

Université de Montréal

**Validation fonctionnelle des variants du récepteur de l'acide rétinoïque bêta
identifiés chez le syndrome PDAC en utilisant le modèle du poisson zèbre**

Par

Claudie Comeau

Département de biochimie et médecine moléculaire, Faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de

Maîtrise en biochimie

Août 2021

© Claudie Comeau, 2021

Université de Montréal

Unité académique : Département de biochimie et médecine moléculaire/ Centre de recherche du
CHU Sainte-Justine/ Faculté de médecine / Université de Montréal

Ce mémoire intitulé

**Validation fonctionnelle des variants du récepteur de l'acide rétinoïque bêta identifiés chez
le syndrome PDAC en utilisant le modèle du poisson zèbre**

Présenté par

Claudie Comeau

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Nikolaus Heveker
Président-rapporteur

Jacques L Michaud
Directeur de recherche

Zoha Kibar
Codirectrice

Éric Samarut
Membre du jury

Résumé

L'acide rétinoïque (AR) est nécessaire au développement de plusieurs organes, dont le cerveau, les yeux, le cœur et les poumons. La perte ainsi que le gain de la signalisation de l'AR perturbent le développement de ces organes, indiquant qu'une régulation précise est nécessaire pour un développement approprié. L'AR se lie aux récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR), qui sont des facteurs de transcription qui modulent l'expression des gènes cibles. Des mutations *de novo* du gène *RARB* conduisent à un syndrome rare et sévère appelé PDAC caractérisé principalement par une hypoplasie Pulmonaire, une hernie Diaphragmatique, une Anophtalmie et/ou une microphthalmie et des anomalies Cardiaques. Au total, notre groupe a identifié 15 variants pathogènes de *RARB* chez plus de 30 patients atteints du syndrome PDAC. *In vitro*, certains de ces variants induisent un gain de fonction (GOF) tandis que d'autres agissent de manière dominante-négative (DN). L'objectif de ce projet est d'utiliser le modèle du poisson zèbre pour étudier l'impact fonctionnel des variants *RARB in vivo*. Nous avons constaté que la surexpression de l'ARN de *RARB* humain de type sauvage (WT) chez le poisson zèbre provoquait des anomalies développementales, notamment une microphthalmie, des défauts de la vessie natatoire et un œdème cardiaque, tandis que l'introduction d'une mutation non-sens (p.K102X) abolit ces effets. Nous avons testé l'impact des présumés GOF (p.R269T, p.R387C) et DN (p.M290R, p.L402P). Nous montrons que la surexpression des GOF provoque un phénotype moins sévère que celui de *RARB* WT. La co-injection des DN révèle que le variant L402P se comporte comme un DN dans un contexte développemental, alors que M290R agit comme une perte de fonction. De plus, nous avons caractérisé une lignée de poisson zèbre *rarga* *-/-*. Nous avons découvert que le poisson zèbre *rarga* *-/-* développe des défauts de la vessie natatoire et des arcs branchiaux. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliquant RARB au cours du développement pourrait aider à développer des stratégies thérapeutiques efficaces par la modulation de la signalisation de l'AR.

Mots-clés : Récepteur de l'acide rétinoïque beta, Syndrome PDAC, poisson zèbre

Abstract

Retinoic acid (RA) is required for the development of several organs, including the brain, eye, heart, and lungs. Both loss and gain of RA signalling disrupt the development of these organs, indicating that its precise regulation is required for appropriate development. RA can bind to retinoic acid receptors (RARs), which are transcription factors that modulate target gene expression. *De novo* mutations in the *RARB* gene lead to a severe, rare and complex syndrome called PDAC characterized mainly by a Pulmonary hypoplasia, Diaphragmatic hernia, Anophthalmia and/or microphthalmia and Cardiac defects. In total, our group have identified 15 pathogenic variants in *RARB* in more than 30 patients affected with PDAC. Some of these variants induce gain-of-function (GOF) whereas others act in a dominant-negative (DN) manner in cell-based transcriptional assays. The goal of this project is to use the zebrafish model to study the functional impact of *RARB* variants *in vivo*. We found that expression of wild-type human *RARB* RNA in zebrafish caused RA dependent developmental defects including microphthalmia, swim bladder defects and cardiac edema. The introduction of a non-sense variant (p.K102X) abolished these effects. We tested the impact of putative GOF (p.R269T, p.R387C) and DN (p.M290R, p.L402P) on this RARB activity. We show that overexpression of the putative GOF cause a less severe phenotype compared to the WT RARB. However, the co-injection of the putative DN reveal that variant L402P behave as a DN in a developmental context, whereas M290R does not. Also, we characterize a *rarga* mutant line carrying a frameshift deletion in the middle of the ligand binding domain. We discovered that homozygous *rarga* zebrafish are lacking inflated swimbladder and branchial arches. A better understanding of the molecular mechanism of RARB during development might help develop effective therapeutic strategies through the modulation of the RA signaling.

Key words : PDAC syndrome, retinoic acid, retinoic acid receptor beta, zebrafish

Table des matières

Résumé	4
Abstract	5
Table des matières	6
Liste des figures	9
Liste des sigles et abréviations	10
Remerciements	12
Chapitre 1 – Introduction	13
1. La voie de signalisation de l'acide rétinoïque	13
1.1 Synthèse de l'acide rétinoïque.....	13
1.2 Régulation génique de l'acide rétinoïque.....	14
1.3 Dégradation de l'acide rétinoïque	15
1.4 Implication de l'acide rétinoïque dans le développement.....	17
1.4.1 Développement de l'œil	18
1.4.2 Développement du cœur.....	18
1.4.3 Développement des poumons.....	19
2. Récepteurs de l'acide rétinoïque	20
2.1 Récepteur de l'acide rétinoïque bêta	21
2.1.1 Altération de RARB	21
3. Le syndrome PDAC	22
3.1 Variants de <i>RARB</i> chez les patients avec le syndrome PDAC	22
4. L'acide rétinoïque et le poisson zèbre	25
4.1 Les RARs chez le poisson zèbre	25
4.2 Altération de la voie de l'AR chez le poisson zèbre	26
5. Hypothèses et objectifs.....	28

Chapitre 2 – Papier	29
Chapitre 3 – Discussion et perspectives	52
6. Conclusions	60
5. Références bibliographiques	61

Liste des figures

Figure 1. Régulation de la voie de signalisation de l'acide rétinoïque	22
Figure 2. Mutations dans le gène <i>RARB</i> identifiées chez les patients atteints du syndrome PDAC	29
Figure 3. Réponse transcriptionnelle des variants <i>RARB</i> à l'ajout de l'acide rétinoïque	30
Figure 4 : Résultats attendus pour les expériences de surexpression et de co-injection d'un variant perte de fonction (LOF), gain de fonction (GOF) ou dominant négatif (DN).....	56

Liste des sigles et abréviations

ADH : Alcool Déshydrogénase

AR : Acide Rétinoïque

AR-all-trans : acide rétinolique all-trans

AR-9-cis : acide rétinolique 9-cis

BCO : Bêta-Carotène Oxygénase

BMP : Bone morphogenetic protein

CRABP : *cellular retinoic acid binding protein*

CYP26 : Cytochrome P450 26

DEAB : diethylaminobenzaldehyde

DBD : domaine de liaison à l'ADN

Dpf : *Day post fertilization*

FGF : Fibroblastic growth factor

GDF : Gain De Fonction

HAT : histone acétyltransférase

HEK : *Human Embryonic Kidney*

HDAC : histone désacétylase

Hox : *Homeobox gene*

LBD : domaine de liaison au ligand

LBP : *Ligand binding pocket*

MO : morpholinos

NCOA : coactivateurs des récepteurs nucléaires

NCOR : corépresseurs des récepteurs nucléaires

Pax6 : *Paired box 6*

Pitx2 : *Paired like homeodomain 2*

PHPV : persistent and hyperplastic primary vitreous body

PDAC : *Pulmonary, Diaphragmatic, Anophthalmia, Cardiac*

RAR : Récepteur de l'Acide Rétinoïque

RARB : Récepteur Bêta de l'Acide Rétinoïque

RARE : *Retinoic acid response element*

RALDH : Rétinaldéhyde déshydrogénase

RBP4 : *Retinol Binding Protein 4*

RDH10 : Rétinol Déshydrogénase 10

RXR : Récepteur X de l'acide Rétinoïque

Shh : Sonic hedgehog

STRA6 : *signaling receptor and transporter of retinol 6*

Tgf : *Transforming growth factor*

VAD : Vitamin A deficiency

WISH : *whole-mount in situ hybridization*

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué au succès de ma maîtrise et qui m'ont aidée lors de la rédaction de ce mémoire. Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance aux personnes suivantes pour leur contribution. La dernière année a été marquée par la COVID-19 et je souhaite souligner la recherche qui a mené aux vaccins ainsi que le travail extraordinaire des services de santé qui ont tenu à bout de souffle notre système hospitalier.

Je souhaite avant tout remercier mon directeur de recherche Dr. Jacques Michaud pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir donné l'occasion de travailler sur un projet motivant, de même que pour son support et sa confiance. Également, je remercie ma co-directrice Zoha Kibar pour sa disponibilité.

J'aimerais exprimer ma gratitude aux membres du laboratoire du Dr. Michaud et du Dr. Kibar : Christina Nassif pour sa gentillesse et sa générosité, monsieur Marc Danik pour sa sagesse et particulièrement merci à Marie-Claude Guyot pour sa précieuse aide, son écoute et ses conseils. Je souhaite également remercier les étudiants que j'ai eu la chance de côtoyer durant ces deux belles années : Nicolas Lemmetti, Sandrine St-Onge, Mingquin Wang et Marianne Mengus. Un merci plus spécial à Devanshi Shah et Ève Racette pour votre support et amitié. En bref, vous avez été comme une famille pour moi et je me considère extrêmement chanceuse d'avoir été entourée de personnes aussi formidables.

Je remercie ma famille pour leur soutien constant et leurs encouragements à travers ces nombreuses années d'étude qui m'ont mené aux études supérieures. Une mention spéciale aux nouveaux arrivés dans la famille, James et Emma, qui ont ensoleillé les deux dernières années et qui rendent matante très fière. Je souhaite également remercier mon support quotidien pour croire en moi bien plus que je crois en moi-même, merci mon amour je t'aime.

Chapitre 1 – Introduction

1. La voie de signalisation de l'acide rétinoïque

L'acide rétinoïque (AR) est un métabolite liposoluble de la vitamine A. L'AR joue un rôle essentiel dans le développement embryonnaire ainsi que chez l'adulte. Au cours de l'embryogénèse, l'AR est impliqué dans le développement de nombreux organes incluant le cœur, les poumons, les yeux et les membres (Ghyselinck and Duester 2019). Chez l'adulte, la vitamine A permet essentiellement la régulation de la fertilité, le maintien d'une vision normale, et la prévention de la croissance anormale des cellules et des maladies neurodégénératives (Niederreither and Dolle 2008). Une augmentation ou une déprivation de vitamine A affecte le développement et la vie adulte, ainsi la compréhension de la voie de signalisation de l'AR est primordiale dans l'étude de ses fonctions.

1.1 Synthèse de l'acide rétinoïque

L'acide rétinoïque est dérivé du rétinol, une forme active de la vitamine A. Le rétinol provient de l'alimentation pour la majorité des animaux puisqu'elle ne peut être synthétisée *de novo* (Rhinn and Dolle 2012). Au cours du développement, le rétinol est transmis à l'embryon par la mère à travers le placenta chez les mammifères. Chez les ovipares, comme le poulet ou le poisson zèbre, la vitamine A provient du sac vitellin et on la retrouve principalement sous forme de rétinol, rétinaldéhyde ou de carotène (Simões-Costa, Azambuja, and Xavier-Neto 2008). Normalement chez les mammifères, le rétinol se retrouve en circulation sous forme lié à RBP4 (retinol binding protein 4) (Figure 1) (Niederreither and Dolle 2008). Au cours du développement, le RBP4 maternel ne peut traverser la barrière placentaire, alors le rétinol diffuse à travers le placenta ou le sac vitellin et se lie ensuite au RBP4 embryonnaire (Maw et al. 1997). Le transport du rétinol-RBP4 vers l'intérieur de la cellule s'effectue par la protéine membranaire STRA6 (signaling receptor and transporter of retinol) (Pasutto et al. 2007).

Une fois le rétinol transporté à l'intérieur de la cellule, celui-ci peut être synthétisé en AR. La voie canonique de synthèse de l'AR se traduit par deux étapes d'oxydation, soit l'oxydation

séquentielle du rétinol en rétinaldéhyde, puis en AR (Figure 1) (Duester 1996). Plus précisément, le rétinol est transformé par un enzyme de la famille des déshydrogénases en rétinaldéhyde. L'enzyme principale qui effectue cette transformation est le rétinol déshydrogénase 10 (RDH10), mais la réaction peut également être possible grâce à des alcools déshydrogénases (ADHs) par exemple ADH1, ADH5 ou ADH7 (Niederreither and Dolle 2008). Ensuite, le rétinaldéhyde peut être transformé en AR par une rétinaldéhyde déshydrogénase (RALDH1 à RALDH3) (Niederreither and Dolle 2008). L'AR intracellulaire est lié à la protéine de liaison cellulaire de l'AR (CRABP) (Zhang et al. 1992).

Une voie alternative de synthèse de l'AR a été récemment identifiée. Cette voie alternative est un vestige d'une ancienne voie présente chez les premiers organismes chordés, et possiblement non-chordés. De plus, c'est la voie principale utilisée chez certaines espèces marines, dans lesquelles le rétinaldéhyde et des caroténoïdes sont conservés dans le sac vitellin au cours du développement. Le bêta-carotène stocké dans le sac vitellin est transformé directement en rétinaldéhyde par l'oxygénase bêta-carotène (Bco) suivie d'une dernière étape d'oxydation pour synthétiser l'AR (Simões-Costa, Azambuja, and Xavier-Neto 2008). En effet, une étude a démontré l'importance de cette voie alternative chez le poisson zèbre (Lampert et al. 2003). Les embryons injectés avec un morpholino contre *bco* ont développé un phénotype morphologique qui comprenait une malformation des yeux, du squelette crâniofacial et des nageoires pectorales, ainsi qu'une pigmentation réduite.

1.2 Régulation génique de l'acide rétinoïque

Dans les années 1980s, il a été démontré pour la première fois que l'AR est le ligand de plusieurs récepteurs nucléaires pour le contrôle direct de la transcription de gènes cibles. La voie de signalisation de l'AR est impliquée dans la régulation de nombreux gènes essentiels au développement embryonnaire. Chez les gènes cibles de l'AR, une séquence spécifique appelée élément de réponse à l'AR (RARE) est située en amont du promoteur (Giguere et al. 1987; Petkovich et al. 1987). Cette séquence est reconnue par l'hétérodimère constitué du récepteur de l'AR (RAR) et du récepteur X de l'AR (RXR) (Leid, Kastner, and Chambon 1992; Giguere et al. 1987). Des centaines de gènes ont été identifiés avec un élément RARE, incluant de nombreux gènes de la voie de signalisation de l'acide rétinoïque comme *Adh7*, *Raldh1*, *Cyp26a1*, *Rara*, *Rarb* et *Rarg*. Cette rétroaction assure une régulation précise de la voie de signalisation. Également,

plusieurs membres de la famille des gènes codant pour des facteurs de transcription à homéodomaine contiennent un élément RARE, incluant *Hoxa1*, *Hoxb1*, *Hoxa4*, *Pax6* et *Pitx2* (Balmer and Blomhoff 2002, 2005).

Les hétérodimères RAR-RXR sont des facteurs de transcription inductibles par un ligand soit l'AR. Le modèle classique de régulation de la transcription par l'AR postule qu'en absence de ligand, l'hétérodimère RAR-RXR reste lié au RARE et recrute des corépresseurs des récepteurs nucléaires (NCORs), qui à leur tour s'associent à d'autres facteurs comme des histones désacétylases (HDACs) ou des ADN-méthyl transférases, réprimant ainsi directement la transcription (Kurokawa et al. 1995; Chen and Evans 1995). La liaison de l'AR aux récepteurs RAR-RXR entraîne un changement de conformation qui induit le recrutement de coactivateurs des récepteurs nucléaires (NCOAs) comme des histones acétyltransférases (HAT). De plus, les NCOAs se lient spécifiquement aux RARs et non aux RXRs, ce qui est consistant avec le fait que RAR est l'élément central de régulation de l'hétérodimère RAR-RXR (Rochel et al. 2011). Cependant, des exceptions au modèle classique de régulation de l'AR ont été observées au cours des dernières années. Certains auteurs ont attribué les phénotypes développementaux causés par la perte des RARs à un manque d'activation des gènes cibles, et non à une déficience de la répression des gènes cibles de l'AR (Mendelsohn et al. 1994; Lohnes et al. 1994; Waxman and Yelon 2011). Toutefois, *Fgf8* et *Hoxb1* sont deux gènes pour lesquels le recrutement de l'AR par l'hétérodimère RAR-RXR entraîne une répression de la transcription (Kumar and Duester 2014; Studer et al. 1994).

1.3 Dégradation de l'acide rétinoïque

La voie métabolique de l'acide rétinoïque doit être bien contrôlée vu son importance pour le développement embryonnaire. Ce contrôle étroit de la distribution de l'AR est en partie dû à sa voie de dégradation. En effet, dans les cellules exprimant le cytochrome P450 26 (CYP26), l'AR est transformé en métabolites polaires appelés 4-hydroxy-RA puis en 4-oxo-RA qui seront dirigés vers la voie de dégradation ou utilisés comme métabolites (Rhinn and Dolle 2012). La présence de trois CYP26 a été démontré chez l'humain, soit CYP26A1, CYP26B1 et CYP26C1, et chacun des CYP26 a un domaine d'expression unique au cours de l'embryogenèse (Niederreither and Dolle 2008). *CYP26A1* a été identifié pour la première fois comme un gène étant régulé par l'AR (White et al. 1996). Cette découverte a démontré que la voie métabolique de l'AR est rétroactive.

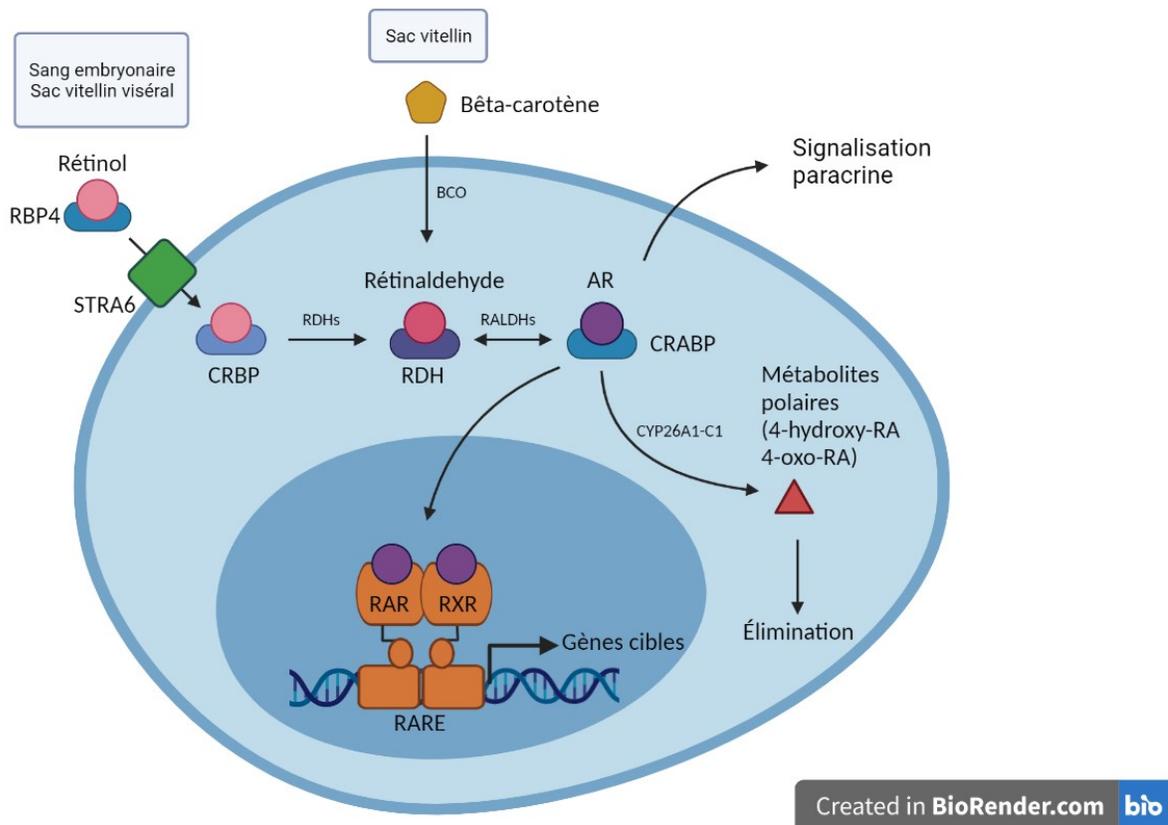


Figure 1. Régulation de la voie de signalisation de l'acide rétinoïque. Les sources d'AR en circulation sont le rétinol ou le bêta-carotène (chez les ovipares). Le rétinol lié à RBP4 est transféré dans les cellules grâce au récepteur STRA6. Le rétinol intracellulaire est transformé en rétinaldéhyde principalement à partir de l'enzyme RDH10, tandis que le bêta-carotène forme le rétinaldéhyde par clivage de l'enzyme BCO. Le rétinaldéhyde est ensuite converti en AR par une rétinaldéhyde déshydrogénase (RALDHs). L'AR se lie à l'hétérodimère RAR-RXR situé sur l'élément de réponse à l'AR (RARE) en amont des gènes cibles afin de modifier leur expression. La dégradation de l'AR est effectuée par l'enzyme CYP26A1-C1 qui transforme l'AR en métabolites polaires qui seront éliminés.

