

Université de Montréal

LES PARTENAIRES D'INTERACTIONS DE CIRHIN, LA
PROTÉINE PORTANT LA MUTATION RESPONSABLE
DE LA CIRRHOSE AMÉRINDIENNE INFANTILE
(NAIC)

par

Marie-Ève Ruest

Département de Biochimie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences
en biochimie option Génétique Moléculaire

Mars, 2012

© Marie-Ève Ruest, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**LES PARTENAIRES D'INTERACTIONS DE CIRHIN, LA PROTÉINE PORTANT
LA MUTATION RESPONSABLE DE LA CIRRHOSE AMÉRINDIENNE
INFANTILE (NAIC)**

Présenté par :
Marie-Ève Ruest

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Nikolaus Heveker

.....
président-rapporteur

Dr. Andrea Richter

.....
directrice de recherche

Dr. Daniel Sinnott

.....
membre du jury

RÉSUMÉ

La Cirrhose Amérindienne Infantile (CAI, NAIC) est une forme de cholestase non-syndromique héréditaire à transmission autosomique récessive, décrite uniquement chez les enfants autochtones du Nord-Ouest québécois et issue d'un effet fondateur. La maladie se présente d'abord sous la forme d'une jaunisse néonatale chez un enfant autrement en bonne santé, qui progresse en cirrhose de type biliaire dans l'enfance et dans l'adolescence. Le taux de survie à l'âge adulte est inférieur à 50% et la seule thérapie efficace à ce jour pour les patients avancés dans la maladie demeure la transplantation hépatique.

Les recherches antérieures menées par le groupe ont permis d'identifier le locus ainsi que le gène responsable de NAIC, qui encode la protéine nucléolaire Cirhin. Cirhin est exprimée uniquement dans le foie et tous les patients sont homozygotes pour la mutation R565W. La fonction de Cirhin est inconnue, mais les motifs WD40 retrouvés dans sa séquence indiquent qu'elle participerait à des interactions protéine-protéine et serait impliquée dans un mécanisme moléculaire de base. Cirhin interagit avec la protéine nucléaire Cirip, qui a un effet positif important sur la transcription de l'élément activateur HIV-1 LTR et qui a un rôle dans la prolifération cellulaire. L'interaction de Cirhin et Cirip est affectée par la mutation R565W.

À l'aide de la technique du double hybride chez la levure, la protéine nucléolaire Nol11 a été identifiée comme étant un partenaire d'interaction de Cirhin. Par son interaction avec MARK3 et c-Myc, Nol11 serait impliquée dans des processus cellulaires tels que le contrôle du cycle cellulaire, la polarité, la croissance cellulaire et possiblement la biogenèse des ribosomes. La portion C-terminale de Nol11 interagirait avec Cirhin, et la mutation R565W abolit cette interaction. Le résidu R565 serait donc important pour la fonctionnalité de Cirhin.

Mots-clés : Cirrhose Amérindienne Infantile, NAIC, Réseau d'interaction, Double Hybride, Cirhin, Nol11, MARK3, Cholestase, Foie

ABSTRACT

North American Indian childhood cirrhosis (NAIC) is a nonsyndromic form of hereditary autosomal recessive cholestasis, described only in children of Algonquin origin from the Abitibi region of north-western Québec and issued from a founder effect. NAIC typically presents with transient neonatal jaundice in a child who is otherwise healthy, but progresses to biliary fibrosis in childhood or young adulthood. The survival rate at adulthood is lower than 50% and liver transplantation is currently the only effective therapy for patients with advanced disease.

Previous research by the group allowed the identification of the locus and the gene responsible for NAIC, which encodes the nucleolar protein Cirhin. Cirhin is expressed only in the liver and all patients are homozygous for the R565W mutation. Cirhin's function is unknown, but it is a WD40-repeat containing protein, which indicates that it would participate in protein-protein interactions and would be involved in a basic molecular mechanism. Cirhin interacts with the nuclear protein Cirip, which has a significant positive effect on the transcription of the HIV-1 LTR enhancer element and has a role in cellular proliferation. The interaction between Cirhin and Cirip is affected by the R565W mutation.

Using the yeast two-hybrid technique, the nucleolar protein Nol11 was identified as an interacting partner of Cirhin. By its interaction with MARK3 and c-Myc, Nol11 may be involved in cellular processes such as cell cycle control, polarity, cell growth and possibly ribosome biogenesis. The C-terminal portion of Nol11 interacts with Cirhin and the R565W mutation abolishes the interaction. The residue R565 may thus be important for Cirhin's functionality.

Keywords : North American Indian Childhood Cirrhosis, NAIC, Interaction network, Two-hybrid, Cirhin, Nol11, MARK3, Cholestasis, Liver

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES TABLEAUX	xii
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	xiii
REMERCIEMENTS	xvi
1 INTRODUCTION	1
1.1 NAIC	2
1.2 Le foie	2
1.2.1 Anatomie et fonctionnement.....	3
1.2.1.1 Cellules hépatiques	4
1.2.1.2 Architecture hépatique	5
1.2.2 Canaux biliaires intrahépatiques	6
1.2.2.1 Morphogenèse des canaux biliaires intrahépatiques (IHBD) – Tubulogenèse	7
1.2.2.1.1 Asymétrie transitoire	8
1.2.2.1.2 Modèles de tubulogenèse.....	10
1.2.2.2 Voies de signalisation impliquées dans le développement des canaux biliaires intrahépatiques.....	13
1.2.2.2.1 Voie de signalisation Notch.....	13
1.2.2.2.2 Voie de signalisation Wnt/ β -caténine.....	14
1.2.2.2.3 Voie de signalisation TGF- β	15
1.2.2.2.4 Voie de signalisation PI3K/Akt (Cascade Akt)	17
1.3 Cholestases	18
1.3.1 Marqueurs biochimiques pour la détection des maladies du foie	18
1.3.2 Cholestases Intrahépatiques	21
1.3.2.1 Cholestase Intrahépatique Progressive Familiale (PFIC)	22
1.3.2.2 Cholestase intrahépatique récurrente bénigne (BRIC).....	25

1.3.2.3	Syndrome d'Alagille (AGS).....	26
1.3.2.4	Hypercholanémie Familiale (FHCA).....	27
1.3.3	Présentation clinique et symptômes de NAIC	31
1.3.3.1	Historique de NAIC	31
1.3.3.2	Symptômes	31
1.3.3.3	Caractéristiques histologiques	32
1.3.3.4	Marqueurs biochimiques	32
1.3.3.5	NAIC et les autre cholestases	33
1.3.4	Traitement de NAIC	34
1.3.5	La génétique de NAIC	34
1.3.5.1	Localisation du locus de NAIC	34
1.3.5.2	Identification de la mutation.....	35
1.3.5.3	Mutation	36
1.3.5.4	Diagnostic moléculaire.....	37
1.4	Nucléole.....	39
1.4.1	Assemblage du nucléole	39
1.4.2	Machineries et organisation du nucléole	40
1.4.3	Recrutement/Localisation nucléolaire	41
1.5	Les protéines de NAIC	42
1.5.1	Cirhin	42
1.5.2	Fonction de Cirhin	44
1.5.2.1	Cirhin dans le développement	45
1.5.2.2	Cirhin dans la biogenèse des ribosomes.....	46
1.5.2.3	Cirip/HIVEP1	48
1.5.2.4	Facteurs de transcription régulant Cirhin	51
1.6	Projet de recherche.....	54
1.6.1	Problématique.....	54
1.6.2	Buts et objectifs.....	54
2	MATÉRIELS ET MÉTHODES	56
2.1	Stratégie générale	57
2.2	Construction des plasmides : sous-clonage.....	58
2.2.1	Protocole	58
2.2.1.1	Sous-clonage des ADNc de Cirhin et R565WCirhin.....	60
2.2.1.2	Sous-clonage des ADNc complets de Noll1	61

2.2.1.3	Sous-clonage des fragments C-terminaux de mNol11.....	62
2.3	Mutagenèse dirigée.....	63
2.3.1	Mutagenèse dirigée par PCR.....	63
2.4	Système double hybride chez la levure	65
2.5	Identification des clones	71
2.5.1	Isolement des plasmides	71
2.5.2	PCR et séquençage	72
2.6	Identification des clones	73
2.7	Prolifération cellulaire.....	73
3	RÉSULTATS.....	76
3.1	Criblage – Identification des ADNc	75
3.2	Interactions protéine-protéine	76
3.2.1	Interaction mCirhin/mNol11 C-terminal	77
3.2.2	Interaction Cirhin/Nol11 pleine longueur.....	78
3.2.3	Interaction R565WCirhin/Nol11 C-terminal et Nol11 pleine longueur (souris et humain).....	80
3.2.4	Étude de troncation de l'ADNc de mNol11	81
3.2.5	Interaction de hNol11 avec mutations autres que NAIC	84
3.3	Effet de Nol11 sur la prolifération	85
4	DISCUSSION	86
4.1	Identification de partenaires par la méthode du double hybride chez la levure	87
4.2	Interaction Cirhin/Nol11	88
4.2.1	Nol11	88
4.2.2	Pertinence biologique de l'interaction	89

4.2.3	Criblage.....	90
4.2.4	Étude détaillée de l'interaction Cirhin/Nol11	91
4.2.4.1	Interaction R565WCirhin/Nol11	92
4.2.5	Étude de troncation.....	92
4.2.6	Interaction R139ACirhin et R279ACirhin/Nol11	94
4.2.7	Interaction Cirhin/Nol11 – Double hybride système chez les mammifères	95
4.3	Avantages et inconvénients de la méthode du double hybride	96
4.4	Étude d'interactions-Autres méthodes	98
4.4.1	Méthodes physiques	98
4.4.2	Méthodes basées sur des bibliothèques	99
4.5	NOL11.....	100
4.5.1	Partenaires d'interaction de NOL11	100
4.5.1.1	MARK3.....	101
4.5.1.2	MYC (c-Myc).....	103
4.5.1.2.1	c-Myc comme facteur de transcription de Nol11	104
4.5.1.2.2	c-Myc dans la biogenèse des ribosomes.....	104
4.6	Rôle de Nol11 dans la prolifération cellulaire	105
4.7	Perspectives.....	108
5	CONCLUSION	109
6	RÉFÉRENCES.....	112

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Représentation schématique de l'apport sanguin au foie.	3
Figure 1.2. Représentation schématique des hépatocytes, des sinusoides et du système biliaire intrahépatique.	5
Figure 1.3. Représentation schématique de la morphogenèse des canaux biliaires intrahépatiques chez la souris.	7
Figure 1.4. Représentation schématique des trois modèles de mécanismes possibles pour la morphogenèse des canaux biliaires.	10
Figure 1.5. Représentation schématique de la formation de la bicouche cellulaire lors de la tubulogenèse.	12
Figure 1.6. Détection de la mutation R565W. Électrophérogramme d'un patient (haut), parent (milieu) et sujet contrôle (bas).	35
Figure 1.7. Séquence partielle de Cirhin et de ses homologues chez les vertébrés (no. GenBank).	37
Figure 1.8. Détection de la mutation NAIC par PCR-RFLP.	38
Figure 1.9. Domaines structurels et fonctionnels prédits de Cirhin.	42
Figure 1.10. Localisation sous-cellulaire de Cirhin et R565WCirhin.	43

Figure 1.11. Effet des siARN contre Cirhin (CIRH1A) ou Cirip (HIVEP1) sur la prolifération des cellules HeLa.....	46
Figure 1.12. Étude interaction Cirhin/Cirip.....	50
Figure 1.13. Schéma des facteurs de transcription prédits s’associant au promoteur de Cirhin.	51
Figure 2.1. Représentation schématique de la stratégie générale pour l’identification et la caractérisation des partenaires d’interactions de Cirhin.	57
Figure 2.2. Cartes des vecteurs d’expression pGBKT7 et pGADT7.....	59
Figure 2.3. Séquence de mNol1.....	62
Figure 2.4. Carte du vecteur d’expression pGBKT7.	67
Figure 2.5. Carte du vecteur d’expression pGADT7.....	67
Figure 2.6. Principe du système double hybride.....	68
Figure 2.7. Constructions de gènes rapporteurs dans les souches de levure AH109 et Y187.68	
Figure 3.1. Gels d’agarose des plasmides obtenus suite au criblage de la librairie d’ADNc d’embryons de souris de 11 jours.	75
Figure 3.2. Interaction mCirhin/mNol1 C-terminal.....	77
Figure 3.3. Interaction mCirhin/mNol1 et hCirhin/hNol1 pleine longueur.....	79

Figure 3.4. Interaction R565WCirhin/Nol11 C-terminal et Nol11 pleine longueur (souris et humain).	80
Figure 3.5. Représentation schématique des fragments C-terminaux testés pour leur interaction avec Cirhin.	81
Figure 3.6. Interaction de mCirhin avec les fragments C-terminaux de mNol11.....	82
Figure 3.7. Interaction hR139ACirhin/hNol11 pleine longueur et hR279ACirhin/hNol11 pleine longueur.	84
Figure 3.8. Effet des siARN contre Nol11 sur la prolifération des cellules HeLa.	85
Figure 4.1. Profils d'expression des protéines Cirhin et Nol11.....	90

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Caractéristiques principales des cholestases intrahépatiques.	29
Tableau II. Liste des ADNc, vecteurs, amorces et oligonucléotides utilisés pour les sous-clonages.	58
Tableau III. Milieux de culture des levures et suppléments requis pour le criblage double hybride.....	70
Tableau IV. Préparation des échantillons pour l'analyse MTT.	74

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ABC	ATP-binding cassette
AD	Domaine d'activation
ADE	Adénine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ALP	Phosphatase alcaline
ALT	Alanine aminotransférase
ARN	Acide ribonucléique
ARN	ARN messenger
AST	Aspartate aminotransférase
ATP	Adénosine triphosphate
BAAT	Bile acid coenzyme A : amino acid N-acetyltransferase
BCS	Syndrome de Bowen-Conradi
BMP	Bone morphogenetic proteins
BRIC	Cholestases Intrahépatiques Récurrents Bénignes
BSEP	Bile salt export pump
CDC	Chenodeoxycholic acid
C/EBP α	CCAAT/Enhancer Binding Protein α
CF	Centres fibrillaires
CFD	Composant fibrillaire dense
CG	Composant granulaire
c-Myc	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
CS	Syndrome de Cockayne
Dll1	Delta-like-1
Dll3	Delta-like-3
Dll4	Delta-like-4
DBD	Domaine de liaison à l'ADN

DDO	Double dropout
Dsh	Dishevelled
E	Jour embryonnaire
EPHX1	époxyde hydrolase 1
FHCA	Hypercholanémie Familiale
FIC1	Familial intrahepatic cholestasis type 1
GGT	Gamma-glutamyltransferase
GSK3 β	Glycogène synthase kinase-3 beta
HES1	Homolog of hairy/enhancer of split-1
Hhex	Hematopoietically expressed homeobox
HIS	Histidine
HNF4 α	Hepatocyte nuclear factor 4, alpha
HNF6	Hepatocyte nuclear factor 6
HPPL	Hepatic progenitor cells proliferating on laminin
IHBD	Canaux biliaires intrahépatiques
JAG1	Jagged1
JAG2	Jagged2
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
LEU	Leucine
LRP	Low density lipoprotein receptor-related protein
LSU	Large subunit
Max	MYC associated factor X
MDR3	Multidrug resistance class III
NF- κ B	Nuclear factor-kappaB
NLS	Signal de localisation nucléaire
NoLS	Signal de localisation nucléolaire
PA	Phosphatase alcaline
PC	Phosphatidylcholines
PCP	Polarité cellulaire planaire

PCR	Réaction en chaîne par polymérase
PDS	Primitive ductal structures
PFIC	Cholestase Intra hépatique Progressive Familiale
QDO	Quadruple dropout
R	Arginine
RBP-JK	Recombination signal bonding protein for immunoglobulin kappa J region
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNP	Ribonucléoprotéine
SBA	Acide biliaire sérique
SBDS	Syndrome de Shwachman-Bodian-Diamond
SD	Synthetically defined
SNP	Single nucleotide polymorphism
SOX9	SRY-related HMG box transcription factor 9
SSLP	Simple Sequence Length Polymorphisms
SSU	Small subunit
SV40	Virus Simien 40
TCS	Syndrome de Treacher Collins
Tex292	Testis-expressed gene 292 protein
TGF- β	Transforming growth factor-beta
TJP2	Tight junction protein 2
TRP	Tryptophane
UAS	Upstream activating sequence
UDCA	Acide ursodéoxycholique
W	Tryptophane

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord mes parents, Ghislaine Leroux Ruest et Yves Ruest, pour leur soutien et leurs encouragements constants depuis le début de mes études, pour leur confiance et pour la fierté qu'ils ont envers moi. Merci infiniment d'être des modèles parfaits de persévérance et de réussite.

Un grand merci à ma directrice de recherche Dr. Andrea Richter pour sa confiance, sa patience et pour m'avoir donné la chance d'étudier dans son laboratoire. Merci également à Jocelyne Mercier et Bin Yu pour leurs nombreux conseils, pour leur grande expertise et pour m'avoir donné les outils nécessaires afin de poursuivre mon cheminement dans le domaine de la recherche.

Un merci spécial à ma sœur Geneviève pour ses encouragements et pour la grande complicité que nous partageons. Je remercie également mes amis, plus particulièrement Isabelle Poirier qui est dans ma vie depuis toujours, à travers le bon et le mauvais, et Marjorie Le Cavalier-Parant, pour tout ce que nous avons vécu ensemble, pour son énergie qui me motive à avancer. Merci à vous trois de toujours être présentes pour moi, de me rendre heureuse et de m'écouter, je ne pourrais pas demander des meilleures amies que vous.

En dernier mais non le moindre, merci à mon amour Benjamin Jackson-Legros, pour son support pendant ces deux années de maîtrise, pour ses encouragements, son énergie débordante et contagieuse et surtout pour son attitude constamment positive et ses judicieux conseils. Tu ne cesseras jamais de m'impressionner et de m'inspirer.

1 INTRODUCTION

1.1 NAIC

La Cirrhose Amérindienne Infantile (CAI, NAIC) est une maladie héréditaire à transmission autosomique récessive décrite uniquement au Québec. Ce désordre hépatique est une forme isolée de cholestase intrahépatique non syndromique, c'est-à-dire un blocage du transport de la bile vers les intestins. Ce blocage mène à une accumulation de la bile, ce qui endommage le foie, état qui à son tour mène à la jaunisse et éventuellement à la perte de fonction du foie. Cette maladie est présente chez les enfants appartenant à 5 grandes familles de 6 communautés des Premières Nations retrouvées dans la région de l'Abitibi dans le Nord-Ouest du Québec (Weber *et al.*, 1981).

1.2 Le foie

Le taux de survie à l'âge adulte des patients atteints de NAIC est inférieur à 50% et ceci peut être expliqué par le rôle crucial du foie dans le développement fœtal. Le foie est la source clé d'acides aminés nécessaires pour la croissance et le transport des nutriments à travers les hépatocytes. Ceci constitue une étape importante du développement. Une blessure au foie lors d'une période critique du développement peut en affecter sa croissance ainsi que sa capacité à effectuer ses fonctions, qui comprennent le métabolisme des nutriments, la production d'énergie et l'excrétion des déchets par la sécrétion biliaire (Richter *et al.*, 2007; Suchy et Narkewicz, 2002). Le foie reçoit le sang veineux directement de l'intestin, de la moelle et du pancréas. De ce fait, il fait face à un large spectre de toxines, nutriments et hormones. Il exerce des fonctions endocrines, telles que la détoxification et la sécrétion des facteurs du sérum et des fonctions exocrines telles que la génération de la bile (Duncan, 2003).

1.2.1 Anatomie et fonctionnement

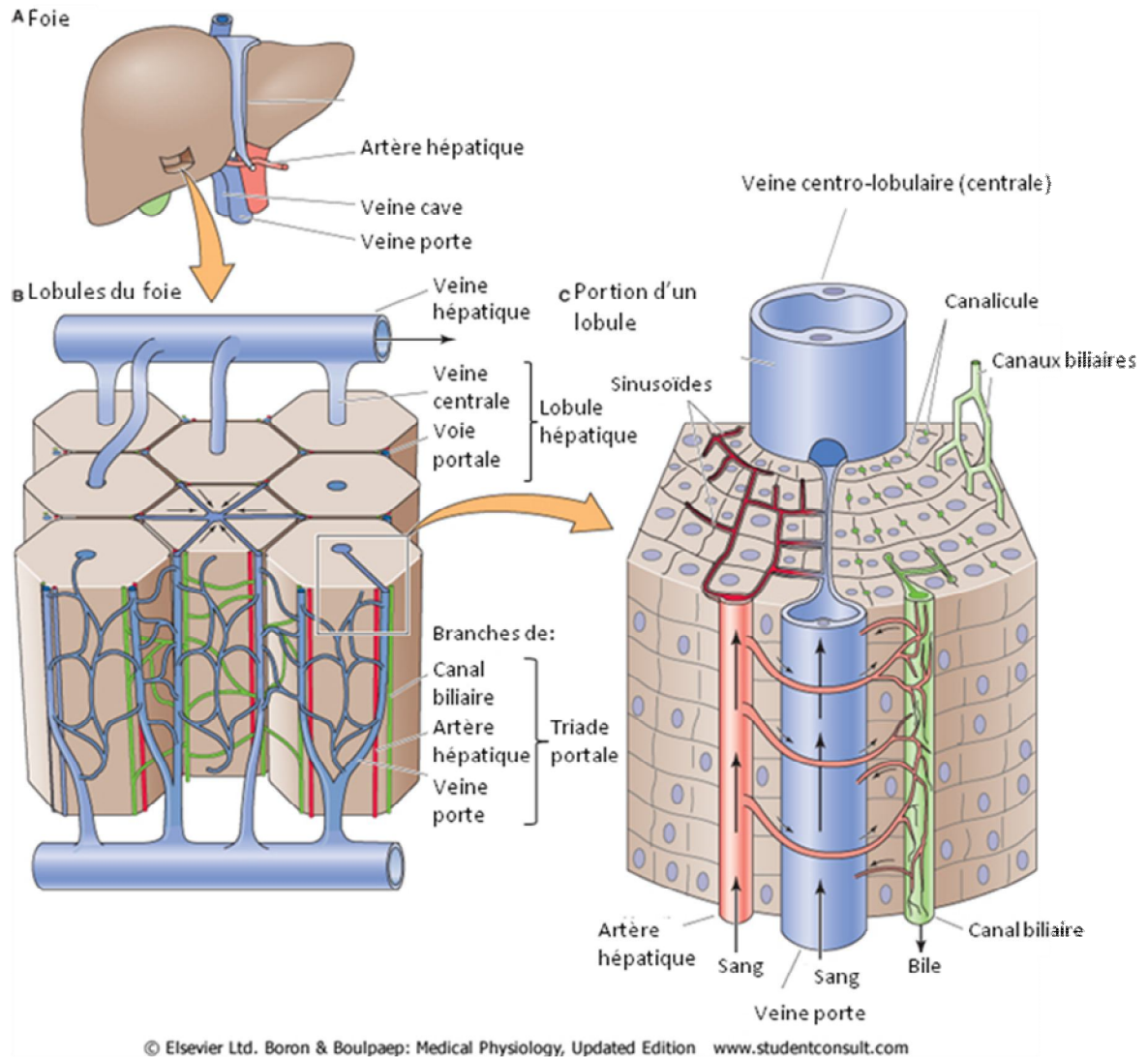


Figure 1.1. Représentation schématique de l'apport sanguin au foie. A) L'apport sanguin au foie provient de la veine porte et de l'artère hépatique. B) Le sang des veinules portales et des artérioles se combinent dans un réseau complexe de sinusoides hépatiques. C) Le sang des sinusoides converge à la veine centro-lobulaire. Les veines centro-lobulaires convergent pour former la veine hépatique. Schéma modifié de Boron et Boulpaep, 2005.

Le foie est formé de plusieurs lobules, tous centrés par une veine centro-lobulaire. L'apport sanguin hépatique s'effectue par deux sources, soit par la veine porte et par l'artère

hépatique, qui sont ramifiées en veinules et en artérioles respectivement à l'intérieur du foie. Une branche de l'artère hépatique, une branche de la veine porte et 1 ou 2 canaux biliaires forment une triade portale (voie portale) et plusieurs de ces triades entourent un lobule (**Figure 1.1.B**). Le sang s'écoule de la voie portale à la veine centro-lobulaire en passant par les hépatocytes disposés en lames monocellulaires, allant de la zone périportale à la zone centro-lobulaire, tandis que la bile s'écoule de la veine centro-lobulaire vers la voie portale par les canalicules biliaires, afin d'être rejetée dans les canaux biliaires (**Figure 1.1.C**) (Boron et Boulpaep, 2005).

1.2.1.1 Cellules hépatiques

Le foie est composé à 60% d'hépatocytes et à 40% de cellules sinusoidales comprenant les cholangiocytes, les cellules de Kupffer et les cellules étoilées du foie (Duncan, 2003). Les hépatocytes et les cholangiocytes dérivent des hépatoblastes et possèdent des marqueurs spécifiques. Les cholangiocytes, ou cellules endothéliales, biliaires, se retrouvent exclusivement dans les canaux biliaires, entourant les sinusoides hépatiques, les réseaux capillaires irriguant les lobules hépatiques. Elles possèdent un système de pores permettant des échanges entre le plasma et les hépatocytes. Elles sont organisées en plaques ductales autour des branches de la veine porte, expriment la cytokératine, la gamma-glutamyl transpeptidase 4 (ggt4), l'intégrine $\beta 4$ ($i\beta 4$) et produisent une lame basale sur le côté portal de la plaque ductale (Clotman *et al.*, 2005). Les cellules hépatiques, également nommées cellules parenchymateuses ou cellules épithéliales, sont retrouvées uniquement dans le foie et contiennent les composantes primaires de la bile. Elles ont une double polarité, soit une face sinusoidale et une face biliaire (canaliculaire). Elles sont organisées dans le parenchyme, expriment le facteur de transcription HNF-4 α , la glycogène synthase 2 (gys2), la carbamoylphosphate synthase I (cpsI), ont un large noyau et plusieurs mitochondries (Clotman *et al.*, 2005).

1.2.1.2 Architecture hépatique

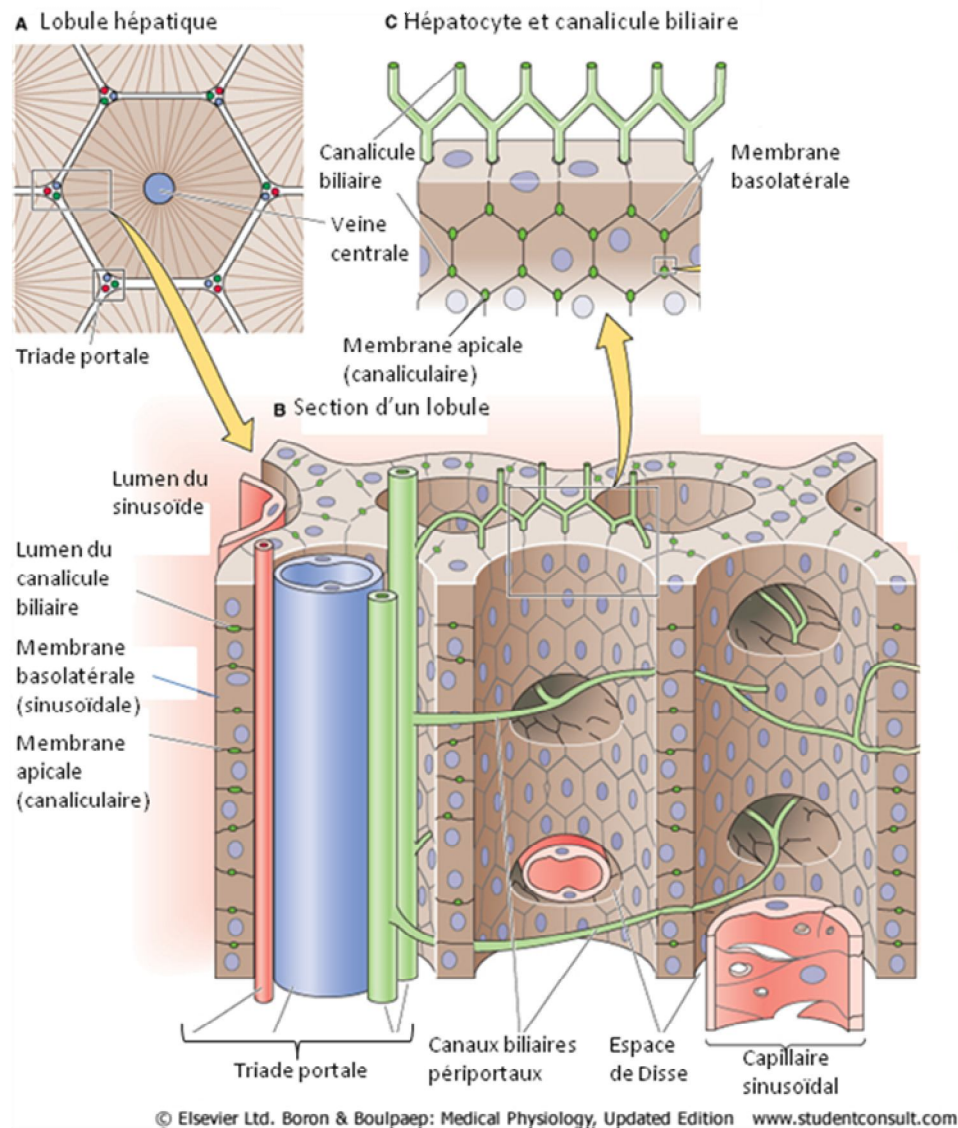


Figure 1.2. Représentation schématique des hépatocytes, des sinusoides et du système biliaire intrahépatique. A) Lobule hépatique entouré de 6 triades portales. B) Monocouches d'hépatocytes entre 2 compartiments de fluides, le lumen canaliculaire contenant la bile et le lumen sinusoidal contenant le sang. La membrane apicale et la membrane basolatérale sont en contact avec la bile et le sang respectivement. C) Les canalicules biliaires sont formés par les membranes apicales d'hépatocytes adjacents. Schéma modifié de Boron et Boulpaep, 2005.

Les hépatocytes sont disposés en lames monocellulaires et séparés les uns des autres par les sinusoides hépatiques. Leur face biliaire délimite le canalicule biliaire, formé par le repliement des membranes de deux hépatocytes adjacents, et y sécrète les composantes de la bile via des transporteurs spécifiques. La face sinusoidale des hépatocytes est en contact avec le sang portal des sinusoides hépatiques, via les cholangiocytes. Les hépatocytes et les cholangiocytes sont séparés par l'espace de Disse (**Figure 1.2**).

1.2.2 Canaux biliaires intrahépatiques

Les données cliniques suggèrent l'implication des canaux biliaires dans la pathologie de la Cirrhose Amérindienne Infantile (van Mil *et al.*, 2005). Les canaux biliaires sont des structures tubulaires qui sont constitués de cholangiocytes. Ils acheminent la bile vers le canal hépatique commun afin que cette dernière soit excrétée dans le duodénum. Plusieurs cas de cholestases néonatales résultent d'un développement anormal des canaux biliaires intrahépatiques, puisqu'un défaut dans le développement des canaux biliaires cause une accumulation de la bile à l'intérieur du foie. La bile étant cytotoxique, ceci induit des blessures hépatiques qui résultent en fibroses et en cirrhoses (Tanimizu *et al.*, 2009). Ces conséquences sont observées chez les patients de NAIC. Il est donc important de faire un survol du développement des canaux biliaires intrahépatiques et des voies de signalisation impliquées dans ce processus.

