ils ont aussi observé une augmentation de l'expression du gène *c-fos* au niveau du système nerveux central

des poissons exposés au PTZ. Puisque ce gène est induit très rapidement, et de façon transitoire par différents stimuli, il est suggéré qu'une augmentation de son expression soit liée à la présence de crises épileptiques [110], [111]. Nous voulons donc vérifier si nos lignées de poissons mutants *chd2* sont plus susceptibles à l'induction chimique de crises épileptiques par le PTZ que les poissons sains et si l'expression du facteur de transcription *c-fos* est davantage augmentée dans le système nerveux des poissons mutants. Pour ce faire, nous prévoyons comparer les comportements des poissons mutants et sains, traités au PTZ, avec un appareil Zebrabox qui détecte et analyse les mouvements, puis étudier l'activité cérébrale de ces poissons avec l'enregistrement électrophysiologique du tectum optique. L'ARN de ces poissons pourrait ensuite être extrait afin de vérifier l'expression du gène *c-fos* [110].

Globalement, pour ce dernier objectif, nos résultats demeurent préliminaires et nous ne pouvons décrire l'effet de l'inactivation du gène *chd2* chez les poissons zèbres dans ce modèle. Par contre, la lignée stable de poissons zèbres homozygotes qui n'expriment pas *chd2* est établie, et elle permettra assurément d'étudier de nombreux aspects de l'épilepsie et des encéphalopathies *CHD2* dans un avenir rapproché. L'inactivation du gène *chd2* n'avait encore jamais été réalisée chez le poisson zèbre, nous sommes donc les premiers à créer ce modèle d'étude de l'épilepsie et de maladies développementales.

## Chapitre 5 : Conclusion

Ce projet de recherche visait le criblage génétique de *CHD2* parmi des patients épileptiques, et la caractérisation fonctionnelle des nouvelles variations chez le poisson zèbre.

Tout d'abord, nous avons découvert une nouvelle variation génétique silencieuse dans un patient photosensible, puis nous avons démontré *in vitro* qu'elle affecte partiellement l'épissage de l'ARN pré-messager en introduisant un nouveau site accepteur. Par conséquent, un nouveau transcrit ayant 59 paires de bases en moins est généré, ce qui mène à l'introduction d'un codon d'arrêt prématuré et fort probablement à une protéine tronquée de 337 acides aminés. Ce résultat suggère que la variation génétique est potentiellement dommageable.

Nous avons ensuite découvert 31 variations rares différentes, soit 60 patients porteurs parmi les 1959 patients épileptiques analysés. Cela représente 3.06% de notre cohorte. Nos résultats étant similaires à ceux de la littérature, nous suggérons donc l'implication du gène *CHD2* dans l'étiologie génétique des épilepsies. Nous devons toutefois analyser une cohorte contrôle afin de pouvoir vérifier si nous présentons statistiquement un excès de variants dans le gène *CHD2*.

Après avoir démontré *in situ* l'expression du gène *chd2* dans le cerveau des poissons zèbres, nous avons entrepris une diminution de ce gène avec un MO. Nous avons reproduit exactement le même phénotype courbé qu'un autre groupe de chercheurs, puis nous avons démontré que le MO génère un transcrit alternatif ayant 51 paires de bases en moins [65]. Les poissons courbés observés ont de la difficulté à nager et ne vivent que quelques jours. Nous avons par la suite sauvé de manière significative ce phénotype en fournissant une copie humaine saine du gène *CHD2* aux poissons injectés avec le MO. Nous avons aussi montré qu'une des variations génétiques trouvées chez un patient épileptique de notre laboratoire semble être pathogénique puisqu'elle ne permet pas de sauver le phénotype de façon significative.

Nous avons finalement établi une lignée stable de poissons zèbres qui n'expriment pas le gène *chd2*. Nous sommes les premiers à proposer ce modèle d'étude de l'épilepsie et des encéphalopathies épileptiques *CHD2* qui servira à mieux comprendre le rôle de ce gène d'intérêt dans ces maladies.

En résumé, nous avons atteint notre objectif principal et bien que nos résultats soient préliminaires, ils semblent très prometteurs pour la suite.