1.4 Implication de l'acide rétinoïque dans le développement

L'importance de la voie de signalisation de l'AR au cours du développement embryonnaire est connue depuis les années 1950. L'une des premières études montrant l'importance de la vitamine A pour le développement a été publiée en 1953 décrivant le syndrome de déficience en vitamine A (« VAD syndrome ») (Wilson, Roth, and Warkany 1953). Dans cette étude, les rats étaient nourris avec une diète sans vitamine A, ce qui a causé un syndrome néonatal complexe touchant le développement de plusieurs organes.

Étonnamment, un excès de vitamine A cause des malformations semblables au syndrome de déficience en vitamine A chez la souris (Lee et al. 2012). Nous connaissons mal les mécanismes par lesquels une perte et un gain de RA causent ces anomalies. Une étude récente suggère que l'administration d'un excès de vitamine A cause de façon paradoxale une réduction de la teneur en RA dans tout l'embryon (Lee et al. 2012). Suite à l'excès de AR, ces auteurs observent une augmentation significative des enzymes qui dégradent l'AR (CYP26A1 et CYP26B2) et une diminution des enzymes qui font la synthèse de l'AR (RALDHs). L'hypothèse de ce groupe de recherche est que l'excès de AR entraîne une déficience prolongée de AR par une inactivation de sa synthèse et une activation de sa dégradation. Également, un autre groupe a démontré chez le poisson zèbre que la délétion des Rars entraîne un mécanisme de rétroaction positive causant une augmentation tératogène en AR (D'Aniello et al. 2013). En effet, il semble que la diminution de la transcription causée par l'absence des RARs entraîne un mécanisme de compensation trop important. Mises ensemble, ces études démontrent encore une fois l'importance des mécanismes de régulation et l'équilibre fragile de la voie de l'AR au niveau du développement.

De nombreux gènes impliqués dans le développement embryonnaire sont directement régulés par la voie de signalisation de l'AR. Les gènes *Hox* sont probablement parmi les gènes possédant des éléments RAREs les mieux caractérisés. Effectivement, l'AR active les gènes *Hox* qui sont nécessaires pour l'établissement de l'axe antéropostérieur au niveau du tronc, de la neurogenèse et de la formation des somites (Cunningham and Duester 2015). Un défaut dans la régulation des gènes *Hox* par la signalisation de l'AR entraîne des défauts au niveau du cerveau postérieur. En effet, un cerveau postérieur et des vertèbres anormales sont observés chez les modèles de souris déficients pour le gène suivant : *Raldh2*, *Cyp261a*, *Rara*, *Rarb* et *Rarg* (Mic et al. 2002; Abu-Abed et al. 2001; Ghyselinck et al. 1997). Aussi, le développement des membres

dépend de cette voie. Il a été démontré que l'AR stimule l'initiation du développement des avant-bras par la répression de *Fgf8* (Zhao et al. 2009). Il est clair que l'AR n'est pas seul dans le contrôle de ces organes. Durant le développement, le lien entre l'AR et plusieurs autres voies de signalisation a été démontré abondamment. Par exemple, la voie de l'AR interagit avec WNT, *sonic hedgehog* (SHH), *fibroblastic growth factor* (FGF), *bone morphogenetic protein* (BMP) et Nodal (Stavridis, Collins, and Storey 2010; Engberg et al. 2010; Metallo et al. 2008; Liu et al. 2012).

1.4.1 Développement de l'œil

Le voie de signalisation de l'AR est essentielle au développement de l'œil. Durant le développement de l'œil, l'AR est généré par RDH10 et des ALDHs au niveau de la rétine dorsale et ventrale (Molotkov, Molotkova, and Duester 2006; Cañestro et al. 2009). La perte de l'AR entraîne une croissance excessive du mésenchyme entourant l'œil. En temps normal, l'AR active la transcription de *Pitx2* qui permet de limiter la croissance du mésenchyme péri optique par l'inhibition de la voie WNT (Kumar and Duester 2010; Ghyselinck and Duester 2019). De plus, plusieurs études ont démontré que la perte de fonction de plusieurs protéines impliquées dans la voie de signalisation de l'AR (ex : RDH10, RALDH3 et RARB) entraîne un développement anormal de l'œil (Ghyselinck et al. 1997; Cunningham et al. 2011; Keegan et al. 2005). En effet, la souris *Rarb*^{-/-} présente des anomalies au niveau de l'œil incluant un vitré primaire persistant et hyperplasique (PHPV). Le vitré primaire est une structure transitoire chez l'embryon qui est formé par le mésenchyme péri optique et qui disparaît au cours du développement pour faire place à la vésicule optique (Ghyselinck et al. 1997). Le PHPV observé chez les souris *Rarb*^{-/-} est causé par un manque d'inhibition du mésenchyme entourant l'œil. Chez le poisson zèbre, une déficience en AR lors du développement de l'œil cause également des défauts oculaires incluant la microphthalmie, anophthalmie et colobome (Le, Dowling, and Cameron 2012; Casey et al. 2011).

1.4.2 Développement du cœur

Le cœur est un autre organe d'importance qui nécessite l'AR pour son développement. Des défauts cardiaques ont été caractérisés, entre autres, chez le rat, la souris et le poisson zèbre lors d'une déficience ou un excès en AR (Wilson, Roth, and Warkany 1953; Niederreither et al. 2001; Keegan et al. 2005). Entre autres, la souris *Raldh2*^{-/-} possèdent de nombreux déficits cardiaques, incluant une communication interauriculaire et une dilatation des ventricules (Niederreither et al.

2001). Chez le poisson zèbre, une diminution de l'AR cause une hypertrophie du cœur. Des études chez le poisson zèbre ont démontré que l'AR est nécessaire pour restreindre la croissance des cellules progénitrices cardiaques. En effet, une diminution de l'AR entraîne une augmentation de la formation de cardiomyocytes (Keegan et al. 2005; Waxman et al. 2008). Selon des études effectuées chez la souris et le poisson zèbre, ce phénomène serait dû à la restriction de la signalisation de FGF8 par la voie de l'AR lors du développement du cœur (Sorrell and Waxman 2011; Sirbu, Zhao, and Duester 2008).

1.4.3 Développement des poumons

L'AR est également impliqué dans la morphogénèse d'organes qui se développent sous forme de bourgeon comme les poumons, les reins et le pancréas (Wang et al. 2006; Martín et al. 2005; Batourina et al. 2001). Concernant les poumons, l'AR joue un rôle clé durant le développement de l'intestin antérieur où naissent les poumons. Plus précisément, l'AR interagit avec les voies de signalisation WNT et TGF β et permet la régulation de *Fgf10* lors de la formation du poumon primaire chez la souris (Chen et al. 2010; Desai et al. 2004). Des anomalies pulmonaires sont une conséquence d'une altération de la voie de l'AR. En effet, les souris *Raldh2*^{-/-} et les souris exposées à une carence en AR lors de la gestation présentent une agénésie pulmonaire (Wang et al. 2006; Desai et al. 2006).

La vessie natatoire chez le poisson zèbre est le pendant des poumons des mammifères (Perry et al. 2001). Chez le poisson zèbre comme chez la souris, la voie de signalisation Wnt est impliquée dans la formation de la vessie natatoire (Yin et al. 2011). En revanche, la voie de l'AR n'a pas encore été mise en relation avec le développement de cette structure.

2. Récepteurs de l'acide rétinoïque

En 1987, deux groupes de recherche indépendants découvrent le récepteur qui est capable de lier l'AR, le récepteur de l'acide rétinoïque (RAR) (Giguere et al. 1987; Petkovich et al. 1987). Les RARs se lient principalement à l'acide rétinoïque all-*trans* (AR-at). Chez les mammifères, il y a trois RARs soit RARA, RARB et RARG. Les RARs ont des domaines à la fois spécifiques et redondants entre les sous-types. De plus, les RARs diffèrent par leur habilité à recruter un corépresseur. En effet, RARA possède une très grande affinité pour les corépresseurs et réprime ainsi fortement la transcription, tandis que RARB et RARG interagissent faiblement avec les corépresseurs et ne répriment pas la transcription (Farboud et al. 2003). La structure de la protéine des RARs est composée de deux domaines majeurs, soit le domaine de liaison à l'ADN et le domaine de liaison au ligand (LBD) (Alvarez et al. 2007; Brand et al. 1988). Le LBD est responsable de la liaison avec l'AR, la dimérisation des récepteurs et l'interaction avec des coactivateurs. De plus, la pochette de liaison au ligand (LBP) est une région extrêmement conservée et seulement 3 résidus diffèrent entre les sous-types de RARs ce qui conférerait une spécificité de chacun (Géhin et al. 1999; Gutierrez-Mazariegos et al. 2016). Un domaine d'activation permettant la liaison de coactivateurs et d'autres facteurs de transcription se retrouve à la portion C-terminale du LBD au niveau de l'hélice 12 (Alvarez et al. 2007; Desai et al. 2004).

Les RXRs ont également été identifiés sous 3 formes, alpha, beta et gamma. Il a été postulé que l'acide rétinoïque 9-*cis* (AR-9-*cis*) est le ligand des RXRs (de Lera, Krezel, and Ruhl 2016). Cependant, contrairement à l'AR-all-*trans*, l'AR-9-*cis* n'est pas essentiel lors du développement et ne peut être détecté de manière endogène dans les tissus embryonnaires ou adultes (Mic et al. 2003). La forme all-*trans*-RA est celle que l'on retrouve majoritairement, mais la présence et l'importance du stéréo-isomère AR-9-*cis* est encore incertaine aujourd'hui. En revanche, des recherches récentes ont révélé un ligand RXR présent de manière endogène, le 9-*cis*-13-14-dihydroretinoïc (de Lera, Krezel, and Ruhl 2016). Les récepteurs RARA, RXRA et RXRB sont exprimés de manière répandue au cours du développement, tandis que les récepteurs RARB, RARG et RXRG montrent un patron d'expression spécifique pour certains tissus selon plusieurs études effectuées chez la souris et chez le poulet (Rhinn and Dolle 2012).

2.1 Récepteur de l'acide rétinoïque bêta

Le récepteur de l'acide rétinoïque bêta (RARβ) est le deuxième récepteur de l'acide rétinoïque à avoir été identifié dans les années 1980 (Brand et al. 1988). RARβ est l'un des trois RARs formant un hétérodimère avec un RXR pouvant lier un RARE et ainsi réguler directement la transcription d'un gène cible en présence du ligand. Le principal partenaire de RARβ est RXRγ, même s'il peut se lier à d'autres sous-types de récepteurs X (Ghyselinck et al. 1997). Chez l'embryon de poulet, l'expression de RARβ a été rapporté au niveau du rhombomère 7 et de la colonne vertébrale, tandis que chez l'embryon de souris, RARβ est exprimé au niveau du mésenchyme, de l'endoderme antérieur, de la plaque latérale du mésoderme, du mésonéphros, du bourgeon des membres et du striatum (Dollé et al. 1989; Smith and Eichele 1991; Ruberte et al. 1991; Ruberte et al. 1993).

2.1.1 Altération de RARβ

La perte de fonction de RARβ a principalement été étudiée chez la souris. La mutation homozygote de *Rarb* est viable, mais cause plusieurs malformations. En effet, la perte de fonction de RARβ chez la souris cause un déficit de croissance, des anomalies vertébrales, des anomalies oculaires et des défauts locomoteurs (Ghyselinck et al. 1997). Selon l'étude de Ghyselinck et al en 1997, les souris avec la perte de fonction de RARβ ont la même longévité que les souris de type sauvage, mais présentent une diminution du poids total d'environ 20% durant les 60 premiers jours de vie (Ghyselinck et al. 1997). Au niveau du développement de l'œil, RARβ est essentiel pour l'involution normale des fibroblastes du corps vitré primaire (Ghyselinck et al. 1997). Ce groupe a observé un PHPV, des cataractes et un repli congénital de la rétine chez les souris avec la perte de fonction de RARβ. Au niveau des vertèbres, une malformation des trois premières vertèbres cervicales, soit une fusion de l'arche antérieure de la C1 avec la C2, a été décrite chez la souris *Rarb*^{-/-} (Ghyselinck et al. 1997). Les poumons et le cœur sont normaux pour les souris *Rarb*^{-/-}, tandis que les doubles mutants *Rarb*^{-/-};*Rara*^{-/-} possèdent des défauts au niveau des poumons et du cœur (Luo et al. 1995; Luo et al. 1996; Ghyselinck et al. 1997). En effet, les triples mutants *Rarb*^{-/-};*Rara*^{-/-};*Rarg*^{-/-} présentent des phénotypes beaucoup plus sévères, se rapprochant des défauts développementaux observés dans le syndrome VAD.

3. Le syndrome PDAC

La combinaison d'une hernie du diaphragme, d'une hypoplasie pulmonaire, d'une anophthalmie et/ou microphtalmie et de défauts cardiaques est caractéristique du syndrome PDAC (Chitayat et al. 2007). L'acronyme PDAC (Pulmonary, Diaphragmatic, Anophthalmia, Cardiac) représente les phénotypes cliniques cardinaux du syndrome, mais il est également connu sous le nom de syndrome Matthew-Wood et syndrome Spear. Les défauts développementaux présents dans le syndrome PDAC demeurent sévères et le taux de survie néonatale est faible. Une mutation récessive de *STRA6*, le transporteur membranaire qui permet l'entrée du rétinol dans la cellule, a été identifiée chez certains patients avec le syndrome de PDAC (Kawaguchi et al. 2007; Pasutto et al. 2007). Cependant, aucune autre cause génétique n'avait été identifiée chez les patients et la majorité des cas du syndrome PDAC restait idiopathique.

3.1 Variants de *RARB* chez les patients avec le syndrome PDAC

En 2013, une étude réalisée dans le laboratoire a permis d'identifier un autre gène causal pour le syndrome PDAC, *RARB* (Srouf et al. 2013). Dans cet article, le séquençage de l'exome de 15 patients avec PDAC a été effectué, permettant d'identifier des variants récessifs et dominants touchant *RARB*. Les variants récessifs de *RARB* c.355C>T (p.Arg199*) et c.1201_1201insCT (p.Ile403Serfs*) ont été identifiées dans une famille précédemment décrite dans (Chitayat et al. 2007) où le gène *STRA6* avait été séquençé; toutefois aucune mutation n'avait été identifiée. Chez cette famille, les parents ont deux filles en bonne santé et quatre enfants atteints du syndrome PDAC (Figure 2A). De plus, deux variants dominants *de novo* touchant le même acide aminé ont été découverts, soit le variant c.1159C>T (p.Arg387Cys) et le variant c.1159C>A (p.Arg387Ser). Le variant p.Arg387Cys a été identifié dans deux familles distinctes, tandis que la mutation p.Arg387Ser a été découverte chez une famille (Figure 2B-D). En effet, les deux variants dominants sont de type faux-sens et touchent le même codon, ce qui démontre l'importance de celui-ci pour le fonctionnement du récepteur.

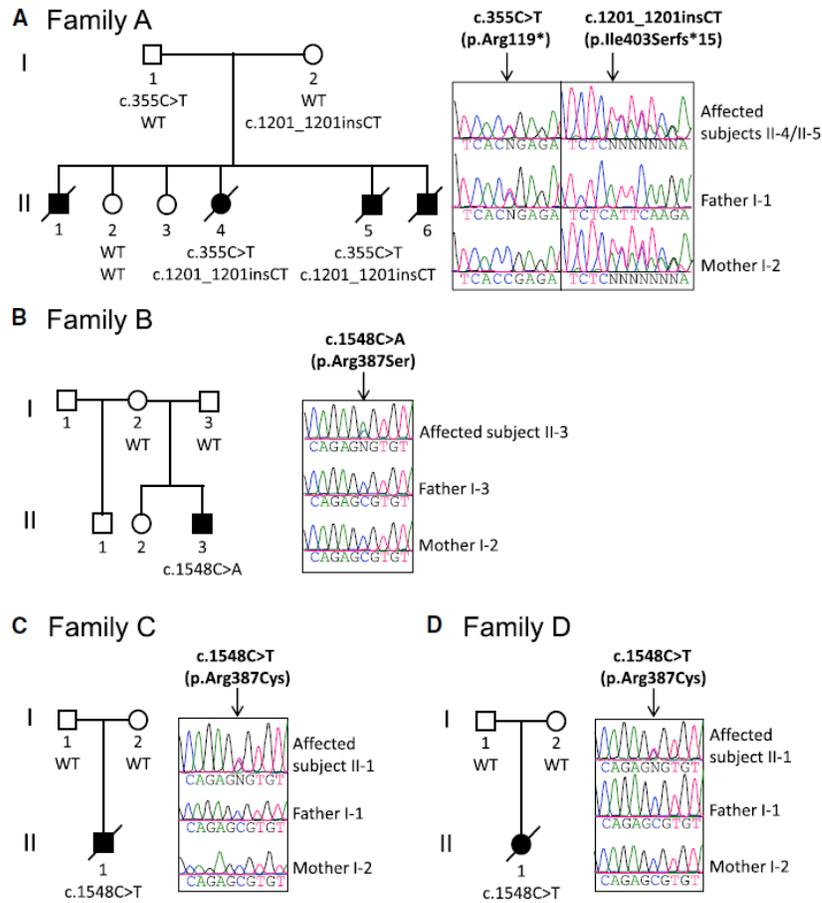


Figure 2. Mutations dans le gène *RARB* identifiées chez les patients atteints du syndrome PDAC. Le séquençage de Sanger a confirmé la ségrégation des mutations récessives dans *RARB* dans la famille A (A) et a révélé que les mutations étaient *de novo* dans les familles B (B), C (C) et D (D). La figure provient de l'article suivant (Srour et al. 2013).

Des expériences effectuées *in vitro* ont démontré que les deux variants dominants touchant l'acide aminé 387 augmentent la réponse transcriptionnelle de *RARB* au ligand, tandis que les variants récessifs p.Arg199* et p.Ile403Serfs* l'abolissent (Figure 3) (Srour et al. 2013). Les expériences de transfection cellulaire effectuées dans l'article suggèrent un mécanisme de gain-de-fonction (GOF) pour les variants dominants p.Arg387Cys et p.Arg387Ser. L'hypothèse décrite était que ces substitutions d'un acide aminé entraînent un changement de conformation qui augmenterait la stabilité du récepteur ou qui favoriserait la liaison à l'AR ou le recrutement de coactivateur. La mutation la plus récurrente chez les patients est la mutation p.Arg387Cys (R387C),

soit identifiée chez environ 40% des patients. Des recherches plus approfondies sont nécessaires pour démystifier les mécanismes moléculaires sous-jacent aux défauts multi-systémiques causés par les variants de *RARB*.

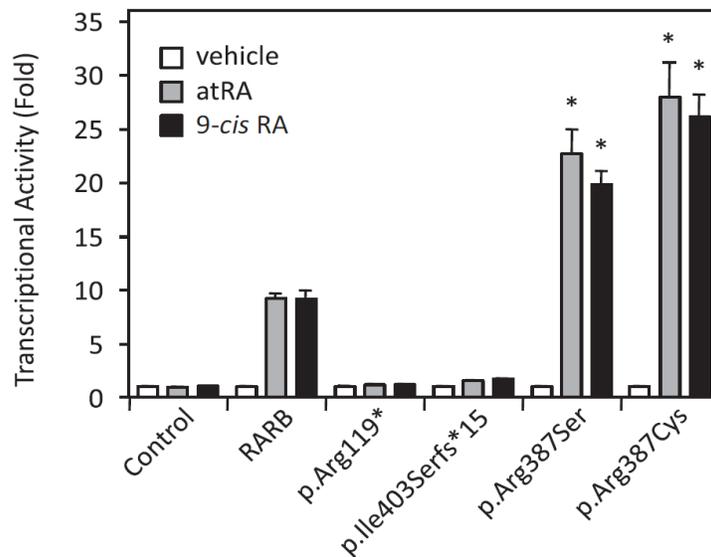


Figure 3. Réponse transcriptionnelle des variants *RARB* à l'ajout de l'acide rétinolique.