1.2.2.1 Morphogenèse des canaux biliaires intrahépatiques (IHBD) – Tubulogenèse

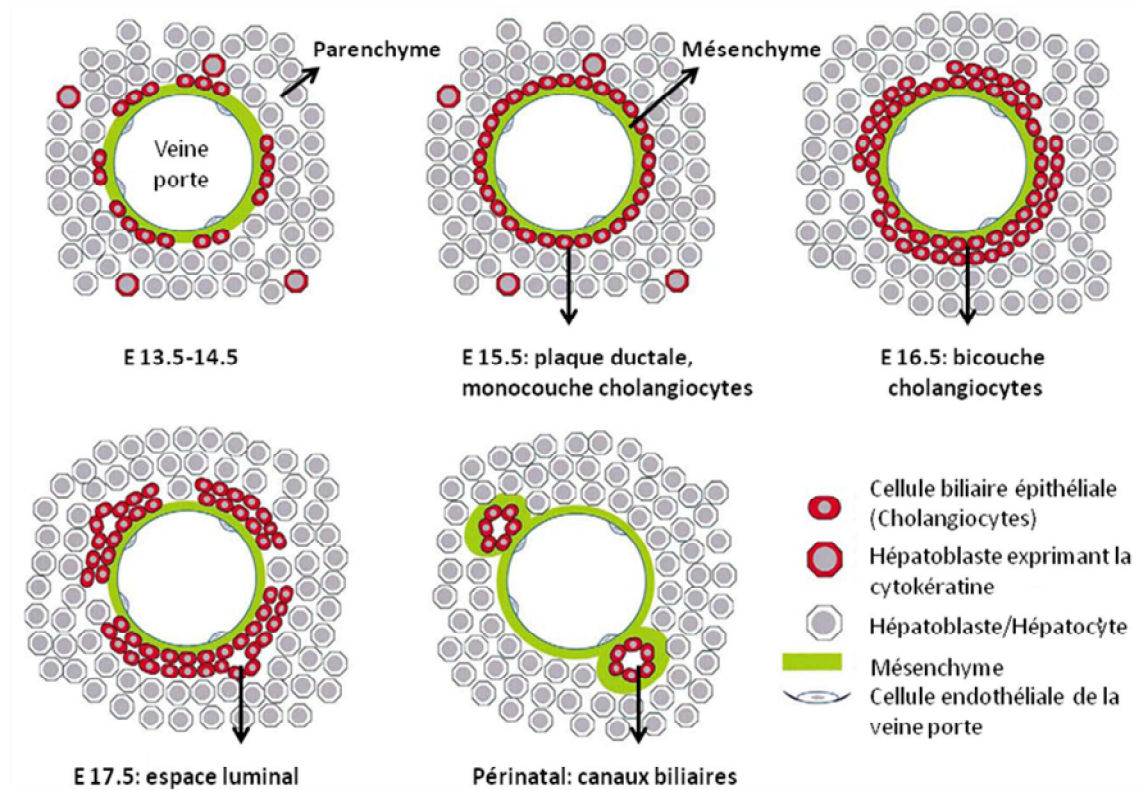


Figure 1.3. Représentation schématique de la morphogenèse des canaux biliaires intrahépatiques chez la souris. Une monocouche de cholangiocytes forme la plaque ductale à E15.5, qui s'organise en bicouche à E16.5. Des espaces luminaux sont créés, qui formeront les canaux biliaires. Schéma modifié de Lemaigre, 2003.

En parallèle à la différenciation fonctionnelle des cholangiocytes, ces derniers subissent également une morphogenèse tubulaire (tubulogenèse) et développent des ramifications tubulaires de canaux biliaires, c'est-à-dire l'arbre de canaux biliaires. La morphogenèse des IHBD est similaire chez les humains, les rats et les souris, mais varie quant aux jours embryonnaires (E) étant donné le temps de gestation variable. La **figure 1.3** représente les étapes de la formation des canaux chez la souris. L'initiation du développement biliaire se

fait autour d'E11.5. À E13.5-E14.5, les cholangiocytes, exprimant la cytokératine spécifique aux cellules biliaires, sont localisées au mésenchyme portal, lieu des futurs canaux biliaires. Certains hépatoblastes situés dans le parenchyme expriment également la cytokératine. La morphogenèse peut être résumée par les étapes suivantes : à E15.5, les cholangiocytes forment une monocouche continue nommée plaque ductale autour du mésenchyme entourant la veine porte. Un jour plus tard, il y a duplication de la plaque ductale qui s'organise partiellement en bicouche. Un espace luminal est ensuite généré entre les 2 couches de cholangiocytes à E17.5. Finalement, la plaque ductale et l'espace luminal sont réorganisés en tubules, qui deviendront les canaux biliaires entièrement entourés du mésenchyme périportal suite à la régression de la plaque ductale non impliquée dans la formation des canaux à la naissance (Lemaigre, 2003; Tanimizu *et al.*, 2009).

1.2.2.1.1 Asymétrie transitoire

L'équipe d'Antoniou *et al.*, 2009, propose un nouveau mode de la tubulogenèse caractérisée par la formation de structures ductales asymétriques transitoires précurseurs aux canaux symétriques, dont la maturation serait contrôlée par le facteur de transcription SOX9 (SRY-related HMG box transcription factor 9).

Les structures asymétriques se nomment PDS (Primitive ductal structures) et sont présentes au moment où la plaque ductale se transforme en une bicouche et qu'un espace luminal est observé. Ces structures sont asymétriques en ce sens que les facteurs exprimés dans les deux couches ne sont pas les mêmes. À E15.5-E16.5, la couche adjacente au parenchyme exprime un marqueur des hépatoblastes, HNF4 α (Hepatocyte nuclear factor 4, alpha), ainsi que le marqueur biliaire E-cadhérine à un niveau très faible. Dans la couche adjacente à la veine porte, les cellules expriment les marqueurs biliaires SOX9 et laminine, absents des cellules du côté du parenchyme, ainsi qu'un niveau élevé d'E-cadhérine. Les canaux matures symétriques sont développés uniquement à la fin de la gestation à E18.5, où ils

sont délimités par une couche continue de laminine, sont SOX9 positifs, HNF4 α négatifs et toutes les cellules expriment E-cadhérine de manière égale.

SOX9 a un rôle dans plusieurs types de cellules progénitrices, incluant celles de l'épithélium intestinal et pancréatique. Il jouerait un rôle dans la différenciation des chondrocytes ainsi que dans la détermination du sexe. Il aurait également un rôle dans la morphogénèse des canaux biliaires, suite à l'identification de SOX9 par Antoniou *et al.*, 2009, comme étant un nouveau marqueur biliaire. SOX9 est détecté aussi tôt qu'à E10.5 dans les cellules endodermes entourant le diverticulum du foie. À E11.5-E13.5, SOX9 et les cellules s'alignent autour de la veine porte pour former la plaque ductale. SOX9 est ensuite exprimé sur le côté portal du PDS, pour se retrouver dans toutes les cellules biliaires à E18.5 jusqu'à la naissance. Après la naissance, l'expression de SOX9 régresse. SOX9 serait donc le marqueur le plus spécifique et le plus précoce des cellules biliaires dans le foie en développement, puisque le développement biliaire débute autour d'E11.5 et que SOX9 est détecté à E10.5 (Antoniou *et al.*, 2009).

SOX9 aurait un rôle dans la maturation des PDS en canaux matures, cette hypothèse étant soutenue par l'observation qu'une déficience de ce facteur de transcription fait en sorte que des PDS asymétriques sont encore observés à E18.5. Les canaux biliaires sont formés 6 jours suivants la naissance, mais le côté du parenchyme est toujours en contact avec les hépatocytes, quand les canaux normaux sont entièrement entourés par le mésenchyme périportal. Ce n'est seulement qu'à 5 semaines après la naissance que les canaux biliaires deviennent normaux. Donc, une déficience en SOX9 est caractérisée par une prolongation de la présence des PDS asymétriques et SOX9 contrôlerait le timing de la morphogénèse des canaux biliaires (Antoniou *et al.*, 2009).

1.2.2.1.2 Modèles de tubulogenèse

Des techniques histochimiques ont permis de mettre en évidence les structures des canaux en développement (**Section 1.2.2.1**) en plus de permettre l'identification de molécules nécessaires à la morphogenèse des canaux biliaires, dont certaines ont été mentionnées ci-haut et d'autres qui seront spécifiées dans les sections suivantes.

Cependant, les mécanismes précis gouvernants la morphogenèse tubulaire des cholangiocytes n'ont pas été spécifiés, dont ceux permettant l'apparition de la bicouche qui mènera à la formation des canaux biliaires. Dans la littérature, trois modèles de mécanisme différents sont développés.

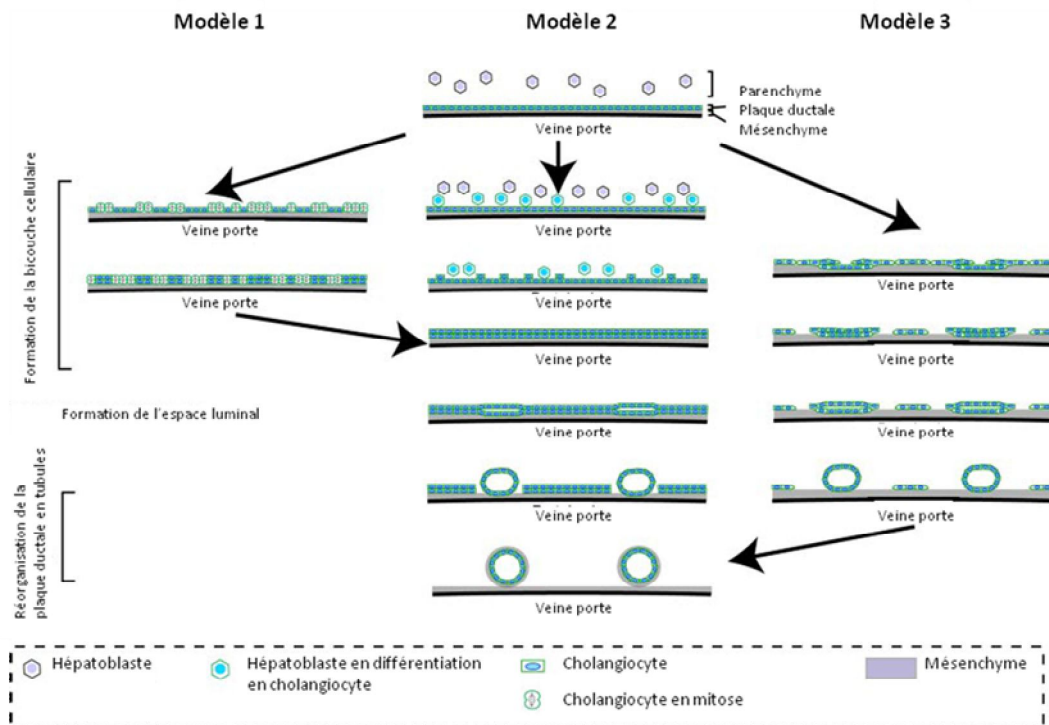


Figure 1.4. Représentation schématique des trois modèles de mécanismes possibles pour la morphogenèse des canaux biliaires. Modèle 1 : prolifération des cholangiocytes. Modèle 2 : différenciation des hépatoblastes en cholangiocytes. Modèle 3 : repliement des cholangiocytes de la plaque ductale (Tanimizu *et al.*, 2009).

Le point de départ commun à ces mécanismes est la plaque ductale constituée d'une monocouche de cholangiocytes présente autour de la veine porte. Le premier modèle propose que la seconde couche de la plaque ductale serait générée par la prolifération de cholangiocytes, le deuxième modèle propose que les hépatoblastes en périphérie de la plaque ductale seraient induits afin de se différencier en cholangiocytes, tandis que selon le troisième modèle, les cholangiocytes de la plaque ductale se replieraient afin de former la bicouche. L'étape finale pour tous les mécanismes proposés, c'est-à-dire lorsque l'espace luminal est formé entre les deux couches, est la réorganisation de la plaque ductale en structures tubulaires, suivit par l'élargissement de l'espace luminal qui devient circulaire. Les cholangiocytes restés dans la plaque ductale régressent alors graduellement pour éventuellement disparaître.

L'équipe de Tanimizu *et al.*, 2009, propose un modèle de culture cellulaire, le modèle «Sandwich», venant soutenir le mécanisme de tubulogenèse présenté dans le modèle 3. Ils ont développé un modèle de culture cellulaire où des HPPL (Hepatic progenitor cells proliferating on laminin), une lignée de cellules progénitrices du foie, formant une monocouche sur un gel de matrice cellulaire (ECM) ont la capacité de se réarranger en bicouche suite à l'ajout d'un second gel de matrice extracellulaire sur ces dernières. Ce deuxième gel induit non seulement le réarrangement de la monocouche, mais également la génération d'un espace luminal entre les deux couches cellulaires, événement similaire à ce qui est observé *in vivo* pour ce qui est du développement. Ce modèle leur a permis d'étudier les mécanismes gouvernant la formation des canaux biliaires intrahépatiques.

Ils ont déterminé que la prolifération cellulaire n'est pas nécessaire au mécanisme de développement tubulaire *in vitro*, ce qui rejoint les résultats *in vivo* où la prolifération des cholangiocytes n'est pas significative lors de la morphogenèse tubulaire, en plus d'observer qu'il n'y a pratiquement pas de cholangiocytes en apoptose dans le foie de la souris, autant durant le développement que dans les jours suivants la naissance. Ils ont également déterminé que les tubules se forment par migration cellulaire et par réarrangement, conséquences d'une perte de polarité apico-basale dans certaines cellules de la

monocouche, ainsi qu'à une perte partielle de jonctions intercellulaires, leur permettant de migrer de l'extrémité vers le centre de l'aire tubulaire. La migration se fait sur un amas de cellules ayant conservé leur polarité apico-basale et les cholangiocytes forment ainsi une aire qui deviendra éventuellement l'espace luminal apical. Les jonctions intercellulaires sont reconstituées lorsque la formation de la deuxième couche est presque complétée. Ce modèle montre qu'une deuxième couche peut-être formée sans recrutement de cellules provenant de l'extérieur (Tanimizu *et al.*, 2009).

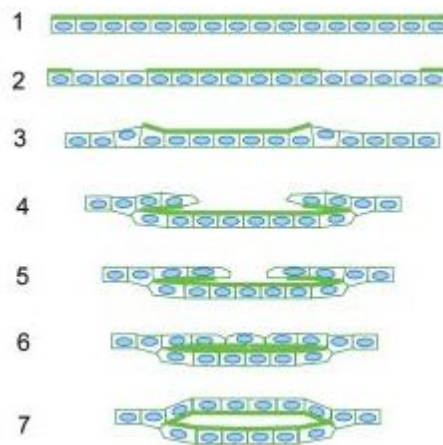


Figure 1.5. Représentation schématique de la formation de la bicouche cellulaire lors de la tubulogénèse. Des cholangiocytes de la monocouche de la plaque ductale perdent leur polarité apico-basale, migrent sur d'autres cellules ayant conservé leur polarité, formant la bicouche cellulaire. Une aire est générée entre les deux couche, qui deviendra l'espace luminal apical des canaux matures (Tanimizu *et al.*, 2009).

En résumé, la probabilité que le mécanisme présenté dans le modèle 1 soit celui expliquant les étapes de la production de la bicouche cellulaire est faible, puisqu'il a été observé que la prolifération cellulaire est dramatiquement diminuée lors de la différenciation des hépatoblastes en cholangiocytes. Il est plus probable que les mécanismes des modèles 2 et 3 soient les bons. Dans le cas du modèle 2 favorisant le recrutement des cellules du parenchyme, il a été déterminé que la signalisation Activin/TGF- β est activée plus fortement dans les hépatoblastes à proximité de la veine porte que dans celles retrouvées dans le parenchyme. Pour ce qui est du modèle 3, il a été en quelque sorte prouvé par

l'équipe de Tanimizu *et al.*, 2009. De plus, les mécanismes présentés dans les modèles 2 et 3 ne nécessitent pas de prolifération cellulaire, ce qui rejoint les résultats *in vivo*. Le modèle 3 est cependant celui le plus probable puisque contrairement au modèle 2, aucun cholangiocytes en apoptose ne seraient observés. En effet, l'étape du recrutement cellulaire dans le deuxième mécanisme ferait en sorte que plusieurs cholangiocytes en apoptose seraient observés suite à la formation des structures tubulaires, puisqu'un plus grand nombre de cholangiocytes ne feraient pas partie intégrale des structures matures. Or, comme mentionné, peu de cholangiocytes en apoptose sont observés *in vivo*. Selon les données accumulées, il est par contre probable que les modèles 2 et 3 se produisent lors de la tubulogenèse des canaux biliaires intrahépatiques.

1.2.2.2 Voies de signalisation impliquées dans le développement des canaux biliaires intrahépatiques

1.2.2.2.1 Voie de signalisation Notch

La voie de signalisation Notch aurait un rôle dans le développement des canaux biliaires intrahépatiques. Cette voie contrôle une grande variété de processus développementaux, tels que la spécification cellulaire, l'engagement aux lignées cellulaires et le maintien des cellules souches/progénitrices, et ce autant au cours du développement que chez les adultes (Sparks, 2010). Lors du développement, cette voie régule l'organisation de l'embryon en conférant les instructions aux cellules avoisinantes quant à leur lignée spécifique (Zong *et al.*, 2009). La voie de signalisation est activée lorsqu'il y a interaction entre les récepteurs (Notch1, Notch2, Notch3 et Notch4) et les ligands (Dll1, Dll3, Dll4, Jag1 et Jag2) qui sont exprimés à la surface des cellules avoisinantes (Tanimizu *et al.*, 2004).

Dans le cas du développement des canaux biliaires intrahépatiques, Jag1, un ligand du récepteur Notch1, est exprimé dans les cellules adjacentes à la plaque ductale et dans les

cholangiocytes en différenciation, tandis que le récepteur Notch2 est exprimé dans les cholangiocytes en développement.

La voie de signalisation Notch a deux rôles dans le développement des canaux. D'abord, elle joue un rôle dans la différenciation biliaire des cellules par l'entremise de RBP-JK (Recombination signal bonding protein for immunoglobulin kappa J region), un effecteur commun de la voie Notch. Le knockout de cette protéine cause une diminution du nombre de cellules normalement destinées à la lignée biliaire. La voie Notch exerce également un rôle dans la morphogenèse des canaux biliaires par l'expression des formes activées des récepteurs Notch1, qui stimulent la différenciation des cellules hépatiques en cellules biliaires et la formation de structures tubulaires (Raynaud *et al.*, 2009). Le facteur de transcription Hes1 (Homolog of hairy/enhancer or split-1), un médiateur de la signalisation Notch, stimule également la formation des structures tubulaires. Il a été démontré qu'une déficience de ce facteur fait en sorte que les structures tubulaires ne sont pas développées, malgré la formation normale de la plaque ductale (Kodama, 2004).

1.2.2.2 Voie de signalisation Wnt/ β -caténine

Une autre voie de signalisation impliquée dans le développement des canaux biliaires intrahépatiques est la voie Wnt/ β -caténine. Les protéines Wnt sont des molécules de signalisation sécrétées agissant comme médiateurs locaux dans le but de réguler une multitude de processus biologiques ainsi que plusieurs aspects du développement, tels que la promotion de la différenciation cellulaire, l'expansion des tissus, la détermination de la lignée cellulaire et la différenciation cellulaire des cellules post-mitotiques. Les gènes cibles semblent être spécifiques au type cellulaire c'est-à-dire que les résultats distincts sont déterminés par l'identité développementale de la cellule répondante et non par la nature du signal. Trois voies de signalisation hautement conservées chez les vertébrés et les invertébrés sont activées par activation des récepteurs liés à Wnt, soit la cascade Wnt/ β -

caténine canonique, la voie de la polarité cellulaire planaire (PCP) et la voie Wnt/Ca²⁺ (Alberts *et al.*, 2004; Clevers, 2006).

La voie canonique est activée suite à la fixation des protéines Wnt aux récepteurs Frizzled, qui coopèrent avec le corécepteur LRP (Low density lipoprotein receptor-related protein). Frizzled interagit avec Dishevelled (Dsh), une protéine de signalisation intracellulaire, ce qui contrôle sa phosphorylation. Dsh a à son tour un rôle d'antagoniste sur l'activité de la glycogène synthase kinase (GSK3 β), ce qui promeut la stabilisation de la protéine cytoplasmique β -caténine, qui transloque alors au noyau et régule la transcription des gènes répondant à Wnt (Clevers, 2006; Sun *et al.*, 2001).

Dsh a également un rôle dans la voie de la polarité cellulaire planaire, la voie Wnt/PCP, qui contrôle la polarité et le mouvement cellulaire par l'activation des voies de signalisation RhoA, JNK (c-Jun N-terminal Kinase) ainsi que NLK (nemo-like kinase) (Katoh, 2005).

Dans le cas du développement des canaux biliaires intrahépatiques, cette voie stimule la différenciation biliaire tout en inhibant la différenciation hépatocytaire, en plus de stimuler la morphogenèse par l'entremise de la protéine β -caténine (Antoniou *et al.*, 2009; Raynault *et al.*, 2009).

1.2.2.2.3 Voie de signalisation TGF- β

Les facteurs TGF- β (transforming growth factor β) sont des cytokines multifonctionnelles exprimées de manière ubiquitaire, comprenant entre autre les Activines et ayant des rôles importants dans l'embryogenèse (Massagué et Chen, 2000). Les facteurs TGF- β se lient à la famille de récepteurs du même nom, des protéines sérine-thréonine kinase transmembranaires de type I et II. Cette voie de signalisation est impliquée dans plusieurs processus cellulaires chez l'adulte et chez l'embryon, en plus de diriger tous les aspects du

développement cellulaire, de la différenciation, de l'homéostasie et de la survie cellulaire, de tous les types de cellules et de tissus (Wendt *et al.*, 2009).

La forme bioactive sous forme de dimère de facteurs se fixe à un hétérodimère de récepteurs (type I et type II), créant un complexe de récepteur hétérotétramérique. Ce complexe phosphoryle les protéines Smads, une famille de facteurs de transcription connus comme étant les seuls substrats directs du récepteur kinase I et médiateurs de la signalisation TGF- β . Les Smads transloquent alors au noyau où ils deviennent transcriptionnellement actifs en se liant à des facteurs de transcription, résultant en des réponses cellulaires spécifiques (Massagué, 1998). Les facteurs de la famille TGF- β ont en effet plusieurs conséquences différentes sur les cellules, dépendant du type et du contexte cellulaire. Le choix des gènes cibles et la grande diversité des réponses obtenues résultent de l'association des complexes Smads activés avec des facteurs de transcription et des cofacteurs spécifiques au type cellulaire, en plus de leur association à des activateurs et répresseurs transcriptionnels (Massagué et Wotton, 2000). L'association avec ces facteurs est nécessaire afin de permettre une reconnaissance hautement spécifique des éléments régulateurs dans leurs gènes cibles, l'interaction des Smads avec leur séquence de reconnaissance étant de faible affinité (Massagué et Chen, 2000).

Comme mentionné à la **section 1.2.2.1.2**, le signal TGF- β participe à la différenciation des hépatoblastes en cholangiocytes ainsi qu'à la morphogenèse des canaux biliaires. La différenciation est effectuée par la production d'un gradient de morphogène, son activité étant élevée à proximité de la veine porte et basse dans le parenchyme. En effet, Activine A, TGF- β 2 et TGF- β 3, des protéines membres de la superfamille des protéines TGF- β , sont exprimées de manière prédominante dans le mésenchyme périportal, le lieu de différenciation des cholangiocytes (Clotman *et al.*, 2005; Raynaud *et al.*, 2009). L'activité des facteurs TGF- β est modulée par des familles de protéines diffusibles se fixant aux ligands et prévenant ceux-ci de s'associer aux récepteurs. Ces protéines pourraient contribuer à la formation du gradient morphogène observé (Massagué et Chen, 2000).

La morphogenèse des canaux biliaires est régulée par les facteurs de transcription de la voie TGF- β , soit HNF6 (Hepatocyte nuclear factor 6) et Onecut 2, qui modulent également un

gradient de signalisation périportal déterminant le développement biliaire à proximité de la veine porte. Une déficience de ces facteurs cause le développement de kystes et non pas de canaux biliaires à partir de la plaque ductale (Clotman, 2004; Clotman, 2005). HNF1 β , une cible d'HNF6 et un facteur de transcription exprimé dans plusieurs structures tubulaires dont les canaux biliaires, est également requise pour la morphogenèse des canaux, plus précisément dans l'élargissement des lumens (Coffinier *et al.*, 1999). La perte de l'activité d'HNF1 β cause une formation anormale des canaux biliaires intrahépatiques caractérisée par des espaces luminaux de petites tailles, comme l'ont identifié l'équipe de Tanimizu *et al.* avec leur modèle «Sandwich» (**Section 1.2.2.1.2**) (Tanimizu *et al.*, 2009). HNF6 et HNF1 β sont exprimés uniquement lorsque Hhex (Hematopoietically expressed homeobox) et C/EBP α (CCAAT/Enhancer Binding Protein α), des facteurs exprimés dans les hépatoblastes et dans les hépatocytes, sont supprimés des cellules biliaires (Hunter, 2007; Yamasaki, 2006). C/EBP α est normalement exprimé dans les cellules du parenchyme et de la plaque ductale jusqu'à E15.5 et réprimé dans les cellules biliaires à E18.5. La répression de C/EBP α serait induite par SOX9, qui modulerait ainsi la signalisation TGF- β au commencement de la morphogenèse des canaux, donc de la maturation des PDS (Antoniou *et al.*, 2009).

1.2.2.2.4 Voie de signalisation PI3K/Akt (*Cascade Akt*)

La voie est activée par plusieurs types de récepteurs qui induisent la production de phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphate par PI3K.

Le modèle de culture cellulaire mis au point par le groupe Tanimizu *et al.* a permis d'identifier la voie de signalisation PI3K/Akt comme étant nécessaire à la morphogenèse tubulaire des cellules HPPL *in vitro* (**Section 1.2.2.1.2**), puisque l'inhibition de PI3K ou d'Akt, une kinase en aval de PI3K, provoque une réduction significative de l'aire des structures tubulaires. De plus, les cellules déficientes en PI3K et Akt demeurent sous la

forme d'une monocouche suite à l'ajout du gel de matrice extracellulaire, contrairement aux cellules normales (Gassama-Diagne *et al.*, 2006; Tanimizu *et al.*, 2009).

1.3 Cholestases

Une cholestase est un désordre du foie caractérisé par une obstruction des canaux biliaires extrahépatiques ou intrahépatiques, due à une détérioration de l'écoulement de la bile dans ces canaux. La bile est composée d'acides biliaires, de phospholipides, de cholestérol, de bilirubine et de sels minéraux. Elle permet l'absorption intestinale des graisses par la sécrétion des acides biliaires, assure l'homéostasie du cholestérol et permet au foie d'accomplir sa fonction de détoxification par l'élimination de toxines telles que la bilirubine, médicaments, nutriments et hormones (Duncan, 2003; Wendum, 2010). Plusieurs conséquences sont associées à une cholestase prolongée, telles que : 1) une diminution de la livraison des acides biliaires à l'intestin proximal, occasionnant la malabsorption du gras et des vitamines liposolubles. 2) La rétention par le foie de substances normalement excrétées dans la bile (acides biliaires, cholestérol, etc.) et 3) des dommages progressifs au foie, avec cirrhose biliaire, hypertension portale et perte de fonction du foie (Balisteri, 2002).

1.3.1 Marqueurs biochimiques pour la détection des maladies du foie

Des marqueurs biochimiques caractéristiques des dommages au foie permettent de porter un diagnostic sur le type de désordre présent. Ces marqueurs comprennent la γ -glutamyltransférase (GGT), la phosphatase alcaline (PA), les transaminases telles que l'aspartate aminotransférase (AST) et l'alanine aminotransférase (ALT), la bilirubine et les acides biliaires sériques (SBA) comprenant l'acide chénodésoxycholique (CDC).

γ -glutamyltransférase (GGT)

La γ -glutamyltransférase (GGT) est une enzyme retrouvée dans plusieurs tissus (rein, pancréas, rate, poumon, cerveau) et largement distribuée dans les cellules impliquées dans la sécrétion et l'absorption de la bile. La GGT contenue dans le sérum est essentiellement d'origine hépatobiliaire, c'est-à-dire produite par les cellules microsomales du foie. Des niveaux élevés de GGT peuvent être observés dans tous les types de maladies du foie, mais la plus grande élévation est observée dans les désordres où il y a une implication intensive des canalicules biliaires. Son élévation se produit plus tôt que d'autres enzymes telles que la PA, la 5' nucléotidase et les aminotransférases. La GGT fait office de marqueur pour la détection de dommages des cellules hépatiques, pour les maladies cholestatiques, et est également sensible à la détection de jaunisse obstructive, de cholangite (inflammation des canaux biliaires du foie) et de cholécystite (inflammation de la vésicule biliaire). Elle n'est cependant pas un excellent marqueur pour le diagnostic d'une cholestase spécifique, étant donné sa présence dans tous les types de désordres hépatobiliaire (Lindor et Talwalker, 2008).

Phosphatase alcaline (PA)

Un niveau élevé de PA sérique est le marqueur caractérisant les désordres du foie, plus spécifiquement les cholestases. Dans le foie, la PA se retrouve essentiellement à la surface des canalicules biliaires et a pour fonction de catalyser l'hydrolyse des esters phosphates à un pH alcalin. Lorsqu'il y a obstruction des canaux biliaires, la phosphatase alcaline est retrouvée sur toute la membrane plasmique (Lindor et Talwalker, 2008).

Transaminases (AST, ALT)

Les transaminases comprennent l'AST et l'ALT, des enzymes intracellulaires qui s'échappent de la cellule par la membrane cellulaire lorsque celle-ci est endommagée. Des niveaux anormaux de transaminases sériques sont une indication de dommages cellulaires. L'AST est présente dans les mitochondries et dans le cytoplasme de tous les types cellulaires, tandis que l'ALT est présente uniquement dans le cytoplasme des hépatocytes, faisant de cette dernière un marqueur plus spécifique des dommages hépatocellulaires (Lindor et Talwalker, 2008).

Bilirubine

La bilirubine est un pigment biliaire de coloration jaune et le colorant principal de la bile, la bile étant le principal produit de catabolisme de l'hème. Deux formes distinctes sont observées, soit la forme conjuguée (directe) et la forme non conjuguée (libre). La bilirubine conjuguée est produite à l'intérieure du foie et est soluble dans l'eau, ce qui fait en sorte qu'elle peut être excrétée dans la bile, tandis que la bilirubine non conjuguée est produite dans la rate et la moelle osseuse, n'est pas soluble dans l'eau et est transportée au foie par liaison avec l'albumine contenue dans le sang.

Une augmentation des niveaux de bilirubine indique la présence d'une jaunisse causée par une augmentation de pigment à l'intérieur du tissu, d'une hépatite (inflammation du foie), d'une cirrhose et/ou d'une malformation des voies de transport de la bile (Lindor et Talwalker, 2008). La jaunisse néonatale est le résultat d'un débalancement entre la production et l'élimination de la bilirubine (Kaplan *et al.*, 2002).

L'hyperbilirubinémie est une augmentation de la quantité de bilirubine dans le sang. Elle peut être causée par une surproduction de bilirubine, une baisse du transport de la bilirubine non conjuguée au foie, ou le résultat de la régurgitation de bilirubine par les hépatocytes ou par des canaux biliaires endommagés (Lindor et Talwalker, 2008). L'hyperbilirubinémie est

très commune chez les nouveau-nés et se produit chez les 2 tiers d'entre eux. La capacité des nouveau-nés à conjuguer et à éliminer la bilirubine est significativement réduite au cours des premiers jours, faisant en sorte que même une légère augmentation de la production de la bilirubine contribue au développement d'une hyperbilirubinémie significative dans les 4 jours suivants la naissance (Maisels et Kring, 2006).

Acide biliaire sérique (SBA)

Les acides biliaires sont des composants de la bile nécessaires à l'absorption des gras et des vitamines liposolubles. Le CDC est un exemple d'un acide biliaire retrouvé dans la bile. C'est un acide biliaire primaire directement synthétisé à partir du cholestérol, qui a la capacité de solubiliser les lipides dans un environnement aqueux (Broughton, 1994).

1.3.2 Cholestases Intrahépatiques

Un grand nombre de cholestases intrahépatiques et plusieurs formes de syndromes spécifiques sont identifiés, dans lesquels les caractéristiques cliniques, la présentation et le pronostic varient. Parmi les désordres les plus documentés et auxquels la Cirrhose Américainne Infantile a été comparée, nous retrouvons les cholestases intrahépatiques progressives familiales (PFIC) de type 1 à 3, les cholestases intrahépatiques récurrentes bénignes (BRIC) de type 1 et 2, le syndrome d'Alagille (AGS) et l'hypercholanémie familiale (FHCA).

1.3.2.1 Cholestase Intrahépatique Progressive Familiale (PFIC)

Certaines cholestases intrahépatiques sont liées à des mutations des transporteurs hépatobiliaires localisés au pôle canaliculaire des hépatocytes. Ces transporteurs font partie de la superfamille d'ATP-binding cassette (ABC) et utilisent l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP afin d'accomplir leur fonction. Leur rôle consiste à faire le transport unidirectionnel de composés organiques à travers la membrane canaliculaire des cellules du foie, vers la bile. Les composantes de la bile sont sécrétées par les hépatocytes à partir de transporteurs spécifiques. Les acides biliaires sont transportés par la pompe BSEP, le cholestérol par l'hétérodimère ABC G5/G8, la bilirubine conjuguée par MRP2 et les phospholipides de type phosphatidyl choline (PC) par MDR3. Parmi les cholestases intrahépatiques causées par des mutations dans des transporteurs, on retrouve les cholestases intrahépatiques progressives familiales (PFIC) et les cholestases intrahépatiques récurrentes bénignes (BRIC) (Wendum, 2010).

Les PFICs se transmettent de manière autosomale récessive et se produisent de manière familiale. Trois sous-types de PFIC ont été identifiés (PFIC 1-3). Ils sont reliés à des mutations dans des gènes de systèmes de transports hépatocellulaire impliqués dans la formation de la bile. Les types de PFIC sont considérés comme étant des maladies rares avec une incidence de 1/50 000 à 1/100 000, mais ils représentent 10 à 15% des causes de cholestases chez les enfants (Davit-Spraul *et al.*, 2009).