## Bibliographie

- [1] H. Gilmour, P. Ramage-Morin, and S. L. Wong, “Epilepsy in Canada: Prevalence and impact.,” *Heal. reports*, vol. 27, no. 9, pp. 24–30, Sep. 2016.
- [2] J. F. Tellez-Zenteno, M. Pondal-Sordo, S. Matijevic, and S. Wiebe, “National and regional prevalence of self-reported epilepsy in Canada.,” *Epilepsia*, vol. 45, no. 12, pp. 1623–1629, Dec. 2004.
- [3] R. S. Fisher *et al.*, “Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE).,” *Epilepsia*, vol. 46, no. 4, pp. 470–472, Apr. 2005.
- [4] B. P. Hermann, M. Seidenberg, and B. Bell, “Psychiatric comorbidity in chronic epilepsy: identification, consequences, and treatment of major depression.,” *Epilepsia*, vol. 41 Suppl 2, pp. S31-41, 2000.
- [5] I. E. Scheffer *et al.*, “ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology.,” *Epilepsia*, Mar. 2017.
- [6] R. S. Fisher *et al.*, “ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy.,” *Epilepsia*, vol. 55, no. 4, pp. 475–482, Apr. 2014.
- [7] J. Engel, G. L. Birbeck, A. G. Diop, S. Jain, and A. Palmmini, *Epilepsy: Global Issues For The Practicing Neurologist*, vol. 2. 2005.
- [8] W. T. Blume, H. O. Luders, E. Mizrahi, C. Tassinari, W. van Emde Boas, and J. J. Engel, “Glossary of descriptive terminology for ictal semiology: report of the ILAE task force on classification and terminology.,” *Epilepsia*, vol. 42, no. 9, pp. 1212–1218, Sep. 2001.
- [9] R. S. Fisher *et al.*, “Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology.,” *Epilepsia*, Mar. 2017.
- [10] R. S. Fisher *et al.*, “Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types.,” *Epilepsia*, Mar. 2017.
- [11] “Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy.,” *Epilepsia*, vol. 30, no. 4, pp. 389–399, 1989.

- [12] P. Kwan *et al.*, “Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies.,” *Epilepsia*, vol. 51, no. 6, pp. 1069–1077, Jun. 2010.
- [13] D. Schmidt and S. C. Schachter, “Drug treatment of epilepsy in adults.,” *BMJ*, vol. 348, p. g254, Feb. 2014.
- [14] J. M. Freeman, E. P. G. Vining, E. H. Kossoff, P. L. Pyzik, X. Ye, and S. N. Goodman, “A blinded, crossover study of the efficacy of the ketogenic diet.,” *Epilepsia*, vol. 50, no. 2, pp. 322–325, Feb. 2009.
- [15] E. Ben-Menachem, “Vagus-nerve stimulation for the treatment of epilepsy.,” *Lancet. Neurol.*, vol. 1, no. 8, pp. 477–482, Dec. 2002.
- [16] J. W. Miller and S. Hakimian, “Surgical treatment of epilepsy.,” *Continuum (Minneapolis, Minn.)*, vol. 19, no. 3 Epilepsy, pp. 730–742, Jun. 2013.
- [17] A. T. Berg *et al.*, “Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009.,” *Epilepsia*, vol. 51, no. 4, pp. 676–685, Apr. 2010.
- [18] A. Nemes, I. M. Najm, J. T. Gale, Z. Ying, M. Johnson, and J. Gonzalez-Martinez, “Underlying Cortical Dysplasia as Risk Factor for Traumatic Epilepsy: An Animal Study.,” *J. Neurotrauma*, vol. 33, no. 20, pp. 1883–1891, Oct. 2016.
- [19] D. H. Lowenstein, “Epilepsy after head injury: An overview,” in *Epilepsia*, 2009, vol. 50, no. SUPPL. 2, pp. 4–9.
- [20] L. Papetti *et al.*, “Metabolic epilepsy: an update.,” *Brain Dev.*, vol. 35, no. 9, pp. 827–841, Oct. 2013.
- [21] M. Spatola and J. Dalmau, “Seizures and risk of epilepsy in autoimmune and other inflammatory encephalitis.,” *Curr. Opin. Neurol.*, Feb. 2017.
- [22] A. Vezzani *et al.*, “Infections, inflammation and epilepsy.,” *Acta Neuropathol.*, vol. 131, no. 2, pp. 211–234, Feb. 2016.
- [23] B. D. Michael and T. Solomon, “Seizures and encephalitis: clinical features, management, and potential pathophysiologic mechanisms.,” *Epilepsia*, vol. 53 Suppl 4, pp. 63–71, Sep. 2012.