Les cellules HEK293 ont été transfectées avec un plasmide contenant *RARB* humain de type sauvage ou les variants génétiques indiqués en présence de la construction du gène rapporteur UAS_{tk}Luc. Les cellules ont été traitées avec 1 M de at-RA, 1 M de 9-cis RA ou un véhicule (DMSO ; 1/1 000, v/v) pendant 16 heures. Les valeurs de luciférase ont été normalisées par rapport à l'activité β -galactosidase. La figure provient de l'article suivant (Srour et al. 2013).

En 2016, deux nouveaux variants *de novo* de *RARB* ont été découverts, soit les variants p.Leu213Pro et p.Gly296Ala (Srour et al. 2016). La réponse transcriptionnelle *in vitro* au ligand est augmentée pour ces deux variants. Depuis 2016, l'équipe du Dr Michaud a identifié au total 15 variants dominants du gène *RARB* (résultats non publiés) chez des patients atteints du syndrome PDAC. Ces variants se trouvent tous dans le LBD de *RARB*. Ces variants dominants peuvent être classés en deux catégories, ceux qui augmentent et ceux qui diminuent la réponse transcriptionnelle *in vitro* au ligand. Selon le mécanisme de GOF, l'augmentation de la réponse transcriptionnelle

causeraient les phénotypes décrits dans le syndrome de PDAC par la suractivation des gènes cibles ou par une rétroaction négative de la voie de l'AR. Chez certains variants, la diminution de la réponse transcriptionnelle peut être expliquée selon deux mécanismes, la perte de fonction (LOF) ou la dominance négative (DN). Puisque les variants sont dominants chez les patients, le mécanisme de LOF impliquerait une haploinsuffisance de RARB. D'autre part, un variant DN agit négativement sur la fonction de l'allèle normale. Dans notre cas, le variant DN de RARB pourrait lier l'ADN sans pouvoir activer la transcription et ainsi prendre la place d'une forme fonctionnelle de RARB. De façon paradoxal, la diminution de la réponse transcriptionnelle cause également chez les patients un syndrome de PDAC. Des études approfondies sur les mécanismes d'action des variants RARB sont nécessaire afin de mieux comprendre ce paradoxe.

4. L'acide rétinoïque et le poisson zèbre

Le poisson zèbre est un modèle puissant pour l'étude des défauts qui se produisent durant le développement grâce à ces nombreux avantages. En outre, le développement de l'embryon est externe et rapide, donc tous les stades de l'embryogénèse peuvent être observés avec facilité. Également, la transparence de l'embryon permet de visualiser des structures comme le cœur et les yeux et est très avantageuse pour plusieurs techniques comme l'hybridation *in situ* et l'immunofluorescence. Les études sur l'effet des drogues sont simples et consiste à l'ajout du traitement directement dans l'aquarium. Comparé à d'autres espèces de vertébrés, l'ancêtre du poisson zèbre a subi une série supplémentaire de duplication du génome entier, ce qui explique la présence en double d'un grand nombre d'orthologues (Meyer and Schartl 1999). 71.4 % des gènes humains ont au moins un gène orthologue chez les poissons zèbres (Vilella et al. 2009).

4.1 Les Rars chez le poisson zèbre

Le poisson zèbre possède deux Rars alpha (Raraa et Rarab) et deux Rars gamma (Rarga et Rargb), mais ne possède pas de sous-type bêta (Waxman and Yelon 2007; Hale et al. 2006). Chez la souris et le poisson zèbre, il existe une certaine redondance au niveau de la fonction des RARs au cours du développement, mais quelques fonctions demeurent spécifiques à un sous-type de récepteur (Lohnes et al. 1994; Mendelsohn et al. 1994; Linville et al. 2009). Chez le poisson zèbre, les 4 Rars sont nécessaire à la formation du gradient antéro-postérieur dans le cerveau postérieur,

tandis que *Rarga* est spécifique à la formation du mésoderme crânien, et *Rarab* est requis pour le développement des nageoires pectorales (Linville et al. 2009).

L'orthologue de *RARB* chez le poisson zèbre est *rarga* avec un pourcentage d'identité de 79. *Rarga* est exprimé de façon spécifique au niveau du mésoderme crânien et est essentiel à la formation des arcs pharyngés (Linville et al. 2009). En effet, la perte seul de *rarga* par l'injection de MO entraîne des malformations au niveau des arcs pharyngés postérieurs (Linville et al. 2009). De plus, selon l'analyse de l'abondance relative des Rars chez le poisson zèbre, *Rarga* est le plus exprimé dans les premiers jours embryonnaire (Oliveira et al. 2013).

4.2 Altération de la voie de l'AR chez le poisson zèbre

La voie métabolique de l'AR chez le poisson zèbre est conservée et bien caractérisée dans la littérature. Des études antérieures ont montré qu'une carence en vitamine A cause chez le poisson zèbre de nombreuses malformations incluant une microphthalmie, un œdème cardiaque, des défauts crâniofaciaux et un axe corporel incurvé (Le, Dowling, and Cameron 2012; Waxman and Yelon 2011). Ces articles décrivent les effets au cours du développement du traitement avec le diéthylaminobenzaldéhyde (DEAB), un inhibiteur de l'enzyme *Raldh* qui participe à la synthèse de l'AR. Également, il existe deux modèles de poisson zèbre mutant pour le gène *raldh2*, *neckless* et *no-fin* (Begemann et al. 2001; Grandel et al. 2002). Les poissons zèbres déficients pour l'enzyme de synthèse de l'AR présentent de nombreuses anomalies développementales incluant une absence de nageoires pectorales, une absence d'arcs branchiaux, un œdème cardiaque et une vessie natatoire non gonflée à 5 jours post fertilisation (dpf).

La régulation du niveau d'AR au cours du développement a été étudiée chez le poisson zèbre. Comme mentionné précédemment, la délétion des Rars entraîne un mécanisme de rétroaction positive causant une augmentation tératogène en AR (D'Aniello et al. 2013). Plus précisément, la perte du gène *rarab1*, un isoforme conservé de *RAR*, cause un œdème cardiaque et une augmentation du nombre de cardiomyocyte. De façon surprenante, l'expression des gènes cibles de l'AR (*hoxb5b*, *cyp26a1*, *dhhrs3a*, *hoxb5a* et *hoxb6b*) est augmentée chez les embryons déficient pour *rarab1* (D'Aniello et al. 2013). Ces résultats suggèrent un nouveau mécanisme de rétroaction qui pourrait expliquer les similitudes entre les effets tératogènes et une carence en AR.

De plus en plus, les expériences sur le poisson zèbre sont incluses dans les études sur les maladies humaines, fournissant une vérification de l'implication d'un gène dans une maladie humaine (Roscioli et al. 2012; Howe et al. 2013; Kalaskar et al. 2020). Par exemple, le poisson zèbre a été utilisé comme modèle lors de l'étude de l'implication du gène *STRA6* dans le développement isolé de défauts oculaires (Casey et al. 2011). L'altération de *STRA6* a été précédemment impliquée dans le syndrome Matthew-Wood, ou PDAC. Dans cet article, les auteurs se concentrent principalement sur les défauts oculaires causés par l'inhibition de l'AR, cependant d'autres anomalies développementales sont présentes incluant des défauts au cœur et de la vessie natatoire. Plus récemment, une mutation de *RARB* a récemment été identifiée causant un colobome oculaire, malformation congénitale de l'œil causant une fissure optique (Kalaskar et al. 2020). Une mutation au niveau du domaine de liaison à l'ADN de *RARB* a été identifiée à la suite d'un dépistage de 66 familles présentant un cas de colobome oculaire. Les expériences sur le poisson zèbre ont confirmé l'implication du gène *RARB* dans le développement du colobome. En effet, la perte de fonction par MO chez le poisson zèbre du gène *rarga*, l'orthologue de *RARB* humain (*hRARB*), cause un colobome et le phénotype peut être légèrement réduit par la présence de l'ARNm *hRARB* (Kalaskar et al. 2020).

5. Hypothèses et objectifs

À ce jour, notre laboratoire a identifié 15 variants pathogènes dominants de *RARB* chez des patients atteints du syndrome PDAC. Le syndrome PDAC est un défaut développemental multi systémique défini par une hypoplasie pulmonaire, une hernie diaphragmatique, une microphthalmie et des malformations cardiaques. Dans le but d'en apprendre davantage sur le mécanisme responsable du syndrome PDAC pour les variants *RARB*, l'activité transcriptionnelle a été mesurée par des essais luciférase dans des cellules HEK (Srour et al. 2013; Srour et al. 2016). La réponse transcriptionnelle au ligand est augmentée ou diminuée chez les variants dominants suggérant un mécanisme de gain de fonction ou de dominant négatif. Cependant, les cellules HEK, des cellules humaines de rein, ne sont pas un modèle idéal pour étudier le mécanisme d'action des variants puisque le rein n'est pas un organe affecté chez les patients PDAC et que la complexité de la voie de signalisation de l'AR au cours du développement ne peut être reproduit *in vitro*. Le but de ce projet est d'étudier le mécanisme d'action des variants *RARB* dans un modèle *in vivo* en utilisant le poisson zèbre. En raison de leur développement rapide *ex vivo* et de la facilité à induire des modifications génétiques, le modèle du poisson zèbre est fréquemment utilisé pour distinguer les mécanismes d'action des allèles pathogènes dominants identifiés chez les patients (Niederriter et al. 2013). La surexpression de *RARB* humain chez le poisson zèbre ainsi que la création d'une lignée *rarga* mutante vont nous permettre de caractériser l'implication du récepteur dans un contexte développemental.

Chapitre 2 – Papier

Functional characterization of RARB mutant alleles identified in the PDAC syndrome using the zebrafish

Claudie Comeau^{1,2}, Marie-Claude Guyot¹, Mingqin Wang¹, Zoha Kibar^{1,2} et Jacques L Michaud^{1,2}

¹Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine Research Center, Montreal, ²Department of Biochemistry and Molecular Medicine University of Montreal

Contributions of co-authors

Claudie Comeau : Site directed mutagenesis, Overexpression, and co-injection of hRARB and variants in zebrafish, RA treatments, Characterization and genotyping of rarga zebrafish line.

Marie-Claude Guyot : Cloning of hRARB in pCS2+ vector, Site directed mutagenesis (R387C).

Mingqin Wang : Design and injection of guide RNA for the zebrafish rarga CRISPR.

Zoha Kibar : Co-supervisor.

Jacques L. Michaud : Supervisor, Correction of the manuscript.

Abstract

Retinoic acid (RA) is required for the development of several organs, including the brain, eye, heart, and lungs. Both loss and gain of RA signalling disrupt the development of these organs, indicating that its precise regulation is required for appropriate development. RA can bind to retinoic acid receptors (RARs), which are transcription factors that modulate target gene expression. De novo mutations in the *RARB* gene lead to a severe, rare and complex syndrome called PDAC characterized mainly by anophthalmia and/or microphthalmia, pulmonary hypoplasia, diaphragmatic hernia and cardiac defects. In total, our group have identified 15 pathogenic variants in *RARB* in more than 30 patients affected with PDAC. Some of these variants induce gain-of-function (GOF) whereas others act in a dominant-negative (DN) manner in cell-based transcriptional assays. The goal of this project is to use the zebrafish model to study the functional impact of *RARB* variants *in vivo*. We found that expression of wild-type human *RARB* mRNA in zebrafish caused RA dependent developmental defects including microphthalmia, swim bladder defects and cardiac edema. The introduction of a non-sense variant (p.K102X) abolished these effects. We tested the impact of putative GOF (p.R269T, p.R387C) and DN (p.M290R, p.L402P) on this RARB activity. We show that overexpression of the putative GOF cause a less severe phenotype compared to the WT *RARB*. However, the co-injection of the putative DN reveal that variant L402P behave as a DN in a developmental context, whereas M290R does not. Also, we characterize a *rarga* mutant line carrying a frameshift deletion in the middle of the ligand binding domain. We discovered that homozygous *rarga* zebrafish are lacking inflated swimbladder and branchial arches. A better understanding of the molecular mechanism of RARB during development might help develop effective therapeutic strategies through the modulation of the RA signaling.

Key words : PDAC syndrome, retinoic acid, retinoic acid receptor beta, zebrafish

Introduction

Retinoic acid (RA) signaling plays an important role in the development and function of several organs, including the eye, heart, diaphragm, lungs, and limbs (Ross et al. 2000; Niederreither and Dolle 2008; Cunningham and Duester 2015). RA is the active form of vitamin A. Precise regulation of the RA pathway is required for appropriate development of these organs. Vitamin A deficiency (VAD) leads to a wide range of abnormalities (Wilson, Roth, and Warkany 1953). In fact, both upregulation and downregulation of the RA signaling can cause similar structural defects. The main retinoid in circulation is retinol, which is transported into target cells by the membrane receptor STRA6. In the nucleus, RA binds the heterodimer formed of retinoic acid receptors (RARs) and retinoic X receptors (RXRs) and modulates the transcriptional activity of target genes (Giguere et al. 1987; Petkovich et al. 1987). In humans, there are three subtypes of RAR (RARA, RARB and RARG).

We previously identified recessive and dominant mutations in *RARB* in patients affected by PDAC syndrome (Srour et al. 2013; Srour et al. 2016). The combination of pulmonary hypoplasia, diaphragmatic hernia, anophthalmia / microphthalmia and cardiac edema is characteristic of PDAC syndrome (Chitayat et al. 2007). PDAC represents the most important features of the condition. It is also known as Spear syndrome and Matthew-Wood syndrome and was strictly linked to recessive mutations in *STRA6* (Kawaguchi et al. 2007; Pasutto et al. 2007). However, we identified to this day 15 dominant pathogenic mutations, all in the ligand binding domain, in individuals with PDAC-related defects. *In vivo* transcriptional assays of those variants revealed that some of the mutations decrease whereas others increase the transcriptional response of the receptor to the ligand in the context of a cell-based one-hybrid reporter assay (Srour et al, 2013, 2016; unpublished results). Additional studies indicate that the variants associated with a decrease of the transcriptional response to the ligand induce a dominant-negative effect *in vitro*. Overall, these functional studies suggest that dominant variants in *RARB* can be classified in those that confer a gain-of-function (GOF) effect and those that induce a dominant-negative (DN) effect. The haploinsufficiency of the *RARB* does not appear to have any clinical consequence.

The zebrafish is a powerful model to study developmental defects such as the one present in PDAC syndrome. Moreover, the development of zebrafish embryo is external, rapid and orthologues have been identified for approximately 70% of human genes, including RA pathway

genes (Howe et al. 2013). The main organs affected in the syndrome are easy to visualize during development due to the transparent aspect of the embryo. RA pathway during zebrafish development is well characterized in the literature. Prior studies showed that early RA deprivation in zebrafish causes microphthalmia, prominent cardiac edema, craniofacial defects and uninflated swimbladder (Le, Dowling, and Cameron 2012; Waxman and Yelon 2011). The knockdown of *stra6* and *rarga* by morpholino (MO) injection in the zebrafish causes cardiac edema and ocular malformations (Kalaskar et al. 2020; Isken et al. 2008). Recently, the mutation p.Arg144Gln in *RARB* DNA binding domain was validated to cause ocular coloboma with the zebrafish model (Kalaskar et al. 2020).

Here, we study the *in vivo* impact of *RARB* variants found in patients with PDAC syndrome using zebrafish. Previous investigations of those variants characterized them as putative GOF or DN based on *in vitro* assays. Due to the complexity of RA pathway regulation, further experiments in a developmental context are needed to explore the *in vivo* mechanisms by which *RARB* variants cause PDAC syndrome.

Materials and Methods

Plasmid constructs and cloning

Open reading frame (ORF) of h*RARB* was cloned in pCS2+ vector. The ORF of h*RARB* was provided by André Tremblay's lab in pCMX. All variant constructs were generated using Q5 site directed mutagenesis Kit (NEB) see table 1 in supplementary. All variants were verified by sanger sequencing. The K102X variant acts as a negative control and was created by adding a stop codon in the DNA binding domain.

Overexpression/ Zebrafish experiments

Zebrafish were raised from colony maintained according to establish procedure in compliance with guidelines set out by the Canadian council for Animal Care (CCAC). Capped mRNA was made using the mMessage mMachine Kit (Invitrogen). The amount of wild-type h*RARB* mRNA injected was titrated to inject the lowest possible dose that produce the maximal phenotype consistent with RA signaling alteration. Prior injection, mRNA integrity was verified on gel and concentration was

determined with nanodrop. Following titration, 100 pg of mRNA for all constructs was injected. Embryos were injected at the 1 cell stage for all experiments. The embryos were imaged under a dissection microscope at 5 days post fertilization (dpf). Injections were performed at least 3 times for each condition.

RA treatments

A stock solution of all-*trans* RA (at-RA) in 100% ethanol was kept in the dark at -20C. For all experiments with RA treatment, at-RA or EtOH was added in the water at a developmental stage of 40% epiboly just before the onset of gastrulation. Embryo treated with 500 nM of at-RA failed to develop and died by 24hpf. Concentration of at-RA of 5 nM and 50 nM were causing severe developmental defects. The concentration of RA for the treatment was optimized to the lowest dose that does not cause defects. For overexpression and RT-q-PCR assays, zebrafish embryos were treated continuously from 40% epiboly with 0,5 nM or 0,05 nM at-RA. The control embryos were treated with the equivalent of ethanol (0,05%). The embryos were imaged under a dissection microscope at 5 dpf. The experiments were done in 3 biological replicates.

RT-q-PCR

Total RNA was extracted (RNeasy Micro Kit, Qiagen) from 20 embryos at 24 hpf injected with 100 pg of *hRARβ* mRNA WT or variants. The RT-q-PCR experiments were done at the University of Montreal Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC). See table 2 in supplementary for primers sequences.

Generation of *rarga* mutant zebrafish

The detailed procedure for CRISPR/Cas9 editing in zebrafish was described previously (Mali et al. 2013; Hwang et al. 2013). CRISPR guide RNA binding site : 5'- taatagcactactata GGGGGCCATAACTCTGAAGAgtttagagctagaa -3' . Injection mixtures included 200 ng/μl of Cas9 mRNA and 50 ng/μl of gRNA. The genotyping of *rarga* mutant zebrafish was done with high resolution melting (HRM) analysis (Samarut, Lissouba, and Drapeau 2016). Primers sequence for HRM : Forward 5'- TGTTTGTGTGAAACAGGAGC -3', Reverse 5'- ATCTCTCGGATGAGAGGAGG -3'.

Alcian Blue Staining

The staining was done at a stage of 5 dpf. The zebrafish were fixed over night in PFA 4% and rinsed with EtOH 95%. Stain the cartilage with Alcian Blue 0,01% for 12h (7 EtOH : 3 acetic acid). Rehydrate for 30 minutes in 70%, 50% and 30% EtOH. Bleach 1 hour at room temperature with 1% H₂O₂ in 0,5% KOH solution. Clear with 1% KOH solution for at least 12h. Transfer in glycerol for long time storage.

Results

Overexpression of human *RARB* mRNA in the zebrafish causes microphthalmia, cardiac edema and swimbladder defects

First, we studied the impact of the overexpression of h*RARB* on zebrafish development. A previous study has shown that embryo injected with zebrafish *rarga* and *rarab* mRNA appear normal at 48 hpf and beyond, and the expression pattern of RA signaling of these injected embryos seemed none affected upon RA treatment (Waxman and Yelon 2011). However, in the same paper the authors showed that overexpression of human dominant negative *RARA* results in loss of pectoral fin, abnormal hindbrain patterning, enlarged heart and loss of the expression of the target genes *dhrs3* and *hoxb5b*. They presume that structural differences between the zebrafish and the human RARs could explain their results, although the exact differences remain unclear due to the high conservation of RARs. Those results are suggesting that ectopic expression of human *RARB* might cause developmental defects consistent with disruption of RA signaling.