Les patients présentent une grande hétérogénéité entre eux, autant dans leurs caractéristiques cliniques que pathologiques, ainsi que dans la progression naturelle de la maladie. Cependant, les PFICs sont un groupe de désordres présentant des caractéristiques communes, telles que: la présence d'une cholestase hépatocellulaire chronique sans guérison, l'exclusion d'un désordre métabolique ou anatomique identifiable, un mode d'occurrence correspondant à un mode de transmission autosomal récessif et une

combinaison caractéristique de facteurs cliniques, biochimiques et histologiques (Balisteri, 2002).

Les types PFIC-1 et PFIC-2 surgissent en période néonatale ou au cours des premiers mois de la vie. Le type PFIC-3 fait apparition plus tardivement, chez les bébés, dans l'enfance ou même chez les jeunes adultes. Les patients sont atteints d'une cholestase, présentent une hépatomégalie (augmentation du volume du foie), un prurit intense, un problème de croissance, une insuffisance pancréatique ainsi qu'une déficience en vitamine liposoluble.

PFIC-1 (Byler Disease)

Ce type de PFIC est causé par une mutation dans le gène *FIC1 (ATP8B1)* (Familial intrahepatic cholestasis 1), localisé sur le chromosome 18q21-22. La protéine FIC1 a une activité de flippase, faisant passer des phospholipides membranaires du feuillet externe de la membrane cytoplasmique vers le feuillet interne. Elle est exprimée dans les cholangiocytes et dans plusieurs types de tissus épithéliaux d'une variété d'organes, tels que le foie, le pancréas, les reins et le petit intestin. Elle est cependant exprimée de manière plus marquée dans le petit intestin que dans le foie. Son rôle dans le mécanisme de la sécrétion de la bile n'est pas complètement élucidé.

Les patients atteints de cette cholestase souffrent d'un prurit sévère et présentent des niveaux élevés de SBA, PA, ALT et AST, une activité normale de GGT sérique, une concentration diminuée de CDC dans la bile ainsi qu'une cholestase intracanaliculaire. Les études histologiques démontrent la présence d'une bile à l'aspect granulaire dans les canalicules biliaires, suggérant un défaut dans le transport des acides biliaires à la membrane canaliculaire. PFIC-1 est associé à des manifestations extrahépatiques telles que la diarrhée chronique, la malabsorption de l'acide biliaire, l'apparition d'une pancréatite et d'une néphrolithiase (pierre au rein). Ces manifestations sont expliquées par l'expression étendue de *FIC1* dans ces tissus, qui aurait une fonction générale dans la biologie de la cellule. La perte de FIC1 occasionne un défaut dans l'asymétrie des phospholipides membranaires et désorganiserait les microdomaines lipidiques. L'activité des autres

transporteurs au niveau de la membrane cytoplasmique du pôle apical des hépatocytes, tel que BSEP, serait alors affecté. Ceci expliquerait les très bas niveaux d'acides biliaires dans la bile (Balisteri, 2002; Carlton *et al.*, 2004; Davit-Spraul *et al.*, 2009; Wendum, 2010; Zollner et Trauner, 2006).

PFIC-2

Ce type de PFIC est causé par une mutation dans le gène *BSEP (ABCB11)* (Bile salt export pump), localisé au chromosome 2q24 et codant pour un transporteur de sels biliaire ayant un rôle important dans la sécrétion canaliculaire d'acides biliaires dans la bile au niveau canaliculaire, en étant le système majeur d'exportation d'acides biliaires des hépatocytes. La mutation aurait un impact sur la fonction de transport de BSEP. La présentation de la maladie est similaire à PFIC-1, mais aucune manifestation extrahépatique n'y est associée, due à l'expression spécifique de BSEP dans le foie. Les patients atteints de cette cholestase présentent une jaunisse au cours des 3 premières semaines de vie, un niveau de GGT sérique normal et une concentration diminuée de CDC biliaire. L'étude histologique démontre l'existence d'une cholestase histologique, d'une hépatite à cellules géantes et une quantité insuffisante de canaux biliaires intrahépatiques. La bile canaliculaire a un aspect amorphe, mais différent de PFIC-1 et l'évolution se fait vers la fibrose et la cirrhose. Les patients peuvent aussi souffrir d'une hépatite chronique avec inflammation lobulaire. Il n'y a aucune thérapie efficace pour ce type de cholestase et il y a progression rapide vers la cirrhose dans la majorité des cas (Balisteri, 2002; Carlton *et al.*, 2004; Davit-Spraul *et al.*, 2009; Wendum, 2010; Zollner et Trauner, 2006).

PFIC-3

Ce type de PFIC est causé par une mutation dans le gène *MDR3 (ABCB4)* (Multidrug resistance class III), causant une troncation du gène. Ce gène est localisé au chromosome

7q21 et code pour une protéine transmembranaire ayant un rôle de flippase de phospholipides, exprimée dans la membrane canaliculaire des hépatocytes. La maladie surgit dans la première année de vie chez les patients qui présentent un niveau élevé de GGT sérique, un manque de phospholipides biliaires et une concentration normale de SBA. Les phospholipides présents dans la bile entrent dans la formation de micelles, avec les acides biliaires et le cholestérol. Ces micelles servent à la protection de l'épithélium des canaux biliaires, qui sont autrement susceptibles aux propriétés détergentes des acides biliaires. Dans le cas où il y a une absence d'excrétion de phospholipides dans la bile, il se produit des blessures à l'intérieur des canaux biliaires (Balisteri, 2002; Carlton *et al.*, 2004; Davit-Spraul *et al.*, 2009; Wendum, 2010; Zollner et Trauner, 2006).

1.3.2.2 Cholestase intrahépatique récurrente bénigne (BRIC)

Deux types de BRIC sont bien documentés, soient BRIC1 et BRIC2. Ces cholestases intrahépatiques se comparent aux PFIC-1 et PFIC-2, respectivement, mais se distinguent par le fait qu'elles sont moins sévères.

BRIC1

BRIC1 est une forme de cholestase intrahépatique causée par une mutation dans le gène *FIC1*, le gène muté dans PFIC-1. Ces maladies présentent des similarités, comme la présence des mêmes manifestations extrahépatiques, en plus d'être alléliques, c'est-à-dire que le gène muté est le même, mais que les mutations qui caractérisent les maladies diffèrent. BRIC1 se distingue cependant au niveau clinique. Elle est caractérisée par des épisodes récurrents de cholestases, accompagnés de jaunisse, d'un prurit sévère et de signes de malnutrition (perte de poids). Les patients présentent un niveau de GGT bas considérant le degré de cholestase présent, un paramètre important pour le diagnostique, et ils sont asymptomatiques entre les attaques. La différence entre les phénotypes des patients atteints

de PFIC-1 et ceux atteints de BRIC1 serait partiellement expliquée par le fait que les mutations identifiées dans le cas de PFIC-1 pourraient perturber sévèrement la fonction de la protéine, tandis que cette fonction serait uniquement partiellement perturbée dans le cas de BRIC1 (Carlton *et al.*, 2004; Davit-Spraul *et al.*, 2009; Wendum, 2010).

BRIC2

Cette forme de BRIC est causée par une mutation dans le gène *BSEP*, le gène muté dans PFIC-2. Les patients atteints de BRIC2 présentent les mêmes symptômes que les patients atteints de BRIC1, mais la progression de la maladie peut varier. Nous pouvons ici également stipuler que les mutations différentes dans la protéine ont des effets distincts sur sa fonction (Carlton *et al.*, 2004; Davit-Spraul *et al.*, 2009; Wendum, 2010).

1.3.2.3 Syndrome d'Alagille (AGS)

Le syndrome d'Alagille est un désordre autosomal dominant hétérogène et multifonctionnel, causé par une mutation dans des gènes de la voie de signalisation Notch. *JAG1*, codant pour le ligand Jagged1, est muté dans 94% des cas et le gène codant pour son récepteur, *NOTCH2*, est muté dans certains cas. Les 2 allèles du gène *JAG1* sont nécessaires pour l'embryogenèse normale chez les humains et la maladie résulte d'une haploinsuffisance de *JAG1*. Ce gène encode une protéine de surface cellulaire qui fonctionne comme un ligand pour le récepteur transmembranaire Notch (Lindor et Talwalker, 2008). Des mutations dans le récepteur Notch2 affecteraient la stabilité de la conformation de la protéine. C'est une maladie généralement non progressive qui apparaît dans les 3 premiers mois de la vie, chez qui les patients atteints présentent des caractéristiques cliniques précises : prurit progressif (démangeaison), un nombre diminué de canaux biliaires, une cholestase en association avec des manifestations cardiaques, squelettiques et ophtalmologiques et une apparence du visage caractéristique (faciès triangulaire, front proéminent, menton pointu). De manière moins fréquente, il y a une

implication des systèmes rénaux et vasculaires et la cirrhose n'est pas un symptôme commun chez les patients. Les patients présentent des niveaux élevés PA, de GGT et de SBA, tous des marqueurs traduisant un défaut dans l'excrétion de la bile. (Ballisteri, 2002; McDaniell *et al.*, 2006).

Le traitement disponible pour les patients est la transplantation hépatique, mais cette opération est habituellement effectuée pour cause de prurit intense afin de soulager le patient et ainsi d'améliorer sa qualité de vie.

1.3.2.4 Hypercholanémie Familiale (FHCA)

Cette maladie du foie est caractérisée par une concentration élevée de SBA, la présence de prurit et par une malabsorption du gras se traduisant en une impossibilité à se rassasier, en une coagulopathie dépendante à la vitamine K et en rachitisme. Ces symptômes reliés à la malabsorption découlent d'une déficience en acide biliaire intestinal. Les patients sont traités à l'acide ursodéoxycholique (UDCA) afin de soulager leurs symptômes. Ce désordre du foie est atypique, car il ne présente pas les signes classiques de dommage au foie. En effet, les marqueurs biochimiques associés à un malfonctionnement du foie sont normaux, excluant l'activité de l'AP qui a tendance à augmenter.

À ce jour, des mutations dans 3 gènes ont été identifiées comme étant la cause de FHCA : *BAAT* (Bile acid coenzyme A : amino acid N-acetyltransférase), *TJP2* (Tight junction protein 2) et *EPHX1* (Epoxide hydrolase 1). Les patients peuvent avoir une ou plusieurs de ces mutations.

Le gène *BAAT*, localisé dans la région chromosomique 9q22.3, encode une protéine impliquée dans le métabolisme de l'acide biliaire. Elle catalyse la deuxième étape dans la formation des conjugués d'acides aminés des acides biliaires. Les conjugués d'acide biliaire agissent alors comme détergent dans la voie gastro-intestinale, favorisant l'absorption des lipides et des vitamines liposolubles. Chez les individus ayant une mutation homozygote

dans le gène *BAAT*, il y a une absence complète de conjugués d'acides aminés d'acides biliaires dans le sérum.

Le gène *TJP2*, localisé dans la région chromosomique 9q13-q21, encode une protéine jouant un rôle de protéine d'échafaudage dans les jonctions serrées des cellules épithéliales et endothéliales. Elle est nécessaire pour l'assemblage adéquat des jonctions serrées. Chez les patients homozygotes pour une mutation dans ce gène, l'acide biliaire entre dans la bile et s'écoule ensuite à travers les jonctions serrées vers le plasma.

Dans le cas du gène *EPHX1*, il est localisé dans la région chromosomique 1q42.1 et encode l'enzyme époxyde hydrolase 1 impliquée dans l'entrée de l'acide biliaire dans les hépatocytes. Des mutations dans cet enzyme causent une diminution de son activité. (Carlton *et al.*, 2004; van Mil *et al.*, 2005).

Tableau I. Caractéristiques principales des cholestases intrahépatiques.

	PFIC-1	PFIC-2	PFIC-3	BRIC1	BRIC2	Syndrome d'Alagille	FHCA
Transmission	Autosomale récessive	Autosomale récessive	Autosomale récessive	Autosomale récessive (pénétrance incomplète)	Autosomale récessive	Autosomale dominante	Autosomale récessive
Gène/Protéine	<i>ATP8B1</i> FIC1	<i>ABCB11</i> BSEP	<i>ABCB4</i> MDR3	<i>ATP8B1</i> FIC1	<i>ABCB11</i> BSEP	<i>JAG1</i> , <i>NOTCH2</i>	<i>BAAT</i> , <i>TJP2</i> , <i>EPHX1</i>
Locus	18q21-22	2q24	7q21	18q21-22	2q24	<i>JAG1</i> : 20p12.2 <i>NOTCH2</i> : 1p11.1	<i>BAAT</i> : 9q22.3 <i>TJP2</i> : 9q13-q21 <i>EPHX1</i> : 1q42.1
Expression	Cholangiocytes, Foie, Intestin, Pancreas, Reins	Foie	Membrane canaliculaire des hépatocytes	Cholangiocytes, Foie, Intestin, Pancreas, Reins	Foie		<i>BAAT</i> : foie <i>TJP2</i> : cellules endothéliales et épithéliales
Fonction	Transport phospholipides membranaires ATP-dépendant	Transport d'acide biliaire dans la bile	Flippase de phospholipides	Transport phospholipides membranaires ATP-dépendant	Transport d'acide biliaire dans la bile	<i>JAG1</i> : ligand de la voie Notch <i>NOTCH2</i> : récepteur de la voie Notch	<i>BAAT</i> : métabolisme de l'acide biliaire <i>TJP2</i> : protéine d'échafaudage jonctions serrées <i>EPHX1</i> : entrée de l'acide biliaire hépatocytes

PFIC-1	PFIC-2	PFIC-3	BRIC1	BRIC2	Syndrome d'Alagille	FHCA	PFIC-1
Symptômes cliniques	Prurit sévère, manifestations extrahépatiques	Prurit sévère	Absence de prurit ou prurit léger	Manifestations extrahépatiques (voir PFIC-1), jaunisse, prurit, asymptomatique entre les attaques	Jaunisse, prurit, asymptomatique entre les attaques	Prurit, manifestations extrahépatiques, visage caractéristique	Prurit, malabsorption du gras, rachitisme
Marqueurs biochimiques	GGT normal PA ↗ AST/ALT ↗ Bilirubine ↗ SBA ↗ CDC ↘	GGT normal PA ↗ AST/ALT ↗ Bilirubine ↗ SBA ↗ CDC ↘	GGT ↗ PA ↗ AST/ALT ↗ Bilirubine ↗ SBA normal	GGT ↘ PA ↗ AST/ALT ↗ SBA ↗	GGT ↘ PA ↗ AST/ALT ↗ SBA ↗	GGT ↗ PA ↗ SBA ↗	GGT normal PA (↗) AST/ALT normal Bilirubine normale SBA ↗ CDC normal
Histologie	Cholestase intracaniculaire, bile granulaire	Cholestase intracaniculaire, hépatite à cellules géantes, fibrose lobulaire et portale prononcée	Fibrose portale, prolifération canaux biliaires	n/a	n/a	Nombre diminué de canaux biliaires	Aucun signe

1.3.3 Présentation clinique et symptômes de NAIC

1.3.3.1 Historique de NAIC

Les observations cliniques de la Cirrhose Amérindienne Infantile ont débuté en 1970 par le suivi de 36 enfants d'origine amérindienne souffrant d'une cirrhose de type biliaire. La maladie se présentait chez plusieurs enfants de la même famille, mais jamais chez leurs parents et tous les enfants atteints appartenaient à des familles des Premières Nations du Nord-Ouest du Québec. L'évaluation de l'état des enfants était effectuée par bilan hépatique tous les 3 à 6 mois, ainsi que tous les ans par une échographie couplée à une étude Doppler du foie. Ces observations ont permis de formuler l'hypothèse que le mode de transmission de la maladie est du type autosomal récessif et que cette maladie est issue d'un effet fondateur. Un effet fondateur est basé sur la présence d'un allèle, rare dans une population mère, mais commun dans une population isolée, qui fait en sorte que le phénotype de la population isolée diffère de celui de la population mère. L'allèle est devenu commun étant donné sa présence chez un ou plusieurs individus à l'origine de cette population (Beaudry, 1985; Drouin *et al.*, 2000; Richter *et al.*, 2007; Weber *et al.*, 1981).

1.3.3.2 Symptômes

La maladie se présente d'abord sous la forme d'une jaunisse néonatale transitoire chez un enfant qui est autrement en bonne santé. La jaunisse est résolue dans la première année de vie et progresse ensuite en cirrhose biliaire et en hypertension portale dans l'enfance ou dans l'adolescence.

1.3.3.3 Caractéristiques histologiques

Les études histologiques ont été effectuées sur les biopsies et sur les foies entiers prélevés lors des transplantations hépatiques et des autopsies. L'analyse d'échantillons de biopsies du foie de patients âgés de moins de 6 mois a permis d'observer une expansion modérée à marquée des espaces portales, accompagnée d'œdème, de fibrose, d'une prolifération frappante de canaux biliaires et d'une inflammation aiguë et chronique. Chez des patients âgés de 1 à 19 ans, les biopsies ont révélées une cirrhose biliaire et de larges bandes fibreuses enlacées qui coupaient les lobules hépatiques en nodules de différentes tailles. Une prolifération des canaux biliaires variable, une inflammation chronique légère à modérée et une cholestase intraductale, intracaniculaire et intrahépatique étaient également observées.

En résumé, les biopsies du foie étaient caractérisées par une prolifération prématurée des canaux biliaires, un développement rapide de fibrose portale et de cirrhose biliaire et par une hypertension portale. Les caractéristiques de ces biopsies étaient compatibles avec une obstruction biliaire et l'ensemble de ces données suggère un phénomène cholangiopathique (Drouin *et al.*, 2000).

1.3.3.4 Marqueurs biochimiques

Les patients présentent un niveau élevé de GGT, un niveau élevé de PA et un niveau élevé de transaminases pouvant atteindre un niveau 10 fois supérieur à la normale. Le niveau élevé de transaminases est une conséquence directe des dommages continus au foie menant à la cirrhose. Les patients présentent également un niveau élevé de bilirubine totale relié à la jaunisse néonatale, qui est normalisé une fois la jaunisse terminée. Il y a tout de même un maintien d'un niveau élevé de la fraction conjuguée (directe) de la bilirubine chez la majorité des patients ne présentant plus de jaunisse. Une hyperbilirubinémie, une

augmentation de bilirubine dans le sang, se développe parallèlement à la perte de fonction du foie (Drouin *et al.*, 2000).

Comme mentionné, les symptômes, les caractéristiques histopathologiques et les marqueurs biochimiques suggèrent un processus cholangiopathique et l'implication des canaux biliaires dans la maladie, plutôt qu'un défaut dans les canalicules biliaires (van Mil *et al.*, 2005).

1.3.3.5 NAIC et les autres cholestases

La Cirrhose Amérindienne Infantile diffère des autres cholestases décrites à la **section 1.3.2**, et ce sur plusieurs points.

Parmi les cholestases décrites, les PFICs sont celles qui rejoignent le plus NAIC, en termes de mode de transmission et de l'occurrence de la maladie, en plus de présenter une combinaison de facteurs cliniques, biochimiques et histologiques semblables à celle des patients atteints de NAIC. Cependant, tous les types présentent des symptômes ou des caractéristiques qui diffèrent de ce qui est observé chez les patients de NAIC, telles que la présence de symptômes extrahépatiques dans le type 1, l'observation d'une quantité insuffisante de canaux biliaires intrahépatiques dans le type 2 ainsi que le moment de l'apparition de la maladie dans le type 3, entre autres.

Dans le cas du syndrome d'Alagille et de l'hypercholanémie familiale, ce sont 2 désordres ayant peu de similarité avec la Cirrhose Amérindienne Infantile. Le syndrome d'Alagille présente des ressemblances au niveau des marqueurs biliaires, mais diffère entièrement au niveau des autres symptômes et du mode de transmission de la maladie. En ce qui concerne les patients atteints de FHCA, ils présentent des marqueurs biliaires normaux en plus de ne présenter aucun signe classique de dommage au foie.

1.3.4 Traitement de NAIC

À ce jour, la transplantation hépatique est le seul traitement efficace pour les patients avancés dans la maladie. La maladie n'a pas resurgi dans les foies des patients transplantés (Richter *et al.*, 2007).

1.3.5 La génétique de NAIC

1.3.5.1 Localisation du locus de NAIC

Le locus de NAIC a été cartographié au chromosome 16q22. Les expériences menant à cette découverte ont été basées sur l'hypothèse qu'un effet fondateur majeur était à l'origine de NAIC et que tous les individus atteints partagent la même mutation. Une stratégie de mise en commun de l'ADN (DNA pooling) a été utilisée afin d'identifier une homozygotie partagée parmi les patients, comparé à leur parenté non atteinte. Des échantillons d'ADN de leucocytes de 51 individus de 5 familles ont été utilisés à cette fin. 3 pools d'ADN ont été créés à partir de ces échantillons, soit un pool d'ADN des parents hétérozygotes (22 individus), un pool d'ADN des individus affectés (13 individus) et un pool d'ADN des frères et sœurs non affectés (16 individus). Tous les individus participants à l'étude provenaient de 6 communautés des Premières Nations au Nord-Ouest du Québec, avaient un historique de jaunisse néonatale et des preuves cliniques et biochimiques de cholangiopathies.

Un criblage du génome entier (genomewide scan) a été effectué avec 333 SSLPs (Simple Sequence Length Polymorphisms) qui ont été amplifiés par PCR en utilisant les 3 pools d'ADN comme gabarits. Tous les individus affectés étaient homozygotes pour l'allèle D16S2624, tandis que le marqueur était polymorphique pour les autres membres de la

famille. L'haplotype, contenu dans un intervalle de 4.9cM défini par D16S3398 et D16S512, était commun à tous les patients atteints de NAIC. Des études subséquentes ont permis de déterminer que l'haplotype formait une région de 2.4Mb entre les marqueurs D16S3085 et D16S3095. La présence d'un haplotype partagé par les 5 familles atteintes de NAIC supporte l'hypothèse d'un effet fondateur et que tous ces individus partagent la même mutation (Bétard *et al.*, 2000).

1.3.5.2 Identification de la mutation

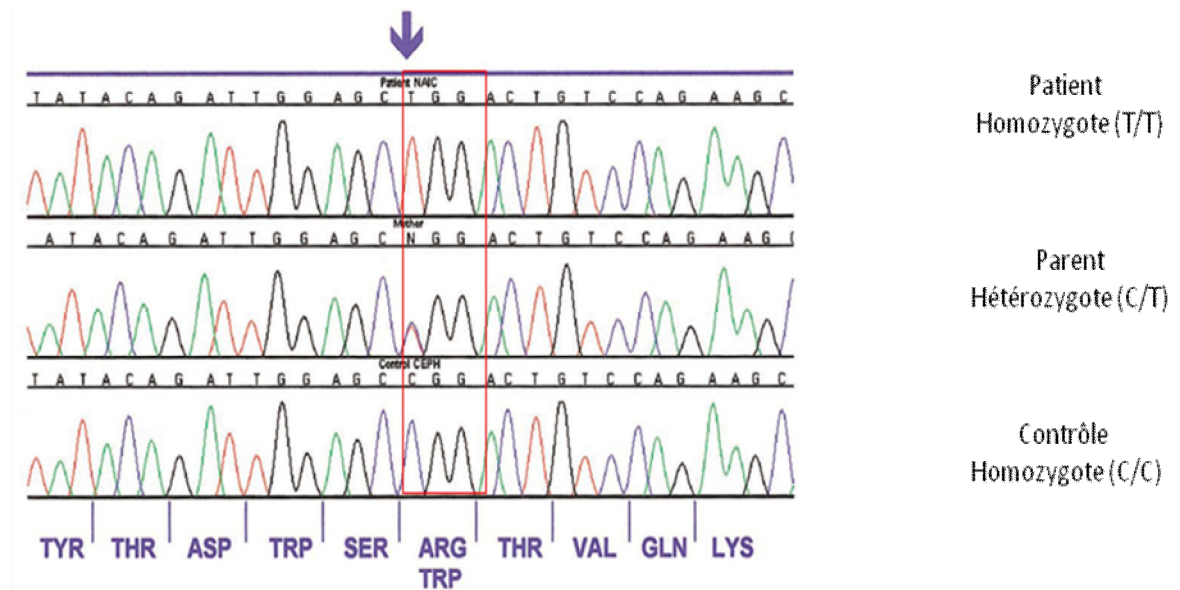


Figure 1.6. Détection de la mutation R565W. Électrophérogramme d'un patient (haut), parent (milieu) et sujet contrôle (bas). La mutation R565W substitue un codon arginine pour un codon tryptophane. Figure tirée et modifiée de Chagnon *et al.*, 2002).


Dans la région délimitée par les marqueurs D16S3085 et D16S3095, 19 gènes ont été identifiés comme étant exprimés dans le foie et ont été séquencés. Des alignements multiples de séquences ont ensuite été effectués et 57 SNPs ont été identifiés entre les marqueurs D16S3085 et D16S3095. Tous ces SNPs étaient localisés dans des introns ou

n'avaient aucun effet sur les exons. Un seul de ces SNPs causait une mutation non-sens dans un gène contenu dans la région critique de NAIC. Cette mutation est localisée sur l'exon 15 de la séquence d'ADNc NM_032830 (c. 1741C→T), gène *FLJ14728*, et est caractérisée par une substitution d'une arginine conservée chez les vertébrés par un tryptophane au codon 565 (R565W). *FLJ14728*, renommé Cirhin (*CIRH1A*), est formé de 17 exons et a une taille de 36.3 Kb de séquence génomique. Il se situe entre le gène *SNTB2* (syntrophin beta2) et le gène *HAS3* (hyaluronan synthase 3).

Le séquençage de l'ADN d'un échantillon de 74 individus provenant de 5 familles atteintes de NAIC a permis de confirmer que la mutation R565W est la cause de la Cirrhose Amérindienne Infantile. Parmi ces individus, 22 étaient affectées et étaient homozygotes pour la mutation c. 1741C→T (T/T). Tous les parents des patients étaient hétérozygotes pour la mutation (C/T), tandis que leurs frères et sœurs non atteints étaient soit homozygotes pour le génotype normal (C/C) ou hétérozygotes comme leurs parents (C/T). Cette observation confirme que la mutation homozygote T/T est la cause de la maladie et que la transmission se fait de manière autosomale récessive (Chagnon *et al.*, 2002).

1.3.5.3 Mutation

La substitution d'une arginine conservée entre les espèces par un tryptophane cause le remplacement d'un domaine hélice- α isolé par un brin de conformation étendu. Cette modification de la structure secondaire pourrait avoir des conséquences fonctionnelles (Chagnon *et al.*, 2002).



Human (Cirhin)	539	NNLVIAHSDQQVFEYSIPDKQYTDWS <u>R</u> TVQKQGFHHLWLQRDTPITHISFHPKRPMHILLHDAYM
Rat (BG666597)	209	NNLVIAHSDQQVFEFSIPDKQYTEWS <u>R</u> SVQKQGFHQLWLQRDTPITHISIHFKRPMHILLHDAYM
Mouse (BG067933)	512	NNLVIAHSDQQVFEFSIPEKQYTEWS <u>R</u> SLQKQGFHQLWLQRDTPITHISFHPKRPMHILLHDAYM
Bovine (BI847962)	188	NNLVIAHSDQQVFEYSIPDKQYTEWS <u>R</u> TVQKQGFHHLWLQRDTPITHISFHPKRPMHILLHDTYM
Pig (BI341887)	13	NNLVIAHSDQQVFEYSIPDKQYTEWS <u>R</u> TIQKQGFHHLWLQRDTPITHISFHPKRPMHILLHDAYM
Zebrafish (AW171085)	612	NCLFMVHADQQIFEFSIEQKEYTDWS <u>R</u> LVQRQGLHRIWLERDTPCLNVTFNQKNPSHVILHDMYM
Salmon (BG936249)	25	NNLTMVHADQQIFEYSIVEKQYTDWS <u>R</u> KLQKQGLHNLWLDLDRDTPVTHVTFNPKNPEQILLHDMHM

Figure 1.7. Séquence partielle de Cirhin et de ses homologues chez les vertébrés (no. GenBank). L'arginine (R) souligné est le résidu muté chez les patients atteints de NAIC. L'alignement de séquences multiples a été effectué avec l'outil d'alignement de ClustalW. Le chiffre en avant de la séquence correspond au premier acide aminé de la séquence présenté (Chagnon *et al.*, 2002).

1.3.5.4 Diagnostique moléculaire

La Cirrhose Amérindienne Infantile peut être diagnostiquée par PCR-RFLP. Le diagnostique par PCR-RFLP est une méthode basée sur la présence d'un ou de plusieurs sites de restrictions polymorphiques dans l'ADN proche d'un gène d'intérêt. Dans une population, plusieurs allèles existent pour un gène ou un locus donné. Ces variations sont liées aux mutations génétiques se produisant dans cette population, qui font en sorte que la séquence d'un gène est modifiée. Il y a donc des différences dans la longueur des fragments d'ADN après digestion par des endonucléases à séquences spécifiques (Primrose et Twyman, 2003).

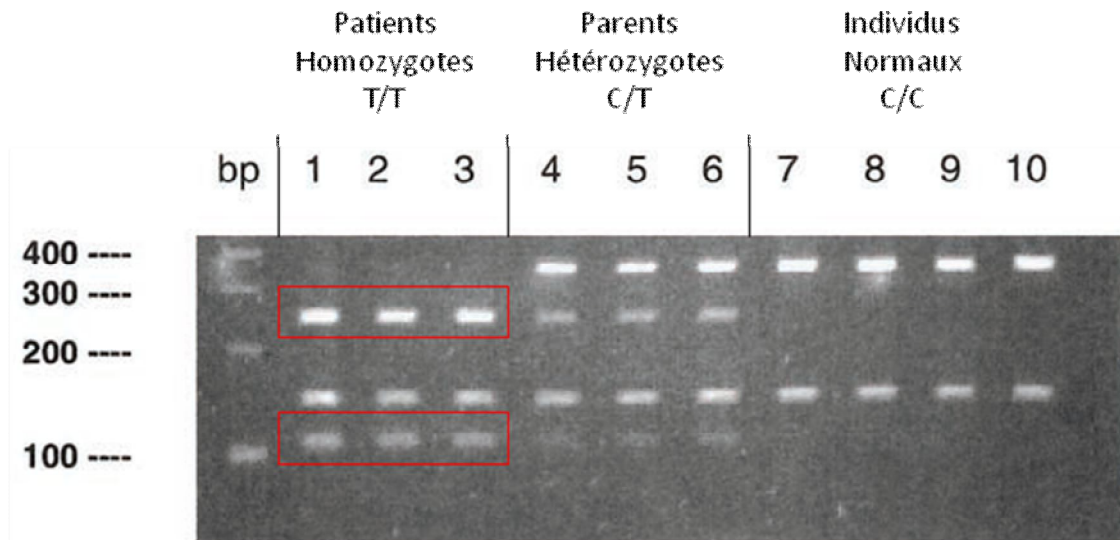


Figure 1.8. Détection de la mutation NAIC par PCR-RFLP. L'exon 15 du gène *FLJ14728* (*CIRH1A*) est amplifié par PCR, l'amplicon est digéré par l'enzyme de restriction *AluI* et les produits de digestion sont séparés sur gel d'agarose 3.0%. Le fragment PCR contient un site *AluI* interne et constant servant de contrôle positif pour la digestion, qui crée un fragment de 150bp. Des fragments de 100bp et 250bp sont créés suite à la digestion par *AluI*, du à la présence de l'allèle mutant (homozygote ou hétérozygote). Figure tirée et modifiée de Chagnon *et al.*, 2002.

Dans le cas de la Cirrhose Amérindienne Infantile, le test diagnostique mis au point par PCR-RFLP est basé sur la présence d'un site de restriction *AluI*, créé par la mutation R565W. Il existe donc 2 allèles pour le gène *CIRH1A*, l'allèle portant la mutation donc le site de restriction *AluI*, ainsi que l'allèle de type sauvage, ou normal. La maladie se transmet de manière autosomale récessive, donc les patients possèdent 2 allèles mutants (homozygote T/T), les parents 1 allèle normal et 1 allèle mutant (hétérozygote C/T) et les individus contrôles 2 allèles normaux (homozygote C/C). Le site polymorphique est alors présent chez les patients et chez les parents. Le site de restriction *AluI* crée des fragments de 100bp et de 250bp détectable sur gel d'agarose.

Chez les patients homozygotes (T/T), les fragments de 100bp et 250bp sont d'une intensité plus forte que les fragments des parents hétérozygotes (C/T) et ces fragments sont absents chez les individus normaux (C/C). Ceci est du au fait que les patients possèdent les 2 allèles mutants contenant le site de restriction *AluI*, alors que les parents en possèdent 1 seul et que

les individus non atteints ne possèdent pas l'allèle mutant. Ces fragments de 100bp et 250bp remplacent le fragment de 400bp présent chez les parents hétérozygotes et chez les individus normaux (Chagnon *et al.*, 2002).

Ce test de dépistage de la Cirrhose Amérindienne Infantile est disponible à l'hôpital Sainte-Justine pour les familles dont les membres sont à risque d'être porteurs de la maladie (Richter *et al.*, 2007).

