

Université de Montréal

**Caractérisation fonctionnelle chez le poisson zèbre de  
l'isoforme protéique WNK1/HSN2 mutée dans la  
neuropathie héréditaire sensitive et autonome de type 2**

par

Valérie Bercier

Département de Pathologie et de Biologie Cellulaire

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine

en vue de l'obtention du grade de Maître

en Pathologies et Biologie Cellulaire

option Neurosciences

Novembre 2011

© Valérie Bercier, 2011

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Caractérisation fonctionnelle chez le poisson zèbre de l'isoforme protéique  
WNK1/HSN2 mutée dans la neuropathie héréditaire sensitive et autonome de type 2

Présenté par :  
Valérie Bercier

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Karl J.L. Fernandes, président-rapporteur  
Guy A. Rouleau, directeur de recherche  
Pierre Drapeau, co-directeur  
Nicole Leclerc, membre du jury

## Résumé

La neuropathie humaine sensitive et autonome de type 2 (NHTA 2) est une pathologie héréditaire rare caractérisée par une apparition précoce des symptômes et une absence d'affectation motrice. Cette pathologie entraîne la perte de perception de la douleur, de la chaleur et du froid ainsi que de la pression (toucher) dans les membres supérieurs et inférieurs et est due à des mutations autosomales récessives confinées à l'exon HSN2 de la protéine kinase à sérine/thréonine WNK1 (*with-no-lysine protein kinase 1*). Cet exon spécifique permettrait de conférer une spécificité au système nerveux à l'isoforme protéique WNK1/HSN2. La kinase WNK1 est étudiée en détails, en particulier au niveau du rein, mais son rôle au sein du système nerveux demeure inconnu. Considérant le début précoce de la neuropathie et le manque d'innervation sensorielle révélé par des biopsies chez les patients NHTA2, notre hypothèse de recherche est que les mutations tronquantes menant à la NHTA de type 2 causent une perte de fonction de l'isoforme WNK1/HSN2 spécifique au système nerveux entraînant un défaut dans le développement du système nerveux sensoriel périphérique. Chez l'embryon du poisson zèbre, WNK1/HSN2 est exprimé au niveau des neuromastes de la ligne latérale postérieure, un système mécanosensoriel périphérique. Nous avons obtenu des embryons *knockdown* pour WNK1/HSN2 par usage d'oligonucléotides morpholino antisens (AMO). Nos trois approches AMO ont révélé des embryons présentant des défauts d'établissement au niveau de la ligne latérale postérieure. Afin de déterminer la voie pathogène impliquant l'isoforme WNK1/HSN2, nous nous sommes intéressés à l'interaction rapportée entre la kinase WNK1 et le co-transporteur neuronal KCC2. Ce dernier est une cible de phosphorylation de WNK1 et son rôle dans la promotion de la neurogenèse est bien connu. Nous avons détecté l'expression de KCC2 au niveau de neuromastes de la ligne latérale postérieure et observé une expression accrue de KCC2 chez les embryons *knockdown* pour WNK1/HSN2 à l'aide de RT-PCR semi-quantitative. De plus, une sur-expression d'ARN humain de KCC2 chez des embryons a produit des défauts dans la ligne latérale postérieure, phénotypant le *knockdown* de WNK1/HSN2. Ces résultats furent validés par un double *knockdown*, produisant des embryons n'exprimant ni KCC2, ni WNK1/HSN2, dont le phénotype fut atténué. Ces résultats nous mènent à suggérer une voie de signalisation où WNK1/HSN2 est en amont de KCC2, régulant son activation, et possiblement son expression. Nous proposons donc que la perte de fonction de l'isoforme spécifique cause un déséquilibre dans les niveaux de KCC2 activée, menant à une prolifération et une différenciation réduites des progéniteurs neuronaux du système nerveux périphérique. Les défauts associés à la NHTA de type 2 seraient donc de nature développementale et non neurodégénérative.

**Mots-clés :** Poisson zèbre, neuropathie sensorielle, HSN2, NHTA2, WNK1, KCC2

## Abstract

Human sensory and autonomic neuropathy type 2 (HSNA2) is a rare human hereditary pathology characterized by an early onset severe sensory loss (for all modalities) in the distal limbs. It is due to autosomal recessive mutations confined to exon HSN2 of the WNK1 (with-no-lysine protein kinase 1) serine-threonine kinase; the specific exon confers nervous system specificity to target isoform WNK1/HSN2. While this kinase is widely studied in the kidneys, little is known about its role in the nervous system. Due to its role in HSAN type 2, we hypothesized that the truncating mutations present in the HSN2 exon lead to a loss-of-function of the WNK1 kinase, impairing development of the peripheral sensory system. In order to investigate the mechanisms by which the lack of the WNK1/HSN2 isoform acts to cause HSAN type 2, we examined its expression pattern in our zebrafish model and observed strong expression in neuromasts of the peripheral sensory lateral line system. We then knocked down the HSN2 exon in zebrafish embryos using antisense morpholino oligonucleotides. Our three approaches to knockdown the WNK1/HSN2 isoform led to embryos with a defective lateral line. In order to establish a pathogenic pathway involving the WNK1/HSN2 isoform, we investigated the reported interaction between the WNK1 kinase and neuronal potassium chloride co-transporter KCC2. This transporter is a target of WNK1 phosphorylation and also has a known role in promoting neurogenesis. We have also showed its expression in mature neuromasts of the posterior lateral line, and observed an increased expression of KCC2 in WNK1/HSN2 *knockdown* embryos by semi-quantitative RT-PCR, lending credence to our interaction hypothesis. Furthermore, overexpression of human KCC2 RNA in embryos led to an impaired mechanosensory lateral line system, phenocopying the WNK1/HSN2 *knockdown*. We then validated these results by obtaining double *knockdown* embryos, both for WNK1/HSN2 and KCC2, which alleviated the lateral line defect phenotype. These results led us to suggest a pathway in which WNK1/HSN2 is upstream of the KCC2 co-transporter. WNK1 is believed to regulate the level of activation, and possibly level of expression, of KCC2 and we therefore hypothesize that the loss-of-function of the specific isoform causes an imbalance in the levels of activated KCC2. This would then lead to decreased progenitor proliferation and hindered differentiation of neurons, causing the defects associated with HSAN type 2.

**Keywords** : Zebrafish, sensory neuropathy, HSN2, HSAN2, WNK1, KCC2

## Table des matières

<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>v</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>vi</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>viii</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>xi</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
Les NHSA .....	1
La NHSA de type 2 .....	2
La génétique de la NHSA de type 2 .....	3
La kinase WNK1 .....	5
Le co-transporteur KCC2 .....	13
Le poisson zèbre comme modèle développemental .....	18
But .....	25
<b>Résultats</b> .....	<b>27</b>
Identification de WNK1 chez le poisson zèbre .....	27
WNK1/HSN2 est localisé au niveau de la ligne latérale chez le poisson zèbre .....	28
Expression de l'isoforme WNK1/HSN2 dans le temps .....	30
Knockdown de l'isoforme WNK1/HSN2 .....	31
Innervation des neuromastes .....	34
Neurones moteurs .....	36
Expérience de sauvetage du phénotype <i>knockdown</i> .....	37
Localisation de KCC2 chez le poisson zèbre .....	43
Phénotype KCC2 chez les embryons <i>knockdown</i> WNK1/HSN2 .....	44
La sur-expression d'ARN humain KCC2 phénocopie le <i>knockdown</i> .....	45
Sauvetage par double <i>knockdown</i> de KCC2 et de WNK1/HSN2 .....	47
Effet du <i>knockdown</i> de WNK1/HSN2 sur les progéniteurs de la LLP .....	49
Sort des progéniteurs de la LLP .....	51
<b>Matériel et Méthodes</b> .....	<b>52</b>

Lignées transgéniques .....	52
Injections d'oligonucléotides morpholino antisens .....	52
Injection d'ARNm.....	54
Immunohistochimie .....	55
Buvardage de type Western .....	55
Hybridation in situ .....	56
RT-PCR (reverse transcriptase) .....	56
Marquage de la ligne latérale .....	57
Détection de mort cellulaire .....	58
Microscopie.....	58
Statistiques .....	59
<b>Discussion.....</b>	<b>60</b>
Le poisson zèbre comme modèle développemental.....	62
Le <i>knockdown</i> de WNK1/HSN2 cause un défaut spécifique de la ligne latérale postérieure.....	63
Spécificité du phénotype <i>knockdown</i> de WNK1/HSN2.....	65
Le co-transporteur KCC2 et WNK1/HSN2 .....	67
Mécanisme moléculaire possible .....	71
Travaux futurs .....	73
Autres hypothèses .....	75
Conclusion .....	79
<b>Bibliographie .....</b>	<b>80</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>i</b>