- [24] M. Sillanpaa, M. Koskenvuo, K. Romanov, and J. Kaprio, "Genetic factors in epileptic seizures: evidence from a large twin population.," *Acta Neurol. Scand.*, vol. 84, no. 6, pp. 523–526, Dec. 1991.
- [25] S. F. Berkovic, R. A. Howell, D. A. Hay, and J. L. Hopper, "Epilepsies in twins: genetics of the major epilepsy syndromes.," *Ann. Neurol.*, vol. 43, no. 4, pp. 435–445, Apr. 1998.
- [26] A. Rebai, "[Linkage analysis for complex diseases: a new life for an old method].," *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, vol. 77, no. 1–4, pp. 25–35, 2000.
- [27] A. Puliti, G. Caridi, R. Ravazzolo, and G. M. Ghiggeri, "Teaching molecular genetics: chapter 4-positional cloning of genetic disorders.," *Pediatr. Nephrol.*, vol. 22, no. 12, pp. 2023–2029, Dec. 2007.
- [28] I. E. Scheffer and S. F. Berkovic, "Generalized epilepsy with febrile seizures plus. A genetic disorder with heterogeneous clinical phenotypes.," *Brain*, vol. 120 ( Pt 3, pp. 479–490, Mar. 1997.
- [29] A. Escayg *et al.*, "Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+2.," *Nat. Genet.*, vol. 24, no. 4, pp. 343–345, Apr. 2000.
- [30] Z. Afawi *et al.*, "Multiplex families with epilepsy: Success of clinical and molecular genetic characterization.," *Neurology*, vol. 86, no. 8, pp. 713–722, Feb. 2016.
- [31] P. Cossette *et al.*, "Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile myoclonic epilepsy.," *Nat. Genet.*, vol. 31, no. 2, pp. 184–189, Jun. 2002.
- [32] J. Spillane, D. M. Kullmann, and M. G. Hanna, "Genetic neurological channelopathies: molecular genetics and clinical phenotypes.," *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, vol. 87, no. 1, pp. 37–48, Jan. 2016.
- [33] C. A. Reid, S. F. Berkovic, and S. Petrou, "Mechanisms of human inherited epilepsies.," *Prog. Neurobiol.*, vol. 87, no. 1, pp. 41–57, Jan. 2009.
- [34] I. Helbig and A. A. N. Tayoun, "Understanding Genotypes and Phenotypes in Epileptic Encephalopathies.," *Mol. Syndromol.*, vol. 7, no. 4, pp. 172–181, Sep. 2016.
- [35] J. N. Hirschhorn and M. J. Daly, "Genome-wide association studies for common diseases and complex traits.," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 6, no. 2, pp. 95–108, Feb. 2005.

- [36] B. P. C. Koeleman, “What do genetic studies tell us about the heritable basis of common epilepsy? Polygenic or complex epilepsy?,” *Neurosci. Lett.*, Mar. 2017.
- [37] M. S. Hildebrand, H.-H. M. Dahl, J. A. Damiano, R. J. H. Smith, I. E. Scheffer, and S. F. Berkovic, “Recent advances in the molecular genetics of epilepsy,” *J. Med. Genet.*, vol. 50, no. 5, pp. 271–279, May 2013.
- [38] R. Bao *et al.*, “Review of current methods, applications, and data management for the bioinformatics analysis of whole exome sequencing,” *Cancer Inform.*, vol. 13, no. Suppl 2, pp. 67–82, 2014.
- [39] H. Ostrer, “Changing the game with whole exome sequencing,” *Clin. Genet.*, vol. 80, no. 2, pp. 101–103, Aug. 2011.
- [40] S. Ishida *et al.*, “Mutations of DEPDC5 cause autosomal dominant focal epilepsies,” *Nat. Genet.*, vol. 45, no. 5, pp. 552–555, May 2013.
- [41] L. M. Dibbens *et al.*, “Mutations in DEPDC5 cause familial focal epilepsy with variable foci,” *Nat. Genet.*, vol. 45, no. 5, pp. 546–551, May 2013.
- [42] J. S. Beckmann, X. Estivill, and S. E. Antonarakis, “Copy number variants and genetic traits: closer to the resolution of phenotypic to genotypic variability,” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 8, no. 8, pp. 639–646, Aug. 2007.
- [43] H. Olson *et al.*, “Copy number variation plays an important role in clinical epilepsy,” *Ann. Neurol.*, vol. 75, no. 6, pp. 943–958, Jun. 2014.
- [44] C. G. F. de Kovel *et al.*, “Recurrent microdeletions at 15q11.2 and 16p13.11 predispose to idiopathic generalized epilepsies,” *Brain*, vol. 133, no. Pt 1, pp. 23–32, Jan. 2010.
- [45] “Copy number variant analysis from exome data in 349 patients with epileptic encephalopathy,” *Ann. Neurol.*, vol. 78, no. 2, pp. 323–328, Aug. 2015.
- [46] C. Marini *et al.*, “Genetic architecture of idiopathic generalized epilepsy: clinical genetic analysis of 55 multiplex families,” *Epilepsia*, vol. 45, no. 5, pp. 467–478, May 2004.
- [47] C. M. Freitag, T. W. May, M. Pfafflin, S. Konig, and D. Rating, “Incidence of epilepsies and epileptic syndromes in children and adolescents: a population-based prospective study in Germany,” *Epilepsia*, vol. 42, no. 8, pp. 979–985, Aug. 2001.