To confirm the impact of h*RARB* mRNA on zebrafish development, we tested if its overexpression causes structural defects at 5 days post fertilization. We found that the injection of WT h*RARB* mRNA in the zebrafish caused developmental defects including microphthalmia, cardiac edema and an uninflated swimbladder (Figure 1). Moreover, we observed a dose-dependant effect since the addition of an increasing dose of RA causes more severe developmental defects. To confirm the specificity of the observed phenotype, we introduced a non-sense mutation by site-directed mutagenesis, c.304A>T (p.K102X), which abolishes the DNA binding and the ligand-binding domains, into h*RARB* mRNA. Zebrafish embryo injected with the variant K102X appeared

normal and development was not affected by the RA treatment. Thus, we found that overexpression of hRARB mRNA causes developmental defects, including microphthalmia, which is also found in PDAC syndrome.

Overexpression of the putative gain of function and dominant negative hRARB variants cause similar or less severe phenotypes as compared to wild-type hRARB

We have identified 15 pathogenic variants in *RARB* in more than 30 patients affected with PDAC syndrome (Srour et al, 2013, 2016; unpublished results). *In vitro* transcriptional assays have shown that some of these variants confer a gain-of-function (GOF) whereas others behave as dominant-negative (DN). To study the impact of these variants on zebrafish development, we tested four of the *RARB* variants found in PDAC patients: R269T and R387C hypothesized to induce a gain of function and M290R and L402P hypothesized to behave as dominant negative *in vitro*. The variant R269T was selected because it induces the strongest transcriptional response to the ligand in our *in vitro* assay whereas the variant R387C was selected because of its clinical importance as it was identified in more than 40% of affected individuals. For the putative dominant negative variants, they are both located in different region of the protein potentially affecting different function. M290R is part of the ligand binding domain and L402P is part of the helix 12, which is involved in the recruitment of transcriptional co-activators (Figure 2a).

We introduced the four variants by site directed mutagenesis into the *RARB* cDNA and tested the impact of their overexpression in the zebrafish. Interestingly, overexpression of the four variants caused swimbladder defects, microphthalmia and cardiac edema, but, overall, at a significantly lower frequency than WT hRARB, indicating that they all affect its activity (Figure 2b-e). There are two exceptions to this observation: L402P induced swimbladder defects and R269T induced cardiac edema at the same frequency as WT hRARB. It should also be noted that when the observed defects are considered together, overexpression of R387C and M290R caused no significant developmental defects (Figure 2e).

We were surprised that variants R387C and R269T did not increase the occurrence of defects when compared to WT hRARB, as expected for GOF variants. We hypothesize that the GOF effect associated with these variants could be RA dependant, requiring supplementation with

RA to be revealed in the context of our assay. Thus, the variant R387C was overexpressed, and the embryos treated with at-RA at various doses just before gastrulation stage until observation at 5 dpf. We found that the frequency of developmental defects increased with the addition of RA, but not as much as with WT hRAR β (Figure S1). Taken together, our results suggest that the variant R387C does not behave as GOF in the context of our zebrafish assay.

The variant L402P acts as dominant negative *in vivo*

Next, we sought to determine whether L402P and M290R behave in a dominant-negative fashion in our zebrafish assay as they do in our *in vitro* assay. To study this question, we co-injected WT hRAR β with one of the variants into zebrafish embryos and studied larvae development at 5 dpf. We observed that the co-injection of L402P and WT hRAR β causes significantly less microphthalmia, cardiac edema and swimbladder defects than the injection of WT RAR β alone, suggesting that L402P indeed behaves as a dominant-negative variant in this assay (Figure 3A-D). However, the co-injection of M290R and WT hRAR β causes the same number of defects as when WT hRAR β is injected alone, indicating that M290R does not behave as a dominant-negative variant in this assay (Figure 3A-D). As expected, the co-injection of the control variant K102X does not affect WT hRAR β activity (Figure S2). We were also interested to determine whether the putative gain of function variants R387C and R269T could induce a dominant-negative effect. The co-injection of R387C or R269T did not decrease the ability of WT hRAR β to cause development defects, ruling out the possibility that they act via a dominant negative effect in the context of zebrafish development (Figure S2).

Phenotype of *rarga* mutants

The closest homolog to human RAR β in zebrafish is *rarga*, with 79% identity. The *rarga* gene knockdown by MO injection resulted in ocular malformation including microphthalmia and coloboma (Kalaskar et al. 2020). Previous studies demonstrated that mutant lines of *raldh2* gene cause defects including the lack of pectoral fin, lack of branchial arches, edema of the heart and an uninflated swimbladder at 5 dpf (Begemann et al. 2001; Grandel et al. 2002). Since, upregulation and downregulation of RA cause similar defects, we hypothesise that the knockdown of *rarga* in

the zebrafish would cause similar developmental phenotype than overexpression of h*RARB*. We design a *rarga* CRISPR line with a deletion of 5 nucleotides (p.382) located in the beginning of exon 8 part of the ligand binding domain. Almost half of the homozygous mutant have an uninflated swimbladder at 5 dpf (Figure S3 A-B). The defect in the swimbladder development caused a lost of homozygous mutant around 2 weeks post fertilization. In fact, the survival rate of *rarga* *-/-* after 2 weeks decreased at 8% for a heterozygous crossing, whereas the ratio of homozygous was normal at 1 week (26%). No microphthalmia or cardiac edema were observed in the *rarga* mutant. However, lack of branchial arches was noticed in the homozygous mutant (Figure S3 C-D).

Discussion

Our group has identified patients with PDAC syndrome carrying mutations in *RARB*. In total, 15 different pathogenic variants were identified. The goal of this study was to characterize *RARB* variants in a developmental context using zebrafish as a model. Previous studies have identified multisystemic phenotypes including microphthalmia, cardiac edema and swimbladder defect when the RA pathway is affected in zebrafish (Grandel et al. 2002; Begemann et al. 2001; Kalaskar et al. 2020; Casey et al. 2011). Our analysis demonstrates that the overexpression of human *RARB* in zebrafish causes developmental defects relevant for PDAC syndrome including microphthalmia, cardiac edema, and swimbladder defect. Moreover, the addition of RA at an early developmental stage increases the severity of the observed phenotypes in the injected fish with h*RARB* WT without affecting the h*RARB* K102X control. These observations suggest that the developmental defects observed might be due to the activation of the transcription. If the overexpression of h*RARB* WT would cause those defects through a mechanism of repression of the transcription, we would expect a rescue of the phenotypes upon RA treatment. The overexpression of K102X along with the addition of RA leads defects comparable to the non-injection control groups, suggesting that the truncated receptor is not functional and that K102X is an adequate control for further experiments. Furthermore, it suggests that the endogenous RA pathway is unaffected by the low RA addition. We tested higher doses of RA and toxicity was observed starting at a concentration of 5 nM. Together, our results suggest that h*RARB* WT can bind to zebrafish RAREs and causes developmental defects through the activation of transcription. It

correlates with the fact that RARB has a low ability to recruit corepressor and repress transcription (Farboud et al. 2003).

Cell culture studies previously revealed that some RARB variants found in PDAC patients confer a gain of function effect, whereas others induce a dominant negative effect (Srouf et al. 2013; Srouf et al. 2016). Hence, it was not surprising to observe two distinct molecular mechanisms possibly causing similar phenotypes in patients, one causing overactivation and another inducing downregulation of RA pathway. The similitude between the effects of loss and gain of RA signaling was reported many times in the literature before. One hypothesis to explain those observation is linked to the feedback mechanism of RA signaling. Increased RA signaling inhibits the expression of the enzyme producing RA, *aldh1a*, while promoting the expression of enzymes that degrade RA, *cyp26a1*. Conversely, decreased RA signaling results in an increase of *aldh1a* and a decrease of *cyp26a1* (Dobbs-McAuliffe, Zhao, and Linney 2004). In fact, a group observed that excess of RA during mouse development is teratogenic because of the long-lasting deficiency of RA signaling (Lee et al. 2012). Moreover, a prior study suggested that depletion of RARs initiates a feedback mechanism that results in developmental defects due to the teratogenic increases of RA (D'Aniello et al. 2013). Considering those articles, one possibility is that the phenotype caused by *hRARB* WT overexpression might be the consequence of transcriptional increase of target genes.-Alternatively, the activation of the transcription by *hRARB* WT could induce a teratogenic long-lasting deficiency by a feedback mechanism. In the future, quantitative experiments of target genes expression are necessary to gain insights of the mechanisms of *hRARB* overexpression in zebrafish.

To better characterize the RARB variants identified in patients with PDAC syndrome, we overexpressed two putative gain of function (GOF) mutations, R387C and R269T, and two putative dominant negative (DN) mutations, M290R and L402P. The overexpression of the variant L402P induced significant developmental malformation and partially rescued the phenotype in the co-injection assay with the WT. These results suggest that L402P variant behaves as dominant negative *in vivo* in zebrafish. The residue L402 is part of a transactivation domain in helix 12 at the end of the LBD. One possibility is that the mutated protein can bind DNA and form heterodimer but cannot bind to coactivators. Prior studies have shown that the variant I403S in *RARB* confers an increased binding to corepressors in the absence of the ligand resulting in a reduction of transcriptional activity (Farboud and Privalsky 2004). Together, our results suggest that variant

L402P causes a dominant negative effect by affecting the helix 12 stability and an increased corepressor binding *in vivo*. One other possible mechanism is that the dominant negative effect is caused by competition of the active sites by functional WT receptor and non-functional L402P variant. Besides, the variant L402P impacts the development in a similar way than the WT, but through opposite mechanisms featuring the paradox of the RA signalling where too much is the same as too little.

The overexpression of the variant M290R did not cause significant developmental defect and the co-injection assay had no rescue effect suggesting that it acts as a loss of function mutation in the zebrafish. The mutation M290R affect the capability of the WT receptor to induce a severe phenotype in zebrafish. Both variants act as a dominant negative in a cell-based assay, whereas *in vivo* only the variant L402P seems to behave in this similar fashion. Moreover, we observed that the variant R387C causes less than half of the phenotypes induced by the WT overexpression. RA treatment of zebrafish injected with R387C demonstrated that the variant is responsive to RA dosage and has a residual function but does not behave as a gain of function. The variant R269T causes significant developmental malformation in zebrafish but less severe phenotype compared to the hRARβ WT. Both presumed GOF variants cannot reproduce the severity of the defects induced by the WT receptor suggesting a residual activity of the mutated receptor.

These conflicting results could be due to the position of the mutations. The residue M290, R387 and R269 are located in the LDB and predicted to be involved in the binding of RA. From a structural point of view, our *in vivo* results could suggest less affinity to the ligand for the variant M290R, R387C and R269T. Interestingly, this was shown by Zhang et al., where the mutations of a charged residue in the ligand binding pocket (LBP) of the cellular retinoic acid binding protein (CRABP) reduces the binding affinity to RA and increases its thermostability (Zhang et al. 1992). The mutation of the arginine positively charged residue for an uncharged residue in variants R387C and R269T would reduce the binding affinity to RA and result in a decreased transcriptional activation. Although, the mutation of an uncharged residue for a charged residue in the variant M290R would increase the affinity to RA.

On the other hand, if R387C and R269T are GOF variants consistent with the *in vitro* studies, the feedback loop mechanism could explain our conflicting results. We can imagine that at one point, the activation of the transcription by hRARβ will disequilibrate the RA signalling and

increase the feedback loop mechanism. We can that the GOF variants are rescued by the feedback loop in a developmental context. Although, it would be surprising because that phenomenon is not observed with the variants R387C upon RA treatment. We observed that the severity of the defects is increasing upon RA treatment in the zebrafish overexpressed with R387C (Figure S1). To uncover the undergoing mechanism of the variant M290R, R387C and R269T further *in vivo* experiments are needed in the future.

We have created a *rarga* mutant line with a frameshift deletion of 5 nucleotides in the middle of the LBD (p.382). The zebrafish *rarga* is the homolog of human *RARB* and is reported to be the most abundant RARs expressed during zebrafish development (Oliveira et al. 2013). Our *rarga* mutant line is predicted to be a knockdown of *rarga* gene in zebrafish since the deletion causes the abolition of the last half of the LBD. We characterized the developmental malformation in homozygous zebrafish showing a swimbladder and branchial arch defects. The penetrance of the observed phenotype is partial since we observed less than half of the homozygous embryos are affected. More experiments with the *rarga* mutant line need to be done to characterize the molecular mechanism of RA receptors. Injection of human *RARB* to rescue the phenotype or RA treatment would be interesting to explore in the future. In fact, the injection of human RARB can partially reduce the ocular phenotype caused by MO knockdown of *rarga* gene (Kalaskar et al. 2020). In summary, our observations suggest that the *rarga* receptor is involved in the development of the branchial arches and swimbladder in zebrafish.

Together, our study demonstrates for the first time that the overexpression of h*RARB* in the zebrafish causes developmental defects similar to PDAC syndrome. Also, both the overexpression assays and the *rarga* mutant showed a swimbladder defect. The implication of RA pathway in the swimbladder development was never investigated before. Although in mice, RA is involved in lung development through Wnt and Fgf10 pathway (Chen et al. 2010; Desai et al. 2004). In zebrafish, the WNT pathway is also implicated in swimbladder development (Yin et al. 2011). Altogether, our results suggest that the RA pathway, more precisely *rarga*, is involved in the swimbladder development, potentially through the Wnt signalling. Further investigations are needed to confirm this hypothesis.

Figures

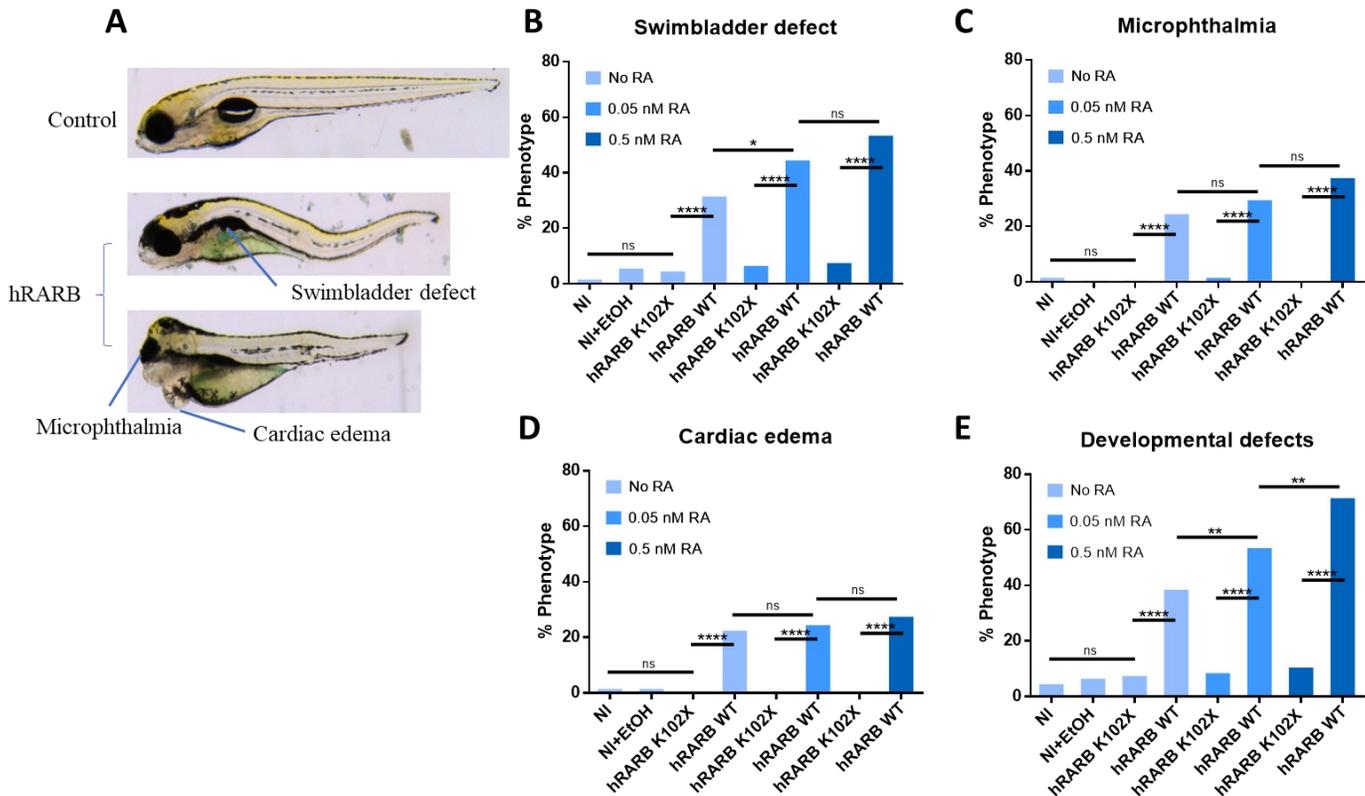


Figure 1 : Overexpression of human *RARB* cause RA dependant developmental defects A: Example of observed phenotypes at 5 dpf in the overexpression assay. Lateral view of zebrafish non-injected and injected with 100 pg of human *RARB* mRNA. B-E: Quantification of the observed phenotypes at 5 dpf in the overexpression of 100 pg of h*RARB* WT and h*RARB* K102X. Treatment of the zebrafish with EtOH 0,05%, 0,05 nM at-RA or 0,5 nM at-RA. None injected (NI). Condition (total embryo injected): NI (153), NI + EtOH (183), K102X (168), K102X + 0,05nM (142), K102X 0,05nM (109), WT (156), WT + 0,05nM (146) and WT + 0,5nM (145). The experiments were done in 3 biological replicates (N=3). Chi-square statistical test : $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$, $p < 0,0001^{****}$

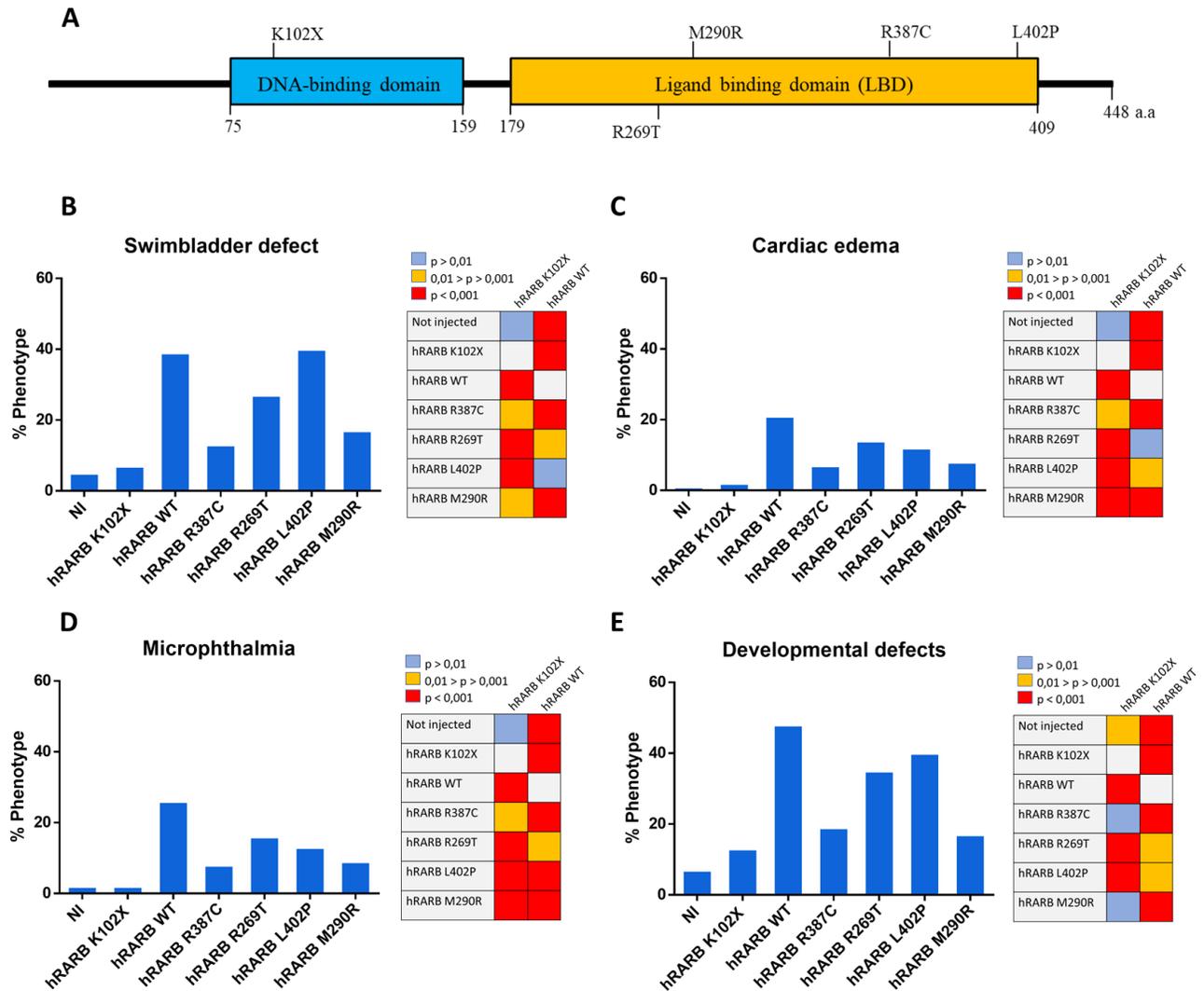


Figure 2 : Human *RARB* variants cause less severe phenotype compared to the WT A: Diagram of human RARB protein and approximate location of the variants. The marks show the position of the mutation identified in patients (R269T, M290R, R387C and L402P) and the negative control (K102X) that were overexpressed in the zebrafish. B-E: Percentage of the observed phenotype after overexpression of hRARβ variants at 5dpf. All variants were injected with 100 pg. On the left of each graph, a p-value table compare each injection with the negative control (K102X) and the hRARβ WT. None injected (NI). Condition (total embryo injected): NI (567), K102X (304), WT (395), R387C (237), R269T (231), L402P (294) and M290R (361). The experiments were done in 3 biological replicates (N=3). Chi-square statistical test.