## Liste des tableaux

Tableau 1. Identification de l'orthologue WNK1 chez le poisson zèbre

Tableau 2. Résultats des alignements d'orthologues variés de WNK1

Tableau 3. Résultats des alignements d'orthologues variés de WNK1 pour HSN2 seul

Tableau 4. Statistiques pour la figure 12-B

Tableau 5. Statistiques pour la figure 15

Tableau 6. Statistiques pour la figure 16

Tableau 7. Statistiques pour la figure 17

Tableau 8. Statistiques pour la figure 18

Tableau 9. Statistiques pour la figure 21-B

Tableau 10. Statistiques pour la figure 22-C

Tableau 11. Statistiques pour la figure 23-B

## Liste des figures

- Figure 1: Structure de la kinase WNK1.
- Figure 2 : Épissage alternatif de la kinase WNK1.
- Figure 3: Voies de signalisation des MAPK, impliquant la kinase WNK1.
- Figure 4: KCC2 dans le revêtement de la signalisation GABAergique.
- Figure 5: Modèle d'interaction entre WNK1 et KCC2.
- Figure 6: Organisation du neuromaste et carte de dépôt de pro-neuromastes.
- Figure 7: Modèle de segmentation du primordium de la LLP.
- Figure 8: Structure de WNK1/HSN2 chez le poisson zèbre.
- Figure 9 : Localisation de l'isoforme WNK1/HSN2 par immunohistochimie sur embryon entier.
- Figure 10: Expression dans le temps de l'isoforme WNK1/HSN2 et de la copie partielle de WNK1 du chromosome 25 par détection d'ARNm en RT-PCR.
- Figure 11: Confirmation de l'efficacité des AMO.
- Figure 12 : Phénotype des embryons knockdown pour WNK1/HSN2.
- Figure 13: Innervation des neuromastes chez les embryons knockdown par immunohistochimie de la protéine synaptique SV2.
- Figure 14: Les embryons knockdown ne présentent pas de défauts d'innervation motrice.
- Figure 15: Diagramme en boîtes du pointage 4-di-2-ASP pour le sauvetage par injection d'ARN de la construction complète de WNK1/HSN2 humain.
- Figure 16: Diagramme en boîtes du pointage 4-di-2-ASP pour le sauvetage par injection d'ARN de la construction partielle de WNK1/HSN2 humaine.
- Figure 17: Diagramme en boîtes du pointage 4-di-2-ASP pour la sur-expression d'ARN de la construction partielle de WNK1/HSN2 humaine.
- Figure 18: Diagramme en boîtes du pointage 4-di-2-ASP pour sur-expression massive d'ARN des constructions complète et partielle de WNK1/HSN2 humaine.
- Figure 19: Hybridation in situ du co-transporteur KCC2.



Figure 20: Expression du co-transporteur KCC2 chez des embryons knockdown pour WNK1/HSN2 par détection d'ARNm en RT-PCR.

Figure 21: Phénocopie du knockdown de WNK1/HSN2 par sur-expression d'ARN humain KCC2.

Figure 22: Sauvetage de la sur-expression de KCC2 par double knockdown WNK1/HSN2 et KCC2.

Figure 23: Baisse de la prolifération des progéniteurs de la LLP.

Figure 24: Mort cellulaire révélée par marquage à l'orange d'acridine.

Figure 25: Mécanisme moléculaire proposé.

## Liste des abréviations

Akt/PKB : protéine kinase B

AMO : *antisens morpholino oligonucleotides*, oligonucléotides morpholino antisens

BDNF : *brain derived neurotrophic factor*, facteur neurotrophique provenant du cerveau

Dpf : *days post fertilisation*, jours post-fertilisation

EGF : *epidermal growth factor*, facteur de croissance épidermique

Egr4 : *early Growth Response 4*

ERK5: *extracellular-signal-regulated kinases*, kinases régulées par signal extracellulaire

EST : *expressed sequence tag*, marqueur de séquence exprimée

FACS : *Fluorescence-activated cell sorting*

GABA : *gamma-aminobutyric acid*, acide  $\gamma$ -aminobutyrique

GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GDNF : *glia derived neurotrophic factor*; facteur neurotrophique dérivé des glies

GFP : *green fluorescent protein*

HEK 293 : *human embryonic kidney cells 293*, cellules de rein embryonnaires

HMSN/ACC : *hereditary motor and sensory neuropathy with agenesis of the corpus callosum*, neuropathie héréditaire motrice et sensorielle avec agénésie du corps calleux

Hpf : *hours post-fertilization*, heures après la fertilisation

HSN2 : *hereditary sensory neuropathy type 2*, neuropathie sensorielle héréditaire type 2

IGF-1 : *insuline-like growth factor I*, facteur de croissance similaire à l'insuline

KCC : K-Cl *cotransporter*, co-transporteur de K-Cl

KIF1A: *kinesin family member 1A*

KS-WNK1 : *kidney specific WNK1*, spécifique aux reins

LINGO-1 : *leucine rich repeat and Ig domain containing 1*

MAP : *mitogen-activated protein*, protéines activées par le mitogène

MAP2K: *mitogen-activated protein kinases*, protéines activées par le mitogène

mGFP : *membrane-associated (farnesylated) Green fluorescent protein*

NCC : Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> *cotransporter*, co-transporteur Na-Cl

NHSA : neuropathie héréditaire sensitive et autonome

NKCC1/2 : Na-K-Cl *cotransporter*, co-transporteur Na-K-Cl

NMDA : N-methyl D-aspartate

ORF : *open reading frame*, cadre ouvert de lecture

OSR1 : *oxidative stress reponse kinase 1*

PHAI : pseudohypoaldostéronisme type II ou syndrome de Gordon

PI3-kinase : phosphoinositide 3-kinase

PKC : protéine kinase C

RACE : *rapid amplification of cDNA ends*, amplification rapide d'extrémités d'ADNc

RT-PCR : *reverse transcriptase polymerase chain reaction*, amplification en chaîne par polymérase (transcription inverse)

S6K : *ribosomal S6 kinase*, kinase ribosomale S6

SH3 : *Src homology domain 3*, domaines d'homologie à Src 3

SPAK : *STE/SPS1-related proline alanine-rich kinase*

SV2: *synaptic vesicle protein 2*

Syt2 : synaptotagmin 2

WNK1: *with-no-lysine (K) kinase 1*

WT : type sauvage

*« Le commencement de toutes les sciences, c'est  
l'étonnement de ce que les choses sont ce qu'elles sont. »*

*Aristote, Métaphysiques, I, 2*

## Remerciements

Tout d'abord j'aimerais remercier mon superviseur, le Dr Guy Rouleau, pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un sujet aussi passionnant, et mon co-superviseur, le Dr Pierre Drapeau pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour m'avoir enseigné les rudiments de la recherche sur le modèle poisson zèbre. Merci à tous deux pour leur rigueur scientifique, leurs idées géniales, mais surtout pour m'avoir permis liberté et autonomie au cours de mon projet. Mon passage dans le monde de la recherche en neurosciences ne sera pas de si tôt oublié. Merci aux membres de mon comité, les Drs Julien Ghislain, Louis Saint-Amant et Patrick Dion pour leur bienveillance et leurs conseils avisés ayant permis d'orienter mon travail. Merci à Nathalie Champagne, Meijiang Liao, Claudia Maios, Mathieu Lapointe et Mathieu Lachance pour l'aide techniques et pour les discussions animées de 'troubleshooting'; merci également à Edna Brustein pour m'avoir enseigné les bases de la microscopie confocale, pour les cours d'injections et pour m'avoir rassuré que oui, mon projet allait bien quelque part! Merci aussi à Guy Laliberté et Marina Drits pour avoir traité mes poissons aux petits oignons (figurativement).

Merci au Dr Edor Kabashi de m'avoir recrutée pour faire son travail à sa place, permettant ainsi une collaboration fructueuse portant sur la sclérose latérale amyotrophique. Merci à Sébastien Côté pour sa bonne humeur contagieuse et pour m'avoir laissé envahir/nettoyer son 'bench' lors des premiers mois. Merci également à tous mes compatriotes du 5<sup>e</sup> étage (Li, Alexandra, Laura, Joël, Gary, Seb, Alexis, Camille, Mathieu, Laura H., Catherine, Stéfanny,...) pour votre camaraderie et vos idées saugrenues qui font toujours d'excellentes histoires!

Finalement, merci à ma famille, particulièrement à mon mari Witek, pour leur support et leurs encouragements, mais aussi pour avoir enduré mes tirades sur les petits poissons et sur une neuropathie dont personne n'a entendu parler.

## Introduction

La NHSA de type 2 est une neuropathie héréditaire affectant le système nerveux sensoriel qui est causée par des mutations dans le gène de la kinase WNK1 (*with-no-lysine (K) kinase 1*). Ces mutations sont confinées à un exon à épissage alternatif nommé HSN2 (*hereditary sensory neuropathy type 2*) et engendrent une perte de fonction d'une isoforme protéique particulière (WNK1/HSN2). Malgré la quantité de recherche portant sur cette kinase, son rôle dans le système nerveux demeure inconnu. Dans cette étude, le modèle animal poisson zèbre est utilisé pour produire un *knockdown* de cette isoforme particulière; la caractérisation du phénotype obtenu nous permet de supposer un rôle développemental quant à l'établissement du système nerveux périphérique. Le co-transporteur neuronal KCC2 (*K-Cl cotransporter 2*) a récemment été identifié comme une cible de phosphorylation de la kinase WNK1 et nous étudierons donc son rôle possible dans l'établissement d'une voie moléculaire pathogène menant à la NHSA de type 2.