- [48] L. Claes, J. Del-Favero, B. Ceulemans, L. Lagae, C. Van Broeckhoven, and P. De Jonghe, “De novo mutations in the sodium-channel gene SCN1A cause severe myoclonic epilepsy of infancy.,” *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 68, no. 6, pp. 1327–1332, Jun. 2001.
- [49] L. Vadlamudi *et al.*, “Timing of de novo mutagenesis--a twin study of sodium-channel mutations.,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 363, no. 14, pp. 1335–1340, Sep. 2010.
- [50] R. H. Thomas *et al.*, “CHD2 myoclonic encephalopathy is frequently associated with self-induced seizures.,” *Neurology*, vol. 84, no. 9, pp. 951–958, Mar. 2015.
- [51] G. L. Carvill *et al.*, “Targeted resequencing in epileptic encephalopathies identifies de novo mutations in CHD2 and SYNGAP1.,” *Nat. Genet.*, vol. 45, no. 7, pp. 825–830, Jul. 2013.
- [52] W. G. WALTER, V. J. DOVEY, and H. SHIPTON, “Analysis of the electrical response of the human cortex to photic stimulation.,” *Nature*, vol. 158, no. 4016, p. 540, Oct. 1946.
- [53] M. Siniatchkin *et al.*, “Spreading photoparoxysmal EEG response is associated with an abnormal cortical excitability pattern.,” *Brain*, vol. 130, no. Pt 1, pp. 78–87, Jan. 2007.
- [54] A. Covanis, “Photosensitivity in idiopathic generalized epilepsies.,” *Epilepsia*, vol. 46 Suppl 9, pp. 67–72, 2005.
- [55] R. Guerrini and P. Genton, “Epileptic syndromes and visually induced seizures.,” *Epilepsia*, vol. 45 Suppl 1, pp. 14–18, 2004.
- [56] A. Verrotti, F. Beccaria, F. Fiori, A. Montagnini, and G. Capovilla, “Photosensitivity: epidemiology, genetics, clinical manifestations, assessment, and management.,” *Epileptic Disord.*, vol. 14, no. 4, pp. 349–362, Dec. 2012.
- [57] D. G. A. Kasteleijn-Nolst Trenite, G. van der Beld, I. Heynderickx, and P. Groen, “Visual stimuli in daily life.,” *Epilepsia*, vol. 45 Suppl 1, pp. 2–6, 2004.
- [58] A. Verrotti *et al.*, “Photosensitivity and epilepsy: a follow-up study.,” *Dev. Med. Child Neurol.*, vol. 46, no. 5, pp. 347–351, May 2004.
- [59] S. Striano *et al.*, “Eyelid myoclonia with absences (Jeavons syndrome): a well-defined idiopathic generalized epilepsy syndrome or a spectrum of photosensitive conditions?,” *Epilepsia*, vol. 50 Suppl 5, pp. 15–19, May 2009.

- [60] E. C. Galizia *et al.*, “CHD2 variants are a risk factor for photosensitivity in epilepsy.” *Brain*, vol. 138, no. Pt 5, pp. 1198–1207, May 2015.
- [61] T. Shen, F. Ji, Z. Yuan, and J. Jiao, “CHD2 is Required for Embryonic Neurogenesis in the Developing Cerebral Cortex.” *Stem Cells*, vol. 33, no. 6, pp. 1794–1806, Jun. 2015.
- [62] J. C. Liu, C. G. Ferreira, and T. Yusufzai, “Human CHD2 is a chromatin assembly ATPase regulated by its chromo- and DNA-binding domains.” *J. Biol. Chem.*, vol. 290, no. 1, pp. 25–34, Jan. 2015.
- [63] C. G. A. Marfella, Y. Ohkawa, A. H. Coles, D. S. Garlick, S. N. Jones, and A. N. Imbalzano, “Mutation of the SNF2 family member Chd2 affects mouse development and survival.” *J. Cell. Physiol.*, vol. 209, no. 1, pp. 162–171, Oct. 2006.
- [64] L. P. Capelli *et al.*, “Deletion of the RMGA and CHD2 genes in a child with epilepsy and mental deficiency.” *Eur. J. Med. Genet.*, vol. 55, no. 2, pp. 132–134, Feb. 2012.
- [65] A. Suls *et al.*, “De novo loss-of-function mutations in CHD2 cause a fever-sensitive myoclonic epileptic encephalopathy sharing features with Dravet syndrome.” *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 93, no. 5, pp. 967–975, Nov. 2013.
- [66] M. Trivisano *et al.*, “CHD2 mutations are a rare cause of generalized epilepsy with myoclonic-atonic seizures.” *Epilepsy Behav.*, vol. 51, pp. 53–56, Oct. 2015.
- [67] Y. Wang *et al.*, “Genetic Variants Identified from Epilepsy of Unknown Etiology in Chinese Children by Targeted Exome Sequencing.” *Sci. Rep.*, vol. 7, p. 40319, Jan. 2017.
- [68] S. Petrovski, Q. Wang, E. L. Heinzen, A. S. Allen, and D. B. Goldstein, “Genic intolerance to functional variation and the interpretation of personal genomes.” *PLoS Genet.*, vol. 9, no. 8, p. e1003709, 2013.
- [69] S. Petrovski *et al.*, “The Intolerance of Regulatory Sequence to Genetic Variation Predicts Gene Dosage Sensitivity.” *PLoS Genet.*, vol. 11, no. 9, p. e1005492, Sep. 2015.
- [70] V. T. Cunliffe, “Building a zebrafish toolkit for investigating the pathobiology of epilepsy and identifying new treatments for epileptic seizures.” *J. Neurosci. Methods*, vol. 260, pp. 91–95, Feb. 2016.
- [71] G. A. Hortopan, M. T. Dinday, and S. C. Baraban, “Zebrafish as a model for studying genetic aspects of epilepsy.” *Dis. Model. Mech.*, vol. 3, no. 3–4, pp. 144–148, 2010.