1.4 Nucléole

Cirhin est une protéine faisant partie du nucléole, un sous-compartiment du noyau, qualifié d'organite malgré qu'il ne soit pas entouré d'une membrane. Le nucléole est principalement reconnu comme étant le centre de synthèse des ARN ribosomiques (ARNr) et le centre d'assemblage des sous-unités ribosomiques 40S et 60S. Le nucléole est également impliqué dans la maturation de complexes impliquant des ARN différents des ARNr, la régulation de la mitose, la croissance et la mort cellulaire, la sénescence, la réponse au stress, le cycle cellulaire, le vieillissement (fonction des télomérases), le contrôle suite à l'infection d'un virus et la suppression de tumeurs.

1.4.1 Assemblage du nucléole

L'équipe de Colau *et al.* propose la théorie de l'auto-organisation comme explication à l'assemblage du nucléole et à la stabilité de la structure malgré l'absence d'une membrane. Selon cette théorie, la capacité d'un complexe macromoléculaire ou d'une organelle à déterminer sa propre structure se base sur les interactions fonctionnelles et transitoires de ses constituants. Le contenu en protéines du nucléole est en état de perpétuel changement et l'association physique de ces molécules génère une structure statique (Colau *et al.*, 2004).

1.4.2 Machineries et organisation du nucléole

La série d'événements de maturation des ARNr et d'assemblage des sous-unités ribosomiques est sous le contrôle de 2 larges complexes de ribonucléoprotéines (RNP), le SSU (small subunit) processome requis pour la sous-unité 40S et le LSU (large subunit) processome requis pour la sous-unité 60S.

Dans les cellules de mammifères, ces machineries du nucléole sont distribuées en trois compartiments principaux : les centres fibrillaires (CF) caractérisés par des régions claires de 0.1 à 1µm, qui sont entourés par le composant fibrillaire dense (CFD) et le composant granuleux (CG) englobant le CFD et le CF, constituée de granules de 15 à 20nm. Les nucléoles de différents types cellulaires présentent un nombre variable de CF de différentes tailles, le nombre et la taille étant inversement proportionnels. Les cellules ayant un haut taux de biogenèse de ribosomes possèdent de nombreux CF de petites tailles, tandis que les cellules dont les activités métaboliques et transcriptionnelles sont réduites présentent un petit nucléole avec un large CF.

Des fonctions spécifiques sont associées à ces compartiments du nucléole, qui sont le siège des processus de transcription et de maturation des ARNr, ainsi que de l'assemblage du ribosome. La localisation des machineries nucléolaires dans ces compartiments spécifiques est associée à leur fonction dans la production des sous-unités ribosomiques. Les gènes d'ARNr apparaissent à la jonction entre les CF et le CFD et s'accumulent dans le CFD. Les protéines nucléolaires participant aux premières étapes des processus de transcription et de maturation des ARNr sont localisées dans le CFD (fibrillarine, nucléoline). La maturation des pré-ARNr et leur assemblage avec les protéines débute dans le CFD et se poursuit dans le CG, où se trouvent des protéines nucléolaires telles que nucléophosmine (B23), participant aux étapes intermédiaires et finales de la maturation des pré-ARN. Dans le CG se trouvent les éléments préribosomaux prêts à être transportés dans le cytoplasme. La nucléophosmine serait une protéine chaperonne nucléolaire permettant ce transport. En conclusion, la distribution dans le nucléole des machineries impliquées successivement

dans la biogenèse des ribosomes corrèle avec les différentes étapes des processus de transcription et de maturation des ARNr en sous-unités ribosomiques (Cooper, 1999; Sirri *et al.*, 2008).

1.4.3 Recrutement/Localisation nucléolaire

L'implication du nucléole dans la cellule se fait par la séquestration et le relâchement rapide et continu de protéines spécifiques en réponse à des conditions métaboliques changeantes (Emmott et Hiscox, 2009; Hernandez-Verdun et Louvet, 2004). En effet, le nucléole est au centre d'échanges dynamiques avec les différents domaines nucléaires (Collau *et al.*, 2004).

Le recrutement des protéines au nucléole se fait d'abord par leur localisation au noyau, d'où elles sont ciblées au nucléole. Contrairement aux signaux gouvernants la localisation et l'export des protéines nucléaires (NLS), les signaux de localisation au nucléole (NoLS) ne sont pas aussi bien caractérisés. Plusieurs NoLS ont été identifiés, mais aucune séquence consensus n'a été décrite. Cependant, tous les NoLS identifiés sont riches en résidus basiques (Sirri *et al.*, 2008).

Il a été démontré que les protéines s'associent et se dissocient rapidement des composants nucléolaires (CF, CFD, CG), en échange continu avec le nucléoplasme. Des mécanismes de rétention compartiments spécifiques permettraient à des protéines de se localiser dans des corps cellulaires. Ceci impliquerait que le temps de rétention d'une molécule spécifique dans un corps nucléaire spécifique dépend de ses interactions. De nombreuses protéines ont la capacité de se localiser au nucléole et ceci serait dû à leur capacité d'entrer en interaction avec certaines protéines nucléolaires pouvant constamment faire la navette entre le nucléole et le nucléoplasme. Les NoLS seraient alors des séquences impliquées dans des interactions fonctionnelles directes ou indirectes avec des macromolécules présentes dans le nucléole, et

non des motifs de reconnaissance pour une machinerie d'importation comme c'est le cas pour la localisation dans les compartiments délimités d'une membrane (Sirri *et al.*, 2008). Cette hypothèse est supportée par le fait que la fusion d'une séquence d'interaction à nucléophosmine à fibrillarine fait en sorte qu'il est possible de relocaliser fibrillarine du CFD au GC, là où la nucléophosmine est majoritairement localisée (Lechertier *et al.*, 2007). La séquence de localisation nucléolaire serait alors une séquence de rétention, conséquence d'une interaction entre protéines (Alberts *et al.*, 2004).

1.5 Les protéines de NAIC

1.5.1 Cirhin

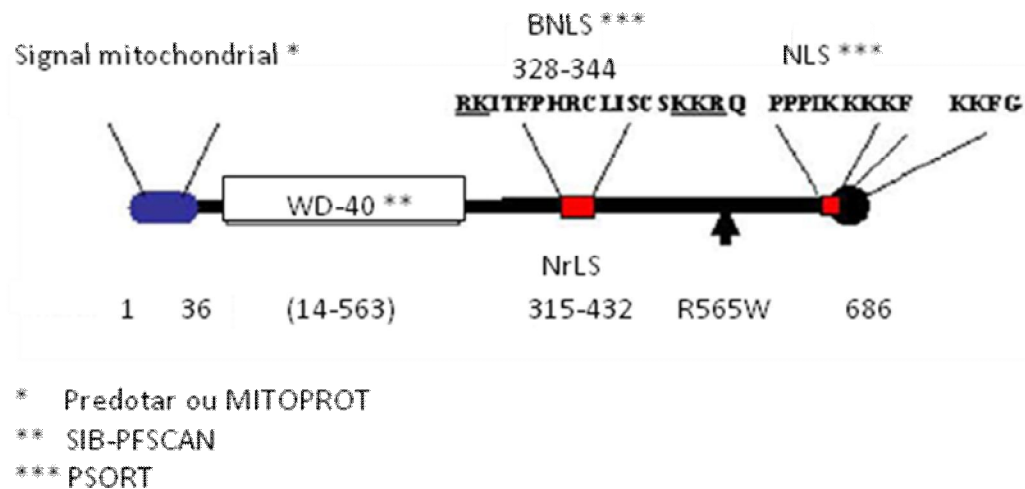


Figure 1.9. Domaines structuraux et fonctionnels prédits de Cirhin. Le signal mitochondrial a été prédit par le programme Predotar/MITOPROT, les domaines WD-40 par SIB-PFSCAN et les domaines BNLS et NLS par PSORT. Figure modifiée de Yu *et al.*, 2005.

Cirhin est une protéine nucléolaire de 686 acides aminés et de masse moléculaire de 76kDa. Des analyses bioinformatiques prédisent que Cirhin est une protéine à répétitions de motifs

WD-40, plus précisément 11 répétitions en deux groupes (résidus 14-563). Il est également prédit qu'elle contient plusieurs signaux de localisation cellulaire, tels qu'un signal de localisation nucléaire à son extrémité C-terminale (NLS, résidus 677-686), un signal de localisation nucléaire en deux parties (BNLS, résidus 328-344), un signal de localisation mitochondrial en N-terminal (résidus 1-36) ainsi qu'un signal de localisation nucléolaire unique (NrLS, résidus 315-432). Cirhin n'a cependant pas de motifs de liaison à l'ARN et l'ADN, donc ne s'associerait pas directement avec les acides nucléiques (Yu *et al.*, 2005).

La présence d'un domaine NLS actif et d'un NrLS en C-terminal a été confirmée dans notre laboratoire. De plus, la mutation R565W dans la protéine Cirhin ne modifie pas la localisation sous-cellulaire de Cirhin, qui demeure nucléolaire (figure 1.10) (Yu *et al.*, 2005).

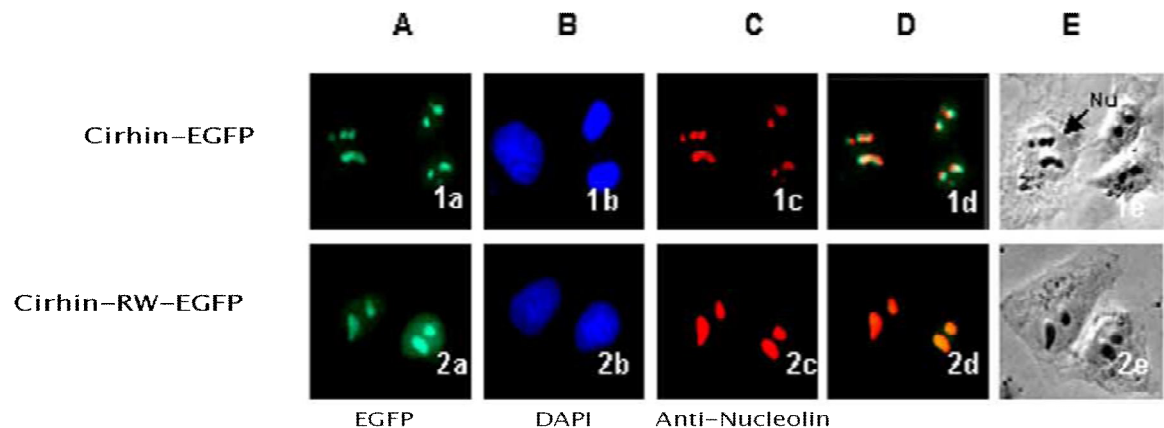


Figure 1.10. Localisation sous-cellulaire de Cirhin et R565WCirhin. Transfection transitoire de cellules HeLa avec Cirhin et R565W Cirhin fusionnées en C-terminal avec EGFP (Cirhin-EGFP, Cirhin-RW-EGFP). A : fluorescence EGFP; B : coloration des noyaux au DAPI; C : coloration à l'anti-nucléoline pour le nucléole; D : superposition des images EGFP (vert), DAPI (bleu) et anti-nucléoline (rouge); E : Contraste de phase.

Cirhin est une protéine conservée chez les vertébrés, tel que la souris, le rat, la vache, le poisson zèbre et le saumon. Une grande similarité entre les séquences de Cirhin humain et de son orthologue Tex292 (Cirh1a) chez la souris est observée, soit 88%. Tex292 (testis-expressed gene 292 protein) est exprimée principalement dans les testicules et le foie. Des

expériences d'hybridation *in-situ* chez des embryons de souris de 11 jours ont permis de déterminer que son expression est prédominante dans le foie à cette période et que son expression est diminuée à 12,5 jours et à la naissance. Ces résultats suggèrent que la maladie résulterait d'un événement prénatal (Chagnon *et al.*, 2002).

1.5.2 Fonction de Cirhin

La séquence de Cirhin ne permet pas de connaître sa fonction, mais comme mentionné, elle possède des répétitions de motifs WD-40, un des domaines les plus abondants dans les génomes eucaryotes. Le motif est défini par une séquence de 44-60 résidus, initié par un dipeptide glycine-histidine (GH) en N-terminal et terminé par un dipeptide tryptophane-acide aspartique (WD) en C-terminal. Entre ces dipeptides se trouve une séquence faiblement conservée d'une longueur d'approximativement 40 acides aminés, d'où le nom WD-40. Chaque répétition WD-40 comprend 4 feuillets β antiparallèles et ces répétitions sont stabilisées par un réseau de pont hydrogène. Ces motifs ne possèdent pas d'activité catalytique et ne sont pas des domaines fonctionnels. Les protéines WD-40 exercent leurs fonctions à travers des interactions protéine-protéine, d'où la nécessité de développer un interactome pour ces protéines, incluant Cirhin (Li et Roberts, 2001; Smith *et al.*, 1999; Xu et Min, 2011).

L'importance de la famille de protéines contenant des motifs WD-40 se traduit non seulement par sa conservation chez tous les eucaryotes, mais également par la grande variété de fonctions cruciales auxquelles elle participe, telles que la transduction du signal, la synthèse et le traitement de l'ARN, la dynamique de la chromatine, le trafic vésiculaire, l'assemblage du cytosquelette, le contrôle du cycle cellulaire, la régulation de la transcription et l'apoptose. La fonction commune de ces protéines est la coordination de l'assemblage de complexes multiprotéiques, en agissant comme échafaudage et en coordonnant les événements en aval, tels que l'ubiquitination et la méthylation des histones,

la spécificité des protéines étant déterminée par les séquences à l'extérieur des répétitions. De plus, plusieurs maladies héréditaires humaines sont reconnues comme étant une conséquence de mutations dans des protéines WD-40. La lissencéphalie, causée par une mutation du gène *LISI*, le syndrome de Cockayne (CS), un désordre autosomal récessif et le syndrome d'Allgrove également un désordre autosomal récessif font partie de ces maladies (Li et Roberts, 2001; Smith *et al.*, 1999; Xu et Min, 2011).

1.5.2.1 Cirhin dans le développement

Chez la souris, des expériences ont été effectuées, qui constituaient à faire des knockouts du gène *Tex292*. Ces expériences ont démontré que l'inactivation homozygote *Cirh1a* *-/-* cause la mort de l'embryon après aussi peu que 8,5 jours de gestation, tandis que l'inactivation hétérozygote *Cirh1a* *+/-* n'a aucun effet négatif sur les souris, qui restent fertiles et phénotypiquement normales (Richter *et al.*, 2007).

Des expériences d'interférence à ARN dans les cellules HeLa et HepG2 ont permis de déterminer que Cirhin a un rôle dans la prolifération cellulaire (Figure 1.11) (Yu *et al.*, non publié).

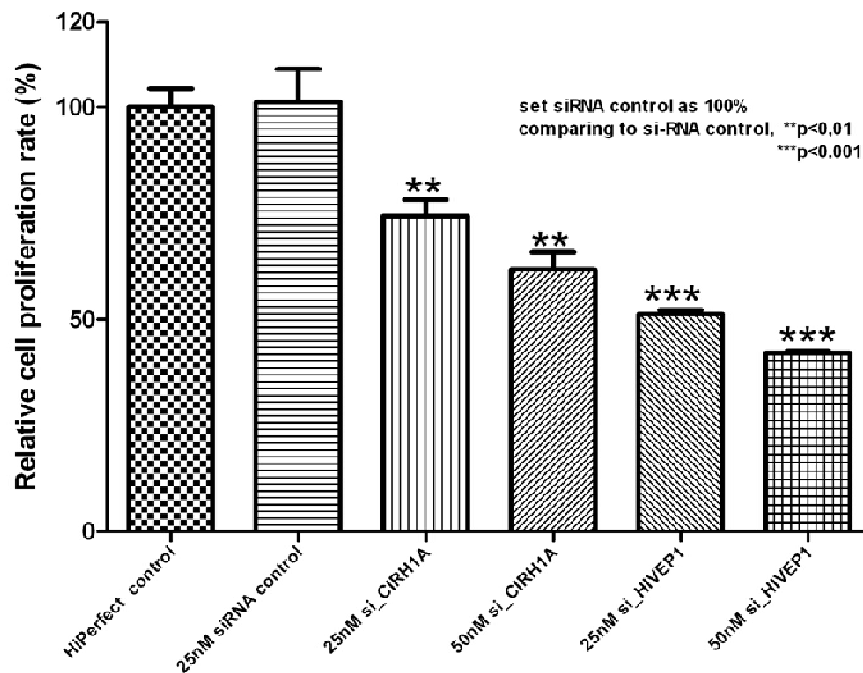


Figure 1.11. Effet des siARN contre Cirhin (CIRH1A) ou Cirip (HIVEP1) sur la prolifération des cellules HeLa. Mesure du taux de prolifération (%) des cellules HeLa transfectées avec 25nM et 50nM de siARN contre Cirhin ou Cirip, à l'aide de l'HiPerfect.

Ces expériences supportent l'hypothèse que Cirhin serait impliquée dans un mécanisme important au cours du développement.

1.5.2.2 Cirhin dans la biogenèse des ribosomes

Comme mentionné, Cirhin est une protéine nucléolaire. En 2010, l'équipe de Freed *et al.* a étudié le rôle de la mutation R565W (NAIC) dans la biogenèse du ribosome. Chez la levure *Saccharomyces Cerevisiae*, Utp4 serait un homologue de Cirhin, est une protéine du SSU processome et membre du complexe t-Utp. Le SSU processome est une large ribonucléoprotéine requise pour la production et la maturation de l'ARNr 18S du ribosome. Le complexe t-Utp est un sous-complexe du SSU processome conservé chez les humains et

formé de 7 protéines (Utp4, Utp5, Utp8, Utp9, Utp10, Utp15 et Utp17). Ce complexe est associé avec la chromatine ribosomale (r-chromatine) et nécessaire pour la transcription optimale de l'ADNr.

Ils proposent que NAIC soit causé par un dysfonctionnement de l'assemblage du pré-ribosome, conséquemment à la perte de l'interaction entre Cirhin/Utp4 et une autre protéine du SSU processome, plus particulièrement Utp8. Utp8 interagit avec la partie C-terminale d'Utp4, une interaction essentielle à l'assemblage du SSU processome et à la fonction d'Utp4 dans la biogenèse des ribosomes, soit la croissance cellulaire et la maturation des ARNr 18S et 25S (Freed et Baserga, 2010). Selon eux, Cirhin serait requise pour la biogenèse des ribosomes et une mutation dans une protéine de la biogenèse de la petite sous-unité ribosomale serait la cause de la Cirrhose Amérindienne Infantile (Freed *et al.*, 2010).

Cirhin et Utp4 sont des gènes orthologues, mais l'hypothèse a été émise que la mutation dans la partie C-terminale d'Utp4 causerait la perte d'interaction avec Utp8, et conséquemment un défaut dans la biogenèse des ribosomes. Afin de démontrer le rôle de la mutation NAIC dans la biogenèse, la mutation homologue de NAIC (K617W et K627) a été introduite dans la partie C-terminale d'Utp4. Ces mutations n'ont causé aucun défaut dans la croissance cellulaire, ni dans la biogenèse des ribosomes. Cependant, le groupe de Freed et Baserga a démontré que la portion C-terminale d'Utp4 est essentielle à la croissance cellulaire et à la maturation des ARNr 18S et 25S, et que d'autres mutations dans la région entourant la mutation NAIC causent les défauts mentionnés. Ils ont également démontré que les résidus 1-745 d'Utp4 ne sont pas suffisants pour l'interaction avec Utp8. Or, la mutation homologue est située au résidu K616 et/ou K627. Utp8 interagirait alors avec des résidus en aval de cette mutation, plus loin en C-terminal et non pas avec les résidus de NAIC. Finalement, ces résultats ne se transposent peut-être pas à l'humain, puisque des résultats non publiés de notre groupe ainsi que des résultats de Freed et Baserga démontrent que Cirhin humain n'a pas réussi à compléter UTP4 supprimé de la levure *S.cerevisiae*. De plus, Utp8 n'est pas conservée chez les mammifères et aucun

analogue d'Utp8 n'a été identifié à ce jour chez les humains (Freed et Baserga, 2010; Prieto et McStay, 2007).

L'hypothèse que Cirhin aurait un rôle dans la biogenèse des ribosomes n'est cependant pas écartée. Presque tous les facteurs nécessaires pour la biogenèse des ribosomes sont essentiels pour la survie cellulaire et des défauts dans la biogenèse causent souvent la mort embryonnaire. Cependant, ces défauts peuvent parfois causer des maladies détectables chez les humains, comme le syndrome de Treacher Collins (TCS), un désordre autosomal dominant, et le syndrome de Bowen-Conradi (BCS), un désordre autosomal récessif, causés par des mutations dans des protéines de biogenèse de la petite sous-unité ribosomique, ainsi que le syndrome de Shwachman-Bodian-Diamond (SBDS), un désordre autosomal récessif causé par une mutation dans une protéine de la biogenèse de la grosse sous-unité ribosomique (Freed *et al.*, 2010). Presque toutes les maladies sont le résultat d'une haploinsuffisance ou d'une perte partielle de l'expression des protéines, et il a été proposé qu'une mutation homozygote des facteurs de la biogenèse des ribosomes soit embryoniquement létale (Wu *et al.*, 2010). Cette hypothèse rejoint une des caractéristiques de NAIC, soit que l'inactivation homozygote *Cirh1a* *-/-* cause la mort de l'embryon après aussi peu que 8,5 jours de gestation, tandis que l'inactivation hétérozygote *Cirh1a* *+/-* n'a aucun effet négatif sur les souris qui restent fertiles et phénotypiquement normales (Richter *et al.*, 2007).

1.5.2.3 Cirip/HIVEP1

Cirip (Cirhin interacting protein) a été identifiée par la méthode du double hybride chez la levure. Cirip est une protéine nucléaire dont la séquence est presque identique aux 684 acides aminés de la partie C-terminale d'HIVEP1.

HIVEP1, aussi connu sous les noms PRDII-BF1 et MBP-1, a une masse moléculaire de 298 kDa et est un membre de la famille des facteurs de transcription à doigt de zinc contenant le domaine ZAS. Cette famille de facteur de transcription se lie au motif NF- κ B (Nuclear

factor-kappaB) et aux séquences apparentées (Van Duyne *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2009). Les motifs NF- κ B se trouvent dans les promoteurs viraux et cellulaires, où ils gouvernent des changements dans les réponses de l'expression des gènes pour une variété de voies de signalisation, incluant celles induites par des protéines virales, les mitogènes et les cytokines. HIVEP1 a 2 domaines de liaison à doigt de zinc largement séparés, chacun de ces domaines capables de se lier au motif NF- κ B (Seeler *et al.*, 1994). Le motif spécifique lié par HIVEP1 est l'élément activateur de HIV-1 LTR (Long terminal repeat), retrouvé dans les promoteurs des gènes cellulaires et des virus infectieux incluant HIV-1, SV40 (simian virus 40) et CMV (cytomégalovirus). Cette région contient 2 motifs NF- κ B et est critique pour l'expression du gène qui est modulée par la liaison de facteurs de transcription, tel que HIVEP1 (Seeler *et al.*, 1994; Van Duyne *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2009).

Dans le cas de Cirip, il contient le second domaine ZAS et un signal de localisation nucléaire (NLS). Des expériences de co-transformation dans un système mammifère ont permis de déterminer que Cirip serait un peptide fonctionnel d'HIVEP1, puisqu'il est actif sur le motif HIV-1 LTR, et serait peut-être responsable des interactions protéine-protéine d'HIVEP1. Il a également été déterminé que Cirhin agit comme un facteur de régulation positif de Cirip sur cet élément activateur, et que la mutation R565W fait en sorte que Cirhin perd partiellement sa fonction de régulateur transcriptionnel (Yu *et al.*, 2009).

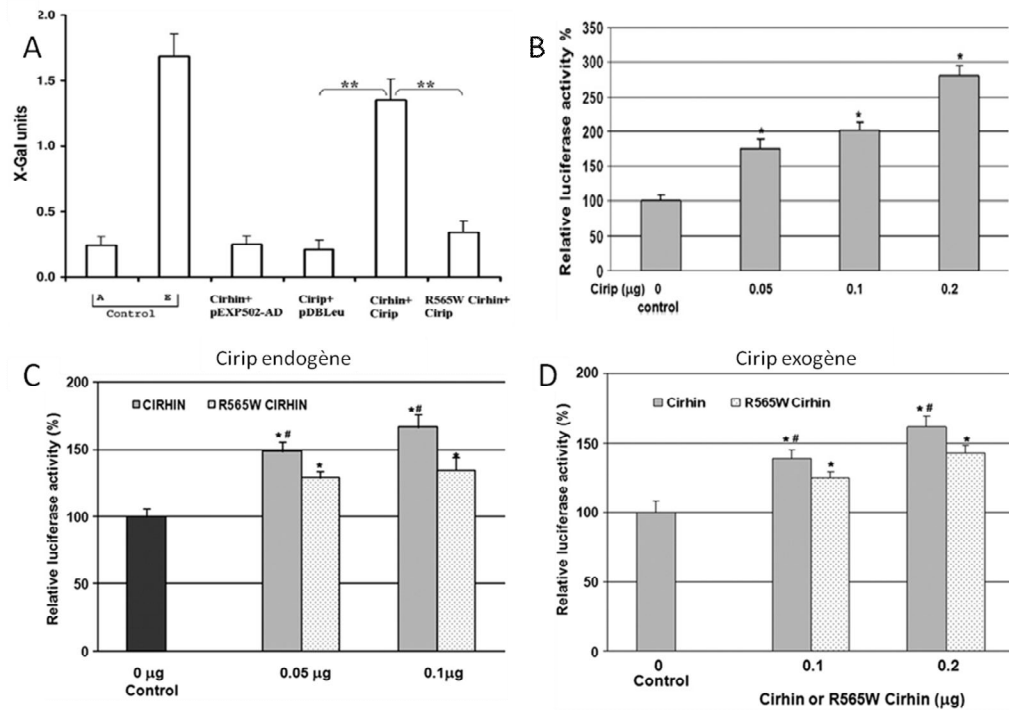


Figure 1.12. Étude interaction Cirhin/Cirip. A) Mesure quantitative de l'interaction par X-Gal liquide. (B, C, D) Mesure de l'activité luciférase reflétant l'activité de l'élément activateur HIV-1 LTR (HIV-1 LTR E-E). B) Effet de Cirip sur HIV-1 LTR E-E dans les cellules HeLa co-transfectées avec des concentrations croissantes de Cirip. C) Influence de Cirhin et R565WCirhin sur l'effet de Cirip endogène sur HIV-1 LTR E-E. Concentrations croissantes de Cirhin et R565WCirhin. D) Influence de Cirhin et R565WCirhin sur l'effet de Cirip exogène sur HIV-1 LTR E-E dans les cellules HeLa transfectées avec HIV-1 LTR E-E (Yu *et al.*, 2009).

L'interaction entre Cirhin, une protéine nucléolaire, et Cirip, une protéine nucléaire, est possible puisque, comme mentionné, plusieurs protéines nucléaires peuvent être rencontrées dans le nucléole. Les protéines recrutées au noyau par leur NLS sont distribuées à travers le nucléoplasme et certaines sont ciblées à des compartiments spécifiques du noyau, tel que le nucléole (Sirri *et al.*, 2008). Cirip diffuserait donc librement dans l'espace nucléaire, entrerait dans le nucléole et y résiderait pour une très courte période grâce à son interaction avec Cirhin.

1.5.2.4 Facteurs de transcription régulant Cirhin

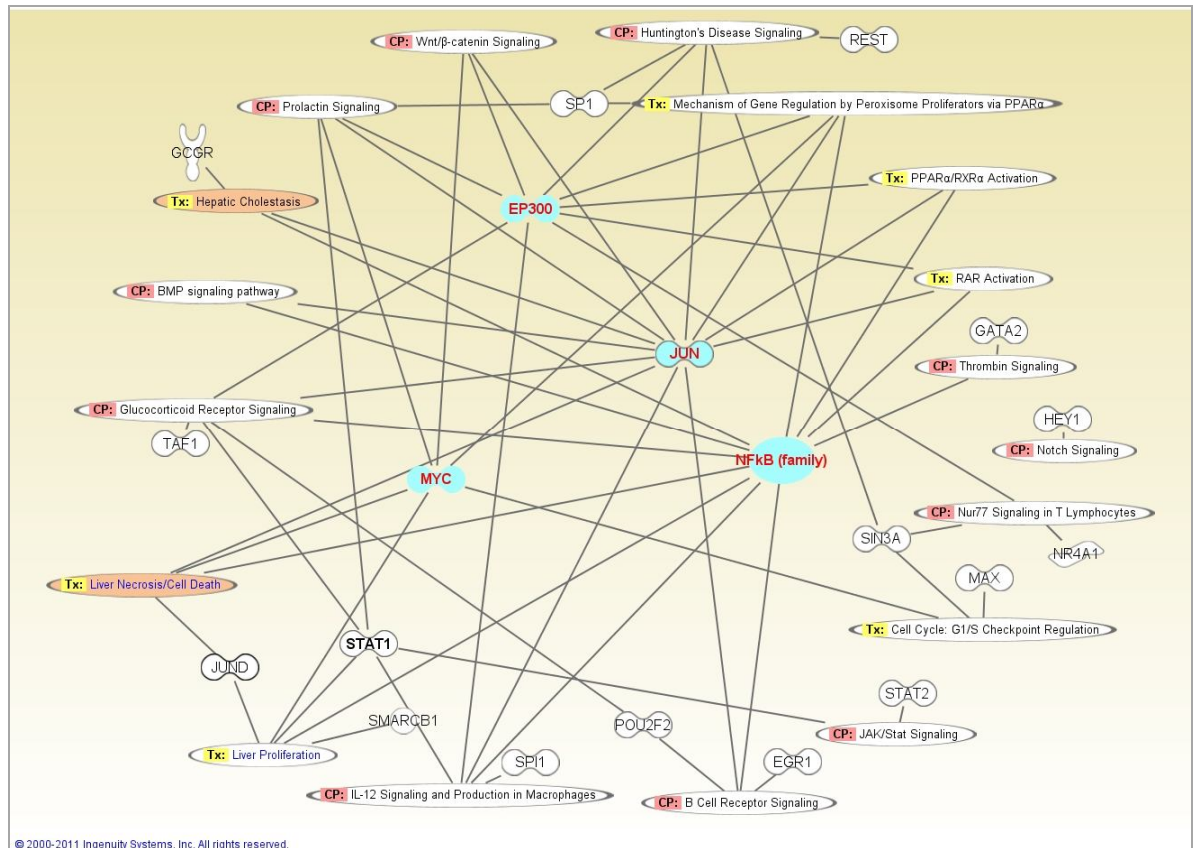


Figure 1.13. Schéma des facteurs de transcription prédits s'associant au promoteur de Cirhin. Les facteurs de transcriptions majeurs sont EP300, JUN, MYC et ceux de la famille NFκB. Obtenu par le logiciel IPA (Ingenuity pathway analysis).

Les facteurs de transcription associés à la séquence promotrice de Cirhin peuvent nous fournir des indices sur la fonction qu'exerce cette dernière.

Les bases de données Ensembl et UCSC fournissent des prédictions sur les caractéristiques de régulation associées au promoteur du gène encodant Cirhin, les facteurs de transcriptions s'associant à la région promotrice étant résumés dans la **figure 1.13** ci-dessus.

Cirhin est reliée aux voies de signalisation impliquées dans le développement des canaux biliaires intrahépatiques, par quelques un de ces facteurs de transcription, soit c-Myc, EP300 et JUN.

Le gène *MYC* encode la phosphoprotéine nucléaire c-Myc (v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog), un facteur de transcription et un proto-oncogène hautement exprimé dans plusieurs types de cancer. Il joue un rôle critique dans la régulation de la croissance et de la prolifération cellulaire, dans la perte de différenciation, dans l'apoptose, dans la régulation transcriptionnelle, dans la modification et le transport des protéines et également dans le contrôle du cycle cellulaire, du métabolisme et de la transduction du signal. Il joue ces rôles en régulant l'expression de gènes impliqués dans le développement et dans la tumorigenèse (Brown *et al.*, 2008; Reymann et Borlak, 2008). c-Myc dimérise (entre autre) avec Max (MYC associated factor X), un régulateur de transcription de la même famille que c-Myc, afin de lier la séquence de reconnaissance 5'-CACGTG-3', connue comme étant la boîte E(CG) (CG-core E-box), et d'activer la transcription (Blackwood et Eisenman, 2001; Brown *et al.*, 2008).

Le gène EP300 encode la protéine p300 associée à E1A (E1A binding protein p300), exprimée dans le noyau des cellules du foie, mais pas dans le nucléole (Barbe *et al.*, 2008). Cette protéine fonctionne comme histone acétyltransférase et régule la transcription via le remodelage de la chromatine en acétylant les 4 histones centraux dans les nucléosomes. L'acétylation des histones est une étiquette épigénétique permettant l'activation de la transcription et ce gène est important dans les processus de prolifération et différenciation cellulaire.

Dans le cas de JUN, il code pour la protéine proto-oncogène Jun, localisée au noyau et se fixant au motif 5'-TGA[CG]TCA-3'.

JUN, MYC et EP300 sont des gènes cibles de la signalisation WNT/ β -caténine, jouant un rôle dans la croissance et la prolifération cellulaire, en plus de la régulation du cycle cellulaire.