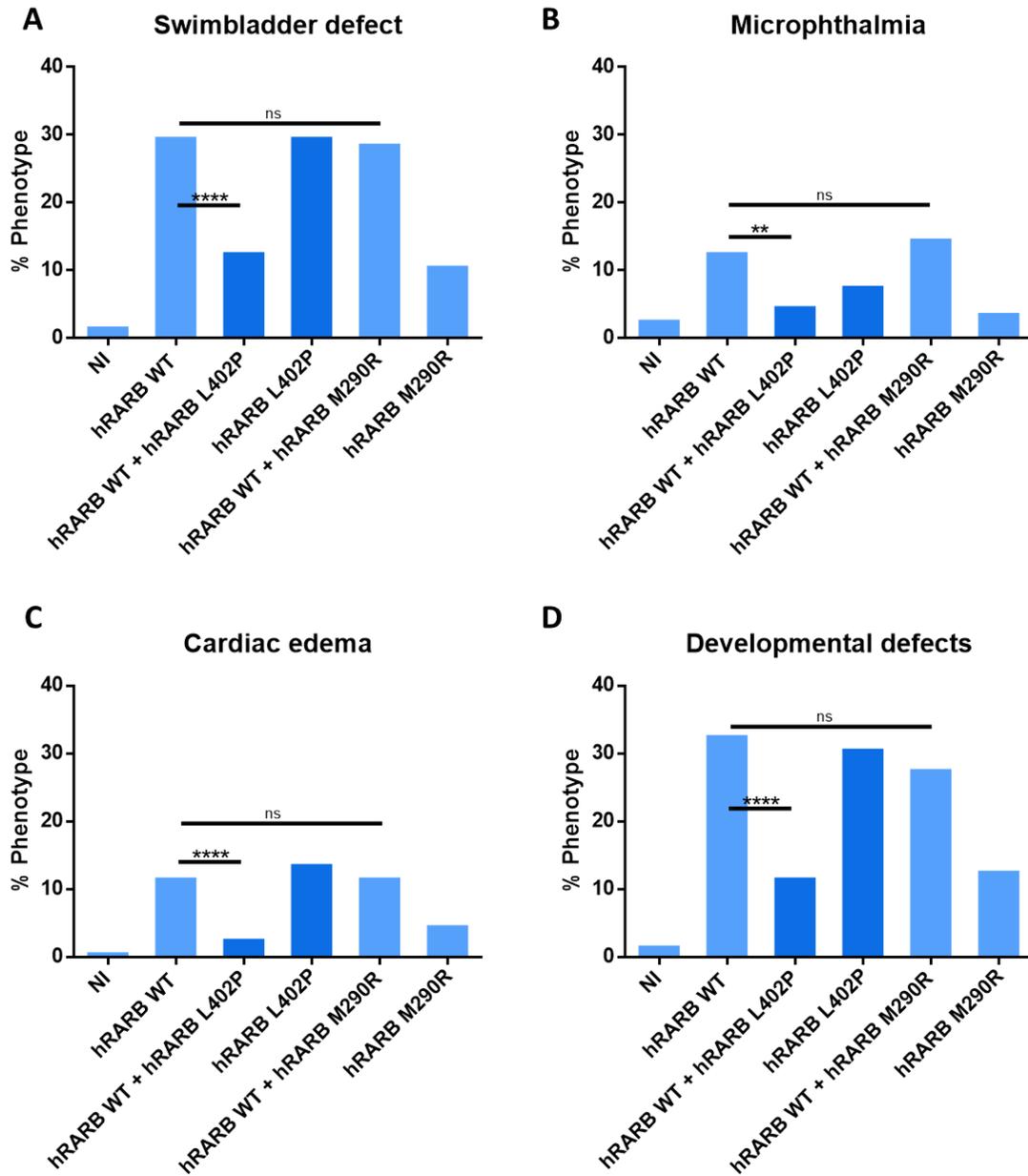
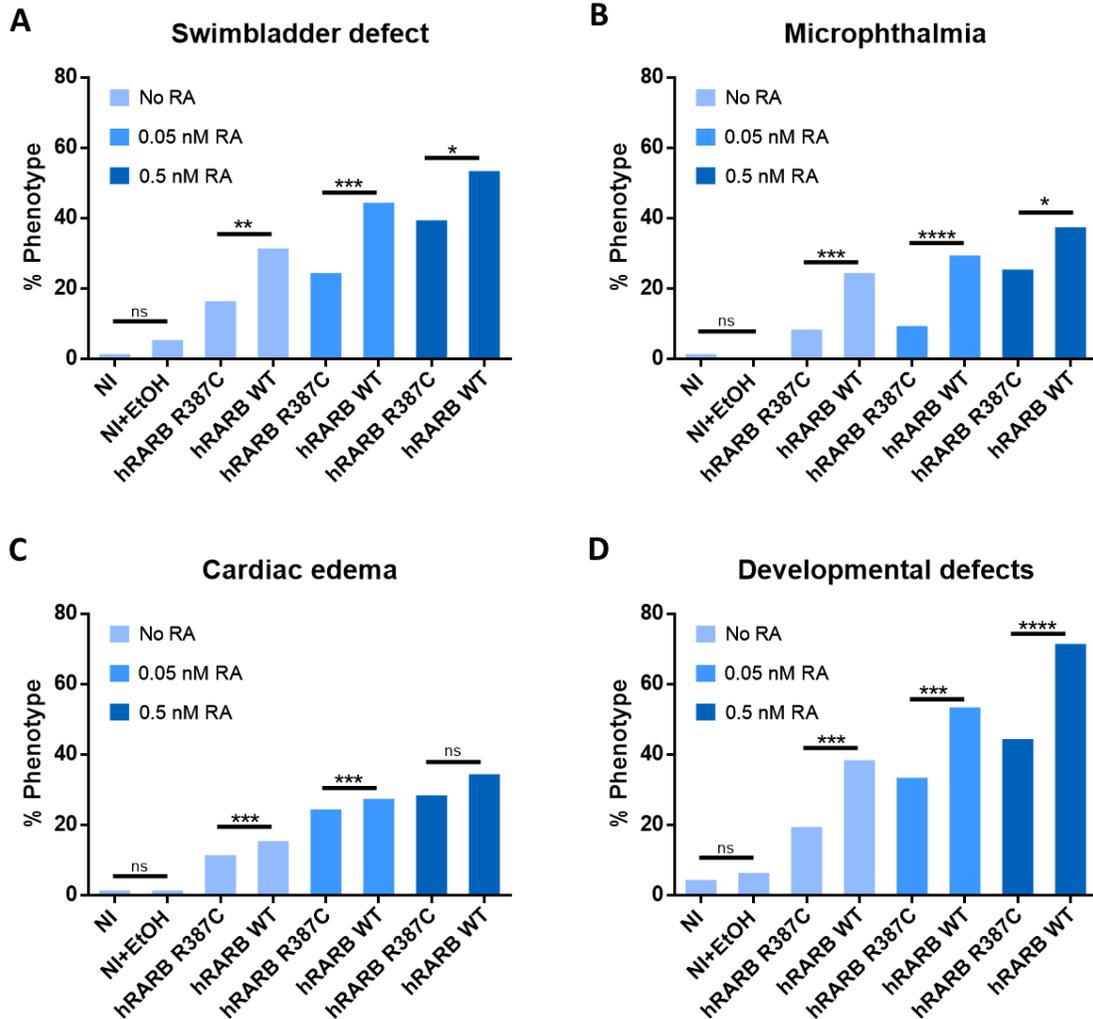
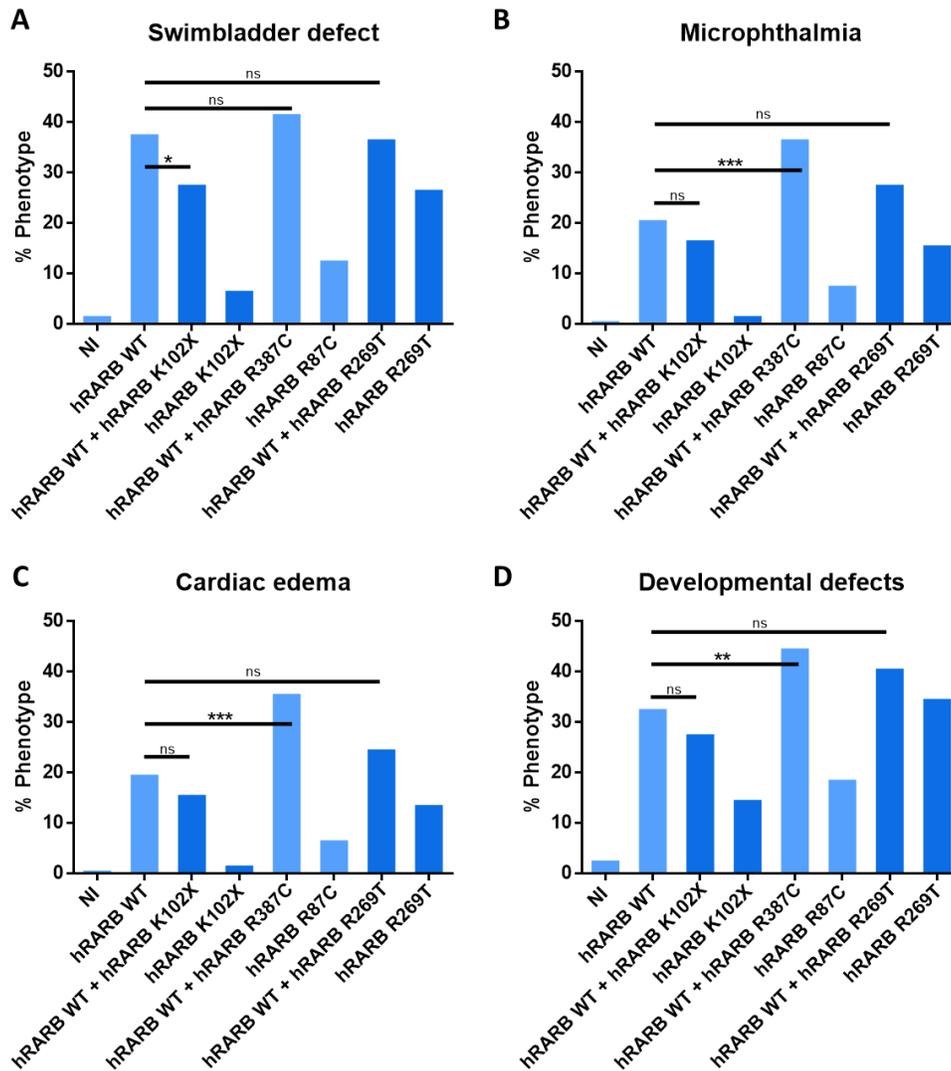


Figure 3 : The variant L402P acts as a dominant negative in zebrafish, whereas the variant M290R does not. A-D : Quantification of the observed phenotypes at 5 dpf of the overexpressed zebrafish with 100 pg of hRARb WT, hRARb L402P or hRARb M290R mRNA. Co-injection with 100 pg of each hRARb WT and of hRARb variants mRNA. None injected (NI). Condition (total embryo injected): NI (342), hRARb WT (240), hRARb WT+M290R (231), hRARb M290R (174), hRARb WT+L402P (268) and hRARb L402P (215). The experiments were done in 3 biological replicates (N=3). Chi-square statistical test : $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$, $p < 0,0001^{****}$



Supplementary Figure S1 : Variant R387C response to RA treatment. A-D : Quantification of the observed phenotypes in the overexpression of 100 pg of hRARβ WT and hRARβ R387C at 5 dpf. Treatment of the zebrafish with EtOH 0,05%, 0,05 nM at-RA or 0,5 nM at-RA. None injected (NI). Condition (total embryo injected): NI (153), NI+EtOH(183), hRARβ R387C (166), hRARβ R387C + 0,05nM (160), hRARβ R387C + 0,05nM (149), hRARβ WT (156), hRARβ WT + 0,05nM (146) and hRARβ WT + 0,5nM (145). The experiments were done in 3 biological replicates (N=3). Chi-square statistical test : $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$, $p < 0,0001^{****}$



Supplementary Figure S2 : Co-injection of hRARb variants K102X, R387C and R269T don't act as dominant negative in zebrafish. A-D : Quantification of the observed phenotypes at 5 dpf of the overexpressed zebrafish with 100 pg of hRARb WT or hRARb variants. Co-injection with 100 pg of each hRARb WT and of hRARb variants mRNA. None injected (NI). Condition (total embryo injected): NI (455), hRARb WT (240), hRARb WT+K102X (316), hRARb K102X (304), hRARb WT+R387C (254), hRARb R387C (237), hRARb WT+R296T (262) and hRARb R269T (231). The experiments were done in 3 biological replicates (N=3). Chi-square statistical test : p<0,05*, p<0,01**, p<0,001***, p<0,0001****

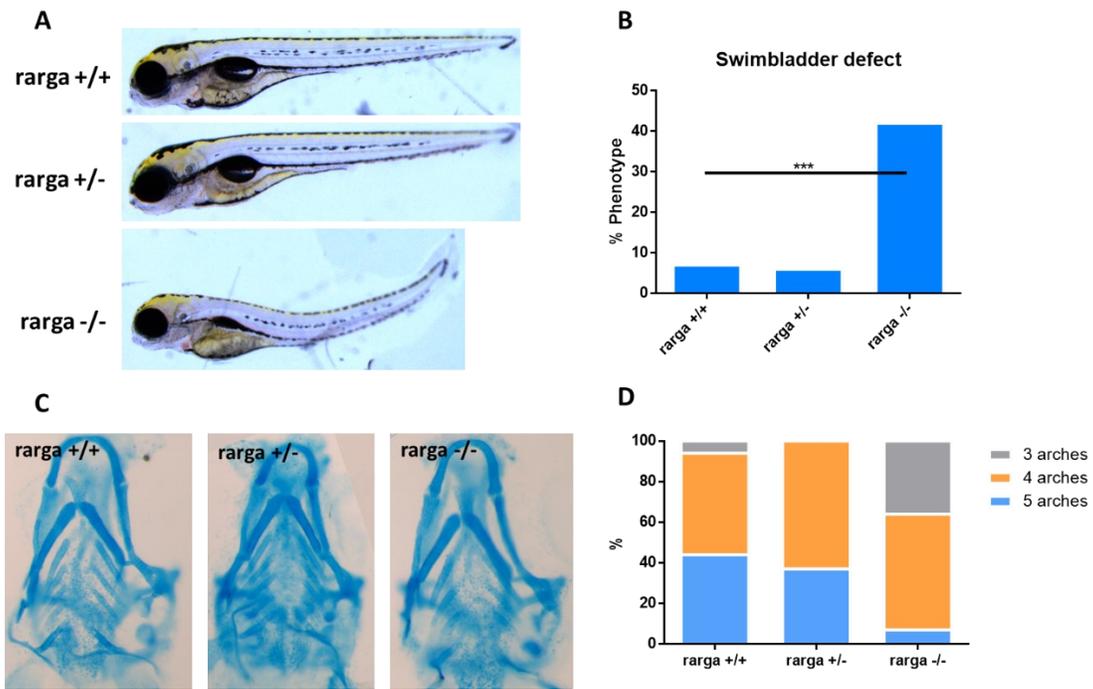


Figure Supplementary S3 : Phenotype of *rarga* mutant line in zebrafish. A: Lateral view at 5 dpf embryos. B: Characterization of the swimbladder defect in the *rarga* line. *rarga* +/+ (46), *rarga* +/- (78) and *rarga* -/- (33). C: Alcian blue staining of the cartilage at 5 dpf embryos. D: Characterization of branchial arch at 5 dpf. *rarga* +/+ (18), *rarga* +/- (19) and *rarga* -/- (14). Chi-square statistical test : $p < 0,001$ ***

Table S1 : Primer sequence for site-directed mutagenesis of hRARB

hRARB variants	Forward primer	Reverse primer
K102X	5' - TGA GGG ATG TTA GGG CTT TTT CCG - 3'	5' - CAG GCG CTG ACC CCA TAG - 3'
R387C	5'- CAG TGC TAA AGG TGC AGA GTG TGT AAT TAC CTT GAA AAT G - 3'	5'- CAT TTT CAA GGT AAT TAC ACA CTC TGC ACC TTT AGC ACT G - 3'
R296T	5' - ATT TGC ACC ACG TAT ACC CCA G - 3'	5' - TCT AAG AAT CAG GAT GTC C - 3'
M290R	5' - CGA ACT CAG AGG CAC AAT GCT - 3'	5' - ATT TAG GGT AAG GCC GTC - 3'
L402P	5' - ATG CCA CCT CCA TTC AAG AAA TG - 3'	5' - TGA TCC AGG AAT TTC CAT TTT C - 3'

Table S2 : Primer sequence for RT-qPCR

Gene	Oligo FWD	Oligo REV	RefSeq
aldh1a2	aacctgaacacggacctc	atgagctccagcacacgtc	NM_131850.1
dhrs3a	tgtggatgcagttaggacca	actggggcagaaggctct	NM_001003477.1
cyp26a1	caatgtccatggagtcaaca	gctggatcacgggaatgta	NM_131146.2
hoxb5b	gcgcaggaggagaatagaga	gcgattttggaaccagattt	NM_131537.3
shha	aaagcccacattcattgctc	ccttctgtctccgtctg	NM_131063.3
Efl alpha	aggacatccgtcgtgtaat	gggtggttcaggatgatgac	ENSDART00000023156
Gapdh	tggaaagtacaagggtgaggtt	gttggtcgggtccctctc	NM_001115114

Acknowledgements

We sincerely thank the members of the animal facility for taking care of the zebrafish. We would like to thank the members of André Tremblay for the collaboration for the *RARB in vitro* studies and Pierre Drapeau laboratory for providing us their expertise on zebrafish. We also thank the interns who helped for the site-directed mutagenesis experiments. This research was funded by a grant from the Canadian Institute of Health Research (CIHR) for the funds.