- [72] H. W. 3rd Detrich, M. Westerfield, and L. I. Zon, "Overview of the Zebrafish system.," *Methods Cell Biol.*, vol. 59, pp. 3–10, 1999.
- [73] E. Samarut, "Zebrafish embryos as in vivo test tubes to unravel cell-specific mechanisms of neurogenesis during neurodevelopment and in diseases.," *Neurogenes. (Austin, Tex.)*, vol. 3, no. 1, p. e1232678, 2016.
- [74] S. C. Baraban, M. T. Dinday, and G. A. Hortopan, "Drug screening in Scn1a zebrafish mutant identifies clemizole as a potential Dravet syndrome treatment.," *Nat. Commun.*, vol. 4, p. 2410, 2013.
- [75] C.-Y. Lin, C.-Y. Chiang, and H.-J. Tsai, "Zebrafish and Medaka: new model organisms for modern biomedical research.," *J. Biomed. Sci.*, vol. 23, p. 19, Jan. 2016.
- [76] A. Nasevicius and S. C. Ekker, "Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish.," *Nat. Genet.*, vol. 26, no. 2, pp. 216–220, Oct. 2000.
- [77] S. Sumanas and J. D. Larson, "Morpholino phosphorodiamidate oligonucleotides in zebrafish: a recipe for functional genomics?," *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.*, vol. 1, no. 3, pp. 239–256, Oct. 2002.
- [78] B. R. Bill, A. M. Petzold, K. J. Clark, L. A. Schimmenti, and S. C. Ekker, "A primer for morpholino use in zebrafish.," *Zebrafish*, vol. 6, no. 1, pp. 69–77, Mar. 2009.
- [79] A. S. Flynt, M. Rao, and J. G. Patton, "Blocking Zebrafish MicroRNAs with Morpholinos.," *Methods Mol. Biol.*, vol. 1565, pp. 59–78, 2017.
- [80] J. Summerton and D. Weller, "Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties.," *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, vol. 7, no. 3, pp. 187–195, Jun. 1997.
- [81] J. S. Eisen and J. C. Smith, "Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense.," *Development*, vol. 135, no. 10, pp. 1735–1743, May 2008.
- [82] Y. Ishino, H. Shinagawa, K. Makino, M. Amemura, and A. Nakata, "Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product.," *J. Bacteriol.*, vol. 169, no. 12, pp. 5429–5433, Dec. 1987.
- [83] M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, and E. Charpentier, "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity.," *Science*, vol. 337, no. 6096, pp. 816–821, Aug. 2012.

- [84] M. K. White, R. Kaminski, W.-B. Young, P. C. Roehm, and K. Khalili, "CRISPR editing technology in biological and biomedical investigation.," *J. Cell. Biochem.*, Apr. 2017.
- [85] M. K. White, W. Hu, and K. Khalili, "The CRISPR/Cas9 genome editing methodology as a weapon against human viruses.," *Discov. Med.*, vol. 19, no. 105, pp. 255–262, Apr. 2015.
- [86] J. Liu and S.-L. Shui, "Delivery methods for site-specific nucleases: Achieving the full potential of therapeutic gene editing.," *J. Control. Release*, vol. 244, no. Pt A, pp. 83–97, Dec. 2016.
- [87] M. S. Hildebrand *et al.*, "PRIMA1 mutation: a new cause of nocturnal frontal lobe epilepsy.," *Ann. Clin. Transl. Neurol.*, vol. 2, no. 8, pp. 821–830, Aug. 2015.
- [88] C. B. Kimmel, W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann, and T. F. Schilling, "Stages of embryonic development of the zebrafish.," *Dev. Dyn.*, vol. 203, no. 3, pp. 253–310, Jul. 1995.
- [89] M. Westerfield, "The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*), 5th Edition," *Univ. Oregon Press. Eugene*, 2007.
- [90] R. C. Albertson and P. C. Yelick, "Roles for *fgf8* signaling in left-right patterning of the visceral organs and craniofacial skeleton.," *Dev. Biol.*, vol. 283, no. 2, pp. 310–321, Jul. 2005.
- [91] N. L. Jacobs, R. C. Albertson, and J. R. Wiles, "Using whole mount in situ hybridization to link molecular and organismal biology.," *J. Vis. Exp.*, no. 49, Mar. 2011.
- [92] M. A. Moreno-Mateos *et al.*, "CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo.," *Nat. Methods*, vol. 12, no. 10, pp. 982–988, Oct. 2015.
- [93] N. D. Meeker, S. A. Hutchinson, L. Ho, and N. S. Trede, "Method for isolation of PCR-ready genomic DNA from zebrafish tissues.," *Biotechniques*, vol. 43, no. 5, p. 610,612,614, Nov. 2007.
- [94] A. M. Pinto *et al.*, "Exome sequencing analysis in a pair of monozygotic twins re-evaluates the genetics behind their intellectual disability and reveals a CHD2 mutation.," *Brain Dev.*, vol. 38, no. 6, pp. 590–596, Jun. 2016.