JUN et MYC sont également des gènes cibles de la voie de signalisation TGF- β . JUN a un rôle dans la voie de signalisation BMP (Bone morphogenetic proteins), des membres de la superfamille des cytokines TGF- β . Ces protéines se fixent à des récepteurs sérine/thréonine kinase, qui transmettent le signal au noyau par l'entremise des protéines Smads, dont un des

gènes cibles est JUN (von Bubnoff et Cho, 2001). Dans le cas de MYC, il joue un rôle dans la régulation du point de contrôle G1/S du cycle cellulaire, et ceci par la translocation de Smad3 au noyau. Smad3 est connu comme étant un médiateur direct de l'activation transcriptionnelle par le récepteur TGF- β , mais il peut également promouvoir la répression transcriptionnelle du gène c-Myc, un promoteur de la croissance cellulaire. Dans le cytoplasme se trouve un complexe composé de Smad3, des facteurs de transcription E2F4/5 et DP1 ainsi que du corépresseur p107. En réponse à la signalisation TGF- β , ce complexe transloque au noyau et s'associe à Smad4, où il reconnaît un site sur c-Myc causant sa répression (Chen *et al.*, 2002).

On peut donc postuler que Cirhin est également associée à des désordres du foie tels que la cholestase hépatique et à la nécrose du foie, par le biais des facteurs JUN dans le cas de la cholestase et JUN, MYC et NF κ B dans le cas de la nécrose. Les facteurs de transcription JUND, MYC, STAT1, NF κ B et SMARCB1 ont également été identifiés comme ayant un rôle dans la prolifération des cellules du foie.

1.6 Projet de recherche

1.6.1 Problématique

La Cirrhose Amérindienne Infantile est la cause majeure de maladie du foie et la plus fréquente cause de transplantation hépatique chez les enfants du Nord-Ouest du Québec. Il a été estimé que le taux de porteurs du gène muté se situe entre 8 et 12%, un taux similaire à ceux des autres maladies des Premières Nations canadiennes, comme l'acidémie glutarique de type I au Manitoba. À ce jour le seul traitement efficace de la Cirrhose Amérindienne Infantile est la transplantation hépatique (Richter *et al.*, 2007).

La protéine Cirhin a été identifiée comme étant la protéine mutée responsable de la maladie. Comme mentionné, sa séquence ne permet pas de connaître sa fonction et ne contient pas de motifs de liaison à l'ADN et à l'ARN. Elle ne se lierait donc pas directement aux acides nucléiques. Elle possède cependant des répétitions de motifs WD40 permettant des liaisons protéine-protéine. L'hypothèse que Cirhin pourrait favoriser l'interaction directe protéine-protéine et qu'elle constituerait un rouage important d'un mécanisme moléculaire de base a donc été formulée (Richter *et al.*, 2007).

1.6.2 Buts et objectifs

Des résultats préliminaires obtenus lors d'un stage dans le laboratoire du Dr. Andrea Richter ont permis d'identifier Nol11 comme un partenaire d'interaction potentiel de Cirhin. Nous voulons confirmer l'interaction directe de ces protéines chez la levure, ainsi qu'étudier en détails cette interaction en identifiant les régions nécessaires à cette dernière. Nous voulons également tester l'interaction R565WCirhin/Nol11 afin de déterminer si la mutation causant la Cirrhose Amérindienne Infantile peut affecter le réseau d'interaction de Cirhin et par le fait même sa fonction. Dans le cas où l'interaction Cirhin/Nol11 est confirmée chez la levure, nous voulons vérifier cette interaction ainsi que l'interaction

R565WCirhin/Nol11 dans un système double hybride de mammifère, donc dans un système dérivé d'un eucaryote plus complexe que la levure. La confirmation des interactions Cirhin/Nol11 dans un tel système supportera fortement nos résultats chez les levures. Notre hypothèse actuelle est que la partie C-terminale de Nol11 interagit avec la partie C-terminale de Cirhin et que cette interaction est affectée par la mutation R565W, comme dans le cas de l'interaction Cirhin/Cirip.

L'objectif général du projet est l'établissement d'un réseau d'interaction de Cirhin valide, qui nous permettra de formuler des hypothèses sur la fonction de Cirhin. L'atteinte de cet objectif serait un avancement vers le but ultime de la recherche effectuée par le groupe, qui est de déterminer le mécanisme d'action de cette maladie. Ceci permettrait d'offrir aux patients des méthodes alternatives de traitements et conséquemment une meilleure qualité de vie en enrayant la nécessité d'une transplantation hépatique.

2 MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Stratégie générale

Dans le but d'identifier et de caractériser les partenaires d'interactions de Cirhin, la méthode principale employée était la technique du double hybride chez la levure.

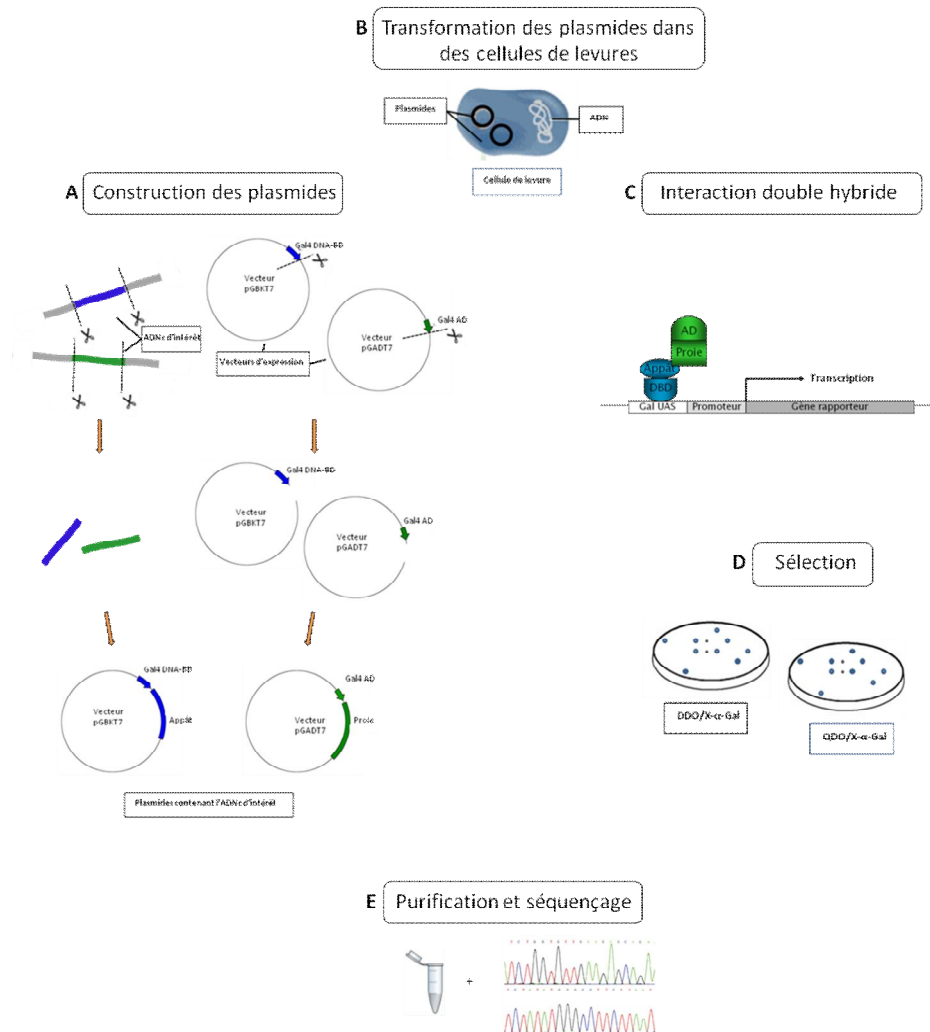


Figure 2.1. Représentation schématique de la stratégie générale pour l'identification et la caractérisation des partenaires d'interactions de Cirhin. A) Construction des plasmides. B) Transformation des plasmides dans les cellules de levures. C) Interaction double hybride. D) Sélection des cellules contenant des partenaires d'interactions. E) Purification et séquençage des plasmides.

2.2 Construction des plasmides : sous-clonage

Toutes les expériences effectuées nécessitaient l'utilisation de constructions d'ADN spécifiques, qui ont été fabriquées par le sous-clonage de l'ADNc désiré dans un vecteur d'expression.

2.2.1 Protocole

L'ADNc des protéines provenant de différentes sources, ainsi que les amorces et oligonucléotides employés pour les réactions PCR pour les sous-clonages sont listés dans le tableau suivant.

Tableau II. Liste des ADNc, vecteurs, amorces et oligonucléotides utilisés pour les sous-clonages.

ADNc	Vecteur
mCirhin	pYX-ASC
mNol11	pCMV-SPORT6 (Open Biosystem, MMM1013-7511379)
hNol11	pCMV-SPORT6 (Open Biosystem, MHS1010-9206064)
Nom de l'amorce	Séquence
T3	5' ATTAACCCTCACTAAAGGGA
T7	5' TAATACGACTCACTATAGGG
mSeq1	5' CGGATTCTCAGTCTCTGCTG
mSeq2	5' GCCTTCATGGAGAGAGTGG
mSeq3	5' ATACTTCCAGCCGCAGTCA
mNdeI-pGB5	5' GGAATTCCATATGGGTGAATTTAAGGTCCATCG
mXmaI-pGB3	5' TCCCCCGGGTTAAGTTCAAATTTCTTCTTTTG
Sfil-mN11	5'CCATTAGGCCATGGAGGCCGCAACCCTGGAAGAAGAATTCACG
mN11-Sm3	5' TCCCCCGGGTCAGAAGAGTTCCAGCACTTCG
HN11-Nd5	5' GGAATTCCATATGGCAGCGCTGGAGGAAG
HN11-Sm3	5' TCCCCCGGGTCAGAAGAGCTCCAGCACTT
Sfil-CtmN111	5' CCATTAGGCCATGGAGGCCCTGACATTCCTGAGTCCACCACC
Sfil-CtmN112	5' CCATTAGGCCATGGAGGCCCTGAAGATGGGAAGTGCAGTGAA
Sfil-CtmN113	5' CCATTAGGCCATGGAGGCCCTCCAACCGTGAGCCAGATTATG

Les séquences d'ADNc ont été vérifiées par séquençage à l'aide de la plateforme «*Applied Biosystem's 3730xl DNA Analyzer technology*», séquençage Sanger, au Centre d'Innovation Génome Québec, Université McGill, Montréal, Canada.

Les fragments d'ADNc ont été sous-clonés dans le vecteur d'expression pGBKT7 (Clontech, PT3248-5) ou pGADT7 (Clontech, PT3249-5).

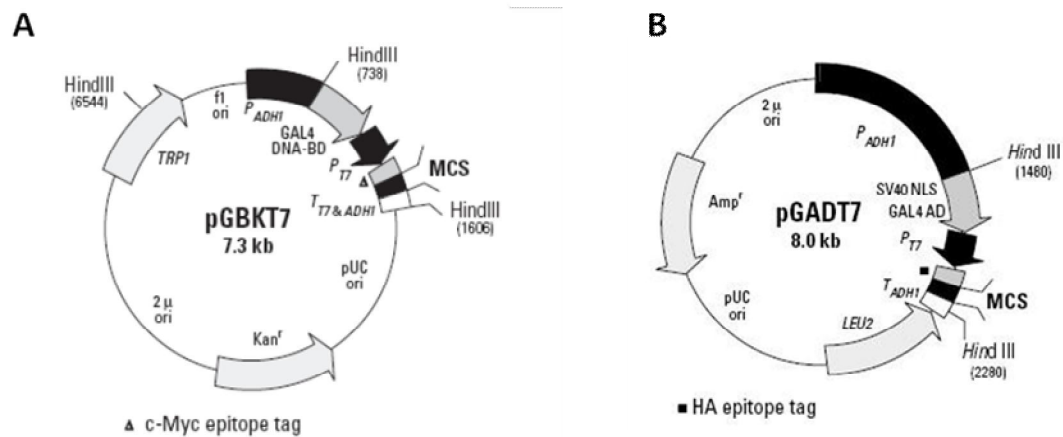


Figure 2.2. Cartes des vecteurs d'expression pGBKT7 et pGADT7. Se répliquent de façon autonome chez *E.coli* à partir de l'origine de réplication pUC. A) Le vecteur d'expression pGBKT7 porte le gène de résistance à la kanamycine pour la sélection chez *E.coli*. B) Le vecteur d'expression pGADT7 porte le gène de résistance à l'ampicilline pour la sélection chez *E.coli* (Clontech, PT3183-1).

Les fragments d'ADNc ainsi que les vecteurs ont été digérés par des endonucléases de restrictions spécifiques, soit par NdeI (NEB, R0111S) et/ou XmaI (NEB, R0180S) et/ou SfiI (NEB, R0123S) (voir sous-sections). Les fragments d'ADN et les vecteurs ont été migrés sur un gel d'agarose et purifiés à l'aide du «*QIAquick Gel Extraction Kit Protocol*» (QIAGEN, 28704). Les ligations ont été effectuées à l'aide de la T4 DNA Ligase (Invitrogen, 15224-017) pour des ratios vecteurs/fragments d'ADNc de 1 :3, 1 :4 et 1 :5. La quantité de vecteur était constante à 40ng, tandis que la quantité de fragment d'ADNc était calculée à partir de l'équation suivante :

$$\text{Quantité de fragment} = \text{Quantité de vecteur} \times (3, 4 \text{ ou } 5) \times \frac{\text{Longueur du fragment}}{\text{Longueur du vecteur}}$$

Les ligations étaient incubées à 14°C pour des périodes variées (voir plus bas) et transformées dans 50µl de cellules compétentes DH5α (Invitrogen, 18265-017). Les cellules d'*E.coli* étaient étalées sur des pétris de sélection contenant l'antibiotique kanamycine (BioShop, 25389-94-0) pour les constructions dans le vecteur pGBKT7, ou l'antibiotique ampicilline (BioShop, 69-52-3) pour les constructions dans le vecteur pGADT7. Chacune des colonies de cellules *E.coli* ont été inoculées à 37°C dans 5ml de milieu LB (BioShop, LBL407) contenant l'antibiotique approprié, pour un minimum de 16hrs. Les constructions d'ADN ont ensuite été purifiées par miniprep à l'aide du «*QIAprep Spin Miniprep Kit Using a Microcentrifuge*» (QIAGEN, 27106). Les constructions ont été vérifiées sur gel d'agarose et par séquençage à l'aide de la plateforme «*Applied Biosystem's 3730xl DNA Analyzer technology*», séquençage Sanger, au Centre d'Innovation Génome Québec, Université McGill, Montréal, Canada.

2.2.1.1 Sous-clonage des ADNc de Cirhin et R565WCirhin

L'ADNc complet de mCirhin était contenu dans le vecteur pYX-ASC résistant à l'ampicilline. La séquence du clone a d'abord été vérifiée à l'aide des amorces T3 et T7 complémentaires aux régions promotrices T3 et T7 contenues dans le vecteur pYX-ASC, ainsi qu'avec trois amorces complémentaires à des régions de l'ADNc de mCirhin, soit mSeq1, mSeq2 et mSeq3.

L'ADNc de mCirhin a ensuite été amplifié par PCR avec les amorces mNdeI-pGB5 et mXmaI-pGB3, à l'aide de l'ADN polymérase Herculase (Invitrogen) dans les conditions de PCR suivantes :

Segment	Phase	Nb. Cycles	Température	Temps
1	Dénaturation initiale de l'ADN	1	94°C	2 min.
2	Dénaturation	30	94°C	1 min.
	Hybridation des amorces		55°C	1 min.
	Élongation		72°C	2 min.
3	Élongation	1	72°C	10 min.

2.2.1.2 Sous-clonage des ADNc complets de Noll1

Les ADNc complets de Noll1 chez la souris (mNoll1) et chez l'humain (hNoll1) étaient contenus dans le vecteur pCMV-SPORT6 portant le gène de résistance à l'ampicilline, donc les clones ont été étalés sur pétris ampicilline. Une miniprep a été effectuée à l'aide du protocole «*Plasmid DNA Purification Using the QIAprep Spin Miniprep Kit and a Microcentrifuge*» (QIAGEN, 27106), et les ADNc ont été séquencés. Afin d'obtenir les ADNc à partir du vecteur pCMV-SPORT6, une réaction PCR a été effectuée avec les amorces SfiI-mN11 et mN11-Sm3 pour l'ADNc de la souris et les amorces HN11-Nd5 et HN11-Sm3 pour l'ADNc humain, dans les conditions suivantes :

Segment	Phase	Nb. Cycles	Température	Temps
1	Dénaturation initiale de l'ADN	1	94°C	2 min.
2	Dénaturation	30	94°C	1 min.
	Hybridation des amorces		55°C	1 min.
	Élongation		72°C	2 min.
3	Élongation	1	72°C	10 min.

mNoll1 a été digéré par les enzymes de restriction SfiI et XmaI tandis hNoll1 a été digéré avec les enzymes de restriction NdeI et XmaI. Les ADNc ont par la suite été sous-clonés dans le vecteur d'expression pGADT7, digéré en conséquence des ADNc.

2.2.1.3 Sous-clonage des fragments C-terminaux de mNol1

Afin de déterminer la séquence la plus courte de mNol1 interagissant avec mCirhin, 3 fragments de l'ADNc de mNol1 ont été générés. L'ADNc identifié lors du criblage de la librairie d'ADNc provenant d'embryons de souris de 11 jours contenu dans le vecteur pGADT7 a été tronqué pour former les fragments mNol1 C-term⁴⁹¹⁻⁷²³, mNol1 C-term⁵⁵⁰⁻⁷²³ et mNol1 C-term⁶⁴⁴⁻⁷²³, correspondant aux séquences présentées à la figure 2.3 B.

A

MATLEEEFTLSTGVLGAGPEGFLGVEQTDKADQFLVTDSGRTVVLYKVSQKPLGSWSVKQGQSITCPAV
 CNFQTGEYIMVHDHKVLRWIWNDDVNVKVKATLSAEVHRIHSVQRTEPLVLFRRGGAARGLEALLVEPQ
 QNIESVPIDEEVIVWSEVFMLFKQPVLI FITENHGHHYAYVRLCKSHSLSKYTLLEKEEKSVKPNFTAR
 VDGKFISLVSLSSDGC IYETLPIYSSDTEQNQRLVRLMLKSVVSGGVRNGVALTILDQDHI AVLGPPL
 SASKECLSIWNIKFQTLQTSKELPQGTSGQLWYHGEVLFMLHGKSLTVIPYKCEESSLAGALGKHKHTQE
 SGTHSVPHFVNWETCSGYELGSSGAEQSRTLRRKKVETNLQPEVPGFKQLLSIIKKDSEKHIEVELRKFL
 AKSTPAFHTIIIGDLVAGLVGRCKAEPSTFYPRNCLTQLIQTHVLSYSLCPDLMEIALEHTDVQMLQLCLQQ
Fragment 1 **Fragment 2**
FPDIPESTTCACLKLFLSVGDDCLRDSNINMESVFDYSDSTQDEKKEMEEQIEIVQNGFGPEDGNCSEDS
QQLNDKPADTAHEPGSFVPTSCPVAPKRAALLNAVLHSAYSEPFLPHLKDIPAKHVTLFLQYLYFLYLLK
Fragment 3
CTGSATMTLPGVNPPTVSQIMDWICLLLDANFTVLLMIPEAKRLLLILYNFVKSQISIIYSELNKAIVSFR
ELQRLNREKSSRGLYSIEVLELF

B

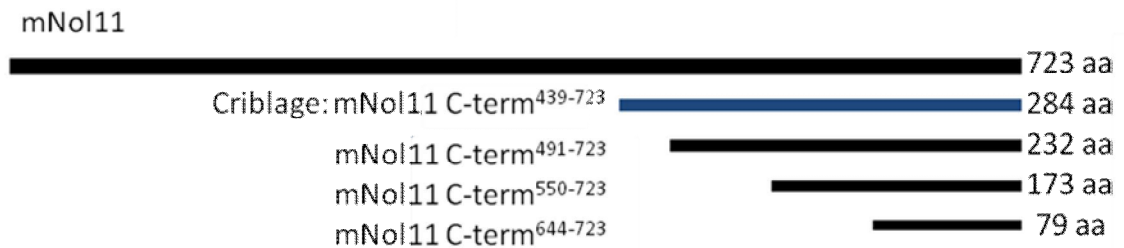


Figure 2.3. Séquence de mNol1. A) Séquence complète de mNol1 (RefSeq : NCBI Reference Sequence: NP_598463.2). B) Représentation schématique de la séquence complète de mNol1 et les fragments C-terminaux générés par PCR.

La séquence a été tronquée entre les 3 hélices alpha formant la portion C-terminale de mNol1. Les troncations ont été effectuées par PCR à l'aide des amorces mN11-Sm3,

commune à toutes les réactions, SfiI-CtmN111 pour le fragment Noll1 C-term⁴⁹¹⁻⁷²³, SfiI-CtmN112 pour le fragment Noll1 C-term⁵⁵⁰⁻⁷²³ et SfiI-CtmN113 pour le fragment Noll1 C-term⁶⁴⁴⁻⁷²³. Les PCR ont été effectuées dans les conditions suivantes :

Segment	Phase	Nb. Cycles	Température	Temps
1	Dénaturation initiale de l'ADN	1	94°C	2 min.
2	Dénaturation	30	94°C	1 min.
	Hybridation des amorces		55°C	1 min.
	Élongation		72°C	2 min.
3	Élongation	1	72°C	10 min.

Les ADNc ont été digéré par les enzymes de restriction SfiI et XmaI et sous-cloné dans le vecteur d'expression pGADT7 digéré en conséquence.

2.3 Mutagenèse dirigée

Dans le but d'étudier l'effet de la mutation R565W sur les interactions de Cirhin avec ses partenaires, celle-ci a été introduite dans la séquence de Cirhin chez la souris, puisque les expériences sont basées sur les résultats obtenus d'un criblage dans une librairie d'ADNc de souris. Pour ce faire, un protocole de mutagenèse dirigée par PCR a été employé.

2.3.1 Mutagenèse dirigée par PCR

Cette méthode *in vitro* se fait en présence de l'ADNc mCirhin, dans lequel la mutation R565W doit être insérée, et d'oligonucléotides mutagènes de séquences connues. Cette technique permet la modification de bases spécifiques à une position donnée. De plus, la mutagenèse dirigée par PCR permet d'obtenir un rendement de 100% de mutants.

Cette méthode nécessite l'utilisation de 4 oligonucléotides :

1. mR565W5 : 5' CAGTATACAGAGTGGAGCTGGTCTCTCCAGAAGCAAGGA
2. mRW-Dxmu3L : 5' GCAAACCTGGCAGGCCCTGGCCCGGGTAAAGTTCCAAATTTCTTC
3. D-primer : 5' GCAAACCTGGCAGGCCCTGG
4. mNdeI-pGB5 : 5' GGAATTCCATATGGGTGAATTTAAGGTCCATCG

L'amorce mR565W5 contient la mutation R565W à introduire dans l'ADNc mCirhin, correspondant, chez la souris, à la mutation de 2 bases (CGC→TGG). Sa séquence est complémentaire à un des brins de l'ADNc mCirhin, au niveau de la région à muter. L'amorce mRW-Dxmu3L correspond en partie à l'extrémité 3' de l'ADNc mCirhin en plus de contenir 19 bases non complémentaires à la séquence d'ADNc mCirhin et la séquence de reconnaissance de l'endonucléase de restriction XmaI. L'amorce D-primer correspond aux 19 bases non complémentaires de mRW-Dxmu3L, tandis que mNdeI-pGB5 correspond à l'extrémité 5' de l'ADNc.

La réaction PCR initiale est effectuée à l'aide de l'ADN polymérase Herculase II en présence des amorces mR565W5 et mRW-Dxmu3L et de l'ADNc mCirhin.

Segment	Phase	Nb. Cycles	Température	Temps
1	Dénaturation initiale de l'ADN	1	95°C	2 min.
2	Dénaturation	35	95°C	45 sec.
	Hybridation des amorces		56°C	45 sec.
	Élongation		72°C	45 sec.
3	Élongation	1	72°C	10 min.

Cette réaction permet l'obtention d'un fragment d'environ 400bp contenant la mutation R565W. Ce fragment est purifié à l'aide du «*QIAquick PCR Purification Kit Protocol*» (QIAGEN, 28104) et sert d'amorce pour une réaction d'extension en présence de l'ADNc mCirhin, sous les conditions suivantes : 1 cycle d'1 min. à 95°C, 1 min. à 60°C et 10 min. à

72°C. Lors de cette réaction, le fragment contenant la mutation s'hybride à l'ADNc mCirhin sur son extrémité 3'. Il est ensuite allongé pour obtenir l'ADNc complet portant la mutation.

Une 2^e réaction PCR est alors effectuée avec les amorces mNdeI-pGB5 et D-primer, en présence du produit d'extension qui sert ici d'ADN cible.

Segment	Phase	Nb. Cycles	Température	Temps
1	Dénaturation initiale de l'ADN	1	95°C	3 min.
	Dénaturation		95°C	1 min.
2	Hybridation des amorces	35	60°C	1 min.
	Élongation		72°C	2 min. 30 sec.
3	Élongation	1	72°C	10 min.

Le produit PCR est séparé sur gel d'agarose et purifié à l'aide du «*QIAquick Gel Extraction Kit Protocol*» (QIAGEN, 28704). Il est ensuite digéré séquentiellement par les endonucléases de restriction NdeI et XmaI, migré sur gel d'agarose et purifié par le protocole mentionné. La ligation et la transformation ont ensuite été effectuées comme mentionné dans la **section 2.2.1**.

2.4 Système double hybride chez la levure

La technique de double hybride chez la levure permet l'identification de protéines interagissant *in vivo*. Le concept est fondé sur le caractère bipartite de plusieurs facteurs de transcription possédant deux domaines fonctionnels indépendant l'un de l'autre, soit le domaine de liaison à l'ADN (DBD) et le domaine d'activation (AD). Le domaine de liaison à l'ADN dirige le facteur de transcription sur une séquence spécifique d'ADN, tandis que le domaine d'activation amène l'ARN polymérase à déclencher la transcription à partir d'un site d'initiation voisin. Ces deux domaines doivent être associés afin d'agir comme facteur

de transcription des gènes cibles du DBD, qui sont des gènes rapporteurs introduits dans le chromosome de levure (Alberts *et al.*, 2004).

Cette technique requiert l'utilisation de deux plasmides distincts chez la levure, soit un plasmide codant pour une protéine hybride constituée d'un DBD fusionné à une protéine «appât» et un plasmide codant pour une protéine hybride contenant un AD fusionné à une protéine «proie» (Alberts *et al.*, 2004). Ces protéines de fusion sont exprimées dans deux souches de levures haploïdes différentes et produisant des phéromones distincts correspondant à des signes sexuels (MATa et MAT α). Les deux souches de levures sont ensuite accouplées dans le but de déterminer s'il y a interaction entre les protéines. L'accouplement se produit lorsque les deux souches de levures entrent en contact, résultant en une fusion des cellules haploïdes qui forment désormais une souche de levure diploïde a/a. À ce point, il est possible de déterminer s'il y a présence d'une interaction en mesurant l'activation du gène rapporteur (Van Criekinge et Bayaert, 1999).

Dans le cas du criblage effectué afin d'identifier des partenaires d'interaction de Cirhin, Cirhin servait de protéine «appât», tandis que les protéines «cibles» étaient contenues dans la librairie d'ADNc provenant d'embryons de souris de 11 jours (Clontech, 630478). Le plasmide pGBKT7 (Invitrogen, 630303) «appât» codait pour la protéine hybride Cirhin et le DBD de Gal4, et le plasmide pGADT7-Rec «cible» codait pour une protéine provenant de la librairie et l'AD de Gal4.

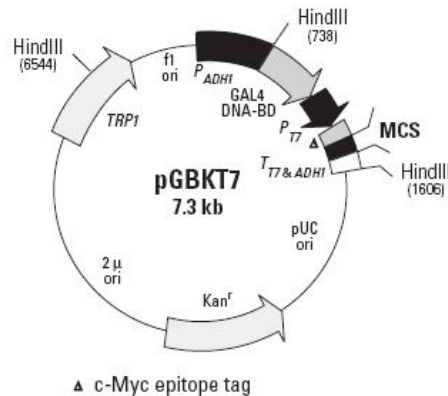


Figure 2.4. Carte du vecteur d'expression pGBKT7. Exprime des protéines fusionnées au domaine de liaison à l'ADN de Gal4. Chez la levure, les protéines de fusion sont exprimées à partir du promoteur constitutivement actif ADH1 (P_{ADH1}) et la transcription est terminée par les signaux de terminaison de transcription T7 et ADH1 ($T_{T7\&ADH1}$). Se réplique de façon autonome chez *E.coli* et *S.cerevisiae* à partir de l'origine de répllication pUC et 2μ ori respectivement. Porte le gène de résistance à la kanamycine pour la sélection chez *E.coli* et le marqueur nutritionnel TRP1 pour la sélection chez la levure (Clontech, PT3183-1).

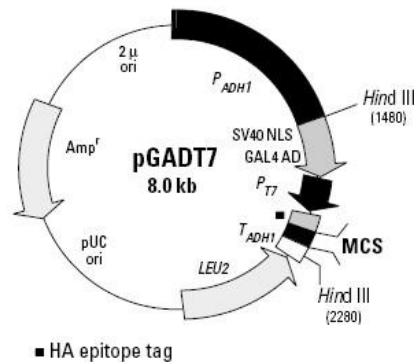


Figure 2.5. Carte du vecteur d'expression pGADT7. Vecteur d'expression chez la levure qui permet l'expression d'une protéine d'intérêt fusionnée au domaine d'activation de Gal4. La transcription des protéines de fusion est contrôlée par le promoteur constitutivement actif ADH1 (P_{ADH1}) e est terminée au signal de terminaison de la transcription ADH1 (T_{ADH1}). Se réplique de façon autonome chez *E.coli* et *S.cerevisiae* à partir de l'origine de répllication pUC et 2μ ori respectivement (Clontech, PT3183-1).

Le plasmide pGBKT7/Cirhin/Gal4-DBD a été transformé dans la souche de levure *Saccharomyces Cerevisiae* AH109, de type sexuel MATa.

La librairie d'ADNc était prétransformée dans la souche de levure *Saccharomyces Cerevisiae* Y187 de type sexuel MAT α , prête à être accouplée à une souche de levure MAT α Gal4, soit *Saccharomyces Cerevisiae* AH109.

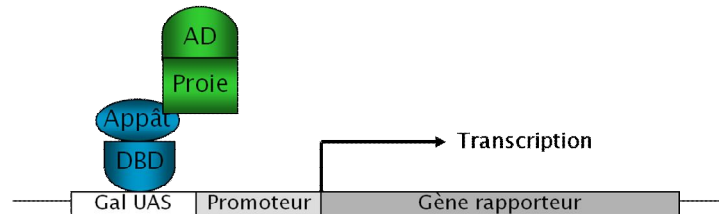


Figure 2.6. Principe du système double hybride. Le schéma a été tiré et modifié du manuel «*MatchmakerTM Pretransformed Libraries User Manual*» (Clontech, PT3183-1).

En réponse à une interaction double hybride, les domaines DBD et AD sont à proximité et la souche de levure AH109 exprime 4 gènes rapporteurs, soit *ADE2*, *HIS3*, *MEL1* et *LacZ*. Ces gènes rapporteurs sont sous le contrôle de séquences activatrices en amont (UAS : upstream activating sequence) et d'éléments cis-régulateur, boîtes TATA, distincts répondant tous au facteur de transcription Gal4.

Constructions Gènes rapporteurs souche AH109

GAL1 UAS	GAL1 TATA	<i>HIS3</i>
GAL2 UAS	GAL2 TATA	<i>ADE2</i>
MEL1 UAS	MEL1 TATA	<i>lacZ</i>
MEL1 UAS	MEL1 TATA	<i>MEL1</i>

Constructions Gènes rapporteur souche Y187

GAL1 UAS	GAL1 TATA	<i>lacZ</i>
MEL1 UAS	MEL1 TATA	<i>MEL1</i>

Figure 2.7. Constructions de gènes rapporteurs dans les souches de levure AH109 et Y187. Dans AH109, les gènes rapporteurs *HIS3*, *ADE2*, *LacZ* et *MEL1* sont sous le contrôle de séquences activatrices répondant à Gal4 et d'éléments promoteurs hétérologues : GAL1, GAL2 et MEL1 respectivement. Les sites de liaison dans les séquences activatrices sont différents, mais tous reliés à la séquence de reconnaissance de Gal4. Le schéma a été tiré et modifié du manuel «*MatchmakerTM Pretransformed Libraries User Manual*» (Clontech, PT3183-1).

Dans le cadre du criblage de la librairie d'ADNc provenant d'embryons de souris de 11 jours par système double hybride, l'activation des gènes rapporteurs mentionnés permet de vérifier le bon fonctionnement des transformations et la présence d'une interaction. Les cellules diploïdes contenant les 2 vecteurs pourront exprimer les gènes rapporteurs. Les gènes rapporteurs *HIS3* et *ADE2* sont des marqueurs nutritionnels chez la levure et encodent l'acide aminé histidine et adénine, respectivement. AH109 est incapable de synthétiser l'histidine et l'adénine, donc ne peut pas croître sur un milieu de culture carencé en ces deux acides aminés essentiels. L'interaction de la protéine «appât» et de la protéine «cible» active l'expression des gènes *HIS3* et *ADE2* et permet à la cellule de synthétiser l'histidine et l'adénine et de croître sur un milieu carencé en ces acides aminés.