## Les NHSA

Les neuropathies héréditaires sensitives et autonomes (NHSA) constituent un groupe de cinq pathologies cliniquement et génétiquement distinctes. Ce sont des troubles héréditaires associés à des dysfonctions sensorielles (généralement une perception altérée de la douleur et de la température ainsi que l'absence de réflexes tendineux) et à des troubles autonomes (tels que reflux gastrique, hypotension posturale et sudation excessive) qui varient en sévérité. Décrites comme des désordres dus à l'atrophie et la dégénération des neurones sensoriels et autonomes, ces neuropathies ont été catégorisées et classifiées en cinq catégories par le Dr Peter J. Dyck et collègues dès 1970. Cette classification a été proposée avant l'arrivée des études globales du génome par analyse de liaison (*linkage studies*) et donc repose sur des critères tels que l'âge de survenue, le mode de transmission, le phénotype prédominant ainsi que, plus tardivement, (Dyck, 1993) sur les altérations neuropathologiques et l'aspect moléculaire. Cette classification est encore très utile de nos

jours autant chez les dermatologues et orthopédistes que chez les cliniciens et aide à attribuer des symptômes typiques tels que l'hyperkératose (surproduction de kératine, produisant des fissures dans la peau qui mènent souvent à des ulcères), les ulcères chroniques et les fractures spontanées à une des neuropathies NHSA (Auer-Grumbach, *et al.*, 2005).

Depuis les 15 dernières années, et suite à l'arrivée des études globales du génome par analyse de liaison (*linkage studies*), il a été possible de confirmer par génétique les catégories de NHSA en identifiant des gènes responsables. Ce qui a surtout été révélé par contre, c'est l'hétérogénéité des différents désordres où plusieurs membres affectés d'une même famille ont une présentation clinique très différente (Auer-Grumbach, *et al.*, 2005). En effet, la pénétrance des mutations associées est complète pour tous les types de NHSA, mais l'expression est variée, menant à la présentation clinique de différents degrés de dysfonctions (Axelrod et Gold-von Simson, 2007).

La catégorisation des NHSAs, selon la particularité des symptômes et la sévérité des dysfonctions présentées, a donc permis l'identification de plusieurs mutations causatives, mais les mécanismes moléculaires menant à l'établissement de la plupart de ces neuropathies sont pour l'instant inconnus. Les NHSA demeurent des pathologies très rares qui pourraient néanmoins nous permettre de lever le voile sur la relation étroite liant développement et survie du système nerveux.

## **La NHSA de type 2**

Des études de cas attribués à la NHSA de type 2 (OMIM #201300) ont été décrites depuis 1946 (Ogryzlo, 1946) mais la description clinique de cette pathologie, alors non-identifiée, dans la littérature n'est pas toujours harmonieuse. Selon la classification établie par P. J. Dyck (Dyck, 1993), la NHSA de type 2 a un mode de transmission autosomal récessif, est diagnostiqué dans les deux premières décennies de vie et se caractérise par la

perte de sensation (toutes modalités) dans les mains et les pieds (Auer-Grumbach, *et al.*, 2005). Il est noté que les patients présentent une perte de sensation de douleur, de température et de toucher de distribution typique « gants et chaussettes » accompagné de la perte des réflexes tendineux, de présence d'ulcères, du développement fréquent de joints de Charcot (arthropathie nerveuse) et d'amputations spontanées alors que le tonus musculaire est maintenu. Les dysfonctions autonomes sont minimales et rares et le développement mental est normal (Ogryzlo, 1946; Johnson et Spalding, 1964; Murray, 1973). Un des tests diagnostiques fréquemment employé est l'injection intradermique d'histamine causant une inflammation (réflexe axonal des nerfs dermiques) absente chez les patients atteints. En effet, suite à une biopsie, une réduction marquée de la taille du nerf sural, ainsi qu'un nombre réduit de fibres myélinisées de petite et de grande taille peuvent être observés. Un manque mineur de fibres non-myélinisées peut aussi être détecté, ainsi que l'absence de récepteurs cutanés et donc de potentiels d'actions sensoriels (Johnson et Spalding, 1964; Murray, 1973; Axelrod et Gold-von Simson, 2007; Kurth, 2010). La NHSA de type 2 est parfois rapportée comme étant une neuropathie progressive, mais comme la sévérité des dysfonctions varie au sein d'une même famille et que la séparation entre les troubles sensoriels et leurs complications (ulcères, amputations) est floue, il peut être complexe de déterminer s'il s'agit réellement de progression. Comme l'indique Dyck (Dyck, 1966 par Murray, 1973), il est particulièrement difficile d'effectuer un test sensoriel chez des enfants affectés car ils n'ont pas la capacité d'interpréter leur douleur de la même façon que leur examinateur; certaines déficiences pourraient passer inaperçues et être considérées comme de la progression lors d'un test prenant place plus tard dans la vie d'un même patient.

## **La génétique de la NHSA de type 2**

Le mode de transmission autosomal récessif a été mis à jour avant même la possibilité d'analyses en génétique moléculaire par l'étude d'une famille étendue de Terre-Neuve, permettant l'élaboration d'un pedigree de plus d'une génération (Heller et Robb,



1955 par Murray, 1973). Plusieurs études rapportent aussi un lien consanguin entre les parents des patients observés, permettant de confirmer, additionné plus tardivement de dépistage de mutations causatives, le mode de transmission des mutations menant à cette neuropathie rare (Johnson et Spalding, 1955; Murray, 1973; Rivière *et al.*, 2004; Roddier *et al.*, 2005; Takagi *et al.*, 2006; Pacheco-Cuellar *et al.*, 2011; Rivière *et al.*, 2011).

Ce même pedigree, additionné de cas considérés « sporadiques » (sans pedigree étendu disponible) provenant du Québec, de Terre-Neuve et de la Nouvelle-Écosse, soit l'est du Canada, ont semé l'idée d'un effet fondateur dès 1973 (Murray, 1973). Ce fut prouvé, suite à l'identification des mutations causatives de la NHSA de type 2 (Lafrenière *et al.*, 2004), par la découverte de deux mutations à très haute prévalence chez des familles du sud du Québec (Roddier *et al.*, 2005). 16 patients de 13 familles différentes ont permis de déterminer la fréquence de porteurs dans la région de Lanaudière (d'où proviennent 75% des patients étudiés dans cet article), soit 1 :116 pour les deux mutations. Les fréquences de porteurs pour chacune des deux mutations dans un petit village d'environ 3,000 habitants près de Joliette (où on retrouve une concentration de patients NHSA de type 2) est de 1 :18 et de 1 :28 et une fréquence de 1 :11 pour les deux mutations combinées. Ces fréquences extrêmement élevées s'expliqueraient par un effet fondateur admettant donc le fait que plus de 50% des patients NHSA de type 2 rapportés dans les études de cas proviennent du Québec (Roddier *et al.*, 2005).

En 2009 on ne dénombrait pas moins de 11 différentes mutations menant à la NHSA de type 2 (Rotthier *et al.* 2009) et en 2011, une nouvelle mutation (Pacheco-Cuellar *et al.*, 2011) est venue s'y ajouter. Bien entendu, on retrouve ces mutations ailleurs qu'au Canada : des patients ont été identifiés au Liban (Rivière *et al.*, 2004), au Japon (Takagi *et al.*, 2006) en Italie, en Autriche, en Belgique (Coen *et al.*, 2006), en Corée (Lee *et al.*, 2002; Cho *et al.*, 2006), en France (Shekarabi *et al.*, 2008), au Mexique (Pacheco-Cuellar *et al.*, 2011), en Afghanistan et en Turquie (Rivière *et al.*, 2011). Malgré le regroupement de cas au

Québec, la prévalence de mutations NHTA de type 2 à l'échelle mondiale, et donc de patients, demeure très faible.

Les premières mutations attribuées à la NHTA de type 2 ont été identifiées en 2004 et avec l'aide de génomique comparée, il a été possible de découvrir un ORF (cadre ouvert de lecture) qui semblait bien conservé. Cet ORF se situait en pleine région intronique du gène *WNK1* (*with-no-lysine (K) kinase 1*) et il semblait probable qu'il code pour un gène à un seul exon, baptisé *HSN2* (*hereditary sensory neuropathy type 2*) qui serait transcrit du même brin que *WNK1*. Toutes les mutations identifiées alors se regroupaient dans les 3 kb du nouveau gène *HSN2*, portant à croire qu'il s'agissait bien d'un « gène dans un gène » (Lafrenière *et al.*, 2004). Plusieurs autres mutations ont par la suite été découvertes chez les patients NHTA de type 2 par séquençage du nouveau gène *HSN2*, menant toutes à une perte de fonction de la protéine suite à la lecture précoce d'un codon stop produisant une protéine tronquée (Rotthier *et al.*, 2009; Kurth, 2010). Ce n'est qu'en 2008 qu'une patiente française atteinte de NHTA de type 2 ne révéla qu'une mutation hétérozygote dans le gène *HSN2*, ce qui vint semer le doute quant à la nature de ce gène à exon unique. Un séquençage de la région avoisinante du gène *HSN2*, soit la région du gène *WNK1* révéla une délétion assez importante de l'exon précédent l'intron où se situait *HSN2*, menant également à une protéine tronquée. Ceci permit de spéculer que *HSN2* était en fait un exon à épissage alternatif du gène *WNK1* (Figure 2). Des amplifications RT-PCR ainsi que des tests RACE ont permis de confirmer cette hypothèse et donc d'établir qu'une mutation perturbant l'isoforme protéique *WNK1/HSN2* était la cause de la NHTA de type 2 (Shekarabi *et al.*, 2008).