- [95] G. Carvill, I. Helbig, and H. Mefford, “CHD2-Related Neurodevelopmental Disorders,” R. A. Pagon, M. P. Adam, H. H. Ardinger, S. E. Wallace, A. Amemiya, L. J. H. Bean, T. D. Bird, N. Ledbetter, H. C. Mefford, R. J. H. Smith, and K. Stephens, Eds. Seattle (WA), 1993.
- [96] E. Samarut, A. Lissouba, and P. Drapeau, “A simplified method for identifying early CRISPR-induced indels in zebrafish embryos using High Resolution Melting analysis.,” *BMC Genomics*, vol. 17, p. 547, Aug. 2016.
- [97] B. J. O’Roak *et al.*, “Recurrent de novo mutations implicate novel genes underlying simplex autism risk.,” *Nat. Commun.*, vol. 5, p. 5595, Nov. 2014.
- [98] W. M. Verhoeven, J. I. Egger, A. C. Knegt, J. Zuydam, and T. Kleefstra, “Absence epilepsy and the CHD2 gene: an adolescent male with moderate intellectual disability, short-lasting psychoses, and an interstitial deletion in 15q26.1-q26.2.,” *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, vol. 12, pp. 1135–1139, 2016.
- [99] C. Lund, E. Brodtkorb, A.-M. Oye, O. Rosby, and K. K. Selmer, “CHD2 mutations in Lennox-Gastaut syndrome.,” *Epilepsy Behav.*, vol. 33, pp. 18–21, Apr. 2014.
- [100] E. L. Heinzen *et al.*, “Exome sequencing followed by large-scale genotyping fails to identify single rare variants of large effect in idiopathic generalized epilepsy,” *Am. J. Hum. Genet.*, 2012.
- [101] K. Howe *et al.*, “The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome.,” *Nature*, vol. 496, no. 7446, pp. 498–503, Apr. 2013.
- [102] S. Chenier *et al.*, “CHD2 haploinsufficiency is associated with developmental delay, intellectual disability, epilepsy and neurobehavioural problems.,” *J. Neurodev. Disord.*, vol. 6, no. 1, p. 9, 2014.
- [103] B. P. Grone *et al.*, “Epilepsy, behavioral abnormalities, and physiological comorbidities in syntaxin-binding protein 1 (STXBP1) mutant zebrafish,” *PLoS One*, vol. 11, no. 3, 2016.
- [104] K. Bouazoune and R. E. Kingston, “Chromatin remodeling by the CHD7 protein is impaired by mutations that cause human developmental disorders.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 47, pp. 19238–19243, Nov. 2012.
- [105] S.-J. Cho *et al.*, “Zebrafish as an animal model in epilepsy studies with multichannel EEG recordings.,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 3099, Jun. 2017.

- [106] A. Rauch *et al.*, “Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study.,” *Lancet (London, England)*, vol. 380, no. 9854, pp. 1674–1682, Nov. 2012.
- [107] A. Rossi *et al.*, “Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns,” *Nature*, vol. 524, no. 7564, pp. 230–233, 2015.
- [108] B. H. M. Mussulini *et al.*, “Seizures induced by pentylenetetrazole in the adult zebrafish: a detailed behavioral characterization.,” *PLoS One*, vol. 8, no. 1, p. e54515, 2013.
- [109] W. Loscher, “Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs.,” *Seizure*, vol. 20, no. 5, pp. 359–368, Jun. 2011.
- [110] S. C. Baraban, M. R. Taylor, P. A. Castro, and H. Baier, “Pentylenetetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression.,” *Neuroscience*, vol. 131, no. 3, pp. 759–768, 2005.
- [111] R. Muller, R. Bravo, J. Burckhardt, and T. Curran, “Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc.,” *Nature*, vol. 312, no. 5996, pp. 716–720, Dec. 1984.