L'expression des gènes rapporteurs *MEL1* et *LacZ* permet la détection visuelle des colonies de cellules de levure portant un couple d'interaction, en donnant un phénotype bleu à ces cellules. Le gène rapporteur *MEL1* encode l'enzyme de levure α -galactosidase, tandis que *LacZ* encode l'enzyme β -galactosidase d'*E.coli*, intégrée dans le chromosome de levure. Lorsqu'il y a interaction entre l'«appât» et la «cible», ces enzymes sont exprimées. L' α -galactosidase est alors sécrétée par les cellules de levure, qui deviennent bleues en présence du substrat X- α -Gal. L'enzyme β -galactosidase n'est cependant pas sécrétée par les cellules, qui doivent être lysées afin qu'un phénotype bleu puisse être détecté en présence d'X-gal. La présence de ces gènes rapporteurs est complémentaire, le résultat étant le même, mais le substrat et la méthode de détection étant différents.

Criblage

Le plasmide «appât» pGBKT7/mCirhin a été transformé dans la souche de levure AH109 en suivant le protocole de transformation (**Section XII.B**). Les expériences contrôles et les expériences d'autoactivation et de toxicité de la protéine mCirhin ont ensuite été effectuées tel qu'indiqué dans le protocole (**Sections VII et VIII**). Les expériences contrôles étaient concluantes et mCirhin n'avait aucune activité d'autoactivation et n'était pas toxique chez la levure AH109.

Le criblage de la librairie d'ADNc est ensuite effectué selon le protocole (**Section IX**). Une culture cellulaire concentrée du plasmide pGBKT7/mCirhin (appât) transformé dans la souche de levure AH109 (MATa) (**Section XII.B**) est mélangée avec 1ml de la librairie d'ADNc prétransformée dans la souche de levure Y187 (MAT α). Le mélange est incubé pour une période d'une nuit et le produit de transformation est étalé en échantillons de volume égaux sur des pétris contenant des milieux de culture appropriés permettant la sélection des cellules de levure diploïdes contenant des partenaires d'interaction.

Tableau III. Milieux de culture des levures et suppléments requis pour le criblage double hybride. Le tableau a été modifié et tiré du manuel «*MatchmakerTM Pretransformed Libraries User Manual*» (Clontech, PT3183-1).

Milieux de culture	Compagnie	No. Catalogue
Milieux riche		
YPDA	BD Biosciences	630409
YPD (Liquide)	BD Biosciences	630409
YPD (Agar)	BD Biosciences	630410
Milieux Minimum		
Milieu SD base minimum (Liquide)	Clontech	630411
Milieu SD base minimum (Agar)	Clontech	630412
Suppléments Dropout		
Supplément DO –Trp	Clontech	630413
Supplément DO –Leu	Clontech	8605-1
Supplément DO –Ura	BD Biosciences	630416
Supplément DO –Leu/–Trp	Clontech	630417
Supplément DO –His/ –Leu/ –Trp	Clontech	8610-1
Supplément DO –Ade/ –His/ –Leu/ –Trp	Clontech	630428

La culture de *S.cerevisiae* est effectuée dans le milieu SD contenant tous les éléments nutritifs requis pour la survie d'une cellule de levure. Des suppléments DO (Dropout) sont ajoutés au milieu afin de permettre une sélection des cellules de levures selon le plasmide et/ou les gènes rapporteurs activés.

Par exemple, le milieu SD/ –Leu/ –Trp (DDO) permet la sélection des cellules de levures contenant les plasmides «appât» et «cible», puisque ces plasmides encodent les gènes de biosynthèse du tryptophane et de la leucine, normalement absents des cellules de levures. Les cellules ayant incorporé les 2 plasmides auront la capacité de croître sur ce milieu.

Dans le cas du milieu SD/ –Ade/ –His/ –Leu/ –Trp (QDO), il permet la sélection des cellules de levures contenant les plasmides «appât» et «cible», mais sélectionne également pour l'activation des gènes *HIS3* et *ADE2* dépendants de Gal4. Les colonies qui croissent sur ce milieu contiennent les deux plasmides et expriment des protéines en interaction qui activent l'expression des gènes *HIS3* et *ADE2*.

L'ajout d'*X- α -Gal* à ces milieux permet la détection de l'activation du gène rapporteur *MEL1*, caractérisé par des colonies au phénotype bleu.

2.5 Identification des clones

Un grand nombre de colonies a été obtenu lors du criblage de la librairie d'ADNc provenant d'embryons de souris de 11 jours par la technique du double hybride. Afin de limiter le séquençage des ADNc, des PCR ont été effectuées dans le but d'éliminer les duplicatas d'ADNc.

2.5.1 Isolement des plasmides

Protocole

Les plasmides contenus dans les cellules de levures sont extraits à l'aide d'un protocole adapté des protocoles «*RNeasy Mini Protocol for Isolation of Total RNA from Yeast*»

(QIAGEN, 74104) et «*Plasmid DNA Purification Using the QIAprep Spin Miniprep Kit and a Microcentrifuge*» (QIAGEN, 27106).

Le protocole débute par les étapes 2 et 3 du protocole «*RNeasy Mini Protocol for Isolation of Total RNA from Yeast*», qui a été adapté pour cette expérience afin de digérer la paroi cellulaire des cellules par lyse enzymatique. Les cellules (2 ou 3 colonies) sont d'abord resuspendues dans 1ml de solution tampon Y1 (1M sorbitol, 0.1M EDTA, pH 7.4) contenant 50U de lyticase. Elles sont ensuite incubées à 37°C avec mouvement pour une période d'1 à 2 heures afin d'obtenir des sphéroplastes, qui sont ensuite culotés par centrifugation du mélange à 600g (7.5 rpm). Le surnageant est jeté. Le protocole «*Plasmid DNA Purification Using the QIAprep Spin Miniprep Kit and a Microcentrifuge*» est ensuite suivi à la lettre afin de purifier les plasmides.

2.5.2 PCR et séquençage

L'ADNc contenu dans les plasmides purifiés est séquencé à l'aide des amorces suivantes, à l'aide du service de séquençage du Centre d'innovation Génome Québec:

AD-3LD: 5' GTGAACTTGC GGGGTTTTTCAGTATCTACGATT
 AD-5LD: 5' CTATTCGATGATGAAGATACCCCAACCAACC

Les PCR ont été effectuées avec la Taq polymérase dans les conditions suivantes :

Segment	Phase	Nb. Cycles	Température	Temps
1	Dénaturation initiale de l'ADN	1	94°C	3 min.
	Dénaturation		94°C	45 sec.
2	Hybridation des amorces	30	55°C	45 sec.
	Élongation		72°C	3 min.
3	Élongation	1	72°C	10 min.

2.6 Identification des clones

Les séquences obtenues sont comparées à celles répertoriées dans la base de données NCBI-BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

2.7 Prolifération cellulaire

Protocoles

Les transfections sont effectuées à l'aide de «*Transfection of Adherent Cells with siRNA/miRNA (Traditional protocol)*», tiré de «*QIAGEN HiPerfect Transfection Reagent Handbook. 5e edition, May 2008*».

Analyse MTT: Protocole adapté

Réactifs

- siRNA: GeneSolution siRNA (QIAGEN, 1027416). Quantité 1nmol. Les siRNA ont été préparés selon le protocole fourni lors de la livraison afin d'obtenir une solution de concentration 10 μ M.
- MTT (Bromure de 3-(4, 5-diméthylthiazol-2-yl)-2, 5-diphényl tetrazolium) provient de Sigma (M2128). Le MTT est dissout dans du 1xPBS dans un bain d'eau à 60°C pour 1 minute et la solution est vortexée. La solution est stérilisée par filtration et incubée à 37°C pour 1 minute.
- Solvant isopropanol acidifié (1ml HCL dans 25ml d'isopropanol, ratio de 0.04)

Culture cellulaire et transfection des siRNA

Les cellules HeLa sont maintenues en culture dans du milieu Eagle's minimum essential complété avec 2mM de L-glutamine (Gibco BRL Canada), supplémenté avec FBS 10%, 0.1mM d'acides aminées non essentiels et 1.0mM de pyruvate de sodium, dans les conditions de culture normales à 37°C et 5% CO₂. 24h précédant la transfection, les cellules ont été ensemencées de manière à obtenir une densité de 5x10⁴ cellules par puits dans 500µl de milieu de culture, sur une plaque de 24 puits. 24h suivant la transfection des cellules, le milieu de culture dans lequel se trouve les cellules est remplacé par du milieu frais.

Les cellules doivent rester en culture pendant 48 heures avant d'être traitées par le MTT et analysées.

Les échantillons à transférer sont préparés en triplicata de la manière suivante:

Tableau IV. Préparation des échantillons pour l'analyse MTT.

Échantillons x 3	siRNA 10µM (µl)	HiPerfect (µl)	Media (µl)	Total (µl)
Contrôle HeLa	n/a	n/a	n/a	0
Contrôle HiPerfect	n/a	6	180	186
Contrôle siRNA	9	6	180	195
siRNA-No11 (25nM)	4.5	6	180	190.5
siRNA-No11 (50nM)	9	6	180	195

Les échantillons sont incubés pour une période de 10 à 15 minutes à température pièce (20-25°C) afin de permettre la formation des complexes de transfection. 60µl de solution de complexe est ensuite ajouté goutte à goutte sur les cellules, en triplicata. La plaque est légèrement remuée afin d'assurer la distribution uniforme des complexes. Les cellules et les complexes sont alors incubés sous des conditions normales de culture (voir ci-haut) pour une période de 48 heures. Le milieu de culture est changé pour du milieu frais aux 24h.

Transfection

La méthode d'introduction d'ADN et d'ARN dans les cellules de mammifères varie selon la lignée cellulaire utilisée et le type d'expérience effectuée. Plusieurs méthodes peuvent être employées, telle que les méthodes physiques (électroporation, micro-injection, choc thermique), les méthodes virales (rétrovirus, adénovirus, lentivirus) et les méthodes chimiques (liposomes, lipide non-liposomale, polyamines, dendrimères).

La méthode utilisée dans le cadre de cette expérience est une méthode chimique. L'HiPerfect est un mélange de lipides cationiques et de lipides neutres qui permettent une prise efficace des siRNA et le relâchement des siRNA dans la cellule. La membrane cellulaire sous forme de bicouche lipidique présente des régions hydrophobiques et hydrophiliques dans chaque molécule, ce qui permet la formation de liposomes sphériques sous conditions aqueuse. En présence de siRNA, les liposomes interagissent avec ces derniers et encapsulent les acides nucléiques, ce qui crée un système de livraison efficace des siRNA.

Analyse MTT

L'analyse MTT est un dosage colorimétrique permettant la quantification de la prolifération cellulaire, dépendant de la capacité des cellules viables à métaboliser un sel de tetrazolium MTT soluble en un produit formazan insoluble formant un précipité de couleur mauve (Twentyman et Luscombe, 1987).

Précédant l'analyse MTT, le milieu de culture est changé par du milieu frais et 50µl de solution MTT est ajouté dans chaque puits. Les cellules sont incubées pendant 3 heures ou jusqu'à ce que l'on puisse observer des cellules bleues et de la cristallisation. Le milieu est alors aspiré et 200µl de solvant isopropanol acidifié est ajouté dans chacun des puits afin de dissoudre les cellules. La plaque est ensuite placée sur un agitateur pour faciliter la dissolution.

3 RÉSULTATS

3.1 Criblage – Identification des ADNc

Une grande quantité de clones a été obtenue suite au criblage de la librairie d'ADNc d'embryons de souris de 11 jours. Des réactions PCR ont donc été effectuées afin de déterminer la présence de différents clones.

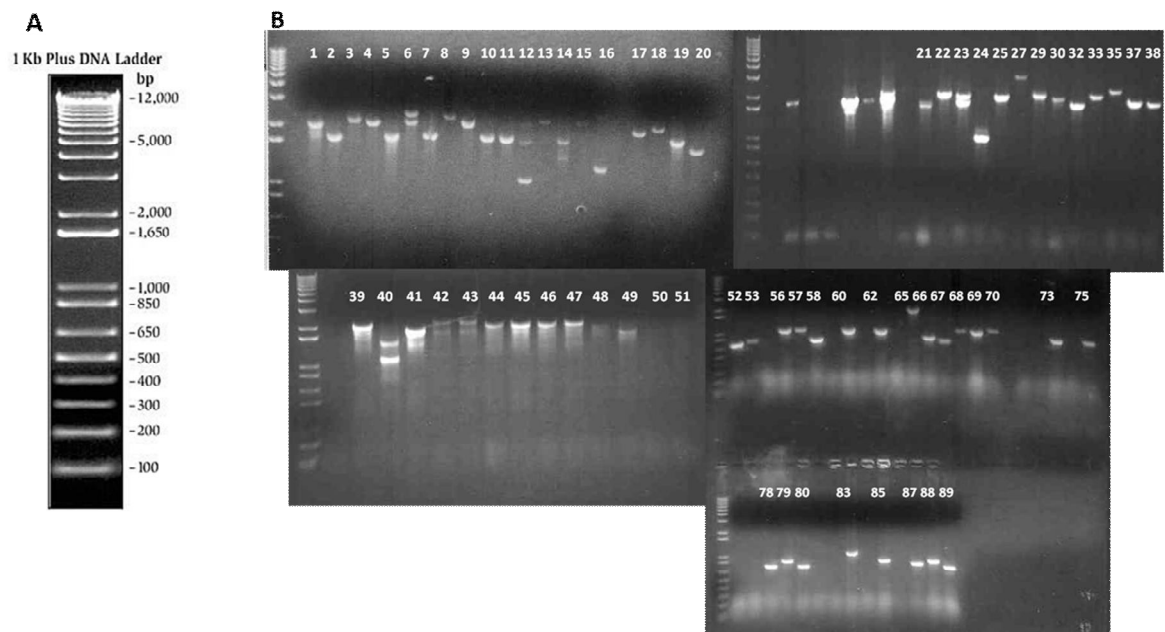


Figure 3.1. Gels d'agarose des plasmides obtenus suite au criblage de la librairie d'ADNc d'embryons de souris de 11 jours. A) Poids moléculaire «*TrackIt™ 1Kb Plus DNA Ladder*» (Invitrogen, 10488085). Permet de déterminer la taille de fragment d'ADN de 100bp à 12Kb. B) Les plasmides ont été purifiés par la méthode décrite à la **section 2.5.1** et migré sur gel d'agarose 0.8%.

Certaines colonnes des gels d'agarose présentent plus d'une bande et ceci est normal suivant la réaction PCR. Ceci indique la présence de plus d'un plasmide dans la cellule de levure, étant donné que les cellules de levures transformées peuvent intégrer plus d'une version d'un plasmide.

La plupart des bandes représentaient des plasmides de 1Kb, 1.65Kb ou 2Kb. Suite au séquençage de plusieurs plasmides de toutes les tailles (voir protocole), la protéine Noll1 a été identifiée comme étant un partenaire d'interaction potentiel de Cirhin chez la souris. Plus précisément, la portion C-terminale de Noll1 a été séquencée.

3.2 Interactions protéine-protéine

Afin de vérifier les interactions protéine-protéine, les plasmides sont co-transformés dans les cellules de levures Y2HGold. Les produits de transformation sont d'abord étalés sur le milieu de sélection DDO/X- α -Gal, qui, comme mentionné à la **section 2.4**, sélectionne les cellules de levures ayant intégré les deux plasmides en plus de sélectionner pour les protéines hybrides encodées par les plasmides, qui interagissent afin d'activer le gène rapporteur *MEL1*. Les interactions protéine-protéine sont ensuite confirmées en repiquant les colonies bleues présentes sur les pétris DDO/X- α -Gal sur des pétris au milieu de sélection plus rigoureux, soit QDO/X- α -Gal.

Afin de distinguer les cellules ayant un phénotype bleu authentique, il était recommandé de strier les cellules sur le milieu de culture de manière à obtenir des colonies uniques. Ceci a été fait en suivant le protocole «*MatchmakerTM Pretransformed Libraries User Manual*». Dans une région où les cellules sont concentrées, même les contrôles négatifs peuvent présenter un phénotype bleu, du à une haute concentration de cellules exprimant des niveaux résiduels de *MEL1*. Par contre, les colonies uniques des contrôles négatifs n'auront pas un phénotype bleu.

3.2.1 Interaction mCirhin/mNol11 C-terminal

Les résultats du criblage de la banque d'ADNc d'embryons de souris de 11 jours ont permis d'identifier que la portion C-terminale de Nol11 entrerait en interaction avec Cirhin, donc que Nol11 est un partenaire d'interaction potentiel de Cirhin. Afin de vérifier s'il s'agit d'une interaction directe, le plasmide contenant Nol11 a été isolé de la cellule de levure par le protocole mentionné à la section 2.4.1 et transformé dans des cellules compétentes DH5 α . Nol11 et Cirhin ont ensuite été co-transformés dans des cellules de levure Y2H Gold.

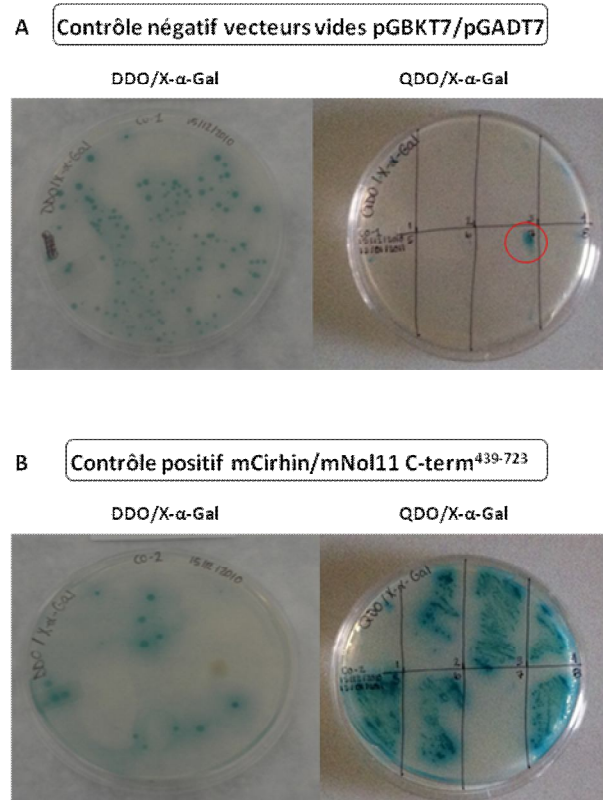


Figure 3.2. Interaction mCirhin/mNol11 C-terminal. A) Contrôle négatif : interaction des vecteurs vides pGBKT7 et pGADT7 sur pétris DDO/X- α -Gal et QDO/X- α -Gal. B) Contrôle positif et interaction mCirhin/mNol11 C-terminal sur pétris DDO/X- α -Gal et QDO/X- α -Gal.

Une tache bleue est observée sur le pétri QDO/X- α -Gal du contrôle négatif (cercle rouge), mais aucune colonie n'est observée plus bas dans la section, où les colonies uniques sont supposées se trouver, donc ce phénotype est normal pour un contrôle négatif.

Contrairement au contrôle négatif, plusieurs portions du pétri QDO/X- α -Gal, sur lequel ont été étalées les cellules co-transformées avec les plasmides contenant mCirhin (pGBKT7-mCirhin) et la portion C-terminale de mNol11 (pGADT7-mNol11), présentent des colonies uniques au phénotype bleu, indiquant une interaction.

La méthode utilisée pour étendre les colonies sur les pétris QDO/X- α -Gal était celle du protocole, les pétris provenaient tous du même lot, toutes les cellules ont été étendues la même journée et tous les pétris ont été incubés pour la même période de temps. Nous considérons donc que le contrôle négatif est valable et que le phénotype bleu des colonies sur QDO/X- α -Gal traduit la présence d'une interaction directe entre mCirhin et la portion C-terminale de mNol11 identifiée lors du criblage.

3.2.2 Interaction Cirhin/Nol11 pleine longueur

Le fait que la portion C-terminale de mNol11 ait la capacité d'interagir avec mCirhin ne veut pas pour autant dire que l'ADNc complet de mNol11 a également la capacité d'interagir avec mCirhin. En effet, des sous-domaines d'ADNc ont la tendance à mieux interagir que l'ADNc complet dans le cas d'un criblage d'une librairie d'ADNc. Afin de vérifier si l'interaction de mCirhin et mNol11 a la capacité de se faire dans des conditions *in vivo*, c'est-à-dire en présence de mCirhin et mNol11 dans leur état tridimensionnelle, les plasmides pGBKT7-mCirhin et pGADT7-mNol11 pleine longueur ont été co-transformés dans les cellules de levure Y2H Gold. Nous avons également testé l'interaction entre hCirhin et hNol11. Les produits de transformation ont été étalés sur pétris DDO et des colonies ont été repiquées sur pétris DDO/X- α -Gal et QDO/X- α -Gal.

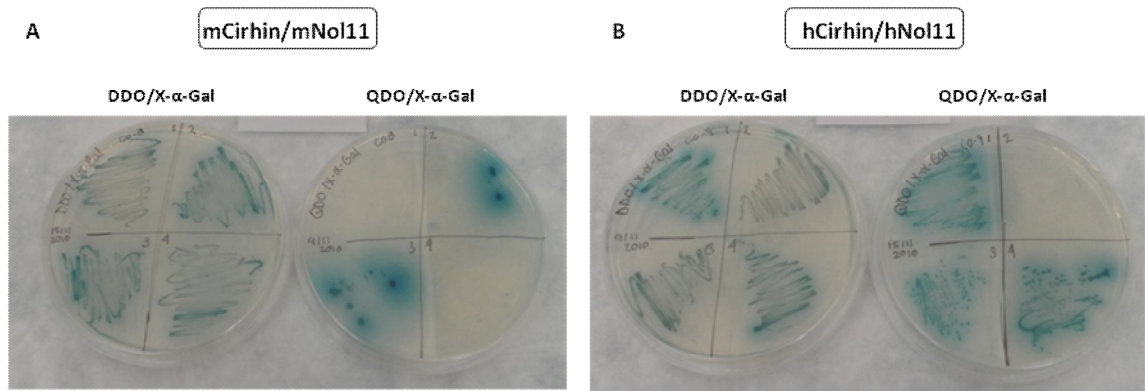


Figure 3.3. Interaction mCirhin/mNol11 et hCirhin/hNol11 pleine longueur. Les cellules transformées ont été étalées sur des pétris DDO, sur lesquels des colonies ont été sélectionnées pour être repiquées sur des pétris DDO/X- α -Gal et QDO/X- α -Gal.

Comme nous pouvons l'observer, des colonies bleues ont pu croître sur le pétri QDO/X- α -Gal, indiquant la présence d'une interaction entre l'ADNc de mCirhin et l'ADNc complet de mNol11.

3.2.3 Interaction R565WCirhin/Nol11 C-terminal et Nol11 pleine longueur (souris et humain)

Comme mentionné, l'interaction de Cirhin avec son partenaire d'interaction Cirip est affectée, mais non complètement perdue, par la mutation R565W responsable de la maladie. Afin de vérifier si l'interaction entre Cirhin et Nol11 est également affectée par cette mutation, les plasmides pGBKT7-mR565WCirhin et pGADT7-mNol11 C-terminal ont été co-transformés dans les cellules de levures Y2HGold. Les produits de transformation ont été étalés sur pétris DDO et des colonies ont été repiquées sur pétris DDO/X- α -Gal et QDO/X- α -Gal.

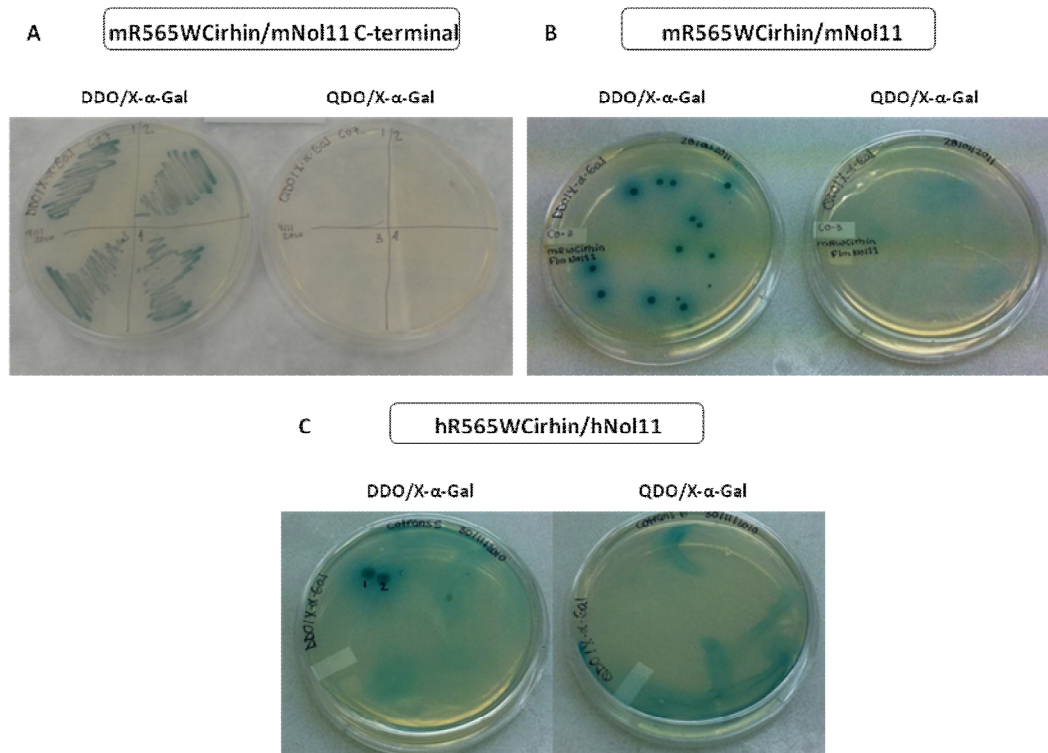


Figure 3.4. Interaction R565WCirhin/Nol11 C-terminal et Nol11 pleine longueur (souris et humain). Les cellules transformées ont été étalées sur des pétris DDO, sur lesquels des colonies ont été sélectionnées pour être repiquées sur des pétris DDO/X- α -Gal et QDO/X- α -Gal.

Aucune colonie n'a poussée sur pétri QDO/X- α -Gal pour les cellules co-transformées avec mCirhin et la portion C-terminale de mNol11 identifiée lors du criblage. Il n'y aurait donc pas d'interaction entre ces protéines, ce qui indique que la mutation R565W affecterait négativement l'interaction.

3.2.4 Étude de troncation de l'ADNc de mNol11

La plus courte séquence de mNol11 que nous avons identifiée interagissant avec mCirhin est la portion C-terminale formée des résidus 439 à 723, identifié par PCR et séquençage. Nous cherchons à déterminer quelle est la séquence la plus courte de mNol11 interagissant avec mCirhin. Pour ce faire, 3 fragments de la partie C-terminale de mNol11 ont été créés à partir de la portion C-terminale 439-723. Les fragments testés étaient :

Fragment 1 : mNol11 C-term⁴⁹¹⁻⁷²³

Fragment 2 : mNol11 C-term⁵⁵⁰⁻⁷²³

Fragment 3 : mNol11 C-term⁶⁴⁴⁻⁷²³

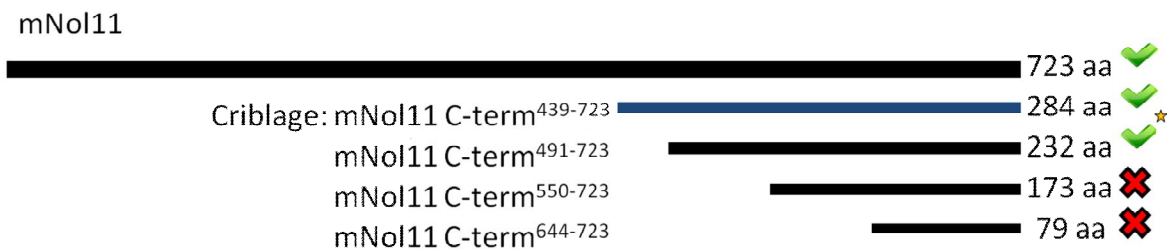


Figure 3.5. Représentation schématique des fragments C-terminaux testés pour leur interaction avec mCirhin. Les fragments marqués d'un crochet vert interagissent avec mCirhin. Le fragment identifié par PCR est de couleur bleu et le plus court fragment en interaction avec mCirhin est marqué d'une étoile. Les fragments marqués d'un X rouge n'interagissent pas avec mCirhin.

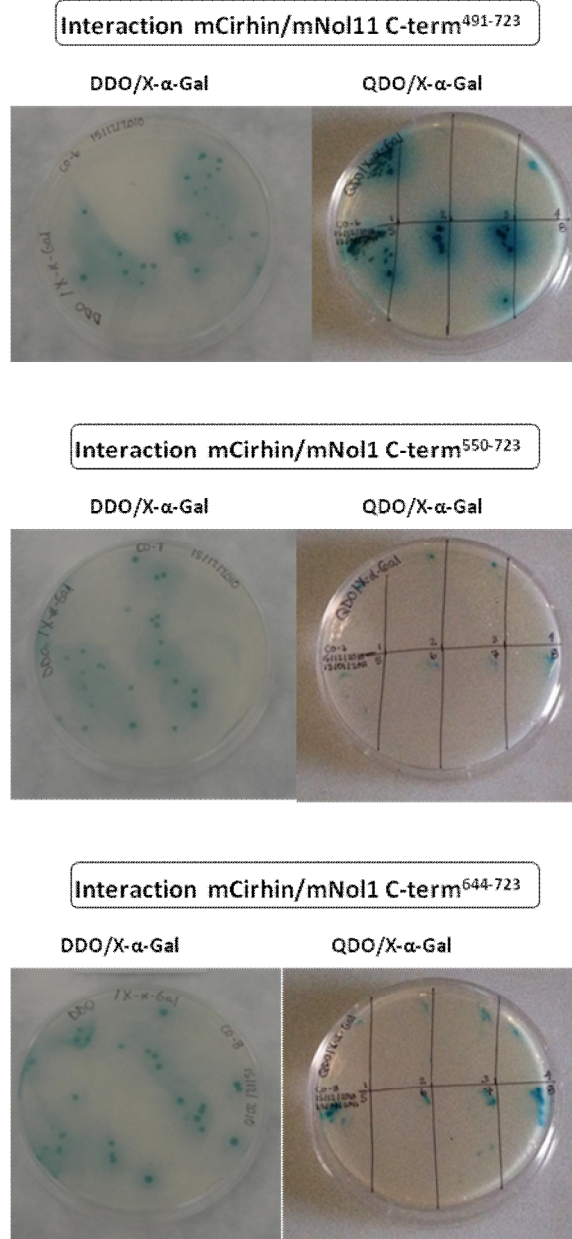


Figure 3.6. Interaction de mCirhin avec les fragments C-terminaux de mNol1. A) Interaction mCirhin/mNol1 C-term⁴⁹¹⁻⁷²³. B) Interaction mCirhin/mNol1 C-term⁵⁵⁰⁻⁷²³. C) Interaction mCirhin/mNol1 C-term⁶⁴⁴⁻⁷²³.

Les résultats attendus de cette expérience étaient soit que les fragments C-terminaux interagissent avec mCirhin de façon comparable ou plus faiblement que la portion C-terminale (439-723) de mNol1, ou bien qu'il n'y ait aucune d'interaction.

Dans le cas des pétris correspondants à l'interaction de mCirhin et du fragment mNol11 C-term⁴⁹¹⁻⁷²³, des colonies au phénotype bleu ont poussées sur DDO/X- α -Gal, ainsi que sur QDO/X- α -Gal, indiquant la réussite de la transformation et la présence d'une interaction, respectivement. Pour les pétris correspondants aux interactions de mCirhin avec les fragments mNol11 C-term⁵⁵⁰⁻⁷²³ et mNol11 C-term⁶⁴⁴⁻⁷²³, les transformations ont fonctionnées comme l'indique la présence de colonies bleues sur les pétris DDO/X- α -Gal, mais aucune colonie n'a poussée sur les pétris QDO/X- α -Gal, indiquant que mCirhin n'interagit pas avec les fragments C-terminaux mNol11 C-term⁵⁵⁰⁻⁷²³ et mNol11 C-term⁶⁴⁴⁻⁷²³. En effet, comme dans le cas du contrôle négatif (**Figure 3.2**), nous pouvons observer des taches bleues correspondant à un phénotype normal sur les pétris QDO/X- α -Gal.