## **La kinase WNK1**

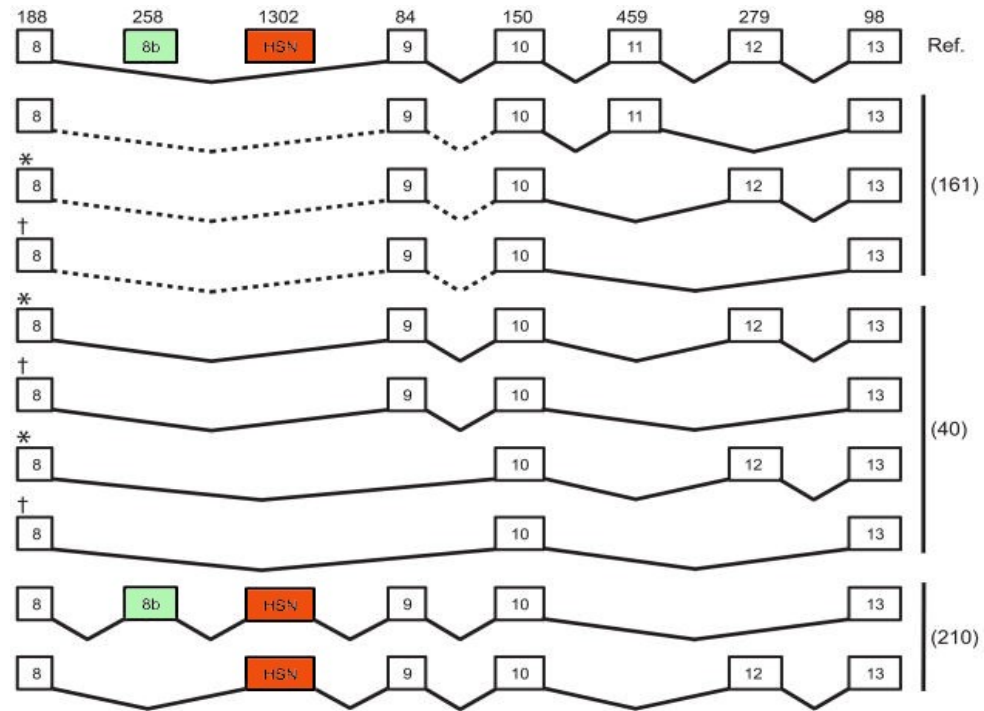
La kinase humaine WNK1 a été identifiée en 2001 comme étant une nouvelle kinase caractérisée par sa séquence inhabituelle d'acides aminés dans le site catalytique.

Effectivement, la séquence de cette kinase contient une cystéine au lieu d'une lysine, résidu bien conservé du sous-domaine II du domaine catalytique. Cette lysine est impliquée dans la liaison d'ATP dans pratiquement toutes les kinases rapportées alors, et elle est une cible pour la génération des mutants de kinase dominantes-négatives. La kinase WNK1 avait d'abord été identifiée chez le rat, présentant la même substitution de lysine à cystéine et il fut montré qu'une lysine située près du sous-domaine I conférait dans ce cas l'activité kinase (Verissimo et Jordan, 2001), lui permettant de catalyser le transfert de groupements phosphates au niveau de son sous-domaine I alors que chez les autres kinases, ceci se produit au niveau du sous-domaine II (McCormick et Ellison, 2011). Les kinases humaines qui lui sont le plus homologues sont STK2, PAK2, MEKK3, PAK3 et Raf-1, qui sont aussi des kinases à sérines/thréonines, ce qui suggère que WNK1 serait un membre des kinases activées par le mitogène (MAP) (Verissimo et Jordan, 2001). Chez l'humain, les gènes codant pour les quatre membres de la famille des WNK (WNK 1-4) sont respectivement localisés sur les chromosomes 12p.13.33, 9q22.31, Xp11.22 et 17q21.31 et ont été identifiés chez plusieurs autres mammifères ainsi que chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) (McCormick et Ellison, 2011).



**Figure 1: Structure de la kinase WNK1** Les structure des kinases WNK1 et KS-WNK1 (*kidney specific WNK1*) sont montrées avec leurs tailles respectives. Ces deux isoformes contiennent un domaine auto-inhibiteur (vert) incluant la phénylalanine essentielle (F), des domaines hélices super-enroulées (jaune). La kinase WNK1 a également un domaine kinase (rose) et deux résidus sérine phosphorylés essentiels à l'activation (P). L'isoforme KS-WNK1 possède un exon alternatif (rouge) en N-terminal au lieu du domaine kinase. Les sites de liaisons à SPAK/OSR1 sont indiqués par une fine bande rouge. (Adapté de McCormick et Ellison, 2011)

Le gène *WNK1* comprend 28 exons sur 160kb et contient deux promoteurs, codant ainsi pour plusieurs isoformes, dont certaines ont été détectées par buvardage de type Northern (Wilson *et al.*, 2001). Le domaine kinase, situé au N-terminal, est fortement conservé entre les différentes WNK (Figure 1). Pour ce qui est de l'activité, la kinase WNK1 est régulée par deux mécanismes majeurs d'inhibition. Un domaine auto-inhibiteur se retrouve aussi en N-terminal et comporte deux résidus phénylalanine bien conservés parmi les WNK qui jouent un rôle important dans cette auto-inhibition. Les kinases WNK peuvent aussi s'inhiber entre elles, par un mécanisme d'inhibition croisée (*cross inhibition*), suggérant l'interaction entre les différents membres de la famille. WNK1 contient aussi des domaines hélices super-enroulées (*coiled-coil domains*) prédits qui ont la caractéristique d'interagir entre eux, permettant l'assemblage et le désassemblage de complexes protéiques. Il a été montré par technique de double hybride (*yeast two hybrid*) que le N-terminus de WNK1 interagit avec un fragment incluant son propre domaine auto-inhibiteur et le deuxième domaine hélice super-enroulée, portant à croire que WNK1 interagit avec elle-même et pourrait possiblement former des polymères, ainsi que participer à des complexes protéiques. De plus, les membres de la famille WNK possèdent des régions riches en prolines, facilement reconnues par des protéines liant ces motifs, par exemple par des domaines SH3. Ces interactions sont généralement impliquées dans la modulation de signaux tels que la croissance cellulaire et la réponse immunitaire (McCormick et Ellison, 2011).



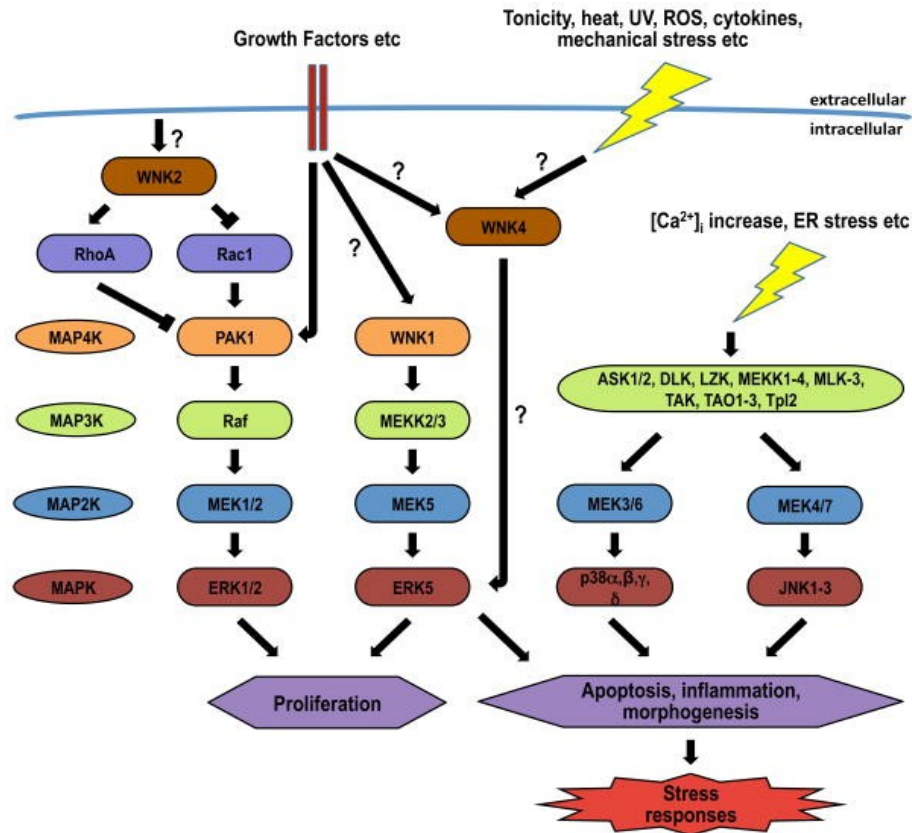
**Figure 2 : Épissage alternatif de la kinase WNK1.** WNK1 présente une grande variabilité d'épissage entre les exons 8 et 13. Les nombres indiqués au-dessus des boîtes d'exons numérotés correspondent à leur longueur en nucléotides et les traits pointillés indiquent que l'épissage entre ces exons n'est pas connu. Les deux exons spécifiques à l'isoforme WNK1/HSN2 sont indiqués en vert (exon 8b dont la fonction est inconnue) et en rouge (exon HSN2). (Adapté de McCormick et Ellison, 2011)

La régulation de l'activité de WNK1, outre sa possibilité d'auto-inhibition, est affectée par l'hypertonie. En effet, il a été démontré dans des cellules HEK 293 (*human embryonic kidney cells*) que suite à une exposition à des conditions hyperosmotiques, la kinase WNK1 est rapidement activée par phosphorylation à plusieurs résidus clés (Zagórska *et al.*, 2007). Cette activation coïncide avec l'activation de deux substrats de WNK1, soit les kinases SPAK (*STE/SPS1-related proline alanine-rich kinase*) et OSR1 (*oxidative stress response kinase 1*), également impliquées dans le contrôle du volume cellulaire et de l'homéostasie ionique et fortement exprimées dans les neurones, par phosphorylation directe de NKCC1/2 (*Na-K-Cl cotransporter*) et NCC (*Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter*) (McCormick et Ellison, 2011). Il a été aussi observé que lors d'un choc hyperosmotique la kinase WNK1, généralement retrouvée au niveau du cytosol et exclue

du noyau, se redistribue vers les structures vésiculaires (e.g. réseau trans-golgien, endosomes) et que ceci se produit par l'entremise de son domaine C-terminal (Zagórska *et al.*, 2007).