## **Annexe 1 : Différents protocoles de PCR utilisés pour amplifier toutes les régions codantes du gène *CHD2***

<b>Région codante du gène</b>	<b>Protocole PCR</b>
<b>Exon 1b</b>	Amplitaq Gold 2
<b>Exon 2</b>	Amplitaq Gold 2
<b>Exon 3</b>	Amplitaq Gold 1
<b>Exon 4</b>	Amplitaq Gold 1
<b>Exon 5</b>	Amplitaq Gold 2
<b>Exon 6</b>	Amplitaq Gold 3
<b>Exon 7</b>	Amplitaq Gold 1
<b>Exon 8</b>	Amplitaq Gold 1
<b>Exon 9</b>	Amplitaq Gold 1
<b>Exon 10</b>	Amplitaq Gold 2
<b>Exons 11-12</b>	Amplitaq Gold 1
<b>Exon 13</b>	Amplitaq Gold 1
<b>Exon 14</b>	Amplitaq Gold 1
<b>Exon 15</b>	Amplitaq Gold 1
<b>Exon 16</b>	Amplitaq Gold 1
<b>Exon 17</b>	Amplitaq Gold 2
<b>Exon 18</b>	Amplitaq Gold 1
<b>Exon 19</b>	Amplitaq Gold 1
<b>Exon 20</b>	Amplitaq Gold 1
<b>Exon 21</b>	Amplitaq Gold 2
<b>Exon 22</b>	Amplitaq Gold 1
<b>Exon 23</b>	Amplitaq Gold 3
<b>Exon 24</b>	Amplitaq Gold 3

<b>Exon 25</b>	Amplitaq Gold 1
<b>Exon 26</b>	Amplitaq Gold 1
<b>Exon 27</b>	Amplitaq Gold 2
<b>Exon 28</b>	Amplitaq Gold 1
<b>Exons 29-30</b>	Amplitaq Gold 1
<b>Exon 31</b>	Amplitaq Gold 3
<b>Exon 32</b>	Amplitaq Gold 3
<b>Exon 33</b>	Amplitaq Gold 1
<b>Exon 34</b>	Amplitaq Gold 2
<b>Exon 35</b>	Amplitaq Gold 1
<b>Exon 36</b>	Amplitaq Gold 1
<b>Exon 37</b>	Amplitaq Gold 2
<b>Exon 38</b>	Amplitaq Gold 1
<b>Exon 39</b>	Amplitaq Gold 1

**Légende :**

Protocole Amplitaq Gold 1 : 1  $\mu\text{L}$  de dNTP (2.5  $\mu\text{M}$ ), 0.4  $\mu\text{L}$  de chacune des amorces (10  $\mu\text{M}$ ) 1.5  $\mu\text{L}$  de tampon à PCR 10x, 0.9  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25mM), 0.06  $\mu\text{L}$  de polymérase Amplitaq Gold (Applied Biosystems), 5  $\mu\text{L}$  d'ADN et de l'eau pour compléter jusqu'à un volume final de 15  $\mu\text{L}$ .

Protocole Amplitaq Gold 2 : 1  $\mu\text{L}$  de dNTP (2.5  $\mu\text{M}$ ), 0.4  $\mu\text{L}$  de chacune des amorces (10  $\mu\text{M}$ ) 1.5  $\mu\text{L}$  de tampon à PCR 10x, 1.2  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25mM), 0.06  $\mu\text{L}$  de polymérase Amplitaq Gold (Applied Biosystems), 5  $\mu\text{L}$  d'ADN et de l'eau pour compléter jusqu'à un volume final de 15  $\mu\text{L}$ .

Protocole Amplitaq Gold 3 : 1  $\mu\text{L}$  de dNTP (2.5  $\mu\text{M}$ ), 0.4  $\mu\text{L}$  de chacune des amorces (10  $\mu\text{M}$ ) 1.5  $\mu\text{L}$  de tampon à PCR 10x, 0.9  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25mM), 3  $\mu\text{L}$  de solution Q de bétaine (Qiagen), 0.06  $\mu\text{L}$  de polymérase Amplitaq Gold (Applied Biosystems), 5  $\mu\text{L}$  d'ADN et de l'eau pour compléter jusqu'à un volume final de 15  $\mu\text{L}$ .