References

- Begemann, G., T. F. Schilling, G. J. Rauch, R. Geisler, and P. W. Ingham. 2001. 'The zebrafish neckless mutation reveals a requirement for raldh2 in mesodermal signals that pattern the hindbrain', *Development*, 128: 3081-94.
- Casey, J., R. Kawaguchi, M. Morrissey, H. Sun, P. McGettigan, J. E. Nielsen, J. Conroy, R. Regan, E. Kenny, P. Cormican, D. W. Morris, P. Tormey, M. N. Chróinín, B. N. Kennedy, S. Lynch, A. Green, and S. Ennis. 2011. 'First implication of STRA6 mutations in isolated anophthalmia, microphthalmia, and coloboma: a new dimension to the STRA6 phenotype', *Hum Mutat*, 32: 1417-26.
- Chen, F., Y. Cao, J. Qian, F. Shao, K. Niederreither, and W. V. Cardoso. 2010. 'A retinoic acid-dependent network in the foregut controls formation of the mouse lung primordium', *J Clin Invest*, 120: 2040-8.
- Chitayat, D., H. Sroka, S. Keating, R. S. Colby, G. Ryan, A. Toi, S. Blaser, S. Viero, L. Devisme, O. Boute-Bénéjean, S. Manouvrier-Hanu, G. Mortier, B. Loeys, A. Rauch, and P. Bitoun. 2007. 'The PDAC syndrome (pulmonary hypoplasia/agenesis, diaphragmatic hernia/eventration, anophthalmia/microphthalmia, and cardiac defect) (Spear syndrome, Matthew-Wood syndrome): report of eight cases including a living child and further evidence for autosomal recessive inheritance', *Am J Med Genet A*, 143a: 1268-81.
- Cunningham, T. J., and G. Duester. 2015. 'Mechanisms of retinoic acid signalling and its roles in organ and limb development', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16: 110-23.
- D'Aniello, E., A. B. Rydeen, J. L. Anderson, A. Mandal, and J. S. Waxman. 2013. 'Depletion of retinoic acid receptors initiates a novel positive feedback mechanism that promotes teratogenic increases in retinoic acid', *PLoS Genet*, 9: e1003689.
- Desai, T. J., S. Malpel, G. R. Flentke, S. M. Smith, and W. V. Cardoso. 2004. 'Retinoic acid selectively regulates Fgf10 expression and maintains cell identity in the prospective lung field of the developing foregut', *Dev Biol*, 273: 402-15.
- Dobbs-McAuliffe, B., Q. Zhao, and E. Linney. 2004. 'Feedback mechanisms regulate retinoic acid production and degradation in the zebrafish embryo', *Mech Dev*, 121: 339-50.
- Farboud, B., H. Hauksdottir, Y. Wu, and M. L. Privalsky. 2003. 'Isotype-restricted corepressor recruitment: a constitutively closed helix 12 conformation in retinoic acid receptors beta

- and gamma interferes with corepressor recruitment and prevents transcriptional repression', *Mol Cell Biol*, 23: 2844-58.
- Farboud, B., and M. L. Privalsky. 2004. 'Retinoic acid receptor-alpha is stabilized in a repressive state by its C-terminal, isotype-specific F domain', *Mol Endocrinol*, 18: 2839-53.
- Giguere, V., E. S. Ong, P. Segui, and R. M. Evans. 1987. 'Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid', *Nature*, 330: 624-9.
- Grandel, H., K. Lun, G. J. Rauch, M. Rhinn, T. Piotrowski, C. Houart, P. Sordino, A. M. Küchler, S. Schulte-Merker, R. Geisler, N. Holder, S. W. Wilson, and M. Brand. 2002. 'Retinoic acid signalling in the zebrafish embryo is necessary during pre-segmentation stages to pattern the anterior-posterior axis of the CNS and to induce a pectoral fin bud', *Development*, 129: 2851-65.
- Howe, K., M. D. Clark, C. F. Torroja, J. Torrance, C. Berthelot, M. Muffato, J. E. Collins, S. Humphray, K. McLaren, L. Matthews, S. McLaren, I. Sealy, M. Caccamo, C. Churcher, C. Scott, J. C. Barrett, R. Koch, G. J. Rauch, S. White, W. Chow, B. Kilian, L. T. Quintais, J. A. Guerra-Assunção, Y. Zhou, Y. Gu, J. Yen, J. H. Vogel, T. Eyre, S. Redmond, R. Banerjee, J. Chi, B. Fu, E. Langley, S. F. Maguire, G. K. Laird, D. Lloyd, E. Kenyon, S. Donaldson, H. Sehra, J. Almeida-King, J. Loveland, S. Trevanion, M. Jones, M. Quail, D. Willey, A. Hunt, J. Burton, S. Sims, K. McLay, B. Plumb, J. Davis, C. Clee, K. Oliver, R. Clark, C. Riddle, D. Elliot, G. Threadgold, G. Harden, D. Ware, S. Begum, B. Mortimore, G. Kerry, P. Heath, B. Phillimore, A. Tracey, N. Corby, M. Dunn, C. Johnson, J. Wood, S. Clark, S. Pelan, G. Griffiths, M. Smith, R. Glithero, P. Howden, N. Barker, C. Lloyd, C. Stevens, J. Harley, K. Holt, G. Panagiotidis, J. Lovell, H. Beasley, C. Henderson, D. Gordon, K. Auger, D. Wright, J. Collins, C. Raisen, L. Dyer, K. Leung, L. Robertson, K. Ambridge, D. Leongamornlert, S. McGuire, R. Gilderthorp, C. Griffiths, D. Manthavadi, S. Nichol, G. Barker, S. Whitehead, M. Kay, J. Brown, C. Murnane, E. Gray, M. Humphries, N. Sycamore, D. Barker, D. Saunders, J. Wallis, A. Babbage, S. Hammond, M. Mashreghi-Mohammadi, L. Barr, S. Martin, P. Wray, A. Ellington, N. Matthews, M. Ellwood, R. Woodmansey, G. Clark, J. Cooper, A. Tromans, D. Grafham, C. Skuce, R. Pandian, R. Andrews, E. Harrison, A. Kimberley, J. Garnett, N. Fosker, R. Hall, P. Garner, D. Kelly, C. Bird, S. Palmer, I. Gehring, A. Berger, C. M. Dooley, Z. Ersan-Ürün, C. Eser, H. Geiger, M. Geisler, L. Karotki, A. Kirn, J. Konantz, M. Konantz, M. Oberländer, S. Rudolph-Geiger, M. Teucke, C. Lanz, G. Raddatz, K. Osoegawa, B. Zhu, A. Rapp, S. Widaa, C. Langford, F. Yang, S. C. Schuster, N. P. Carter, J. Harrow, Z. Ning, J. Herrero, S. M. Searle, A. Enright, R. Geisler, R. H. Plasterk, C. Lee, M. Westerfield, P. J. de Jong, L. I. Zon, J. H. Postlethwait, C. Nüsslein-Volhard, T. J. Hubbard, H. Roest Crolius, J. Rogers, and D. L. Stemple. 2013. 'The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome', *Nature*, 496: 498-503.
- Hwang, W. Y., Y. Fu, D. Reyon, M. L. Maeder, S. Q. Tsai, J. D. Sander, R. T. Peterson, J. R. Yeh, and J. K. Joung. 2013. 'Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system', *Nat Biotechnol*, 31: 227-9.
- Isken, A., M. Golczak, V. Oberhauser, S. Hunzelmann, W. Driever, Y. Imanishi, K. Palczewski, and J. von Lintig. 2008. 'RBP4 disrupts vitamin A uptake homeostasis in a STRA6-deficient animal model for Matthew-Wood syndrome', *Cell Metab*, 7: 258-68.
- Kalaskar, V. K., R. P. Alur, L. K. Li, J. W. Thomas, Y. V. Sergeev, D. Blain, R. B. Hufnagel, T. Cogliati, and B. P. Brooks. 2020. 'High-throughput custom capture sequencing identifies novel

- mutations in coloboma-associated genes: Mutation in DNA-binding domain of retinoic acid receptor beta affects nuclear localization causing ocular coloboma', *Hum Mutat*, 41: 678-95.
- Kawaguchi, R., J. Yu, J. Honda, J. Hu, J. Whitelegge, P. Ping, P. Wiita, D. Bok, and H. Sun. 2007. 'A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A', *Science*, 315: 820-5.
- Le, H. G., J. E. Dowling, and D. J. Cameron. 2012. 'Early retinoic acid deprivation in developing zebrafish results in microphthalmia', *Vis Neurosci*, 29: 219-28.
- Lee, L. M., C. Y. Leung, W. W. Tang, H. L. Choi, Y. C. Leung, P. J. McCaffery, C. C. Wang, A. S. Woolf, and A. S. Shum. 2012. 'A paradoxical teratogenic mechanism for retinoic acid', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 13668-73.
- Mali, P., L. Yang, K. M. Esvelt, J. Aach, M. Guell, J. E. DiCarlo, J. E. Norville, and G. M. Church. 2013. 'RNA-guided human genome engineering via Cas9', *Science*, 339: 823-6.
- Niederreither, K., and P. Dolle. 2008. 'Retinoic acid in development: towards an integrated view', *Nat Rev Genet*, 9: 541-53.
- Oliveira, E., M. Casado, D. Raldua, A. Soares, C. Barata, and B. Pina. 2013. 'Retinoic acid receptors' expression and function during zebrafish early development', *J Steroid Biochem Mol Biol*, 138: 143-51.
- Pasutto, F., H. Sticht, G. Hammersen, G. Gillessen-Kaesbach, D. R. Fitzpatrick, G. Nürnberg, F. Brasch, H. Schirmer-Zimmermann, J. L. Tolmie, D. Chitayat, G. Houge, L. Fernández-Martínez, S. Keating, G. Mortier, R. C. Hennekam, A. von der Wense, A. Slavotinek, P. Meinecke, P. Bitoun, C. Becker, P. Nürnberg, A. Reis, and A. Rauch. 2007. 'Mutations in STRA6 cause a broad spectrum of malformations including anophthalmia, congenital heart defects, diaphragmatic hernia, alveolar capillary dysplasia, lung hypoplasia, and mental retardation', *Am J Hum Genet*, 80: 550-60.
- Petkovich, M., N. J. Brand, A. Krust, and P. Chambon. 1987. 'A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors', *Nature*, 330: 444-50.
- Ross, S. A., P. J. McCaffery, U. C. Drager, and L. M. De Luca. 2000. 'Retinoids in embryonal development', *Physiol Rev*, 80: 1021-54.
- Samarut, É, A. Lissouba, and P. Drapeau. 2016. 'A simplified method for identifying early CRISPR-induced indels in zebrafish embryos using High Resolution Melting analysis', *BMC Genomics*, 17: 547.
- Srour, M., V. Caron, T. Pearson, S. B. Nielsen, S. Levesque, M. A. Delrue, T. A. Becker, F. F. Hamdan, Z. Kibar, S. G. Sattler, M. C. Schneider, P. Bitoun, N. Chassaing, J. A. Rosenfeld, F. Xia, S. Desai, E. Roeder, V. Kimonis, A. Schneider, R. O. Littlejohn, S. Douzgou, A. Tremblay, and J. L. Michaud. 2016. 'Gain-of-Function Mutations in RARB Cause Intellectual Disability with Progressive Motor Impairment', *Hum Mutat*, 37: 786-93.
- Srour, M., D. Chitayat, V. Caron, N. Chassaing, P. Bitoun, L. Patry, M. P. Cordier, J. M. Capo-Chichi, C. Francannet, P. Calvas, N. Ragge, S. Dobrzeniecka, F. F. Hamdan, G. A. Rouleau, A. Tremblay, and J. L. Michaud. 2013. 'Recessive and dominant mutations in retinoic acid receptor beta in cases with microphthalmia and diaphragmatic hernia', *Am J Hum Genet*, 93: 765-72.
- Waxman, J.S. 2011. 'Zebrafish retinoic acid receptors function as context-dependent transcriptional activators', *Dev Biol*, 352: 128-40.

- Wilson, J. G., C. B. Roth, and J. Warkany. 1953. 'An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation', *Am J Anat*, 92: 189-217.
- Yin, A., S. Korzh, C. L. Winata, V. Korzh, and Z. Gong. 2011. 'Wnt signaling is required for early development of zebrafish swimbladder', *PLoS One*, 6: e18431.
- Zhang, J., Z. P. Liu, T. A. Jones, L. M. Gierasch, and J. F. Sambrook. 1992. 'Mutating the charged residues in the binding pocket of cellular retinoic acid-binding protein simultaneously reduces its binding affinity to retinoic acid and increases its thermostability', *Proteins*, 13: 87-99.

Chapitre 3 – Discussion et perspectives

Notre groupe a identifié des patients atteints du syndrome PDAC porteurs de mutations du gène *RARB*. Jusqu'à maintenant, 15 variants pathogéniques dominants ont été identifiés chez plus de 30 patients PDAC. L'activité transcriptionnelle de ces variants a démontré lors d'un essai *in vitro* que l'activation des gènes était modifiée à la hausse ou à la baisse (Srouf et al. 2016; Srouf et al. 2013). Ces résultats préliminaires suggèrent un mécanisme de GOF ou DN, cependant le modèle cellulaire ne peut reproduire la complexité du développement embryonnaire entraînant le syndrome PDAC. Le but de cette étude était de caractériser le gène *RARB* ainsi que ses variants dans un contexte développemental en utilisant le poisson zèbre.

Des études antérieures ont identifié des phénotypes multi systémiques, notamment une microphthalmie, un œdème cardiaque et une anomalie de la vessie natatoire lorsque la voie de l'AR est affectée chez le poisson zèbre (Grandel et al. 2002; Begemann et al. 2001; Kalaskar et al. 2020). Premièrement, nos analyses démontrent que la surexpression du *RARB* humain entraîne des défauts développementaux ressemblant au syndrome PDAC, notamment une microphthalmie, un œdème cardiaque et un défaut de la vessie natatoire chez le poisson zèbre. De plus, les phénotypes observés sont dépendants de l'AR. En effet, l'ajout d'AR à un stade de développement précoce amplifie les phénotypes chez les poissons injectés avec h*RARB* de type sauvage sans toutefois affecter le développement des poissons zèbres injectés avec la mutation perte de fonction, h*RARB* K102X. En effet, les traitements avec l'AR n'entraînent aucune activation du variant K102X et causent des défauts comparables aux poissons non-injectés ce qui démontre que la mutation non-sens n'est pas fonctionnelle et justifie son utilisation comme contrôle négatif dans de futures expériences. Également, la concentration d'AR lors du traitement est très faible (0,05 et 0,5 nM) et on observe que la voie endogène n'est pas activée chez le contrôle. De plus grandes concentrations ont été testées et une toxicité a été observée à partir de 5 nM.

Les résultats de surexpression de h*RARB* WT suggèrent que h*RARB* peut se lier aux RAREs et modifier la transcription des gènes cibles. Les traitements avec l'AR suggèrent que les défauts de développement observés sont dus à l'activation de la voie de l'AR par h*RARB* et non des Rars endogènes. De surcroît, des études antérieures ont démontré que le sous-type *RARB* a une faible

capacité à recruter un corépresseur et ne parvient pas à réprimer la transcription (Farboud et al. 2003). En prenant cela en considération, la microphthalmie, l'œdème cardiaque et le défaut de la vessie natatoire causé par la surexpression de *hRARβ* chez le poisson zèbre serait le résultat d'une suractivation de la transcription des gènes cibles.

En outre, les résultats de la surexpression de *hRARβ* concordent avec les phénotypes décrits dans la littérature lors de l'altération de la voie de l'AR. Précédemment, les anomalies oculaires ainsi que les défauts cardiaques ont été étudiés indépendamment, toutefois l'ensemble des défauts multi-systémiques cohérent avec le syndrome PDAC sont rarement étudiés simultanément. En 2008, un modèle pour le syndrome PDAC a été décrit chez le poisson zèbre déficient pour le gène *STRA6* (Isken et al. 2008). Dans cet article, la perte de *STRA6* par l'injection de MO entraîne la perturbation de RBP4 qui cause l'excès non spécifique d'AR dans les tissus embryonnaires. Ainsi, la réduction de RBP4 sauve les phénotypes oculaires et cardiaques. Cet article décrit des défauts multi-systémiques similaires à la surexpression de *hRARβ*, en revanche leur modèle décrit un mécanisme qui est propre à la perte de *STRA6*.

Le laboratoire d'André Tremblay, notre collaborateur, (résultats non publiées) a démontré *in vitro* que certains variants *RARB* trouvés chez les patients PDAC agissent comme un GDF, tandis que d'autres seraient DN. Il est surprenant d'observer que deux mécanismes différents provoquent des phénotypes similaires chez les patients, soit que l'un entraîne une suractivation alors que l'autre induit une régulation négative de la voie de la AR. La similitude entre les effets d'une perte et d'un gain de la signalisation de l'AR a été mentionnée à plusieurs reprises précédemment dans la littérature. En effet, l'hypothèse évoquée pour expliquer ces observations est liée au mécanisme de rétroaction de la voie de l'AR. Plus précisément, l'augmentation de la signalisation de l'AR inhibe l'expression de l'enzyme produisant la AR, *aldh1a*, tout en favorisant l'expression de l'enzyme qui dégrade l'AR, *cyp26a1*. Inversement, une diminution de la signalisation de l'AR entraîne une augmentation d'*aldh1a* et une diminution de *cyp26a1* (Dobbs-McAuliffe, Zhao et Linney 2004). En effet, un groupe a observé qu'un excès d'AR au cours du développement chez la souris est tératogène par le déficit durable de la signalisation de l'AR (Lee et al. 2012). De plus, une étude antérieure chez le poisson zèbre a suggéré que la perte des Rars initie un mécanisme de rétroaction qui entraîne une augmentation tératogène de l'AR (D'Aniello et al. 2013). Compte tenu de ces

articles, nous nous demandons si les phénotypes causés par la surexpression de *RARB* humain chez le poisson zèbre est la conséquence de l'augmentation de la transcription des gènes cibles ou les résultats d'un déséquilibre du mécanisme de rétroaction. Lors de nos expériences, l'ajout d'AR augmente la sévérité des anomalies développementales ce qui suggère un mécanisme d'activation de la transcription. Si un mécanisme de rétroaction était à la base des phénotypes observés, la surexpression de *hRARB* entraînerait un déficit à long terme de la signalisation de l'AR et l'ajout d'AR aurait permis de sauver les défauts développementaux. Le mécanisme d'activation de la réponse transcriptionnelle semble être l'hypothèse la plus probable, en revanche des expériences quantitatives de l'expression des gènes cibles seront réalisées dans le futur pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents.

Également, pour explorer le rôle des variants *RARB* dans le développement du syndrome PDAC, nous avons surexprimé 2 mutations présumées GDF, R387C et R269T, et 2 mutations présumées DN, M290R et L402P. Le variant R387C a été sélectionné pour l'expérience de surexpression puisque c'est le variant le plus récurrent chez le patient PDAC. Il a été identifié chez 9 individus sans lien de famille connu. Le variant R269T est le GDF chez qui l'activité transcriptionnelle dans les cellules était la plus augmentée, résultats non publiés par notre collaborateur André Tremblay. Les deux variants présumés DN possèdent une mutation dans différentes régions de la protéine, soit M290R est impliqué dans la liaison à l'AR, tandis que L402P se retrouve dans le domaine de liaison des coactivateurs.

Nous avons démontré que la surexpression du variant R387C provoque moins de la moitié des phénotypes induits par la surexpression du récepteur de type sauvage. De plus, le traitement de l'AR lors de la surexpression de R387C a démontré que le variant est sensible au dosage de l'AR, toutefois R387C ne se comporte pas comme un gain de fonction. D'autre part, le variant R269T entraîne des malformations développementales significatives, mais un phénotype moins sévère par rapport au *hRARB* de type sauvage. Pour un variant GOF, l'activité transcriptionnelle du récepteur muté est augmentée, ainsi les résultats attendus lors d'une surexpression sont une augmentation de la sévérité des phénotypes (Figure 4). Or, les deux variants présumés GDF ne peuvent pas reproduire la gravité des défauts induits par le récepteur de type sauvage ne suggérant pas un GDF, mais plutôt une activité résiduelle du récepteur muté. Ces résultats sont surprenants puisque ce sont

des mutations dominantes chez les patients atteints du syndrome PDAC et que l'activité transcriptionnelle était fortement augmentée dans les cellules.

La surexpression du variant M290R n'entraîne pas de phénotypes développementaux significatifs. Pour la co-injection d'un variant DN, les résultats attendus sont une diminution de la sévérité des phénotypes en comparaison avec l'injection de *RARB* de type sauvage puisqu'il empêche le fonctionnement normal des récepteurs actifs (Figure 4). Cependant, la co-injection du variant M290R avec *hRARB* de type sauvage n'a causé la diminution des anomalies développementales observées lors de l'injection de *hRARB* seul. Nos résultats suggèrent que le variant M290R agit comme une mutation de perte de fonction chez le poisson zèbre. Nous avons été surpris par la réponse du variant M290R aux expériences de surexpression et co-injection. Chez les patients, M290R a été identifiée comme une mutation dominante, tandis que notre collaborateur a démontré *in vivo* avec des expériences utilisant des cellules que l'activité transcriptionnelle du récepteur muté était significativement réduite (données non publiées). Ces informations auraient mené vers l'hypothèse d'une mutation dominante négative, cependant dans un contexte développemental chez le poisson zèbre, M290R agit comme une mutation perte de fonction.

En revanche, la variante L402P a induit des anomalies développementales significatives et a sauvé le phénotype lors de la co-injection avec *hRARB* de type sauvage. Ensemble, nos résultats suggèrent que la variante L402P se comporte comme une mutation dominante négative *in vivo* chez le poisson zèbre. Par ailleurs, notre collaborateur a démontré que les variants M290R et L402P agissent comme dominant négatif lors d'expériences de co-transfections, alors que dans un contexte de développement utilisant le poisson zèbre, seul L402P semble se comporter comme tel (données non publiées). Ces résultats contradictoires pourraient être dus à la position de la mutation au niveau de la protéine. En effet, le résidu M290 fait partie de la LDB et est impliqué dans la liaison de l'AR. Alors que le résidu L402 fait partie du domaine de transactivation de l'hélice 12 à la fin du LBD. Des études antérieures ont montré que le variant I403S *RARB* confère une liaison accrue au corépresseur en l'absence de ligand entraînant une réduction de l'activité transcriptionnelle (Farboud and Privalsky 2004). Ensemble, nos résultats suggèrent que la mutation L402P de *RARB* provoque un effet négatif dominant en affectant la stabilité de l'hélice 12 et la liaison aux corépresseurs *in vitro* et *in vivo*. De façon paradoxale, les phénotypes observés lors de la surexpression de *hRARB* de type sauvage causant l'activation de la réponse transcriptionnelle et

lors de la surexpression de h*RARB* L402P causant une réduction de la réponse transcriptionnelle sont similaires. Ces observations peuvent être expliquées par le mécanisme de rétroaction qui causerait une activation tératogène de la voie de l'AR lors de la répression de la transcription par le variant L402P.