Un lien entre la kinase WNK1 et l'insuline, ainsi qu'au facteur de croissance similaire à l'insuline IGF-1 (*insulin-like growth factor I*) a aussi été montré, via la voie PI3-kinase (phosphoinositide 3-kinase) qui active les kinases de la famille AGC, comme la kinase Akt1 (*Akt1/protein kinase B*) et la kinase S6K (*ribosomal S6 kinase*). En effet, WNK1 contient un site de phosphorylation ciblé par Akt1 et S6K et il fut confirmé que WNK1 est un substrat de Akt1 et que l'activation de la voie PI3-kinase/Akt est requise pour la stimulation par l'insuline de la phosphorylation de WNK1. Cette phosphorylation n'a cependant pas été attribuée à une activité catalytique particulière et son importance n'est alors pas connue. Toutefois, WNK1 semblerait fonctionner comme régulateur négatif de la mitogenèse insulino-dépendante (Jiang *et al.*, 2005). Il a également été rapporté que la kinase WNK1 se localise au niveau des vésicules contenant de l'insuline dans des lignées cellulaires pancréatiques où elle pourrait jouer un rôle dans les mécanismes de sécrétion d'insuline (McCormick et Ellison, 2011).

Le domaine kinase des WNK est similaire à ceux retrouvés au sein des MAP2K (*mitogen-activated protein kinases*), ce qui suggéra un rôle de WNK1 dans la signalisation des MAP (Figure 3). Des études par transfection ont révélé qu'une sur-expression de WNK1 résulte en une activation de ERK5 (*extracellular-signal-regulated kinases*), une kinase activée par le stress et la prolifération, dans la voie MAP3K MEKK2/3 et MAP2K MEK5. WNK1 interagit directement avec MEKK2/3 pour l'activer, ceci indépendamment de son activité kinase, possiblement par formation de complexe protéique. WNK1 serait alors impliquée dans la régulation de la prolifération et dans les mécanismes apoptotiques en réponse au stress, par régulation de la transcription génique (McCormick et Ellison, 2011).



**Figure 3: Voies de signalisation des MAPK, impliquant la kinase WNK1.** La voie des MAPK est activée par des facteurs de croissance et le stress intracellulaire ou environnemental. Cette voie résulte en réponse de prolifération ou de réponse au stress par la régulation de la transcription génique. Des membres de la famille des WNK influencent la signalisation MAPK, tel que présenté. (Adapté de McCormick et Ellison, 2011)

WNK1 est exprimée surtout dans le cœur, les reins, les muscles squelettiques et les testicules, avec une expression plus faible dans le cerveau. Très peu de temps suivant sa découverte, cette kinase fut identifiée comme étant la cause du syndrome de Gordon (ou Pseudohypoaldostérisme type II, PHAI), une pathologie humaine menant à de l'hypertension et de l'hyperkaliémie (excès de potassium plasmiq) (McCormick et Ellison, 2011), symptômes absents chez les patients NHSA de type 2 (Lafrenière *et al.*, 2004). Les mutations menant au syndrome de Gordon sont de larges délétions introniques de l'exon 1 résultant en une expression augmentée de la kinase WNK1 (Wilson *et al.*, 2001). Pour cette raison, la kinase WNK1 est surtout étudiée en ce qui a trait à son rôle au niveau du rein où la cascade de phosphorylation WNK-OSR1/SPAK-NCC est essentielle à la régulation de l'équilibre de NaCl dans le corps (Naito *et al.*, 2010). À ce niveau, deux

isoformes sont détectées : un transcrit long, version originellement décrite, et un transcrit court spécifiquement exprimé dans les reins le KS-WNK1 (KS : *kidney specific*) qui est dépourvu de son domaine kinase (Náray-Fejes-Tóth *et al.*, 2004).

Au sein du système nerveux, la kinase WNK1 semble avoir un lien avec la prolifération cellulaire et la migration. En effet, par l'activation de la voie ERK5 mentionnée précédemment, la kinase serait impliquée dans la survie neuronale et la prolifération cellulaire, ce qui est appuyé par sa présence très abondante dans le cerveau embryonnaire mais à plus faible niveau dans le cerveau adulte, indiquant un rôle probable dans le développement. Par l'usage de cellules C17.2, qui sont des cellules progénitrices de neurones provenant de souris, il fut possible d'observer que WNK1 est essentielle à l'activation de ERK5 par l'EGF (*epidermal growth factor*), un facteur de croissance ayant une grande influence sur l'état des progéniteurs neuronaux. En effet, les cellules qui n'exprimaient pas WNK1 avaient une morphologie altérée et semblaient immatures et non différenciées. De plus, leur capacité de migration, qui est cruciale pour l'établissement de réseaux neuronaux, ainsi que leur taux de croissance ont été réduits de façon dramatique en absence de la kinase, indiquant que la voie de signalisation activée par l'EGF pourrait être le mécanisme majeur par lequel passe WNK1 pour avoir un effet sur la prolifération, la différenciation et la migration neuronale (Sun *et al.*, 2006).

Pour l'instant, ce qui est connu sur l'isoforme WNK1 contenant l'exon *HSN2* (soit WNK1/HSN2, Figure 2) impliquée dans la NHTA de type 2 provient du modèle murin et a trait à sa sous-localisation particulière. Effectivement, l'isoforme WNK1/HSN2 n'est exprimée qu'au niveau neuronal, plus précisément dans le cerveau, la moelle, les cellules du ganglion spinal et le nerf sciatique (Shekarabi *et al.*, 2008; McCormick et Ellison, 2011). Non seulement WNK1/HSN2 a une localisation restreinte par rapport aux autres isoformes WNK1, mais elle se sous-localise différemment au niveau des neurones



sensoriels, où elle se retrouve dans le corps cellulaire et dans les axones alors que WNK1 sans l'exon *HSN2* est confiné au soma (Shekarabi *et al.*, 2008).

Il avait préalablement été démontré que WNK1 était essentielle au développement, car un *knockout* chez la souris s'est avéré létal chez l'embryon (Zambrowicz *et al.*, 2003). Une étude plus récente, révéla que ces embryons présentent des défauts du développement cardiovasculaire, ayant des troubles angiogéniques autant au niveau de la formation des veines que des artères. Ceci indique un rôle fondamental de WNK1 au niveau des cellules endothéliales essentielles à l'angiogenèse et au développement cardiaque et pourrait indiquer une implication de la kinase dans le contrôle de la tension artérielle affectée chez les patients atteints de PHAII (Xie *et al.*, 2009). Cependant, aucun modèle de *knockout* de l'isoforme spécifique WNK1/HSN2 n'a encore été développé.

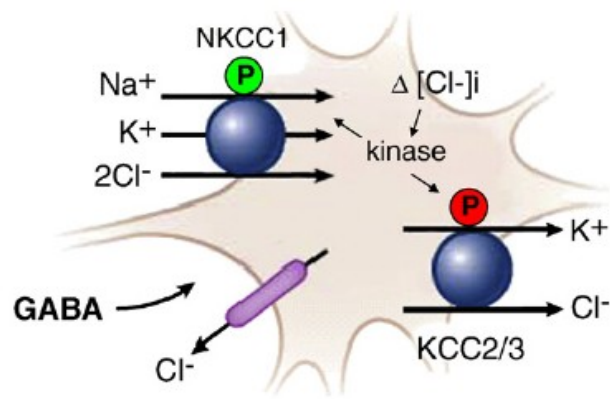
L'ampleur des dysfonctions présentes ainsi que le début précoce des symptômes chez les patients atteints de la NHSA de type 2 portent à croire que le rôle exercé par la kinase WNK1, plus précisément son isoforme WNK1/HSN2 à la localisation restreinte, est essentiel au développement adéquat du système nerveux sensoriel périphérique. Cette neuropathie serait donc probablement due à un développement inadéquat et non à un processus de neurodégénérescence. Afin d'approfondir sur le sujet de la voie moléculaire pathogène, le co-transporteur de chlorure lié au potassium KCC2 à expression neuronale a été identifié comme cible potentielle en aval de la kinase WNK1. Celui-ci serait régulé par la kinase et lui servirait d'effecteur menant au développement des symptômes liés à la NHSA de type 2.