Il y a présence d'une interaction entre mCirhin et la portion C-terminale de mNol11 (491-723), mais cette interaction ne semble pas être aussi forte que l'interaction entre mCirhin et la portion C-terminale (439-723). En effet, les pétris QDO/X- α -Gal de l'expérience ci-dessus ont été incubé à 30°C pour une période de 3 à 4 jours, sans que des colonies puissent être observées, contrairement au pétri QDO/X- α -Gal de l'interaction mCirhin-mNol11 C-term⁴³⁹⁻⁷²³ (**Figure 3.2**), servant de contrôle positif pour cette expérience, qui a été incubé à la même température pour la même période de temps. Les colonies observées pour l'interaction mCirhin/mNol11 C-term⁴⁹¹⁻⁷²³ sont apparues uniquement suite à l'incubation du pétri QDO/X- α -Gal à 4°C pour une période de quelques jours et ceci laisse présager que cette interaction est plus faible.

Cette expérience a été répétée 3 fois en suivant le même protocole et dans les mêmes conditions (temps du choc thermique, milieux de culture). De plus, les conditions des co-transformations des contrôles négatifs et positifs (**Figure 3.2**) étaient les mêmes puisqu'elles ont été effectuées dans la même expérience.

3.2.5 Interaction de hNol11 avec mutations autres que NAIC

Il a été prédit que d'autres résidus arginine de Cirhin pourraient participer à des interactions protéine-protéine, tels que R139 et R279 (non publié). Ces résidus ont donc été mutés afin de vérifier si Noll 1 interagit avec ces résidus de la protéine Cirhin.

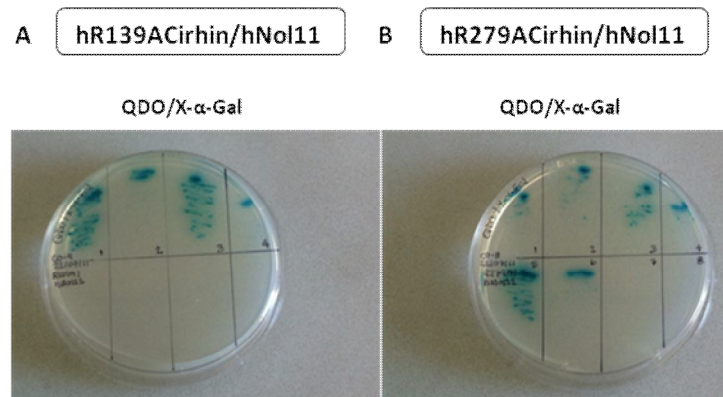


Figure 3.7. Interaction hR139ACirhin/hNol11 pleine longueur et hR279ACirhin/hNol11 pleine longueur. A) Interaction hR139ACirhin/hNol11 pleine longueur sur pétri QDO/X- α -Gal. B) Interaction hR279ACirhin/hNol11 pleine longueur sur pétri QDO/X- α -Gal.

Les cellules co-transformées ont d'abord été étalées sur un milieu nutritionnel DDO et ensuite des colonies ont été sélectionnées afin d'être repiquées sur un milieu sur pétri QDO/X- α -Gal. Pour les 2 co-transformations, nous observons des colonies uniques au phénotype bleu indiquant la présence d'une interaction, donc ces mutations n'ont probablement aucune conséquence sur l'interaction Cirhin/Nol11.

3.3 Effet de Nol11 sur la prolifération

Comme mentionné, il avait été montré que Cirhin et Cirip ont un effet positif sur la prolifération cellulaire (non publié). Nous avons répété cette expérience afin de déterminer si Nol11 a également un effet sur ce processus biologique. Nos résultats démontrent que Nol11 n'a aucun effet significatif sur la prolifération cellulaire.

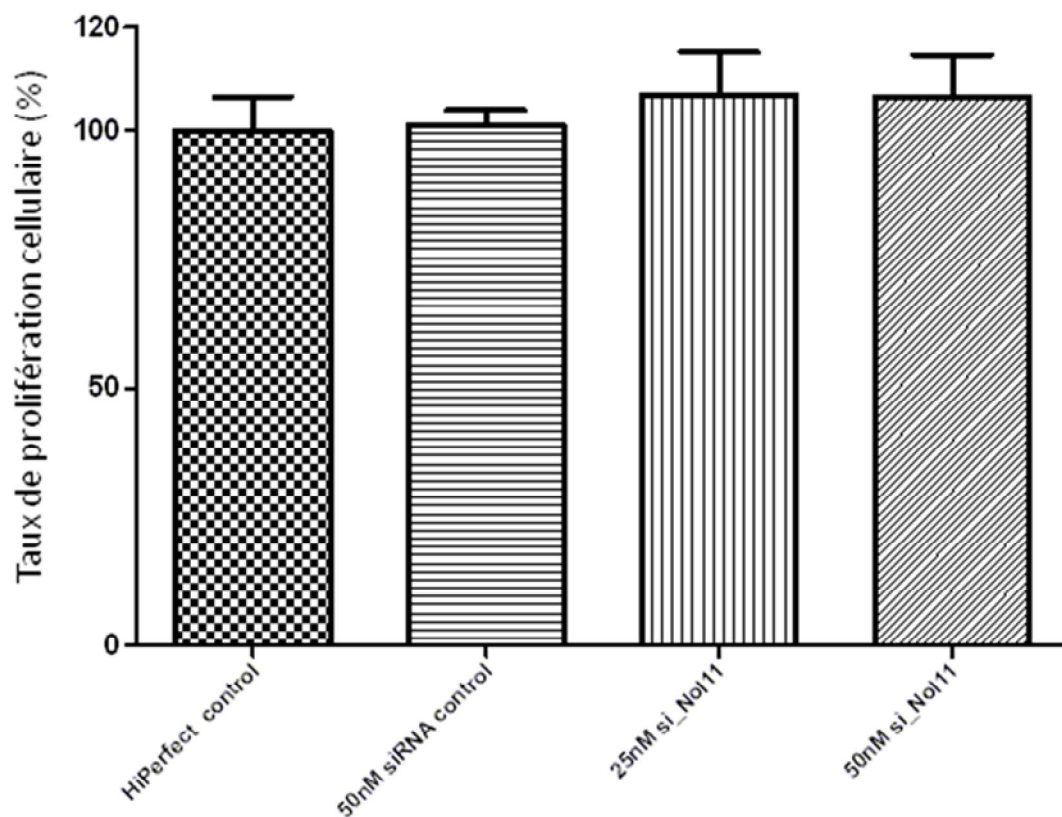


Figure 3.8. Effet des siARN contre Nol11 sur la prolifération des cellules HeLa. Mesure du taux de prolifération (%) des cellules HeLa transfectées avec 25nM et 50nM de siARN contre Nol11 à l'aide de l'HiPerfect. Aucun effet significatif n'est observé sur la prolifération cellulaire.

4 DISCUSSION

4.1 Identification de partenaires par la méthode du double hybride chez la levure

La protéine mutée responsable de la Cirrhose Amérindienne Infantile, Cirhin (R565WCirhin) a été identifiée, mais sa fonction ne peut être complètement résolue par l'analyse de sa séquence et de sa structure. Dans le cas où le séquençage d'un gène inconnu ne donne aucune information sur la fonction de la protéine encodée, il est nécessaire d'employer des méthodes alternatives afin de révéler cette dernière. Des stratégies seraient de modifier systématiquement le gène par recombinaison chez des microorganismes tel que *Saccharomyces cerevisiae*, ou d'effectuer des expériences d'interférence à l'ARN dans le nématode *Caenorhabditis elegans*. Dans le cadre de ce projet, nous avons opté pour la méthode du double hybride chez la levure étant donné que cette technique est bien maîtrisée dans le laboratoire, en plus que cette technique offrait plusieurs avantages.

Cette méthode permet l'identification de nouveaux partenaires d'interaction de Cirhin, une information importante étant donné qu'aucune protéine n'accomplit sa ou ses fonctions sans qu'elle n'interagisse avec d'autres biomolécules. En effet, les interactions protéine-protéine sont intrinsèques à quasiment tous les processus cellulaires. De plus, les interactions avec d'autres protéines sont d'une importance cruciale et peuvent servir d'indices pour la prédiction de la fonction d'une protéine. L'association physique entre une nouvelle protéine et une protéine bien caractérisée indiquent que la protéine inconnue a une fonction liée à celle de la protéine connue. L'analyse des interactions protéine-protéine est donc une partie intégrale de la génomique fonctionnelle.

La méthode du double hybride chez la levure est une des approches la mieux établie afin d'étudier les interactions, à un tel point qu'elle peut être employée à l'échelle du génome entier, comme l'ont démontré plus d'une équipe en examinant les interactions entre les milliers de protéines encodées dans le génome de *S. cerevisiae* (Ito *et al.*, 2011) . Le système double hybride se base sur l'activité transcriptionnelle comme mesure de l'interaction protéine-protéine. Il se base sur la nature modulaire de plusieurs activateurs

transcriptionnels, qui possèdent un domaine de liaison à l'ADN et un domaine d'activation transcriptionnel. Le domaine de liaison à l'ADN permet de cibler le domaine d'activation au gène spécifique qui sera exprimé, tandis que l'activateur recrute d'autres protéines de la machinerie de transcription afin de permettre la transcription (Phizicky et Fields, 1995).

4.2 Interaction Cirhin/Nol11

Lors du criblage de la librairie d'ADNc provenant d'embryons de souris de 11 jours, constituée de tous les ARN messagers (ARNm), sous forme d'ADN, contenus dans les tissus de l'embryon de souris de 11 jours, la protéine Nol11 a été identifiée comme étant un partenaire d'interaction potentiel de Cirhin.

4.2.1 Nol11

Nol11 est une protéine nucléolaire formée de 776 acides aminés et de masse moléculaire de 81.7kb. Le gène codant pour Nol11 possède le domaine NUC205 conservé à travers les espèces, telles que l'humain, l'orang-outan, la souris, l'espèce bovine et chez les drosophiles *melanogaster* et *pseudoobscura*. Ce domaine se situe à la position 200-243 chez toutes les espèces mentionnée, tandis qu'il se trouve à la position 97-140 chez les drosophiles. Malgré sa grande conservation, aucune interaction n'est connue à ce jour pour ce domaine (Staub *et al.*, 2004).

La fonction de Nol11 n'est pas complètement élucidée. Des expériences d'interférence à ARN chez la drosophile, effectuées par Sims *et al.*, 2009, identifient Nol11, CG9300 chez la drosophile, comme ayant un rôle dans la croissance cellulaire des cellules S2R+ de drosophile. Tous les gènes identifiés dans ces expériences sont conservés entre la

drosophile et l'humain, donc cette présumée fonction pourrait être conservée chez les mammifères.

4.2.2 Pertinence biologique de l'interaction

Comme mentionné à la **section 4.3**, dans le cas où des partenaires d'interaction sont identifiés par le système double hybride, la pertinence de l'interaction doit être vérifiée. En analysant les profils d'expression de ces 2 protéines, on remarque qu'elles sont exprimées dans les mêmes types cellulaires (**Figure 4.1**), en plus du fait qu'elles soient les 2 nucléolaires. Ceci indique que l'interaction identifiée est pertinente et qu'il y a une possibilité qu'elle puisse se former *in vivo*. Cependant, le profil d'expression est une mesure indirecte pour les processus biologiques. Des informations plus détaillées seraient obtenues par l'analyse des protéines en tant que telles, qui contiennent plusieurs informations sur leurs fonctions biologiques (Phizicky et Fields, 1995).

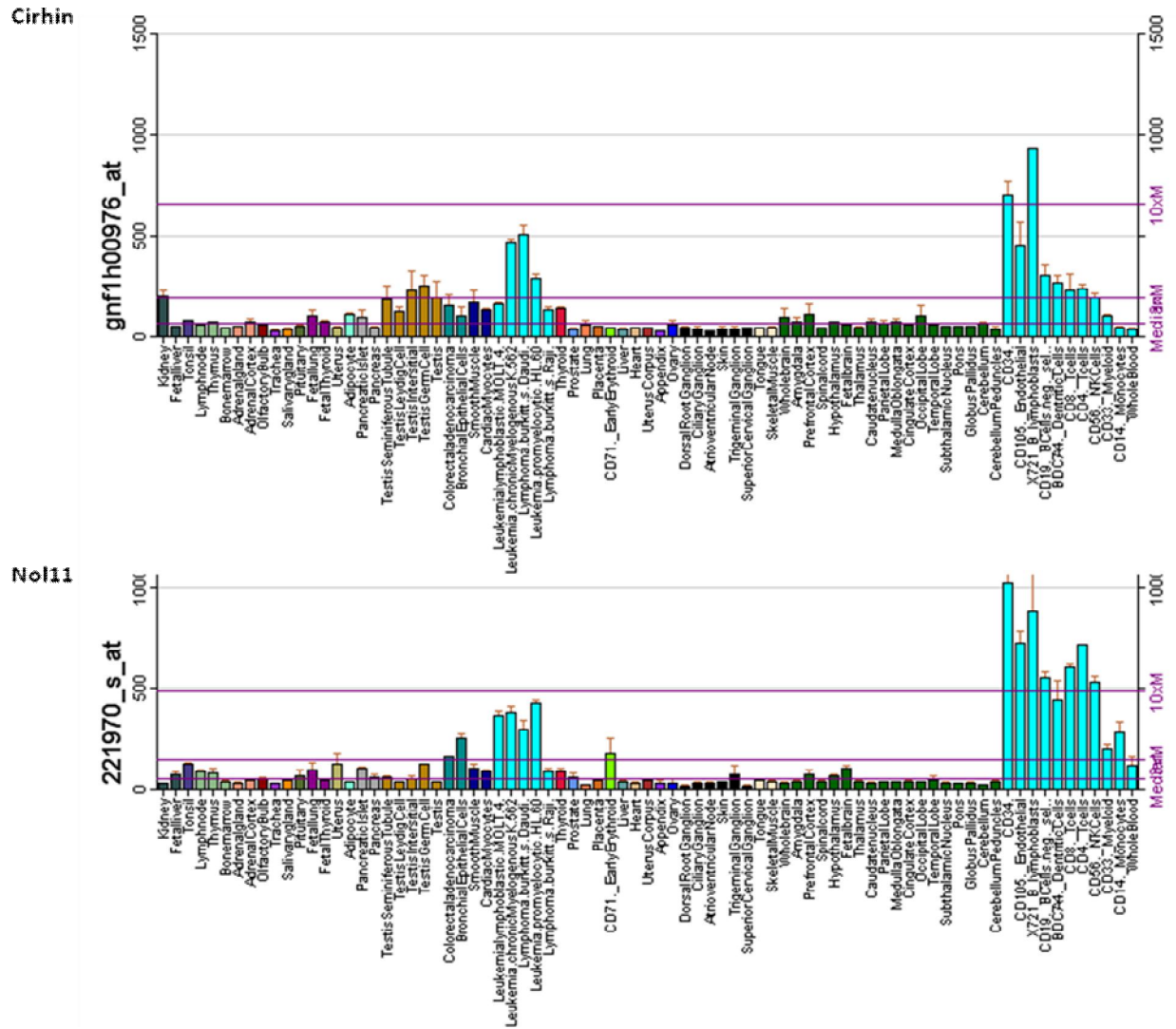


Figure 4.1. Profils d’expression des protéines Cirhin et Noll1. Générés par les bases de données bioGPS et Genecards.

4.2.3 Criblage

Une bonne représentation des ARNm est cruciale lors d’un criblage d’une librairie d’ADNc. Ceci implique que cette dernière contienne au moins une copie de chaque ARNm présent dans le tissu d’où proviennent ces messagers. La composition d’une librairie

d'ADNc est unique et difficile à prévoir, puisque les quantités relatives des différents messagers, ainsi que leur traductibilité, peuvent varier de manière considérable dépendant de la physiologie cellulaire, c'est-à-dire de la stimulation, de la prolifération, etc. De plus, les protéines ne sont naturellement pas représentées de manière égale, puisque la quantité d'ARNm codant pour des protéines différentes dans la cellule est variable. L'ARNm d'une protéine présente en très faible quantité, mais ayant une durée de vie très courte, va être plus représentée que l'ARNm codant pour une protéine abondante à très longue durée de vie. Pour complexifier la situation, il existe dans les cellules des ARNm qui ne sont jamais traduits en protéines.

Le criblage d'une librairie d'ADNc sélectionne les interactions optimales, cependant plusieurs ADNc qui seront isolés ne sont pas l'ADNc complet. Comme mentionné à la **section 3.2.2**, il a été montré que les clones contenant les sous-domaines ont la possibilité de mieux interagir que les clones contenant l'ADNc complet. Ceci serait dû à l'accessibilité de domaines fonctionnels dans les sous-domaines, qui sont rendus inaccessibles dans l'ADNc complet, puisque la protéine exprimée se replie dans la cellule. Contrairement à l'ADNc complet, les sous-domaines ne se replient pas, ou partiellement dans la cellule (Kaplan et Delpech, 1993; Van Crielinge et Beyaert, 1999). La taille des fragments amplifiés par PCR (**Figure 3.1**) variait entre 1 et presque 3kb, tandis que la protéine complète a une masse moléculaire de 81.7kb. Suite au séquençage de ces fragments, il a été confirmé qu'ils correspondaient tous à la partie C-terminale de Nol11. Nous avons donc refait les expériences d'interaction avec l'ADNc complet de Nol11 et déterminé que Cirhin peut également interagir avec Nol11 dans sa forme complète (**Figure 3.3**).

4.2.4 Étude détaillée de l'interaction Cirhin/Nol11

L'identification de Nol11 comme partenaire d'interaction potentiel de Cirhin suite à un criblage d'une librairie provenant d'embryons de souris de 11 jours, nous avons donc entrepris d'étudier en détails cette interaction chez la souris, mais également chez l'humain.

Dans le cas où une interaction est identifiée, des délétions peuvent être effectuées dans l'ADN codant pour un des partenaires d'interaction, afin d'identifier un domaine minimal nécessaire à cette interaction. Des mutations peuvent également être insérées afin d'identifier des résidus critiques pour l'interaction (Phizicky et Fields, 1995). C'est ce qui a été effectué dans l'expérience de troncation et dans l'expérience de mutagenèse, respectivement.

4.2.4.1 Interaction R565WCirhin/No111

Nous avons voulu déterminer si la mutation causant NAIC, R565W, a une conséquence positive, négative ou aucune conséquence sur l'interaction Cirhin/No111, afin de comparer les effets avec ceux de la mutation sur l'interaction R565WCirhin/Cirip, qui est de plus faible intensité que l'interaction Cirhin/Cirip. Comme le démontre les résultats du double hybride, l'interaction entre les protéines No111 et Cirhin est perdue. Notre hypothèse est donc que No111 interagirait avec la portion C-terminale de Cirhin, puisque la mutation se trouve dans cette région.

Dans le cas de Cirip, la mutation fait en sorte que l'interaction entre les protéines Cirhin et Cirip est partielle, alors les résultats observés au cours de cette expérience supportent l'hypothèse que le résidu R565 est un membre du domaine d'interaction actif de Cirhin. De plus, la mutation R565W est observée chez tous les patients NAIC, faisant de R565 un résidu important pour la fonctionnalité de Cirhin (Yu *et al.*, 2009).

4.2.5 Étude de troncation

Dans une expérience de double hybride, plusieurs clones codent pour des régions qui se superposent, donc le domaine minimal pour l'interaction peut être déjà apparent à partir du criblage initial (Phizicky et Fields, 1995). C'est ce qui a été observé lors du criblage de la

librairie d'ADNc, comme nous avons pu l'observer suite à l'amplification des ADN des clones (**Figure 3.1**). La taille des fragments se situait entre 1kb et 3kb, donc le domaine minimal d'interaction serait d'environ 1kb. Nous avons voulu identifier la séquence minimale exacte permettant l'interaction entre Cirhin et Noll1.

Étant donné que nos résultats suggèrent que Noll1 interagit avec Cirhin, mais uniquement dans sa forme non mutée, nous avons voulu identifier les résidus d'acides aminés nécessaires à cette interaction spécifique, en effectuant une étude de troncation. La région mNoll1 C-term⁴³⁹⁻⁴⁹¹ ayant été identifiée lors du criblage (**Figure 3.5 A**), nous avons donc sélectionné cette séquence comme gabarit pour créer des fragments de la partie C-terminale. Cette région est constituée de trois hélices alpha et nous voulions déterminer si ces trois hélices ont un rôle dans l'interaction. Trois fragments ont été créés, soit les fragments mNoll1 C-term⁴⁹¹⁻⁷²³, mNoll1 C-term⁵⁵⁰⁻⁷²³ et mNoll1 C-term⁶⁴⁴⁻⁷²³ (**Figure 3.5 B**).

Les résultats des expériences de double hybride effectuées chez la levure nous indiquent que la séquence la plus courte de Noll1 interagissant avec Cirhin serait la portion mNoll1 C-term⁴⁹¹⁻⁷²³ (**Figure 3.6 A**). Cependant, cette interaction ne serait pas aussi forte que l'interaction mCirhin/mNoll1 C-term⁴³⁹⁻⁷²³, et ce basé sur le temps requis avant l'apparition de colonies sur les pétris. Il semble que les résidus 491-723 soit suffisants pour l'interaction mCirhin/mNoll1, mais qu'il y aurait un ou plusieurs résidus dans la région mNoll1 C-term⁴³⁹⁻⁴⁹¹ ayant un rôle dans cette interaction et une certaine importance afin de faciliter l'interaction. Par contre, nos résultats ne nous permettent pas de déterminer si des résidus de la portion N-terminale de Noll1 sont également nécessaires pour l'interaction avec Cirhin, malgré le fait que parmi les clones de Noll1 séquencés, aucun ne correspondaient à la partie N-terminale.

4.2.6 Interaction R139ACirhin et R279ACirhin/No11

Comme mentionné, il a été prédit que l'arginine 565 fait partie du domaine d'interaction actif de la protéine Cirhin. Il est également possible que la surface d'interaction soit en fait plus large et que plus de résidus de surface soient impliqués dans l'interaction de Cirhin avec ses partenaires. Il a été prédit que les résidus R139 et R279, des résidus de surface se trouvant entre les boucles des dites répétitions WD40, fassent partie de ce domaine d'interaction (Dr. M. Grynberg, communication personnelle). Ceci a été vérifié dans le cas de l'interaction Cirhin/Cirip en utilisant la même stratégie de mutagenèse dirigée employée pour introduire la mutation R565W. Les mutations R139A et R279A ont été introduites dans la séquence de Cirhin et des expériences de double hybride chez la levure ont permis de déterminer que la mutation R139A abolissait complètement l'interaction Cirhin/Cirip, tandis que la mutation R279A diminuait l'interaction de manière similaire à la mutation R565W, comme mentionné précédemment (Yu *et al.*, 2009).

Selon les résultats obtenus, il est possible que No11 n'interagissent pas avec les arginines 139 et 279, puisque la mutation de ces résidus n'a pas affecté l'interaction Cirhin/No11 (**Figure 3.7**). Il est également possible que No11 ait une certaine interaction avec ces résidus, mais de moins forte intensité qu'avec R565, puisque R565 n'a pas été muté dans ces plasmides. Afin de vérifier ceci, il aurait fallu introduire la mutation R565W dans ces plasmides et ainsi observer l'effet individuel de R139 et R279. Dans une expérience où les résidus R139 et R279 auraient été mutés, mais où le résidu R565 est intact, nous aurions pu déterminer si R139 et R279 ont un effet combiné sur l'interaction Cirhin/No11. Cependant, cette expérience n'a pas été réalisée.

En résumé, les expériences de double hybride chez la levure permettent d'émettre l'hypothèse que la portion mNo11 C-term⁴⁹¹⁻⁷²³ est suffisante pour l'interaction Cirhin/No11, mais que cette interaction n'est pas optimale. Des résidus dans la région mNo11 C-term⁴³⁹⁻⁴⁹¹ seraient également importants afin de faciliter l'interaction. Nous croyons que la portion C-terminale de Cirhin interagisse avec la portion C-terminale de

Nol11, puisque la mutation R565W fait en sorte que l'interaction entre ces deux protéines est perdue. De plus, nos résultats des interactions de R139ACirhin et R279ACirhin avec Nol11 montrent que ces mutations individuelles n'ont aucun effet sur l'interaction, puisque les cellules co-transformées ont pu croître et ont un phénotype bleu sur le milieu de sélection QDO/X- α -Gal.

4.2.7 Interaction Cirhin/Nol11 – Double hybride système chez les mammifères

Comme mentionné dans l'introduction, nous voulions vérifier l'interaction Cirhin/Nol11 et R565WCirhin/Nol11 dans un système double hybride chez les mammifères, donc dans un système dérivé d'un eucaryote plus complexe que la levure, afin de venir supporter nos résultats d'interaction. Nous avons co-transfecté ces protéines dans des cellules HeLa et HepG2, mais aucune interaction n'a été observée entre Cirhin et Nol11, même si toute la machinerie cellulaire nécessaire est présente afin d'assurer un repliement correct des protéines, ainsi que les modifications post-traductionnelles. Ceci ne confirme pas que Cirhin et Nol11 n'interagissent pas dans un système plus complexe que la levure, car le système double hybride chez les mammifères est un système plus similaire à ce qui est retrouvé *in vivo*. Il est alors possible que Cirhin exogène (transfectée) interagisse avec Nol11 endogène, qui peut être présente dans une concentration plus élevée que Nol11 exogène. Pour palier à cette probable concentration élevée de Nol11, nous avons varié les concentrations de Cirhin et Nol11 exogène que nous avons transfectées (non montré). Encore une fois, aucune interaction n'a été observée. Une autre hypothèse expliquant l'absence d'interaction était que Cirhin interagisse avec d'autres protéines présentes dans les cellules de mammifères mentionnées. L'expression de Cirhin et de Nol11 n'ont pas été vérifiées dans les cellules HeLa. Un western blot aurait du être effectué afin de confirmer que les résultats obtenus étaient bien expliqués par une de ces hypothèses, et non dus à une absence d'expression de ces protéines dans ces lignées cellulaires.

4.3 Avantages et inconvénients de la méthode du double hybride

La méthode du double hybride est une méthode *in vivo* bien établie et avantageuse pour les études d'interactions. Elle comporte plusieurs avantages, comme le fait d'être une technique très sensible permettant l'identification d'interactions faibles ou transitoires, par l'utilisation d'un gène indicateur permettant une amplification du signal de réponse. L'utilisation de la levure comme cellule hôte offre également l'avantage de fournir des caractéristiques des eucaryotes dans les expériences, puisque les interactions sont détectées dans l'environnement naturel de la cellule. De plus, comparativement à d'autres techniques où des quantités importantes de protéines purifiées sont requises, et à des techniques demandant l'utilisation d'anticorps de bonne qualité, le matériel requis pour effectuer un criblage est minime. En effet, aucune purification n'est nécessaire et uniquement l'ADNc du gène d'intérêt, complet ou en partie, est requis (Phizicky et Fields, 1995; Van Criekinge et Beyaert, 1999). Le protocole «*MatchmakerTM Pretransformed Libraries User Manual*», utilisé pour l'identification de partenaires d'interaction de Cirhin dans le cadre de notre expérience, possède des avantages supplémentaires. La souche de levure AH109 exprime 4 gènes rapporteurs sous le contrôle de 3 UAS distincts (**Figure 2.7**), en plus d'avoir plusieurs étapes de criblage dans des conditions stringentes, faisant en sorte que l'incidence de faux positifs est réduite à un minimum comparé à d'autres systèmes.

Cette technique comporte cependant quelques désavantages, dont le fait qu'elle ne peut être qu'utilisée uniquement pour l'identification de partenaires d'interaction de protéines pouvant se localiser au noyau, puisque les protéines doivent être exprimées par la levure afin d'entrer en interaction. Ce système n'est donc pas avantageux pour des protéines extracellulaires ou des protéines n'ayant pas de signaux de localisation assez puissants (Phizicky et Fields, 1995; Van Criekinge et Beyaert, 1999). Dans le cas de notre expérience, la protéine Cirhin est une protéine nucléolaire, donc le système double hybride est un système approprié pour l'identification de nouveaux partenaires d'interaction.

De plus, l'utilisation de la souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* comme hôte peut représenter un désavantage dans le système double hybride, en ce sens que la levure ne possède pas nécessairement toute la machinerie requise pour le bon repliement des protéines. La protéine doit avoir la capacité de se replier correctement afin d'exister comme une protéine stable dans les cellules de levures et l'interaction entre deux partenaires se produit uniquement si les deux protéines sont repliées adéquatement. Une modification de la conformation de la protéine peut altérer son fonctionnement, diminuer son activité et occasionner l'inaccessibilité de ses domaines de liaison. Donc, les interactions qui requièrent des modifications post-traductionnelles ne se produisant pas dans les cellules de levures ne seront pas détectées. Il reste que la levure est un système hétérologue et que ses caractéristiques propres peuvent faire en sorte que les transformations post-traductionnelles peuvent mener à des protéines différentes des protéines originales et ceci peut être un désavantage. Pour cette raison, il est possible que lors du criblage de la banque d'ADNc, certaines interactions n'ont pas pu être détectées étant donné le mauvais repliement de certaines protéines dans la souche de levure Y187 (Phizicky et Fields, 1995; Van Criekinge et Beyaert, 1999).

Dans le cas où des partenaires d'interaction sont identifiés par le système double hybride, la pertinence biologique de l'interaction doit être vérifiée. En effet, lors d'un criblage exhaustif, toutes les combinaisons possibles d'interaction protéine-protéine sont expérimentées, faisant en sorte que de faux partenaires d'interaction peuvent être identifiés. Le criblage se fait sous une contrainte de temps et d'espace, contrairement à *in vivo* où certaines protéines peuvent ne jamais se retrouver à proximité, soit parce qu'elles sont exprimées dans des types cellulaires différents, ou parce que leur localisation sous-cellulaire est différente. De plus, les protéines peuvent être exprimées à différents points lors de l'embryogenèse, ou à différents points lors du cycle cellulaire (Van Criekinge et Beyaert, 1999).

4.4 Étude d'interactions-Autres méthodes

Une seule méthode ne peut à elle seule prouver la présence d'une interaction. La technique du double hybride chez la levure est une méthode hautement qualitative et les interactions identifiées doivent être subséquemment confirmées par des approches biochimiques. Ces méthodes incluent des méthodes physiques telles que la chromatographie d'affinité par protéines et la co-immunoprécipitation, des méthodes basées sur des bibliothèques telles que le l'étiquetage des protéines, ainsi que des méthodes génétiques.

4.4.1 Méthodes physiques

Chromatographie d'affinité par protéines

La chromatographie d'affinité par protéines est une méthode par laquelle une protéine fixée de manière covalente à une matrice est utilisée pour la sélection des protéines d'intérêt (partenaires d'interaction), qui sont retenues sur la matrice, par l'entremise de la protéine qui y est fixée.

Co-immunoprécipitation

La méthode de co-immunoprécipitation est une méthode classique de détection d'interaction protéine-protéine, employée dans presque toutes les expériences d'interactions. C'est une technique par laquelle un lysat cellulaire ou un mélange de protéines est incubé avec un anticorps couplé à une résine. L'anticorps se lie à l'antigène de la protéine d'intérêt, sous forme d'un épitope tag ou GST par exemple. Cette solution est centrifugée, lavée et éluée afin d'obtenir la protéine d'intérêt liée à un ou des protéines d'interaction.

Cette méthode est intéressante étant donné qu'elle permet la détection d'interactions dans le contexte naturel de la cellule. Elle comporte plusieurs avantages, tels l'expression des protéines dans des cellules de mammifères possédant la machinerie nécessaire aux modifications post-traductionnelles, et le fait que les protéines se trouvent dans leur état naturel. Ceci fait en sorte que les interactions nécessitant une phosphorylation ou un autre type de modification sont évaluées d'une manière plus réaliste. De plus, les complexes élaborés dans la cellule sont déjà dans leur état naturel et peuvent être facilement co-précipités. De tels complexes peuvent être difficiles à assembler *in vitro*. Cette méthode a également l'avantage que l'antigène et les protéines d'interaction sont présents dans les mêmes concentrations relatives retrouvées dans la cellule, faisant en sorte que tous les effets artificiels de la surproduction des protéines sont évités (lysats bruts uniquement). Finalement, les résultats issus de cette technique ont une grande spécificité, puisque les interactions sont détectées malgré toutes les protéines compétitrices présentes dans le lysat brut.

Des désavantages sont également associés à cette méthode, dont le fait que les protéines qui co-précipitent n'interagissent pas nécessairement directement, mais font peut-être partie d'un complexe plus large. La méthode ne permet également pas de déterminer si l'interaction se produit à l'intérieur de la cellule, puisque les cellules sont lysées. De plus, la co-immunoprécipitation n'est pas la méthode la plus sensible pour la détection des interactions, puisque la concentration de l'antigène est plus basse que dans le cas de la chromatographie d'affinité par protéines, par exemple.

4.4.2 Méthodes basées sur des bibliothèques

Les méthodes basées sur des bibliothèques permettent de cribler une grande quantité de gènes ou de fragments de gènes, dont les produits peuvent interagir avec une protéine d'intérêt. Les interactions identifiées par l'entremise de ces méthodes doivent être vérifiées par des

méthodes biochimiques, donc celles-ci n'auraient pas pu confirmer l'interaction entre Cirhin et Noll1. Les résultats de ces méthodes auraient par contre pu venir soutenir l'hypothèse d'une interaction, ou bien aider à identifier d'autres partenaires d'interaction potentiels de Cirhin et/ou de Noll1.