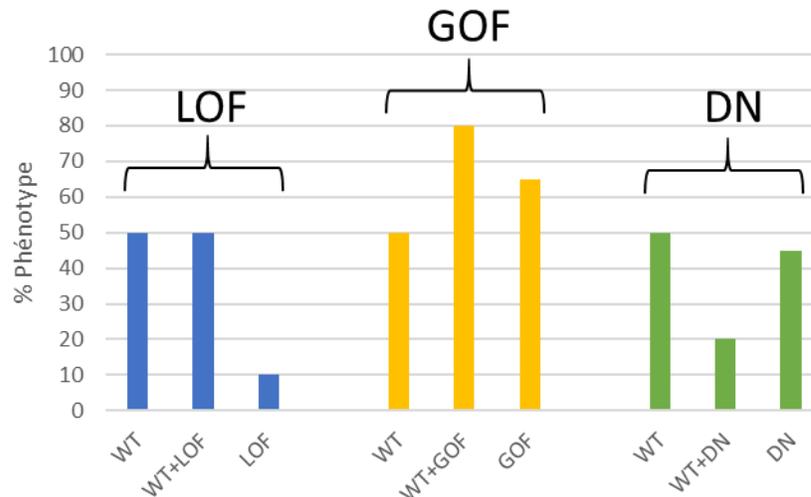


Figure 4 : Résultats attendus pour les expériences de surexpression et de co-injection d'un variant perte de fonction (LOF), gain de fonction (GOF) ou dominant négatif (DN). En bleu, la surexpression d'un variant LOF n'entraîne pas de phénotype. Lors d'une co-injection, le LOF n'affecte pas le phénotype causé par l'allèle de type sauvage (WT). En jaune, un variant GOF cause un phénotype plus sévère que le WT lors d'une surexpression ainsi que d'une co-injection. En vert, un variant DN entraîne un phénotype significatif lors d'une surexpression, tandis qu'il diminue l'effet du WT lors d'une co-injection.

Les mutations R269T, R387C et M290R ont en commun leur implication au niveau de la liaison de l'AR et le fait que les résultats de surexpression ne concorde pas avec les résultats *in vitro*. L'haploinsuffisance survient lorsqu'un phénotype dominant est causé par un allèle hétérozygote LOF (Deutschbauer et al. 2005). L'hypothèse d'haploinsuffisance pour le gène *RARB* n'est pas convaincante puisque des mutations hétérozygotes LOF ont été trouvées chez des parents en bonne santé avec des enfants atteints du syndrome PDAC (Srouf et al. 2013). Le résidu R269 fait partie

du LBP et se lie directement à l'AR (Pogenberg et al. 2005). La mutation R269T entraîne le changement d'une arginine, un acide aminé chargé positivement, pour une thréonine, un résidu polaire. Des études cristallographiques ont établi que le résidu Arg387 est tourné vers l'intérieur par rapport à la LBP, à proximité de l'AR (Srour et al. 2013). La mutation R387C entraîne le changement d'une arginine pour une cystéine, un résidu non-polaire. Le résidu M290 est également à proximité du LPB. La mutation M290R entraîne le changement d'une méthionine, un résidu polaire pour un arginine, un résidu chargé positivement. Le changement de conformation apporté par ces substitutions pourrait affecter la liaison avec l'AR ou altérer la stabilité de la protéine. En effet, un groupe de recherche a démontré que les mutations de résidu chargé comme l'arginine au niveau du LBP de la protéine de liaison cellulaire de l'AR (CRABP) entraînent une diminution de l'affinité avec l'AR et une augmentation de la thermostabilité (Zhang et al. 1992). La substitution de l'arginine pour un résidu non chargé chez les variants R387C et R269T pourrait entraîner une diminution de l'affinité avec l'AR et augmenter la thermostabilité. La substitution d'un résidu non chargé pour une arginine chez M290R devrait avoir l'effet contraire, soit augmenter l'affinité avec l'AR et diminuer la thermostabilité. Étonnamment, l'affinité pour le ligand serait diminuée chez les variants présumés GDF R387C et R269T, tandis que l'affinité pour l'AR serait augmentée chez le variant présumé DN M290R. Il est possible que la thermostabilité du récepteur impacte davantage la réponse transcriptionnelle que l'affinité pour l'AR, ainsi la substitution d'un résidu chargé augmenterait la stabilité et la longévité des variants R387C et R296T, tandis que la longévité serait diminuée pour M290R. Des études plus approfondies devront être effectuées pour déchiffrer le mécanisme d'action des variants R387C, R269T et M290R.

Les phénotypes physiologiquement pertinents ont été analysés pour la surexpression de *hRARβ*, cependant des différences entre les expériences *in vitro* et *in vivo* ont été rapportées. Selon nous, les deux expériences devraient être prises en considération, mais analysées individuellement. La complexité de la boucle de rétroaction de la voie de l'AR rend l'analyse *in vivo* des mécanismes des variants RARB plus difficile. En revanche, l'utilisation de techniques quantitatives sera un ajout primordial à l'étude. Par ailleurs, une expérience de RT-q-PCR a été effectuée dernièrement, en revanche aucune différence dans l'expression des gènes *aldh1a2*, *dhrs3a*, *cyp261a*, *hoxb5b* et *shh* n'a été observée. Le stade de développement utilisé pour l'expérience n'est pas optimal selon moi. L'ARN totale a été extraite à 24 hpf pour le RT-q-PCR. Cependant à la suite de la révision de plusieurs articles, il serait préférable de répéter l'expérience à un stade beaucoup plus précoce, soit

vers 8 somites (D'Aniello et al. 2013; Linville et al. 2009). L'utilisation de différents points dans le temps permettrait de déceler le mécanisme de rétroaction de la voie de l'AR à la suite de l'injection de *hRARB*. De plus, la technique d'hybridation *in situ* pourrait être effectuée dans le futur. Le *whole-mount in situ hybridization* (WISH) permettrait de visualiser et localiser l'expression d'un gène à différents stades de développement. En effet, il a été démontré que l'injection d'une forme hyperactive de *rarab* chez le poisson zèbre entraîne une expression ectopique des gènes *dhrs3a* et *hoxb5b* (Waxman and Yelon 2011). Ces techniques pourront nous donner des informations supplémentaires sur les mécanismes de régulation de la signalisation de l'AR par l'étude des gènes *aldh1a2*, *dhrs3a* et *cyp261a*. Des marqueurs spécifiques au développement d'un organe seront utiles pour explorer l'implication de RARB dans le développement de ceux-ci. En effet, *pax6.1* est un marqueur précédemment utilisé chez le poisson zèbre pour le développement des yeux (Isken et al. 2008). Pour le développement du cœur, les gènes *nkx2.5* et *hand2* sont des progéniteurs de cardiomyocytes qui sont altérés lors d'une déficience en *rarab* (D'Aniello et al. 2013). Les gènes *Wnt* et *shh* sont indispensables au développement approprié de la vessie natatoire (Yin et al. 2011). D'autre part, la formation des arcs branchiaux est possiblement affectée lors de la surexpression de *hRARB*. En effet, des défauts au niveau des arcs branchiaux ont été caractérisés lors de la perte de *aldh1a2* ainsi que dans notre lignée de poisson zèbre *rarga* (Begemann et al. 2001; Grandel et al. 2002). Il serait intéressant de déterminer si la surexpression de *hRARB* cause également un défaut des arcs branchiaux.

Un modèle perte de fonction pour le gène *rarga* a été créé chez le poisson zèbre dans le but d'en apprendre davantage sur le rôle de l'orthologue de *RARB*. La lignée mutante *rarga* possède une délétion de 5 nucléotides qui se retrouve au centre du LBD de la protéine (p.382). Cette délétion entraîne un changement de cadre de lecture et cette mutation devrait entraîner une perte de fonction du récepteur puisque la moitié du LBD est absente. Actuellement, aucune lignée mutante pour les RARs n'a été décrite dans la littérature. En revanche, la délétion de *rarga* par MO entraîne des malformations au niveau des arcs pharyngés postérieurs (Linville et al. 2009). De plus, *rarga* est le RARs le plus abondant dans les premiers jours de vie chez le poisson zèbre, ce qui suggère une grande implication au niveau de l'embryogénèse (Oliveira et al. 2013).

Étant donné les recherches précédentes, nous avons principalement caractérisé les phénotypes développementaux observés chez la lignée *rarga*. Les poissons zèbres *rarga* *-/-* ont des défauts au niveau des arcs branchiaux et de la vessie natatoire. Le phénotype des arcs branchiaux concorde avec la littérature lors de l'altération de *rarga* par MO et de la voie de l'AR (Linville et al. 2009; Begemann et al. 2001). De plus, la vessie natatoire n'est pas gonflée chez environ la moitié des homozygotes à 5 dpf, ce qui est possiblement la cause d'une importante mortalité vers 2 semaines de vie des poissons. Les poissons zèbres se nourrissent à partir des nutriments contenus dans le sac vitellin (Fraher et al. 2016). Une fois les provisions terminées, le poisson zèbre doit être en mesure de se nourrir par lui-même. La vessie natatoire permet au poisson zèbre de flotter et ainsi d'avoir accès à la nourriture à la surface de l'eau. Selon nous, le défaut de la vessie natatoire que nous observons empêcherait une alimentation adéquate, entraînant la mort des poissons *rarga* *-/-*. En résumé, nos observations suggèrent que *rarga* est impliqué dans le développement des arcs branchiaux et de la vessie natatoire. D'autres expériences avec la lignée mutante *rarga* doivent être menées pour mieux caractériser le rôle de *Rarga* au cours du développement. Dans le futur, l'injection de *RARB* humain ou le traitement de la AR chez les poissons *rarga* *-/-* serait intéressant à explorer. En effet, il est possible que l'injection de *hRARB* puisse sauver les défauts de vessie natatoire et des arcs branchiaux.

Pour la première fois, une altération des RARs serait impliquée dans le développement de la vessie natatoire chez le poisson zèbre. En effet, nos résultats démontrent que l'injection de *hRARB* et la délétion de *rarga* causent un défaut du gonflement de la vessie natatoire. Dans la littérature, un défaut de la vessie natatoire a été brièvement décrit chez le mutant *no-fin*, mutant pour le gène *aldh1a2* (Grandel et al. 2002). Toutefois, aucune explication sur le mécanisme sous-jacent n'avait été suggérée à ce moment. L'importance de la voie de l'AR pour le développement des poumons a été largement démontrée chez les mammifères, cependant l'équivalence chez le poisson zèbre n'avait pas encore été évoquée. Chez la souris, il a été démontré que l'AR contrôle la présence de Wnt lors du développement des poumons (Chen et al. 2010). De plus, le développement de la vessie natatoire comme des poumons est dépendante de la voie de signalisation Wnt (Yin et al. 2011; Desai et al. 2004). Cependant, l'implication de l'AR dans le développement de la vessie natatoire par la régulation la voie des Wnt n'a jamais été énoncée précédemment. Des recherches plus approfondies seront nécessaires pour mettre en relation la voie de l'AR et de Wnt lors du développement de la vessie natatoire chez le poisson zèbre.

6. Conclusions

Notre étude démontre pour la première fois que la surexpression de l'ARNm humain de *RARB* chez le poisson zèbre cause des défauts développementaux similaires au syndrome PDAC. En effet, une microphthalmie, un œdème cardiaque et un défaut de la vessie natatoire ont été observés. En revanche, la surexpression de h*RARB* contenant une des mutations identifiées chez les patients PDAC n'a pu reproduire la sévérité du phénotype causé par le type sauvage. L'expérience de co-injection a démontré que le variant L402P agit comme une mutation dominante négative. Des recherches plus approfondies sur le mécanisme d'action des variants R387C, R269T et M290R sont nécessaires pour mieux comprendre leurs implications dans le développement du syndrome PDAC. L'étude de l'activité transcriptionnelle *in vivo* serait une méthode plus précise pour classifier ses variants. De plus, nous avons caractérisé un modèle de poisson zèbre mutant pour *rarga*, l'orthologue de *RARB*. Nous avons trouvé que le mutant *rarga* *-/-* présente des défauts au niveau des arcs branchiaux et du gonflement de la vessie natatoire. Nos résultats ont certainement contribué à approfondir les connaissances sur l'impact des récepteurs de l'acide rétinoïque durant le développement avec l'utilisation du poisson zèbre. Toutefois, des expériences quantitatives sont requises pour soutenir ainsi que mieux caractériser nos observations.

5. Références bibliographiques

- Abu-Abed, S., P. Dollé, D. Metzger, B. Beckett, P. Chambon, and M. Petkovich. 2001. 'The retinoic acid-metabolizing enzyme, CYP26A1, is essential for normal hindbrain patterning, vertebral identity, and development of posterior structures', *Genes Dev*, 15: 226-40.
- Alvarez, S., P. Germain, R. Alvarez, F. Rodríguez-Barrios, H. Gronemeyer, and A. R. de Lera. 2007. 'Structure, function and modulation of retinoic acid receptor beta, a tumor suppressor', *Int J Biochem Cell Biol*, 39: 1406-15.
- Balmer, J. E., and R. Blomhoff. 2002. 'Gene expression regulation by retinoic acid', *J Lipid Res*, 43: 1773-808.
- . 2005. 'A robust characterization of retinoic acid response elements based on a comparison of sites in three species', *J Steroid Biochem Mol Biol*, 96: 347-54.
- Batourina, E., S. Gim, N. Bello, M. Shy, M. Clagett-Dame, S. Srinivas, F. Costantini, and C. Mendelsohn. 2001. 'Vitamin A controls epithelial/mesenchymal interactions through Ret expression', *Nat Genet*, 27: 74-8.
- Begemann, G., T. F. Schilling, G. J. Rauch, R. Geisler, and P. W. Ingham. 2001. 'The zebrafish neckless mutation reveals a requirement for raldh2 in mesodermal signals that pattern the hindbrain', *Development*, 128: 3081-94.
- Brand, N., M. Petkovich, A. Krust, P. Chambon, H. de Thé, A. Marchio, P. Tiollais, and A. Dejean. 1988. 'Identification of a second human retinoic acid receptor', *Nature*, 332: 850-3.
- Cañestro, C., J. M. Catchen, A. Rodríguez-Marí, H. Yokoi, and J. H. Postlethwait. 2009. 'Consequences of lineage-specific gene loss on functional evolution of surviving paralogs: ALDH1A and retinoic acid signaling in vertebrate genomes', *PLoS Genet*, 5: e1000496.
- Casey, J., R. Kawaguchi, M. Morrissey, H. Sun, P. McGettigan, J. E. Nielsen, J. Conroy, R. Regan, E. Kenny, P. Cormican, D. W. Morris, P. Tormey, M. N. Chróinín, B. N. Kennedy, S. Lynch, A. Green, and S. Ennis. 2011. 'First implication of STRA6 mutations in isolated anophthalmia, microphthalmia, and coloboma: a new dimension to the STRA6 phenotype', *Hum Mutat*, 32: 1417-26.
- Chen, F., Y. Cao, J. Qian, F. Shao, K. Niederreither, and W. V. Cardoso. 2010. 'A retinoic acid-dependent network in the foregut controls formation of the mouse lung primordium', *J Clin Invest*, 120: 2040-8.
- Chen, J. D., and R. M. Evans. 1995. 'A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors', *Nature*, 377: 454-7.
- Chitayat, D., H. Sroka, S. Keating, R. S. Colby, G. Ryan, A. Toi, S. Blaser, S. Viero, L. Devisme, O. Boute-Bénéjean, S. Manouvrier-Hanu, G. Mortier, B. Loey, A. Rauch, and P. Bitoun. 2007. 'The PDAC syndrome (pulmonary hypoplasia/agenesis, diaphragmatic hernia/eventration, anophthalmia/microphthalmia, and cardiac defect) (Spear syndrome, Matthew-Wood syndrome): report of eight cases including a living child and further evidence for autosomal recessive inheritance', *Am J Med Genet A*, 143a: 1268-81.
- Cunningham, T. J., C. Chatzi, L. L. Sandell, P. A. Trainor, and G. Duester. 2011. 'Rdh10 mutants deficient in limb field retinoic acid signaling exhibit normal limb patterning but display interdigital webbing', *Dev Dyn*, 240: 1142-50.

- Cunningham, T. J., and G. Duester. 2015. 'Mechanisms of retinoic acid signalling and its roles in organ and limb development', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16: 110-23.
- D'Aniello, E., A. B. Rydeen, J. L. Anderson, A. Mandal, and J. S. Waxman. 2013. 'Depletion of retinoic acid receptors initiates a novel positive feedback mechanism that promotes teratogenic increases in retinoic acid', *PLoS Genet*, 9: e1003689.
- de Lera, A. R., W. Krezel, and R. Ruhl. 2016. 'An Endogenous Mammalian Retinoid X Receptor Ligand, At Last!', *ChemMedChem*, 11: 1027-37.
- Desai, T. J., F. Chen, J. Lü, J. Qian, K. Niederreither, P. Dollé, P. Chambon, and W. V. Cardoso. 2006. 'Distinct roles for retinoic acid receptors alpha and beta in early lung morphogenesis', *Dev Biol*, 291: 12-24.
- Desai, T. J., S. Malpel, G. R. Flentke, S. M. Smith, and W. V. Cardoso. 2004. 'Retinoic acid selectively regulates Fgf10 expression and maintains cell identity in the prospective lung field of the developing foregut', *Dev Biol*, 273: 402-15.
- Deutschbauer, A. M., D. F. Jaramillo, M. Proctor, J. Kumm, M. E. Hillenmeyer, R. W. Davis, C. Nislow, and G. Giaever. 2005. 'Mechanisms of haploinsufficiency revealed by genome-wide profiling in yeast', *Genetics*, 169: 1915-25.
- Dobbs-McAuliffe, B., Q. Zhao, and E. Linney. 2004. 'Feedback mechanisms regulate retinoic acid production and degradation in the zebrafish embryo', *Mech Dev*, 121: 339-50.
- Dollé, P., E. Ruberte, P. Kastner, M. Petkovich, C. M. Stoner, L. J. Gudas, and P. Chambon. 1989. 'Differential expression of genes encoding alpha, beta and gamma retinoic acid receptors and CRABP in the developing limbs of the mouse', *Nature*, 342: 702-5.
- Duester, G. 1996. 'Involvement of alcohol dehydrogenase, short-chain dehydrogenase/reductase, aldehyde dehydrogenase, and cytochrome P450 in the control of retinoid signaling by activation of retinoic acid synthesis', *Biochemistry*, 35: 12221-7.
- Engberg, N., M. Kahn, D. R. Petersen, M. Hansson, and P. Serup. 2010. 'Retinoic acid synthesis promotes development of neural progenitors from mouse embryonic stem cells by suppressing endogenous, Wnt-dependent nodal signaling', *Stem Cells*, 28: 1498-509.
- Farboud, B., H. Hauksdottir, Y. Wu, and M. L. Privalsky. 2003. 'Isotype-restricted corepressor recruitment: a constitutively closed helix 12 conformation in retinoic acid receptors beta and gamma interferes with corepressor recruitment and prevents transcriptional repression', *Mol Cell Biol*, 23: 2844-58.
- Farboud, B., and M. L. Privalsky. 2004. 'Retinoic acid receptor-alpha is stabilized in a repressive state by its C-terminal, isotype-specific F domain', *Mol Endocrinol*, 18: 2839-53.
- Fraher, D., A. Sanigorski, N. A. Mellett, P. J. Meikle, A. J. Sinclair, and Y. Gibert. 2016. 'Zebrafish Embryonic Lipidomic Analysis Reveals that the Yolk Cell Is Metabolically Active in Processing Lipid', *Cell Rep*, 14: 1317-29.
- Géhin, M., V. Vivat, J. M. Wurtz, R. Losson, P. Chambon, D. Moras, and H. Gronemeyer. 1999. 'Structural basis for engineering of retinoic acid receptor isotype-selective agonists and antagonists', *Chem Biol*, 6: 519-29.
- Ghyselinck, N. B., and G. Duester. 2019. 'Retinoic acid signaling pathways', *Development*, 146.
- Ghyselinck, N. B., V. Dupe, A. Dierich, N. Messaddeq, J. M. Garnier, C. Rochette-Egly, P. Chambon, and M. Mark. 1997. 'Role of the retinoic acid receptor beta (RARbeta) during mouse development', *Int J Dev Biol*, 41: 425-47.