## **Le co-transporteur KCC2**

Le co-transporteur KCC avait tout d'abord été associé à une neuropathie en 2002 lorsqu'une mutation dans le gène de KCC3 fut identifiée comme la cause de la neuropathie héréditaire motrice et sensorielle avec agénésie du corps calleux (HMSN/ACC) (Howard *et al.*, 2002). Cette neuropathie est autosomale récessive et résulte en un développement et un maintien anormal du système nerveux dans son entier. Typiquement, les axones auront une migration anormale à travers la ligne médiane du cerveau et les nerfs périphériques enfleront amplement, puis seront démyélinisés. (Salin-Cantegrel *et al.*, 2008) Puis, il fut découvert que la kinase WNK1 est un régulateur important de l'activité des co-transporteurs NKCC et KCC, qui sont respectivement activés et inhibés par une phosphorylation sérine/thréonine suite à de l'hypertonie extracellulaire (Kahle *et al.*, 2010). KCC serait donc lié à des symptômes neuropathiques causés par un développement anormal du système nerveux et la kinase WNK1 interagirait avec ce co-transporteur, ce qui en fait une cible intéressante pour un mécanisme pathogène.

Chez les mammifères, on retrouve quatre membres de la famille de co-transporteurs KCC (K-Cl *cotransporter*), soit KCC 1-4, responsables du transport net du chlorure hors de la cellule. Les rôles physiologiques ainsi que les localisations de chacun des KCC sont variés : KCC1 est ubiquitaire, KCC2 est exprimé exclusivement au niveau neuronal, KCC3 est fortement exprimé dans les neurones et l'épithélium du rein et KCC4 se retrouve dans l'épithélium de l'oreille interne et du rein ainsi que dans les neurones et la glie de différentes régions du système nerveux central (Kahle *et al.*, 2010). Plus précisément, KCC2,3 et 4 sont distribuées au niveau des noyaux de Ranvier des axones myélinisés périphériques, aux microvillosités des cellules de Schwann et l'activité KCC est essentielle à la conduction des impulsions le long des fibres myélinisées (Sun *et al.*, 2010).

Les co-transporteurs KCC et NKCC jouent un rôle important car ils régulent le niveau intracellulaire de chlorure de neurones, ce qui détermine la polarité, soit inhibitrice ou excitatrice, de leur réponse au neurotransmetteur GABA (acide  $\gamma$ -aminobutyrique), dont le récepteur de type A (récepteur GABA<sub>A</sub>) est couplé à un canal chlorure (Kahle *et al.*, 2010). En effet, il a été rapporté que le courant sortant de chlorure induit par KCC2 est responsable du renversement de potentiel du chlorure qui convertit le GABA en neurotransmetteur hyperpolarisant, alors qu'il était préalablement dépolarisant (Kanaka *et al.*, 2001). De plus, KCC2 serait exprimé en parallèle avec la maturation neuronale, soit absent chez les neurones immatures mais présent chez les neurones matures. Le co-transporteur devient activé chez les neurones immatures suivant une phosphorylation par une tyrosine kinase endogène, régulant son implication dans le revirement développemental de la réponse GABAergique (figure 4). Le rôle de neurotransmetteur exciteur de GABA au tout début du développement est très important pour la maturation du système nerveux central, car il permet d'assurer une augmentation du calcium intracellulaire par l'action de dépolarisation membranaire (Stein *et al.*, 2004). KCC2 aurait également un rôle morphogénique, expliquant sa présence bien avant le revirement de la réponse GABAergique. Effectivement, ce rôle serait indépendant de sa fonction de transporteur d'ions et serait donc de promouvoir le développement des épines dendritiques par une interaction avec des protéines associées au cytosquelette, comme 4,1N. Ceci est appuyé par le fait que KCC2 est exprimé à haut niveau à proximité des synapses excitatrices et dans les épines dendritiques. Chez la souris, une expression de KCC2 fonctionnellement inactive perturbe la migration des cellules de la crête neurale, qui sont également réduites en nombre. Ces cellules migrent habituellement du tube neural vers différentes régions du corps afin de développer des structures comme le système nerveux périphérique, l'ossature crânio-faciale, les glandes endocrines et le septum des chambres de chasse cardiaques (Horn *et al.*, 2010).



### Figure 3: KCC2 dans le revirement de la signalisation GABAergique.

Dans les neurones GABAergiques, la balance entre l'activité de NKCC et de KCC détermine la concentration intracellulaire de chlorure, qui en plus du potentiel membranaire détermine la direction du flux cellulaire de chlorure en réponse au GABA. La phosphorylation de NKCC et KCC résulte respectivement en leur activation et inhibition. (Adapté de Kahle *et al.*, 2010)

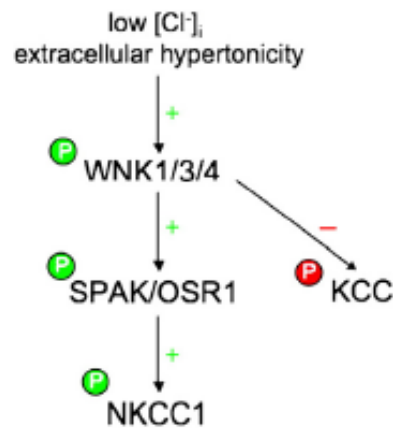
KCC2 serait essentiel au développement, car chez la souris, un *knockout* de KCC2 cause la mort immédiatement après la naissance. Cette mort est due à de l'activité excitatrice GABAergique et glycinergique anormale menant à des défauts des fonctions motrices, incluant le contrôle de la respiration (Hubner *et al.*, 2001). Toutefois, des souris exprimant des niveaux de KCC2 20-30% la normale ne présentent pas d'anomalies comportementales et sont viables. Celles exprimant seulement des niveaux de 5-10% la normale présentent des convulsions spontanées et généralisées et meurent peu de temps après la naissance (Woo *et al.*, 2002). Chez des neurones de l'hippocampe en culture, une inactivation de KCC2 mène à une plus haute sensibilité des neurones aux stress oxydatif et à l'excitotoxicité, ce qui indiquerait un rôle neuroprotecteur du KCC2 endogène. En effet, plusieurs hypothèses se présentent pour expliquer ce rôle neuroprotecteur. Par exemple, KCC2 pourrait être essentiel à la diminution du gonflement neuronal dépendant du chlorure qui prend place en conditions toxiques, protégeant ainsi d'un événement menant habituellement à la mort cellulaire. Également, dans le neurone mature, KCC2 est nécessaire au maintien du bas niveau de chlorure intracellulaire, permettant l'action inhibitrice du GABA ou de la glycine. Considérant que la réduction de l'inhibition par GABA mène à l'activation de canaux calciums voltage-dépendants, et donc à une facilitation des entrées de calcium par les récepteurs NMDA (N-methyl D-aspartate), il est

possible que KCC2 permette une protection contre les entrées excessives de calcium se produisant en conditions toxiques (Pellegrino *et al.*, 2011).

KCC2, lorsque lié à la membrane, a un taux de renouvellement très élevé, ce qui permet une modulation du chlorure intracellulaire neuronal selon son niveau d'expression (Payne *et al.*, 2003). Ceci suggère que le changement d'expression à la surface cellulaire serait un des mécanismes majeurs régulant l'activité de KCC2. Une étude a d'ailleurs démontré que des potentiels d'action post-synaptiques pouvaient induire une régulation à la baisse de KCC2 *via* un mécanisme dépendant du calcium et de la protéine kinase-C. KCC2 serait donc régulé par différentes cascades cellulaires impliquant des kinases et des phosphatases, et ce, indépendamment de changements de niveaux d'ARNm ou de protéines exprimées (Wake *et al.*, 2007). Entre autres, la protéine kinase-C (PKC) serait responsable de la phosphorylation de KCC2 permettant sa stabilisation à la membrane (Lee *et al.*, 2007).

Également, il a été découvert que le BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) induit l'expression de KCC2 chez des neurones immatures dans une culture de neurones de l'hippocampe. Alors que chez les neurones matures le BDNF réduit l'expression d'ARNm de KCC2, il l'augmente chez les neurones immatures par l'entremise de Egr4, en aval de la voie de signalisation des MAPK, en passant par ERK1/2. L'effet du BDNF sur l'expression de KCC2 décline suivant la maturation des neurones en culture, suggérant un renversement développemental de l'effet du BDNF à ce niveau. En démontrant que le BDNF pouvait toujours induire une régulation à la hausse de KCC2 chez les neurones adultes, il fut possible de suggérer que l'expression du co-transporteur est régulée par deux mécanismes en compétition. Le mécanisme supprimant l'expression de KCC2 demeure inconnu, mais comme la voie MAPK est empruntée par un grand nombre de voies de signalisation, le nombre d'effecteurs probables est presque illimité (Ludwig *et al.*, 2011).

La kinase WNK1 et le co-transporteur KCC2, tous deux localisés au niveau du système nerveux périphérique interagissent afin de contrôler le volume cellulaire en défense des changements de tonicité extracellulaire (Kahle *et al.*, 2010). Contrairement à l'interaction avec NKCC1 qui passe par l'entremise des kinases SPAK et OSR1, le mécanisme d'action de WNK1 sur KCC2 n'est pas encore connu (figure 5). La kinase WNK1 jouerait le rôle d'osmosenseur et pourrait réguler la concentration de calcium intracellulaire dans les neurones centraux et périphériques, ce qui permettrait, comme mentionné précédemment, d'établir la polarité des neurotransmissions GABAergiques (Ben-Ari *et al.*, 1989; Kahle *et al.*, 2010; Bertram *et al.*, 2011).