Étiquetage des protéines

Une protéine étiquetée peut servir de sonde afin de cribler une librairie d'expression dans le but d'identifier des gènes codant des protéines interagissant avec cette sonde. Cette méthode est basée sur le fait qu'un anticorps peut être utilisé afin de cribler une librairie d'expression pour identifier un gène codant pour un antigène de protéine. Les interactions se forment sur une membrane de nitrocellulose, sur laquelle sont immobilisées des protéines provenant d'une librairie d'ADNc. La protéine étiquetée se fixe à une ou plusieurs de ces protéines et la ou les interactions sont détectées à l'aide d'un anticorps.

4.5 Noll1

4.5.1 Partenaires d'interaction de NOLL1

Quelques partenaires d'interaction de Noll1 ont été identifiés, tels que la protéine sérine/thréonine kinase MARK3 et le facteur de transcription c-Myc.

Selon la nature des ses partenaires, Noll1 serait impliqué dans un ou plusieurs processus cellulaires importants tels que la régulation du cycle cellulaire, la polarité cellulaire, la prolifération cellulaire ainsi que la différenciation cellulaire.

4.5.1.1 MARK3

Nol11 interagit avec MARK3, un membre de la famille des «Microtubule Affinity Regulating Kinase» (MARK)/Par-1 et est également connu sous les noms PAR-1a/p78/C-TAK1. L'interaction entre ces protéines a été identifiée par la méthode du double hybride chez *S.cerevisiae* (Stelzl *et al.*, 2005)

La famille de protéines sérine/thréonine kinases MARK phosphoryle les MAPs (Microtubule-associated proteins) et ont un rôle dans la polarité cellulaire, la stabilité des microtubules, la stabilité des protéines, la signalisation et le contrôle du cycle cellulaire. Les microtubules jouent également un rôle dans plusieurs processus cellulaires, tels que la régulation de la forme de la cellule, la polarité cellulaire durant la différenciation, la partition des chromosomes lors de la mitose et le transport intracellulaire. Les microtubules sont en instabilité dynamique, un état nécessaire à leur réarrangement lors de ces processus. Des facteurs cellulaires tels que les MAPs et les protéines filamenteuses sont fixés sur les microtubules et modulent cette instabilité dynamique en les stabilisant. Le niveau de phosphorylation des MAPs module leur capacité de stabilisation et c'est ici que la famille de protéines kinases MARK entre en jeu en phosphorylant les MAPs sur la séquence KXGS, causant le détachement des MAPs des microtubules (Drewes *et al.*, 1997).

MARK3/C-TAK1/p78 ont un rôle dans la localisation sous-cellulaire de leur substrat et ont tous le même mécanisme de régulation basé sur la phosphorylation de leur substrat, ce qui promeut la séquestration de la cible par la protéine 14-3-3.

C-TAK1

C-TAK1 joue un rôle dans la localisation sous-cellulaire de ses substrats, en phosphorylant un résidu sérine, permettant l'association de la protéine 14-3-3 sur les substrats et leur séquestration au cytoplasme.

C-TAK1 a un rôle dans la voie de signalisation Ras/MAPK, qui a un rôle critique dans la prolifération cellulaire et la différenciation dans plusieurs organismes multicellulaires. C-TAK1 phosphoryle la protéine KSR1, une protéine d'échafaudage localisée dans le cytoplasme, qui stimule l'assemblage du complexe multiprotéique de signalisation Ras/Raf-1/MEK/MAPK lorsqu'elle est transloquée à la membrane plasmique. La phosphorylation de KSR1 par C-TAK1 maintient KSR1 dans le cytosol et empêche sa translocation à la membrane plasmique, inhibant la voie Ras/MAPK. C-TAK1 est constitutivement associée à KSR1 dans les cellules quiescentes afin de maintenir la phosphorylation du résidu sérine (Müller *et al.*, 2001).

C-TAK1 a également un rôle dans la régulation du cycle cellulaire. C-TAK1 phosphoryle la protéine phosphatase Cdc25C, un régulateur clé du cycle cellulaire, qui régule la transition de la phase intermédiaire G₂ à la phase M du cycle cellulaire chez les humains. La phase G₂ est une phase intermédiaire du cycle cellulaire qui permet, entre autre, à la cellule de croître et à s'assurer que les conditions de son environnement sont propices à la mitose. La mitose est la phase lors de laquelle il y a ségrégation chromosomique et division cellulaire (Alberts *et al.*, 2004). Cette étape est régulée par Cdc2/cycline B, qui est inactif lors des autres phases du cycle. Le niveau d'expression de Cdc25C est constant au cours du cycle cellulaire, mais son activité est mesurable uniquement à l'étape de la mitose. Cdc25C déphosphoryle alors Cdc2, ce qui active Cdc2/cycline B et stimule la transition G₂ → M. C-TAK1 entre en jeu au cours de l'interphase où elle régule négativement l'interaction fonctionnelle entre Cdc25C et Cdc2/cycline B. Elle phosphoryle Cdc25C sur un résidu sérine, ce qui permet son association avec la protéine 14-3-3 et sa séquestration au cytoplasme, empêchant l'activation de Cdc2/cycline B (Donzelli et Draetta, 2003; Peng *et al.*, 1998).

Par-1a

Le gène PAR-1 a été identifié chez *C.elegans*. Chez *C.elegans* et la drosophile, PAR-1 est requis pour la polarité antérieure/postérieure au stade d'une cellule durant le

développement embryonnaire. Il permet la ségrégation asymétrique des déterminants de la lignée cellulaire (Sun *et al.*, 2001). La famille mammalienne Par-1 est composée de 4 membres (Par-1a, -b, -c et -d) (Watkins *et al.*, 2008).

Par-1 phosphoryle Dishevelled (Dsh), une protéine originalement identifiée chez la drosophile, qui, comme mentionné, a un rôle dans le contrôle de la polarité planaire de la cellule et un rôle dans la voie de signalisation Wnt/ β -caténine canonique. Comme mentionné, Dsh a un rôle dans la polarité cellulaire et JNK est un composant important de la voie.

Les voies Wnt/ β -caténine et JNK (polarité cellulaire), dépendent de Dsh pour leur fonction. Cependant, les domaines de Dsh requis sont différents. Dsh possède trois domaines, soit le domaine Dix en amino-terminal, le domaine PDZ au centre et le domaine DEP en carboxy-terminal. La voie Wnt/ β -caténine requiert les trois domaines, tandis que la polarité cellulaire requiert uniquement le domaine DEP.

4.5.1.2 MYC (c-Myc)

L'interaction entre Noll1 et MYC a été identifiée par spectrométrie de masse (Ewing *et al.*, 2007).

Comme mentionné à la **section 1.5.2.4**, le gène MYC code pour la phosphoprotéine nucléaire c-Myc, un facteur de transcription jouant un rôle critique dans la régulation de la croissance et de la prolifération cellulaire, dans la perte de la différenciation, dans l'apoptose, dans la régulation transcriptionnelle, dans la modification et le transport des protéines et également dans le contrôle du cycle cellulaire, du métabolisme et de la transduction du signal. Il joue ces rôles en régulant l'expression de gènes dans le développement et dans la tumorigenèse (Brown *et al.*, 2008; Reymann et Borlak, 2008).

4.5.1.2.1 c-Myc comme facteur de transcription de Noll1

Reymann et Borlak ont voulu élucider le réseau de régulation transcriptionnel de c-Myc, qui consiste en des mécanismes directs et indirects participants probablement dans le phénotype tumorigénique de c-Myc. Selon leurs résultats, la séquence promotrice de Noll1 contient la séquence de reconnaissance E(CG) et serait un gène directement régulé par c-Myc. Cependant, le processus biologique correspondant à cette régulation est inconnu. Le réseau de régulation transcriptionnel de c-Myc peut varier selon les tissus, donc les facteurs de transcription et la réponse biologique associée peuvent différer. Par contre, la présence de la séquence de reconnaissance de c-Myc dans le promoteur de Noll1 indique que l'interaction entre ces protéines est possible dans plusieurs tissus (Reymann et Borlak, 2008).

4.5.1.2.2 c-Myc dans la biogenèse des ribosomes

Un autre groupe, le groupe de Brown *et al.*, a émis l'hypothèse que la synthèse des ribosomes nécessite une grande coordination et que ce niveau de régulation serait contrôlé par une signature d'ADN hautement spécifique, un régulon. Ce régulon permettrait aux facteurs appropriés de réguler de manière coordonnée les gènes de la biogenèse des ribosomes. Par une approche multi-génomique, ils ont démontré qu'une grande majorité des gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes sont associés avec des promoteurs contenant la boîte E(GC), et ce dans tous les génomes holozoïques contenant c-Myc. La séquence E(CG) constituerait alors un régulon de la biogenèse des ribosomes exclusivement animal.

Tout comme le groupe de Reymann et Borlak, ils identifient Noll1 comme étant un gène contenant E(CG) dans sa séquence promotrice et comme mentionné, Noll1 est connu comme ayant un rôle dans la biogenèse des ribosomes. La grande conservation des fonctions des protéines associées à la biogenèse des ribosomes à travers les génomes

holozoïques fait en sorte qu'il est probable que les gènes identifiés chez *Drosophila Melanogaster* soient également régulés par ce régulon distinct chez d'autres espèces, malgré l'évolution des signatures régulatrices qui y sont associées.

Chez l'humain, l'interaction Noll1/c-Myc aurait un rôle dans la synthèse des ribosomes, donc Cirhin, également une protéine nucléolaire, serait peut-être impliquée dans cette fonction. En effet, comme mentionné dans la **figure 1.12**, il est prédit que le facteur de transcription c-Myc s'associe à la séquence promotrice de Cirhin, basé sur le fait que sa séquence de reconnaissance, E(CG), s'y retrouve. La mutation R565W dans Cirhin fait en sorte que l'interaction entre Cirhin et Noll1 est perdue, ce qui pourrait par le fait même modifier la fonction de Noll1 dans la synthèse des ribosomes. Le fait que Noll1 ait un rôle dans la biogenèse des ribosomes, que Noll1 interagissent avec Cirhin et que ces 2 protéines sont possiblement régulées par le facteur de transcription c-Myc, ayant également un rôle dans la biogenèse des ribosomes (Brown *et al.*, 2008), vient soutenir l'hypothèse de Freed et al. selon laquelle Cirhin aurait un rôle dans l'assemblage du pré-ribosome, donc dans la biogenèse des ribosomes (**Section 1.5.2.2**) (Freed *et al.*, 2010).

4.6 Rôle de Noll1 dans la prolifération cellulaire

Les résultats de l'expérience d'interférence à ARN montrent que Noll1 n'a aucun effet sur la prolifération cellulaire, contrairement à Cirhin et Cirip qui ont un effet positif sur la prolifération, tel que démontré par les expériences d'interférence à ARN effectuées dans notre laboratoire (non publié).

Ce résultat concorde avec les résultats de Sims *et al.*, qui montrent que Noll1 aurait un rôle dans la croissance cellulaire des cellules S2R+ de drosophiles, mais n'aurait aucun lien avec la voie de signalisation Ras/MAPK qui joue un rôle prédominant dans la prolifération cellulaire chez les cellules de mammifères.

Chez les mammifères, la prolifération cellulaire et la croissance cellulaire (accumulation de masse) sont régulées de manière indépendante, par des voies de signalisation distinctes. La voie Ras/MAPK joue un rôle dans la prolifération cellulaire, tandis que les voies de signalisation PI3K et Tor contrôlent la croissance cellulaire, par la promotion de la biogenèse des ribosomes et de la traduction des protéines. Cependant, ces deux processus ne sont pas indépendants l'un de l'autre. Afin que la taille des cellules soit stable au cours du développement du tissu, il doit y avoir une coordination entre la prolifération et le taux d'accumulation de masse. Ceci est réalisé par un croisement des voies de signalisation impliquées.

L'implication de Noll1 dans la croissance cellulaire est pertinente, puisque les voies de signalisation PI3K et Tor stimulent la biogenèse des ribosomes et la traduction des protéines. En effet, Noll1 est une protéine nucléolaire, le compartiment sous-cellulaire du noyau reconnu comme étant le site de biogenèse des sous-unités ribosomales 40S et 60S (Alberts *et al.*, 2004) et Noll1 est connu comme ayant un rôle dans ce processus cellulaire.

Nos résultats sont également soutenus par le fait que des changements dans la taille de la cellule peuvent également se produire lorsqu'il y a un délai dans la division cellulaire. En effet, Noll1 interagit avec MARK3/Par-1a/p78/C-TAK1, or C-TAK1, comme mentionné auparavant dans la **section 4.5.1**, phosphoryle la protéine phosphatase Cdc25C, qui va ensuite activer Cdc2/cycline B et promouvoir la transition $G_2 \rightarrow M$ du cycle cellulaire. Une modification dans la croissance cellulaire peut être observée lorsque le gène *Cdc25* est rendu silencieux. Cdc2/cycline B demeurent alors séquestrés dans le cytoplasme et la cellule croît sans jamais passer à l'étape de la division cellulaire (Sims *et al.*, 2009).

Noll1 interagit avec MARK3/C-TAK1 ayant un rôle dans la régulation du cycle cellulaire et qui peut intervenir dans la croissance cellulaire, mais Noll1 interagit également avec Cirhin, qui a un effet positif sur la prolifération cellulaire. Ces résultats opposés peuvent signifier que Noll1 joue un rôle dans le croisement des voies de signalisation régulant la prolifération cellulaire et la croissance cellulaire, en participant à la biogenèse des

ribosomes et en interagissant avec Cirhin, qui elle aussi aurait un rôle dans ce processus en plus d'entrer en interaction avec des protéines à l'extérieur du nucléole, telle que Cirip, afin de participer à la prolifération cellulaire et à d'autres processus biologiques. Une autre hypothèse pourrait être que les interactions Cirhin/Nol11 et Nol11/MARK3 ont deux rôles complètement opposés dans la cellule.

4.7 Perspectives

Nos résultats semblent indiquer que Cirhin et ses partenaires d'interactions seraient impliqués dans des processus cellulaires de bases tels que la croissance et la prolifération cellulaire, et dans la littérature, Cirhin et Nol11 seraient impliqués dans la biogenèse des ribosomes. La pathologie de NAIC impliquant les canaux biliaires intrahépatiques (van Mil *et al.*, 2005) serait donc relié à un processus de base dans le développement de ceux-ci. Ceci viendrait expliquer le fait que la maladie se manifeste avant la naissance, lors du développement de l'embryon.

Nous croyons qu'il serait intéressant de poursuivre l'étude du rôle de la protéine Nol11 dans le mécanisme d'action de la Cirrhose Amérindienne Infantile. Cirhin et Nol11 ont des caractéristiques communes telles que leur localisation cellulaire et leurs profils d'expression sont très similaires. Nos résultats suggèrent fortement une interaction directe entre Cirhin et Nol11, faisant en sorte qu'il est fort probable que ces protéines aient une fonction commune dans la cellule. De plus, les 2 protéines possèdent la séquence de reconnaissance de c-Myc dans leur promoteur. Plusieurs processus cellulaires sont contrôlés par ce facteur de transcription, mais la littérature portant sur ces 2 protéines nous poussent fortement vers un rôle de ces protéines dans la biogenèse des ribosomes et dans la prolifération cellulaire.

Il serait également intéressant d'identifier d'autres partenaires d'interaction faisant partie d'une des voies de signalisation impliquée dans la morphogénèse des canaux biliaires intrahépatiques, en plus d'aller étudier en détail les facteurs de transcription se liant à la région promotrice de Cirhin.

5 CONCLUSION

La Cirrhose Amérindienne Infantile est une forme de cholestase intrahépatique différente des autres formes de cholestases identifiées dans la littérature. La protéine, Cirhin, ainsi que la mutation responsable de cette maladie, R565W, avaient été identifiées, mais peu d'information était disponible pour caractériser la fonction de Cirhin. Des études d'interactions ont donc été effectuées afin d'identifier des partenaires d'interaction. La protéine Cirip a d'abord été identifiée et ensuite Noll1, les 2 protéines ayant été identifiées dans des expériences de double hybride chez la levure.

Dans le cadre de ce projet, un de nos objectifs était de confirmer l'interaction Cirhin/Noll1 chez la levure, ce qui a été fait. L'interaction a d'abord été confirmée chez la levure par le système double hybride, en co-transformant le plasmide contenant Cirhin et le plasmide contenant la séquence complète de Noll1. Afin de déterminer si l'interaction Cirhin/Noll1 était affectée par la mutation R565W, la même expérience a été répétée, mais en substituant Cirhin par R565WCirhin dans l'expérience de co-transformation. Cette expérience nous a permis de déterminer que la mutation R565W fait en sorte que l'interaction est complètement perdue entre Cirhin et Noll1. Ceci viendrait appuyer l'hypothèse que la mutation modifie la structure secondaire de Cirhin et aurait par le fait même des conséquences fonctionnelles.

Nous sommes ensuite allé explorer en détail l'interaction Cirhin/Noll1 par des expériences de troncation, afin de déterminer la séquence la plus courte de Noll1 interagissant avec Cirhin. Pour ce faire, 3 fragments de la partie C-terminale de Noll1 ont été créés à partir du plasmide, identifié par PCR suite au criblage. La même expérience de co-transformation a été effectuée et cette expérience nous a permis d'identifier la séquence Noll1 C-term⁴⁹¹⁻⁷²³ comme étant la plus courte séquence de Noll1 interagissant avec Cirhin, mais que cette interaction ne serait pas aussi forte que le fragment mNoll1 C-term⁴³⁹⁻⁷²³. Le fait de fractionner la partie C-terminale de Noll1 pourrait donc avoir un effet sur la fonctionnalité de la protéine.

Le criblage d'une librairie d'ADNc par la méthode du double hybride chez la levure permet de formuler de nouvelles hypothèses, mais celles-ci doivent être validées par d'autres techniques. Ceci n'a pas été fait dans le cadre de cette maîtrise, il s'ensuit donc que ces expériences

fournissent des résultats préliminaires à l'identification de la fonction de Cirhin et du mécanisme de la maladie de NAIC.

6 RÉFÉRENCES

- Alberts, B. et al. (2004). *Biologie Moléculaire de la Cellule*, 3^e éd. Paris : Médecine-Sciences Flammarion, 1463 p.
- Antoniou A, Raynaud P, Cordi S, Zong Y, Tronche F, Stanger BZ, Jacquemin P, Pierreux CE, Clotman F & Lemaigre FP (2009) Intrahepatic bile ducts develop according to a new mode of tubulogenesis regulated by the transcription factor SOX9. *Gastroenterology* **136**, 2325-2333.
- Balistreri WF (2002) Intrahepatic cholestasis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **35 Suppl 1**, S17-23.
- Betard C, Rasquin-Weber A, Brewer C, Drouin E, Clark S, Verner A, Darmond-Zwaig C, Fortin J, Mercier J, Chagnon P, Fujiwara TM, Morgan K, Richter A, Hudson TJ & Mitchell GA (2000) Localization of a recessive gene for North American Indian childhood cirrhosis to chromosome region 16q22-and identification of a shared haplotype. *Am J Hum Genet* **67**, 222-228.
- Beaudry, Jean-R. (1985). *Génétique Générale*, Canada: Décarie, éditeur inc., 501 p.
- Blackwood EM & Eisenman RN (1991) Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* **251**, 1211-1217.
- Boron, Walter F., **Boulpaep**, Emile L. (2005). *Medical Physiology*, Updated éd. U.S.A: Elsevier Inc., 1319 p.
- Broughton G, 2nd (1994) Chenodeoxycholate: the bile acid. The drug. a review. *American Journal of the Medical Sciences* **307**, 54-63.
- Brown SJ, Cole MD & Erives AJ (2008) Evolution of the holozoan ribosome biogenesis regulon. *BMC Genomics* **9**, 442.
- Carlton VE, Pawlikowska L & Bull LN (2004) Molecular basis of intrahepatic cholestasis. *Annals of Medicine* **36**, 606-617.
- Chagnon P, Michaud J, Mitchell G, Mercier J, Marion JF, Drouin E, Rasquin-Weber A, Hudson TJ & Richter A (2002) A missense mutation (R565W) in cirhin (FLJ14728) in North American Indian childhood cirrhosis. *Am J Hum Genet* **71**, 1443-1449.
- Clevers H (2006) Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* **127**, 469-480.
- Clotman F, Jacquemin P, Plumb-Rudewiez N, Pierreux CE, Van der Smissen P, Dietz HC, Courtoy PJ, Rousseau GG & Lemaigre FP (2005) Control of liver cell fate decision by a gradient of TGF beta signaling modulated by Onecut transcription factors. *Genes and Development* **19**, 1849-1854.
- Clotman F, Lannoy VJ, Reber M, Cereghini S, Cassiman D, Jacquemin P, Roskams T, Rousseau GG & Lemaigre FP (2002) The onecut transcription factor HNF6 is required for normal development of the biliary tract. *Development* **129**, 1819-1828.

- Coffinier C, Gresh L, Fiette L, Tronche F, Schutz G, Babinet C, Pontoglio M, Yaniv M & Barra J (2002) Bile system morphogenesis defects and liver dysfunction upon targeted deletion of HNF1beta. *Development* **129**, 1829-1838.
- Colau G, Thiry M, Leduc V, Bordonne R & Lafontaine DL (2004) The small nucleolar RNA cap trimethyltransferase is required for ribosome synthesis and intact nucleolar morphology. *Molecular and Cellular Biology* **24**, 7976-7986.
- Cooper, Geoffrey (1999). *La Cellule : une approche moléculaire*, traduction de la 1^{ère} éd. américaine. Paris : De Boeck Université s.a., 706 p.
- Davit-Spraul A, Gonzales E, Baussan C & Jacquemin E (2009) Progressive familial intrahepatic cholestasis. *Orphanet J Rare Dis* **4**, 1.
- Donzelli M & Draetta GF (2003) Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep* **4**, 671-677.
- Drewes G, Ebner A, Preuss U, Mandelkow EM & Mandelkow E (1997) MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell* **89**, 297-308.
- Drouin E, Russo P, Tuchweber B, Mitchell G & Rasquin-Weber A (2000) North American Indian cirrhosis in children: a review of 30 cases. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **31**, 395-404.
- Duncan SA (2003) Mechanisms controlling early development of the liver. *Mechanisms of Development* **120**, 19-33.
- Emmott E & Hiscox JA (2009) Nucleolar targeting: the hub of the matter. *EMBO Rep* **10**, 231-238.
- Ewing RM, Chu P, Elisma F, Li H, Taylor P, Climie S, McBroom-Cerajewski L, Robinson MD, O'Connor L, Li M, Taylor R, Dharsee M, Ho Y, Heilbut A, Moore L, Zhang S, Ornatsky O, Bukhman YV, Ethier M, Sheng Y, Vasilescu J, Abu-Farha M, Lambert JP, Duwel HS, Stewart, II, Kuehl B, Hogue K, Colwill K, Gladwish K, Muskat B, Kinach R, Adams SL, Moran MF, Morin GB, Topaloglou T & Figeys D (2007) Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry. *Mol Syst Biol* **3**, 89.
- Freed EF & Baserga SJ (2010) The C-terminus of Utp4, mutated in childhood cirrhosis, is essential for ribosome biogenesis. *Nucleic Acids Res* **38**, 4798-4806.
- Freed EF, Bleichert F, Dutca LM & Baserga SJ (2010) When ribosomes go bad: diseases of ribosome biogenesis. *Mol Biosyst* **6**, 481-493.
- Gassama-Diagne A, Yu W, ter Beest M, Martin-Belmonte F, Kierbel A, Engel J & Mostov K (2006) Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate regulates the formation of the basolateral plasma membrane in epithelial cells. *Nat Cell Biol* **8**, 963-970.
- Gietz RD & Schiestl RH (2007) Quick and easy yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc* **2**, 35-37.

- Gurdon JB & Bourillot PY (2001) Morphogen gradient interpretation. *Nature* **413**, 797-803.
- Hernandez-Verdun D & Louvet E (2004) [The nucleolus: structure, functions, and associated diseases]. *Med Sci (Paris)* **20**, 37-44.
- Hunter MP, Wilson CM, Jiang X, Cong R, Vasavada H, Kaestner KH & Bogue CW (2007) The homeobox gene Hhex is essential for proper hepatoblast differentiation and bile duct morphogenesis. *Developmental Biology* **308**, 355-367.
- Kaplan, Jean-Claude; **Delpech**, Marc (1993). *Biologie Moléculaire et Médecine*, 2^e éd.. Paris : Médecine-Sciences Flammarion, 790 p.
- Kaplan M, Muraca M, Hammerman C, Rubaltelli FF, Vilei MT, Vreman HJ & Stevenson DK (2002) Imbalance between production and conjugation of bilirubin: a fundamental concept in the mechanism of neonatal jaundice. *Pediatrics* **110**, e47.
- Kato M (2005) WNT/PCP signaling pathway and human cancer (review). *Oncology Reports* **14**, 1583-1588.
- Kodama Y, Hijikata M, Kageyama R, Shimotohno K & Chiba T (2004) The role of notch signaling in the development of intrahepatic bile ducts. *Gastroenterology* **127**, 1775-1786.
- Lechertier T, Sirri V, Hernandez-Verdun D & Roussel P (2007) A B23-interacting sequence as a tool to visualize protein interactions in a cellular context. *Journal of Cell Science* **120**, 265-275.
- Lemaigre FP (2003) Development of the biliary tract. *Mechanisms of Development* **120**, 81-87.
- Li D & Roberts R (2001) WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences* **58**, 2085-2097.
- Lindor, Keith D.; **Talwalker**, Jayant A. (2008). *Cholestatic liver disease* [Livre], sur le site *Université de Montréal-Bibliothèques*. Consulté le 12 janvier 2011. <http://www.springerlink.com/content/p61554/#section=647650&page=1>
- Maisels MJ & Kring E (2006) The contribution of hemolysis to early jaundice in normal newborns. *Pediatrics* **118**, 276-279.
- Massague J (1998) TGF-beta signal transduction. *Annual Review of Biochemistry* **67**, 753-791.
- Massague J & Chen YG (2000) Controlling TGF-beta signaling. *Genes and Development* **14**, 627-644.
- Massague J & Wotton D (2000) Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO Journal* **19**, 1745-1754.
- McDaniell R, Warthen DM, Sanchez-Lara PA, Pai A, Krantz ID, Piccoli DA & Spinner NB (2006) NOTCH2 mutations cause Alagille syndrome, a heterogeneous disorder of the notch signaling pathway. *Am J Hum Genet* **79**, 169-173.

- Muller J, Ory S, Copeland T, Piwnica-Worms H & Morrison DK (2001) C-TAK1 regulates Ras signaling by phosphorylating the MAPK scaffold, KSR1. *Molecular Cell* **8**, 983-993.
- Peng CY, Graves PR, Ogg S, Thoma RS, Byrnes MJ, 3rd, Wu Z, Stephenson MT & Piwnica-Worms H (1998) C-TAK1 protein kinase phosphorylates human Cdc25C on serine 216 and promotes 14-3-3 protein binding. *Cell Growth and Differentiation* **9**, 197-208.
- Phizicky EM & Fields S (1995) Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiological Reviews* **59**, 94-123.
- Prieto JL & McStay B (2007) Recruitment of factors linking transcription and processing of pre-rRNA to NOR chromatin is UBF-dependent and occurs independent of transcription in human cells. *Genes and Development* **21**, 2041-2054.
- Primrose, Sandy B.; **Twyman**, Richard M. (2003). *Principles of Genome Analysis and Genomics*, 3^e éd. UK: Blackwell Publishing, 263 p.
- Raynaud P, Carpentier R, Antoniou A & Lemaigre FP (2009) Biliary differentiation and bile duct morphogenesis in development and disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*.
- Reymann S & Borlak J (2008) Transcription profiling of lung adenocarcinomas of c-myc-transgenic mice: identification of the c-myc regulatory gene network. *BMC Syst Biol* **2**, 46.
- Richter A, Mitchell GA & Rasquin A (2007) [North American Indian childhood cirrhosis (NAIC)]. *Med Sci (Paris)* **23**, 1002-1007.
- Seeler JS, Muchardt C, Suessle A & Gaynor RB (1994) Transcription factor PRDII-BF1 activates human immunodeficiency virus type 1 gene expression. *Journal of Virology* **68**, 1002-1009.
- Sims D, Duchek P & Baum B (2009) PDGF/VEGF signaling controls cell size in *Drosophila*. *Genome Biol* **10**, R20.
- Sirri V, Urcuqui-Inchima S, Roussel P & Hernandez-Verdun D (2008) Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochemistry and Cell Biology* **129**, 13-31.
- Smith TF, Gaitatzes C, Saxena K & Neer EJ (1999) The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends in Biochemical Sciences* **24**, 181-185.
- Sparks EE, Huppert KA, Brown MA, Washington MK & Huppert SS (2010) Notch signaling regulates formation of the three-dimensional architecture of intrahepatic bile ducts in mice. *Hepatology* **51**, 1391-1400.
- Staub E, Fiziev P, Rosenthal A & Hinzmann B (2004) Insights into the evolution of the nucleolus by an analysis of its protein domain repertoire. *Bioessays* **26**, 567-581.
- Stelzl U, Worm U, Lalowski M, Haenig C, Brembeck FH, Goehler H, Stroedicke M, Zenkner M, Schoenherr A, Koeppen S, Timm J, Mintzlaff S, Abraham C, Bock N, Kietzmann S, Goedde A, Toksoz E, Droege A, Krobitsch S, Korn B, Birchmeier W, Lehrach H & Wanker EE (2005) A human protein-protein

- interaction network: a resource for annotating the proteome. *Cell* **122**, 957-968.
- Suchy F & Narkewicz MR (2002) Development of the liver and bile ducts. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **35 Suppl 1**, S4-6.
- Sun TQ, Lu B, Feng JJ, Reinhard C, Jan YN, Fantl WJ & Williams LT (2001) PAR-1 is a Dishevelled-associated kinase and a positive regulator of Wnt signalling. *Nat Cell Biol* **3**, 628-636.
- Tanimizu N & Miyajima A (2004) Notch signaling controls hepatoblast differentiation by altering the expression of liver-enriched transcription factors. *Journal of Cell Science* **117**, 3165-3174.
- Tanimizu N, Miyajima A & Mostov KE (2009) Liver progenitor cells fold up a cell monolayer into a double-layered structure during tubular morphogenesis. *Molecular Biology of the Cell* **20**, 2486-2494.
- Twentyman PR & Luscombe M (1987) A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *British Journal of Cancer* **56**, 279-285.
- Van Criekinge W & Beyaert R (1999) Yeast Two-Hybrid: State of the Art. *Biol Proced Online* **2**, 1-38.
- Van Duyne R, Guendel I, Kehn-Hall K, Easley R, Klase Z, Liu C, Young M & Kashanchi F (2010) The identification of unique serum proteins of HIV-1 latently infected long-term non-progressor patients. *AIDS Res Ther* **7**, 21.
- van Mil SW, Houwen RH & Klomp LW (2005) Genetics of familial intrahepatic cholestasis syndromes. *Journal of Medical Genetics* **42**, 449-463.
- Watkins JL, Lewandowski KT, Meek SE, Storz P, Toker A & Piwnicka-Worms H (2008) Phosphorylation of the Par-1 polarity kinase by protein kinase D regulates 14-3-3 binding and membrane association. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 18378-18383.
- Weber AM, Tuchweber B, Yousef I, Brochu P, Turgeon C, Gabbiani G, Morin CL & Roy CC (1981) Severe familial cholestasis in North American Indian children: a clinical model of microfilament dysfunction? *Gastroenterology* **81**, 653-662.
- Wendt MK, Allington TM & Schiemann WP (2009) Mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition by TGF-beta. *Future Oncol* **5**, 1145-1168.
- Wendum D (2010) [Liver disease associated with hereditary defects of hepatobiliary transporters]. *Annales de Pathologie* **30**, 426-431.
- Wu X, Sandhu S, Patel N, Triggs-Raine B & Ding H (2010) EMG1 is essential for mouse pre-implantation embryo development. *BMC Dev Biol* **10**, 99.
- Xu C & Min J (2011) Structure and function of WD40 domain proteins. *Protein Cell* **2**, 202-214.
- Yamasaki H, Sada A, Iwata T, Niwa T, Tomizawa M, Xanthopoulos KG, Koike T & Shiojiri N (2006) Suppression of C/EBPalpha expression in periportal

- hepatoblasts may stimulate biliary cell differentiation through increased Hnf6 and Hnf1b expression. *Development* **133**, 4233-4243.
- Yu B, Mitchell GA & Richter A (2005) Nucleolar localization of cirhin, the protein mutated in North American Indian childhood cirrhosis. *Experimental Cell Research* **311**, 218-228.
- Yu B, Mitchell GA & Richter A (2009) Cirhin up-regulates a canonical NF-kappaB element through strong interaction with Cirip/HIVEP1. *Experimental Cell Research* **315**, 3086-3098.
- Zollner G & Trauner M (2006) Molecular mechanisms of cholestasis. *Wiener Medizinische Wochenschrift* **156**, 380-385.
- Zong Y, Panikkar A, Xu J, Antoniou A, Raynaud P, Lemaigre F & Stanger BZ (2009) Notch signaling controls liver development by regulating biliary differentiation. *Development* **136**, 1727-1739.