## Annexe 2 : Amorces utilisées pour amplifier toutes les régions codantes du gène humain *CHD2*

Région codante du gène	Séquences des amorces
<b>Exon 1b</b>	F : ACGTTTGAGTGTCAGAGGCG R : GCCTAACGCTGTATTCTGCC
<b>Exon 2</b>	F : GGGCACAGGACTTCAAAGC R : TGTAAGCTGAGGTTTCTCCCC
<b>Exon 3</b>	F : TTAAGCAGATTCATGTGTCAGTTC R : CAACAAAGGTCTGCTAGCTTGTC
<b>Exon 4</b>	F : AAAATGGCGCTTTATTGTCTC R : AACTTCTTGCCTTACTGTATCTGG
<b>Exon 5</b>	F : TGTTGTCCCGAAGAAGTGTG R : GGCAGTCCTAGAAATGCTGAC
<b>Exon 6</b>	F : TGTCGGATTATTTATCTTGAAGG R : AGCACGACATTATCCTTCCC
<b>Exon 7</b>	F : GTATGAACCACTGCTCTGGG R : TAAGTGCACAACCCCGGAC
<b>Exon 8</b>	F : GTGACGGTTATGTGTGGCAG R : CTGAAACACTGGGTCAGAAAG
<b>Exon 9</b>	F : GATAATTGCATTCTTGGGAAGC R : AACCTTCCCTTCTTTCAGGC
<b>Exon 10</b>	F : TGTGGATCCCCAGACTTTAG R : CTTCCAAAAGCAAAAGCCAC
<b>Exons 11-12</b>	F : GAACCCAAAATCTTTCATTCTTC R : CCTTCTTTCACCTTCAAAATGGC
<b>Exon 13</b>	F : GCTTTGATGCCGAATATGTG R : TTCTTGGTTGAGATAACAATAAGGG
<b>Exon 14</b>	F : GTGAAGCATTGGTGTCGTTG

	R : CAGCACAGTATCAGAATAATAACCAC
<b>Exon 15</b>	F : TCGGTGGTCAGTGTTTTAATTC R : CATCTGGACAAGTCGCACTG
<b>Exon 16</b>	F : CACTTGAAAGCACTTGTGGG R : AAAAGCATTGGCATTTCAGAC
<b>Exon 17</b>	F : TTTTGTTCCTTCTATTTAAGAGC R : TGGCGCATCCCTGTAATC
<b>Exon 18</b>	F : CTCTTCTGGTACCTACAACCTTCTG R : AAAAGCACCTAGAGAACTAAGCG
<b>Exon 19</b>	F : AGCAGGTTGCTAAGGGCTTC R : GTGTAGGAAGGTTGGGGAGG
<b>Exon 20</b>	F : AAAGGTTCCAAGTCTGCTGTTC R : ACTTCCCCTTGATGCAGAG
<b>Exon 21</b>	F : CCAGGTGTAAGGGCTTATTGG R : TTAACATCCTGAAAGGGCTG
<b>Exon 22</b>	F : CCCCTCTTGGGTTTTGACAG R : GACTAATGTCTGTGGTAGAAAATCC
<b>Exon 23</b>	F : TTTTCAGCAGTTAACTTGACCTC R : TTTTCTTTACAAAAGCCTCTAACAG
<b>Exon 24</b>	F : TGGGCAACTAGGCAACTC R : AAAGAAAGCGTTCATAAACATTAGTC
<b>Exon 25</b>	F : TGGATAAATTGTTTTAGTAGATGGTG R : TCTGTGTCAGGGGAACAATG
<b>Exon 26</b>	F : TCACCACTTGAACCTCGCAC R : CAGGATCCAGTCAACCCAAG
<b>Exon 27</b>	F : TTTGACAATTTGCATGGCTC R : ACATGAATGAACAGGCACCC
<b>Exon 28</b>	F : TGCAGGAGAAGATTATGTGAGG R : CAAGCCTGTCCTTAAAACGC
<b>Exons 29-30</b>	F : CTAAGAGGTCAGGGTTCGTTG

	R : CGTGAAACAGTGCCACAATC
<b>Exon 31</b>	F : TCTGTTTATCCTGATCCACTAACC R : AATTCTGCAGGGTAGGAGCC
<b>Exon 32</b>	F : TCATCATGTTGTTTGGTTATGC R : TTCCAGCTGGCATGATAAG
<b>Exon 33</b>	F : ACAGTGATGAACCACTGGGG R : AGGGCCCTCAAATCTCATTC
<b>Exon 34</b>	F : AATCGCACGGTAGGATTGC R : ATAAAAGGCAGAGCCACAGC
<b>Exon 35</b>	F : GTGGGCTGTGTTTTTCATCG R : AGAATCCACTCCCACACTCAG
<b>Exon 36</b>	F : AGCTTGCCATCCATGAAG R : CATGATTCTGTGATCATCTCCC
<b>Exon 37</b>	F : TCTCTGGGGAATTAAGCCTG R : TCTTTGGAAAATGAAACGGC
<b>Exon 38</b>	F : TTGTAGTGAAAGTGAAATTCATCC R : CCCTAGAAACAGCTCCTGGC
<b>Exon 39</b>	F : TGAGCATTGTCTTGAATATG R : AGCAGCATGTCCAAAACCTCC

**Légende :** Les séquences d'amorces ont été conçues pour être situées environ 50 paires de bases avant 50 paires de bases après les différents exons, à l'aide du logiciel Primer3. Elles ont été synthétisées chez Integrated DNA Technologies.