**Figure 4: Modèle d'interaction entre WNK1 et KCC2.** La phosphorégulation du co-transporteur NKCC et KCC par la kinase WNK1 dépend de la concentration intracellulaire de chlorure et/ou de l'hypertonicité extracellulaire. L'interaction entre WNK1 et KCC n'est pas encore élucidée. (Kahle *et al.*, 2010)

En bref, KCC2 aurait plusieurs rôles primordiaux découlant ou non de sa fonction de régulation du chlorure intracellulaire, soit la migration neuronale, le développement, la formation des synapses inhibitrices et excitatrices ainsi que la neuroprotection. Ce co-transporteur, ainsi que sa contrepartie, le co-transporteur NKCC, sont respectivement désactivé et activé par la kinase WNK1. En effet, cette régulation s'effectue par phosphorylation à sérine/thréonine en réponse à l'hypertonicité extracellulaire. Également, la kinase WNK1 interagit avec les kinases SPAK et OSR1, par contact direct impliquant leur domaine C-terminal, qui serviraient alors de kinases effectrices sur NKCC en réponse

au signal d'osmosenseur de WNK1 à la défense du volume cellulaire, du transport épithélial et au maintien de la concentration de chlorure intracellulaire, déterminant la polarité des neurotransmissions GABAergiques (Kahle *et al.*, 2010). L'interaction entre WNK1, plus précisément l'isoforme sous-localisé WNK1/HSN2, et KCC2 pourrait donc s'avérer impérative à un développement adéquat du système nerveux périphérique.

## **Le poisson zèbre comme modèle développemental**

Le poisson zèbre est un modèle animal de premier ordre en ce qui a trait à l'étude du développement. En effet, ce vertébré présente une organisation des tissus et des organes communs conservée, incluant le cerveau et la moelle épinière (Kabashi *et al.*, 2010). Les mécanismes sous-tendant l'embryogenèse sont phylogénétiquement conservés (Bandmann et Burton, 2010). Le développement précoce du poisson zèbre est externe, rapide et accessible. En effet, la fertilisation des œufs est externe et permet un développement rapide et synchronisé, où le premier jour de développement représente l'équivalent du premier trimestre du développement mammifère (Kabashi *et al.*, 2010). L'embryon entier, ainsi que la membrane protectrice l'entourant, le chorion, sont transparent, permettant une observation aisée de la morphologie dès la fertilisation et même chez la larve nageant librement et se nourrissant d'elle-même. L'embryon se libérera de son chorion vers deux jours post-fertilisation (*2 days post-fertilisation; 2 dpf*) et commencera à se nourrir à environ 5 dpf. Entre temps, tous les organes majeurs se seront développés et auront commencé à exercer leur fonction (Veldman et Lin, 2008), l'embryon pourra alors survivre par les réserves contenues dans son vitellus, obtenant son oxygène par diffusion passive, sans besoin de système circulatoire fonctionnel (Kabashi *et al.*, 2010).

La transparence de l'embryon permet non seulement une observation expérimentale de procédés développementaux comme la division cellulaire, la migration et la

différenciation, mais permet également l'usage de méthodes de visualisation par fluorescence qui ne sont pas envisageables chez des vertébrés supérieurs, telles que l'expression de gènes rapporteurs fluorescents, ou la génération de lignées transgéniques arborant un marquage fluorescent de sous-populations cellulaires qui sont observables chez l'animal vivant. L'usage de poissons transgéniques exprimant une protéine fluorescente permet également l'étude développementale à haute résolution d'interactions cellulaires en temps réel (Bandmann et Burton, 2010). Le poisson zèbre est utile quant à la modulation de l'expression génique. Effectivement, son développement externe permet l'accès facile à l'étude d'expression et de fonction génique à travers le développement. Son génome a été séquencé (quoique pas entièrement annoté) et la plupart de ces gènes à haute syntenie et homologie avec l'humain peuvent être manipulés par approche de gain et perte de fonction. Ceci est possible par l'expression (sur-expression) de transcrits humains, soit de type sauvage ou mutés, ou par *knockdown* de l'homologue génique du poisson zèbre par injection d'oligonucléotide morpholino antisens (AMO). (Kabashi *et al.*, 2010; Kabashi *et al.*, 2011)

Ce modèle est utile pour l'étude de pathologies humaines, car il existe de fortes similarités génomiques et moléculaires entre le poisson zèbre et d'autres vertébrés comme l'humain et la souris (Veldman et Lin, 2008). Il se porte également à l'étude de maladies associées à la neurodégénérescence puisqu'il existe un haut degré de conservation fonctionnelle entre les gènes humains impliqués dans les pathologies neurodégénératives et leur orthologue chez le poisson. Ceci permet une conservation des voies moléculaires pathologiques et une observation de changements post-translacionnels spécifiques à certaines pathologies bien connues, comme la maladie de Parkinson ou bien la maladie d'Alzheimer. Des changements pathologiques ont été évoqués chez le poisson suite à une modulation génique ubiquitaire, ce qui reflète la situation se présentant lors de pathologie neurodégénérative humaine. Il est alors possible d'émettre l'hypothèse que les découvertes moléculaires en ce qui a trait à la neurodégénérescence effectuées à l'aide de ce modèle, par



exemple suite à un criblage à haut débit de composés thérapeutiques, seront applicables aux mammifères (Bandmann et Burton, 2010).

Quoique plus simple que l'humain, le poisson zèbre peut s'avérer tout de même complexe, présentant des fonctions neurales intégrées comme la mémoire, la réponse conditionnée et les comportements sociaux. La simplicité relative de son système nerveux facilite l'usage du poisson zèbre à des fins d'analyse. En effet, le système nerveux du poisson zèbre, comme la plupart de ses organes, est similaire à celui de l'humain en ce qui a trait à sa structure, à l'exception du télencéphale, qui ne comporte qu'un cortex rudimentaire. Il est même possible de visualiser le système de neurotransmetteurs complet dès 5 dpf et le poisson aura déjà commencé à présenter un réel répertoire de réponses comportementales stéréotypées (Mathur et Guo, 2010). Environ 17 heures après la fertilisation (*17 hours post-fertilization*, 17 hpf), les premières contractions (*coiling*) seront observables chez l'embryon toujours enfermé dans son chorion. Peu de temps après, il deviendra sensible au toucher, à l'apparition dans la moelle de ses neurones sensoriels transitoires, les Rohon-Beards, qui partageront la tâche avec les neurones du ganglion spinal (*dorsal root ganglion cells*) vers 3dpf, puis seront complètement remplacés par ceux-ci vers 5dpf (Svoboda *et al.*, 2001; Reyes *et al.*, 2004). Vers 27hpf, la nage en bonne et due forme s'installe chez l'embryon. Suivant son éclosion, la larve pourra enfin commencer ses épisodes de nage de courte durée (*burst swimming*), qui prendront vers 4dpf la séquence de battement-et-glissement (*beat-and-glide swimming*) que le poisson conservera à l'âge adulte (Brustein *et al.*, 2003).

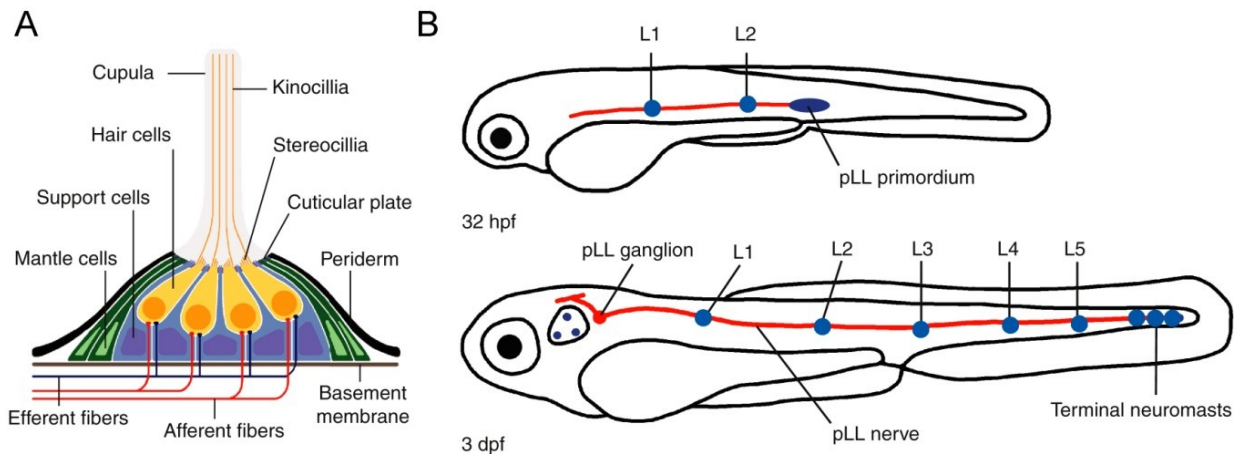
### **La ligne latérale embryonnaire**

Comme chez l'humain, le poisson zèbre capte l'information relative à son environnement à l'aide d'organes sensoriels spécialisés incluant les yeux, le système olfactif et les oreilles. Le poisson zèbre possède cependant un organe sensoriel

supplémentaire : la ligne latérale (Mathur et Guo, 2010). La NHSA de type 2 étant une pathologie affectant strictement le système nerveux sensoriel périphérique, la ligne latérale postérieure du poisson zèbre sera utilisée comme système équivalent dans cette étude.