- Giguere, V., E. S. Ong, P. Segui, and R. M. Evans. 1987. 'Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid', *Nature*, 330: 624-9.
- Grandel, H., K. Lun, G. J. Rauch, M. Rhinn, T. Piotrowski, C. Houart, P. Sordino, A. M. Küchler, S. Schulte-Merker, R. Geisler, N. Holder, S. W. Wilson, and M. Brand. 2002. 'Retinoic acid signalling in the zebrafish embryo is necessary during pre-segmentation stages to pattern the anterior-posterior axis of the CNS and to induce a pectoral fin bud', *Development*, 129: 2851-65.
- Gutierrez-Mazariegos, J., E. K. Nadendla, R. A. Studer, S. Alvarez, A. R. de Lera, S. Kuraku, W. Bourguet, M. Schubert, and V. Laudet. 2016. 'Evolutionary diversification of retinoic acid receptor ligand-binding pocket structure by molecular tinkering', *R Soc Open Sci*, 3: 150484.
- Hale, L. A., A. Tallafuss, Y. L. Yan, L. Dudley, J. S. Eisen, and J. H. Postlethwait. 2006. 'Characterization of the retinoic acid receptor genes *raraa*, *rarab* and *rarg* during zebrafish development', *Gene Expr Patterns*, 6: 546-55.
- Howe, K., M. D. Clark, C. F. Torroja, J. Torrance, C. Berthelot, M. Muffato, J. E. Collins, S. Humphray, K. McLaren, L. Matthews, S. McLaren, I. Sealy, M. Caccamo, C. Churcher, C. Scott, J. C. Barrett, R. Koch, G. J. Rauch, S. White, W. Chow, B. Kilian, L. T. Quintais, J. A. Guerra-Assunção, Y. Zhou, Y. Gu, J. Yen, J. H. Vogel, T. Eyre, S. Redmond, R. Banerjee, J. Chi, B. Fu, E. Langley, S. F. Maguire, G. K. Laird, D. Lloyd, E. Kenyon, S. Donaldson, H. Sehra, J. Almeida-King, J. Loveland, S. Trevanion, M. Jones, M. Quail, D. Willey, A. Hunt, J. Burton, S. Sims, K. McLay, B. Plumb, J. Davis, C. Clee, K. Oliver, R. Clark, C. Riddle, D. Elliot, G. Threadgold, G. Harden, D. Ware, S. Begum, B. Mortimore, G. Kerry, P. Heath, B. Phillimore, A. Tracey, N. Corby, M. Dunn, C. Johnson, J. Wood, S. Clark, S. Pelan, G. Griffiths, M. Smith, R. Glithero, P. Howden, N. Barker, C. Lloyd, C. Stevens, J. Harley, K. Holt, G. Panagiotidis, J. Lovell, H. Beasley, C. Henderson, D. Gordon, K. Auger, D. Wright, J. Collins, C. Raisen, L. Dyer, K. Leung, L. Robertson, K. Ambridge, D. Leongamornlert, S. McGuire, R. Gilderthorp, C. Griffiths, D. Manthavadi, S. Nichol, G. Barker, S. Whitehead, M. Kay, J. Brown, C. Murnane, E. Gray, M. Humphries, N. Sycamore, D. Barker, D. Saunders, J. Wallis, A. Babbage, S. Hammond, M. Mashreghi-Mohammadi, L. Barr, S. Martin, P. Wray, A. Ellington, N. Matthews, M. Ellwood, R. Woodmansey, G. Clark, J. Cooper, A. Tromans, D. Grafham, C. Skuce, R. Pandian, R. Andrews, E. Harrison, A. Kimberley, J. Garnett, N. Fosker, R. Hall, P. Garner, D. Kelly, C. Bird, S. Palmer, I. Gehring, A. Berger, C. M. Dooley, Z. Ersan-Ürün, C. Eser, H. Geiger, M. Geisler, L. Karotki, A. Kirn, J. Konantz, M. Konantz, M. Oberländer, S. Rudolph-Geiger, M. Teucke, C. Lanz, G. Raddatz, K. Osoegawa, B. Zhu, A. Rapp, S. Widaa, C. Langford, F. Yang, S. C. Schuster, N. P. Carter, J. Harrow, Z. Ning, J. Herrero, S. M. Searle, A. Enright, R. Geisler, R. H. Plasterk, C. Lee, M. Westerfield, P. J. de Jong, L. I. Zon, J. H. Postlethwait, C. Nüsslein-Volhard, T. J. Hubbard, H. Roest Crollius, J. Rogers, and D. L. Stemple. 2013. 'The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome', *Nature*, 496: 498-503.
- Hwang, W. Y., Y. Fu, D. Reyon, M. L. Maeder, S. Q. Tsai, J. D. Sander, R. T. Peterson, J. R. Yeh, and J. K. Joung. 2013. 'Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system', *Nat Biotechnol*, 31: 227-9.

- Isken, A., M. Golczak, V. Oberhauser, S. Hunzelmann, W. Driever, Y. Imanishi, K. Palczewski, and J. von Lintig. 2008. 'RBP4 disrupts vitamin A uptake homeostasis in a STRA6-deficient animal model for Matthew-Wood syndrome', *Cell Metab*, 7: 258-68.
- Kalaskar, V. K., R. P. Alur, L. K. Li, J. W. Thomas, Y. V. Sergeev, D. Blain, R. B. Hufnagel, T. Cogliati, and B. P. Brooks. 2020. 'High-throughput custom capture sequencing identifies novel mutations in coloboma-associated genes: Mutation in DNA-binding domain of retinoic acid receptor beta affects nuclear localization causing ocular coloboma', *Hum Mutat*, 41: 678-95.
- Kawaguchi, R., J. Yu, J. Honda, J. Hu, J. Whitelegge, P. Ping, P. Wiita, D. Bok, and H. Sun. 2007. 'A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A', *Science*, 315: 820-5.
- Keegan, B. R., J. L. Feldman, G. Begemann, P. W. Ingham, and D. Yelon. 2005. 'Retinoic acid signaling restricts the cardiac progenitor pool', *Science*, 307: 247-9.
- Kumar, S., and G. Duester. 2010. 'Retinoic acid signaling in perioptic mesenchyme represses Wnt signaling via induction of Pitx2 and Dkk2', *Dev Biol*, 340: 67-74.
- . 2014. 'Retinoic acid controls body axis extension by directly repressing Fgf8 transcription', *Development*, 141: 2972-7.
- Kurokawa, R., M. Söderström, A. Hörlein, S. Halachmi, M. Brown, M. G. Rosenfeld, and C. K. Glass. 1995. 'Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-repressor', *Nature*, 377: 451-4.
- Lampert, J. M., J. Holzschuh, S. Hessel, W. Driever, K. Vogt, and J. von Lintig. 2003. 'Provitamin A conversion to retinal via the beta,beta-carotene-15,15'-oxygenase (bcx) is essential for pattern formation and differentiation during zebrafish embryogenesis', *Development*, 130: 2173-86.
- Le, H. G., J. E. Dowling, and D. J. Cameron. 2012. 'Early retinoic acid deprivation in developing zebrafish results in microphthalmia', *Vis Neurosci*, 29: 219-28.
- Lee, L. M., C. Y. Leung, W. W. Tang, H. L. Choi, Y. C. Leung, P. J. McCaffery, C. C. Wang, A. S. Woolf, and A. S. Shum. 2012. 'A paradoxical teratogenic mechanism for retinoic acid', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 13668-73.
- Leid, M., P. Kastner, and P. Chambon. 1992. 'Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways', *Trends Biochem Sci*, 17: 427-33.
- Linville, A., K. Radtke, J. S. Waxman, D. Yelon, and T. F. Schilling. 2009. 'Combinatorial roles for zebrafish retinoic acid receptors in the hindbrain, limbs and pharyngeal arches', *Dev Biol*, 325: 60-70.
- Liu, L., K. Suzuki, N. Nakagata, K. Mihara, D. Matsumaru, Y. Ogino, K. Yashiro, H. Hamada, Z. Liu, S. M. Evans, C. Mendelsohn, and G. Yamada. 2012. 'Retinoic acid signaling regulates sonic hedgehog and bone morphogenetic protein signalings during genital tubercle development', *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 95: 79-88.
- Lohnes, D., M. Mark, C. Mendelsohn, P. Dollé, A. Dierich, P. Gorry, A. Gansmuller, and P. Chambon. 1994. 'Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (I). Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants', *Development*, 120: 2723-48.

- Luo, J., P. Pasceri, R. A. Conlon, J. Rossant, and V. Giguère. 1995. 'Mice lacking all isoforms of retinoic acid receptor beta develop normally and are susceptible to the teratogenic effects of retinoic acid', *Mech Dev*, 53: 61-71.
- Luo, J., H. M. Sucov, J. A. Bader, R. M. Evans, and V. Giguère. 1996. 'Compound mutants for retinoic acid receptor (RAR) beta and RAR alpha 1 reveal developmental functions for multiple RAR beta isoforms', *Mech Dev*, 55: 33-44.
- Mali, P., L. Yang, K. M. Esvelt, J. Aach, M. Guell, J. E. DiCarlo, J. E. Norville, and G. M. Church. 2013. 'RNA-guided human genome engineering via Cas9', *Science*, 339: 823-6.
- Martín, M., J. Gallego-Llamas, V. Ribes, M. Kedinger, K. Niederreither, P. Chambon, P. Dollé, and G. Gradwohl. 2005. 'Dorsal pancreas agenesis in retinoic acid-deficient Raldh2 mutant mice', *Dev Biol*, 284: 399-411.
- Maw, M. A., B. Kennedy, A. Knight, R. Bridges, K. E. Roth, E. J. Mani, J. K. Mukkadan, D. Nancarrow, J. W. Crabb, and M. J. Denton. 1997. 'Mutation of the gene encoding cellular retinaldehyde-binding protein in autosomal recessive retinitis pigmentosa', *Nat Genet*, 17: 198-200.
- Mendelsohn, C., D. Lohnes, D. Décimo, T. Lufkin, M. LeMeur, P. Chambon, and M. Mark. 1994. 'Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants', *Development*, 120: 2749-71.
- Metallo, C. M., L. Ji, J. J. de Pablo, and S. P. Palecek. 2008. 'Retinoic acid and bone morphogenetic protein signaling synergize to efficiently direct epithelial differentiation of human embryonic stem cells', *Stem Cells*, 26: 372-80.
- Meyer, A., and M. Schartl. 1999. 'Gene and genome duplications in vertebrates: the one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions', *Curr Opin Cell Biol*, 11: 699-704.
- Mic, F. A., R. J. Haselbeck, A. E. Cuenca, and G. Duester. 2002. 'Novel retinoic acid generating activities in the neural tube and heart identified by conditional rescue of Raldh2 null mutant mice', *Development*, 129: 2271-82.
- Mic, F. A., A. Molotkov, D. M. Benbrook, and G. Duester. 2003. 'Retinoid activation of retinoic acid receptor but not retinoid X receptor is sufficient to rescue lethal defect in retinoic acid synthesis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 7135-40.
- Molotkov, A., N. Molotkova, and G. Duester. 2006. 'Retinoic acid guides eye morphogenetic movements via paracrine signaling but is unnecessary for retinal dorsoventral patterning', *Development*, 133: 1901-10.
- Niederreither, K., and P. Dolle. 2008. 'Retinoic acid in development: towards an integrated view', *Nat Rev Genet*, 9: 541-53.
- Niederreither, K., J. Vermot, N. Messaddeq, B. Schuhbaur, P. Chambon, and P. Dollé. 2001. 'Embryonic retinoic acid synthesis is essential for heart morphogenesis in the mouse', *Development*, 128: 1019-31.
- Niederriter, A. R., E. E. Davis, C. Golzio, E. C. Oh, I. C. Tsai, and N. Katsanis. 2013. 'In vivo modeling of the morbid human genome using *Danio rerio*', *J Vis Exp*: e50338.
- Oliveira, E., M. Casado, D. Raldua, A. Soares, C. Barata, and B. Pina. 2013. 'Retinoic acid receptors' expression and function during zebrafish early development', *J Steroid Biochem Mol Biol*, 138: 143-51.

- Pasutto, F., H. Sticht, G. Hammersen, G. Gillessen-Kaesbach, D. R. Fitzpatrick, G. Nürnberg, F. Brasch, H. Schirmer-Zimmermann, J. L. Tolmie, D. Chitayat, G. Houge, L. Fernández-Martínez, S. Keating, G. Mortier, R. C. Hennekam, A. von der Wense, A. Slavotinek, P. Meinecke, P. Bitoun, C. Becker, P. Nürnberg, A. Reis, and A. Rauch. 2007. 'Mutations in STRA6 cause a broad spectrum of malformations including anophthalmia, congenital heart defects, diaphragmatic hernia, alveolar capillary dysplasia, lung hypoplasia, and mental retardation', *Am J Hum Genet*, 80: 550-60.
- Perry, S. F., R. J. Wilson, C. Straus, M. B. Harris, and J. E. Remmers. 2001. 'Which came first, the lung or the breath?', *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 129: 37-47.
- Petkovich, M., N. J. Brand, A. Krust, and P. Chambon. 1987. 'A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors', *Nature*, 330: 444-50.
- Pogenberg, V., J. F. Guichou, V. Vivat-Hannah, S. Kammerer, E. Pérez, P. Germain, A. R. de Lera, H. Gronemeyer, C. A. Royer, and W. Bourguet. 2005. 'Characterization of the interaction between retinoic acid receptor/retinoid X receptor (RAR/RXR) heterodimers and transcriptional coactivators through structural and fluorescence anisotropy studies', *J Biol Chem*, 280: 1625-33.
- Rhinn, M., and P. Dolle. 2012. 'Retinoic acid signalling during development', *Development*, 139: 843-58.
- Rochel, N., F. Ciesielski, J. Godet, E. Moman, M. Roessle, C. Peluso-Iltis, M. Moulin, M. Haertlein, P. Callow, Y. Mély, D. I. Svergun, and D. Moras. 2011. 'Common architecture of nuclear receptor heterodimers on DNA direct repeat elements with different spacings', *Nat Struct Mol Biol*, 18: 564-70.
- Roscioli, T., E. J. Kamsteeg, K. Buysse, I. Maystadt, J. van Reeuwijk, C. van den Elzen, E. van Beusekom, M. Riemersma, R. Pfundt, L. E. Vissers, M. Schraders, U. Altunoglu, M. F. Buckley, H. G. Brunner, B. Grisart, H. Zhou, J. A. Veltman, C. Gilissen, G. M. Mancini, P. Delrée, M. A. Willemsen, D. P. Ramadža, D. Chitayat, C. Bennett, E. Sheridan, E. A. Peeters, G. M. Tan-Sindhunata, C. E. de Die-Smulders, K. Devriendt, H. Kayserili, O. A. El-Hashash, D. L. Stemple, D. J. Lefeber, Y. Y. Lin, and H. van Bokhoven. 2012. 'Mutations in ISPD cause Walker-Warburg syndrome and defective glycosylation of α -dystroglycan', *Nat Genet*, 44: 581-5.
- Ross, S. A., P. J. McCaffery, U. C. Drager, and L. M. De Luca. 2000. 'Retinoids in embryonal development', *Physiol Rev*, 80: 1021-54.
- Ruberte, E., P. Dolle, P. Chambon, and G. Morriss-Kay. 1991. 'Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. II. Their differential pattern of transcription during early morphogenesis in mouse embryos', *Development*, 111: 45-60.
- Ruberte, E., V. Friederich, P. Chambon, and G. Morriss-Kay. 1993. 'Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. III. Their differential transcript distribution during mouse nervous system development', *Development*, 118: 267-82.
- Samarut, É, A. Lissouba, and P. Drapeau. 2016. 'A simplified method for identifying early CRISPR-induced indels in zebrafish embryos using High Resolution Melting analysis', *BMC Genomics*, 17: 547.
- Simões-Costa, M. S., A. P. Azambuja, and J. Xavier-Neto. 2008. 'The search for non-chordate retinoic acid signaling: lessons from chordates', *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 310: 54-72.

- Sirbu, I. O., X. Zhao, and G. Duyster. 2008. 'Retinoic acid controls heart anteroposterior patterning by down-regulating *Isl1* through the *Fgf8* pathway', *Dev Dyn*, 237: 1627-35.
- Smith, S. M., and G. Eichele. 1991. 'Temporal and regional differences in the expression pattern of distinct retinoic acid receptor-beta transcripts in the chick embryo', *Development*, 111: 245-52.
- Sorrell, M. R., and J. S. Waxman. 2011. 'Restraint of *Fgf8* signaling by retinoic acid signaling is required for proper heart and forelimb formation', *Dev Biol*, 358: 44-55.
- Srour, M., V. Caron, T. Pearson, S. B. Nielsen, S. Levesque, M. A. Delrue, T. A. Becker, F. F. Hamdan, Z. Kibar, S. G. Sattler, M. C. Schneider, P. Bitoun, N. Chassaing, J. A. Rosenfeld, F. Xia, S. Desai, E. Roeder, V. Kimonis, A. Schneider, R. O. Littlejohn, S. Douzgou, A. Tremblay, and J. L. Michaud. 2016. 'Gain-of-Function Mutations in *RARB* Cause Intellectual Disability with Progressive Motor Impairment', *Hum Mutat*, 37: 786-93.
- Srour, M., D. Chitayat, V. Caron, N. Chassaing, P. Bitoun, L. Patry, M. P. Cordier, J. M. Capo-Chichi, C. Francannet, P. Calvas, N. Ragge, S. Dobrzeniecka, F. F. Hamdan, G. A. Rouleau, A. Tremblay, and J. L. Michaud. 2013. 'Recessive and dominant mutations in retinoic acid receptor beta in cases with microphthalmia and diaphragmatic hernia', *Am J Hum Genet*, 93: 765-72.
- Stavridis, M. P., B. J. Collins, and K. G. Storey. 2010. 'Retinoic acid orchestrates fibroblast growth factor signalling to drive embryonic stem cell differentiation', *Development*, 137: 881-90.
- Studer, M., H. Pöpperl, H. Marshall, A. Kuroiwa, and R. Krumlauf. 1994. 'Role of a conserved retinoic acid response element in rhombomere restriction of *Hoxb-1*', *Science*, 265: 1728-32.
- Vilella, A. J., J. Severin, A. Ureta-Vidal, L. Heng, R. Durbin, and E. Birney. 2009. 'EnsemblCompara GeneTrees: Complete, duplication-aware phylogenetic trees in vertebrates', *Genome Res*, 19: 327-35.
- Wang, Z., P. Dollé, W. V. Cardoso, and K. Niederreither. 2006. 'Retinoic acid regulates morphogenesis and patterning of posterior foregut derivatives', *Dev Biol*, 297: 433-45.
- Waxman, J. S., B. R. Keegan, R. W. Roberts, K. D. Poss, and D. Yelon. 2008. '*Hoxb5b* acts downstream of retinoic acid signaling in the forelimb field to restrict heart field potential in zebrafish', *Dev Cell*, 15: 923-34.
- Waxman, J. S., and D. Yelon. 2007. 'Comparison of the expression patterns of newly identified zebrafish retinoic acid and retinoid X receptors', *Dev Dyn*, 236: 587-95.
- . 2011. 'Zebrafish retinoic acid receptors function as context-dependent transcriptional activators', *Dev Biol*, 352: 128-40.
- White, J. A., Y. D. Guo, K. Baetz, B. Beckett-Jones, J. Bonasoro, K. E. Hsu, F. J. Dilworth, G. Jones, and M. Petkovich. 1996. 'Identification of the retinoic acid-inducible all-trans-retinoic acid 4-hydroxylase', *J Biol Chem*, 271: 29922-7.
- Wilson, J. G., C. B. Roth, and J. Warkany. 1953. 'An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation', *Am J Anat*, 92: 189-217.
- Yin, A., S. Korzh, C. L. Winata, V. Korzh, and Z. Gong. 2011. 'Wnt signaling is required for early development of zebrafish swimbladder', *PLoS One*, 6: e18431.
- Zhang, J., Z. P. Liu, T. A. Jones, L. M. Gierasch, and J. F. Sambrook. 1992. 'Mutating the charged residues in the binding pocket of cellular retinoic acid-binding protein simultaneously

reduces its binding affinity to retinoic acid and increases its thermostability', *Proteins*, 13: 87-99.

Zhao, X., I. O. Sirbu, F. A. Mic, N. Molotkova, A. Molotkov, S. Kumar, and G. Duyster. 2009. 'Retinoic acid promotes limb induction through effects on body axis extension but is unnecessary for limb patterning', *Curr Biol*, 19: 1050-7.