Ce système mécanosensoriel, agissant comme un « toucher à distance » permettant au poisson de percevoir les vibrations de l'eau, est impliqué dans un éventail de comportements, de la parade de séduction, en passant par la détection de proie et même un comportement censément aussi simple que la nage en banc. Ce système se divise en deux branches : la ligne latérale antérieure, responsable de l'innervation de la tête, et la ligne latérale postérieure, responsable de l'innervation du tronc et de la queue du poisson. La formation de la ligne latérale commence au niveau du rhombencéphale, dans la région post-otique, sous forme de placode ectodermique d'environ 100 cellules qui se divisera en deux parties, formant le ganglion crânien et le primordium de la ligne latérale postérieure (LLP). Vers 20hpf ce primordium (primI) débutera sa migration caudale le long du septum musculaire qui se terminera à l'extrémité de la queue à environ 40hpf. Le primordium en mouvement est accompagné des axones en extension provenant du ganglion où des cellules gliales vont migrer pour myéliniser les nerfs de la LLP. En tout et partout, cinq groupes d'une vingtaine de cellules auront été déposés le long de la queue (nommés L1 à L5) et deux à trois groupes seront issus de la fragmentation du primordium à la fin de sa migration (nommés terminaux) (figure 6). Ces pro-neuromastes sont le résultat d'un dépôt engendré par le ralentissement du primordium migrant à des endroits prédéterminés et reproductibles. Quelques heures suivant le dépôt, chaque pro-neuromaste se différenciera et formera un neuromaste mature, comprenant jusqu'à 20 cellules ciliées mécanosensorielles entourées de deux types de cellules accessoires, soit les cellules de support et les cellules du manteau. Un second primordium, primII, commence sa migration au moment où le premier atteint l'extrémité de la queue. Il contient moins de cellules et son rythme est beaucoup plus lent que primI, lui permettant d'atteindre la moitié du chemin en environ une semaine. À trois jours de développement (72hpf), la ligne latérale embryonnaire sera composée des

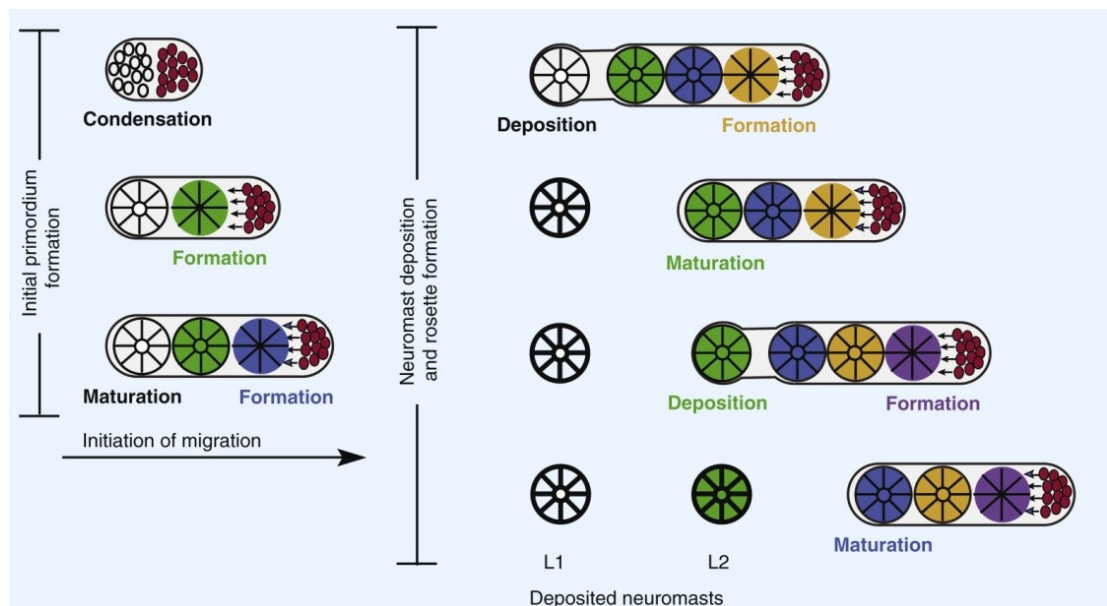
neuromastes déposés par primI et de deux neuromastes s'intercalant entre L1 et L2 (soit LII.1 et LII.2) déposés par primII (Ghysen et Dambly-Chaudière, 2003; Ghysen et Dambly-Chaudière, 2007). Les cellules ciliées mécanosensorielles des neuromastes matures sont innervées par des neurones sensoriels bipolaires étendant leurs projections du rhombencéphale (Dambly-Chaudière *et al.*, 2003). Un neurone afférent peut innerver plusieurs cellules ciliées, formant des terminaux bulbeux, et peut également établir plus d'un contact synaptique avec une seule cellule ciliée (Liao, 2010; Trapani et Nicolson, 2011).



**Figure 5: Organisation du neuromaste et carte de dépôt des pro-neuromastes.** A- Anatomie du neuromaste, B- Carte de dépôt des pro-neuromastes à différents stades de développement. (Adapté de Ma et Raible, 2009)

Le primordium est un organe très dynamique qui doit palier au dépôt de pro-neuromaste par une activité mitotique et une réorganisation constante. En effet, au début de la migration, les cellules du primordium prolifèrent et s'organisent en rosettes entourant des cellules particulières exprimant *atoh1*, préfigurant le pro-neuromaste qui sera déposé. La signalisation incluant *atoh1*, *notch3* et *deltaA/B* est impliquée dans l'organisation du primordium, mais aussi dans la différenciation une fois le pro-neuromaste déposé. Une période de quiescence s'installe ensuite jusqu'au dépôt, suivie d'une nouvelle période de prolifération. Les périodes de mitoses et de quiescence du primordium sont donc régulées

dans l'espace et dans le temps, suivant le développement de la LLP. Également, trois zones sont délimitées à l'intérieur même du primordium incluant la zone de tête et la zone de queue. La zone de queue n'a pas d'activité mitotique, comprenant la rosette qui sera déposée comme pro-neuromaste. La zone de tête aura une activité mitotique afin de former une nouvelle rosette, ramenant à trois le total de rosettes du primordium migrant (figure 7). Ces cycles de mitose-quiescence seraient régulés génétiquement, indépendamment de la taille du primordium, et permettraient d'anticiper le nombre de cellules requises à l'établissement d'une LLP en bonne et due forme. Lors de situations anormales, la taille du primordium est régulée par mécanisme apoptotique, induisant la mort cellulaire chez des cellules progénitrices considérées superflues (Laguerre *et al.*, 2009).



**Figure 6: Modèle de segmentation du primordium de la LLP.** Suite à sa formation en trois rosettes, le primordium quitte la placode céphalique et migre le long du tronc. Il dépose des pro-neuromastes et maintient le nombre de cellules le composant par un processus de mitose se produisant en tête du primordium. (Adapté de Ma et Raible, 2009)

Le poisson zèbre a la capacité de régénérer les cellules ciliées composant ses neuromastes, avec un renouvellement total seulement 72h après lésion. Le même nombre

de cellules qui étaient présentes à l'origine sont produites, indiquant un mécanisme limitant le nombre de cellules ciliées au sein des neuromastes (Ma et Raible, 2009). L'innervation par des axones afférents lors de la régénération dépend de l'expression du facteur neurotrophique dérivé des glies, le GDNF. Celui-ci est exprimé par le primordium migrant lors de l'établissement de la LLP, mais est aussi exprimé par les glies entourant les cellules inter-neuromastes. Ces glies serviraient à réprimer la différenciation chez les cellules inter-neuromastes qui sont réactivées lors de processus de régénération ou lors de production de neuromastes supplémentaires par migration verticale plus tard dans la vie du poisson (Schuster *et al.*, 2010).

### **La moelle épinière**

Le modèle poisson zèbre est avantageux en ce qui a trait à l'étude du système nerveux car le développement de sa moelle épinière est rapide. Effectivement, la neurogenèse commence dès 10 hpf, la synaptogenèse dès 18hpf et l'embryon éclos vers 48hpf (soit lors de la deuxième journée après la fertilisation). Dès la première journée de développement, plusieurs traits du système nerveux central sont présents et des populations neuronales identifiables peuvent être étudiées. À ce stade développemental, la moelle est sous divisée en somites qui ne contiennent chacun pas plus de 12 types cellulaires, formant des circuits simples (Kabashi *et al.*, 2010).

La moelle du poisson zèbre est composée d'un nombre restreint de neurones qui sont répétés dans chaque segment. Au moment des premières contractions de l'embryon (17hpf), on y retrouve des motoneurones primaires ainsi que des interneurones. Vers 20hpf, ces neurones développeront des prolongations axonales qui vont s'organiser en amas. Parmi ces neurones, on retrouve les neurones sensoriels Rohon-Beards mentionnés précédemment ainsi que des interneurones. Plus tardivement, encore plus d'interneurones seront formés et

un nouveau groupe de motoneurones, les secondaires, commenceront à apparaître, coïncidant avec le début de la nage chez l'embryon (Brustein *et al.*, 2003).

Au niveau de la moelle, le co-transporteur KCC2 joue un rôle majeur dans le développement car il est responsable du revirement de la réponse GABAergique. En effet, son expression marque le début de la neurotransmission inhibitrice, permettant la maturation du réseau neuronal. L'action dépolarisante du GABA (et de la glycine) sont impliquées dans la prolifération, la migration, la différenciation, le guidage axonal, l'arborisation dendritique et la synaptogenèse autant au sein du système nerveux immature que mature. L'expression dans le temps de KCC2 est essentielle à sa fonction, étant régulé et exprimé en parallèle avec la maturation axonale, et sa présence hors de la période appropriée peut altérer les mécanismes auxquels il participe. Chez le poisson zèbre, une sur-expression globale précoce de KCC2 entraîne des défauts de la neurogenèse. En effet, au niveau cellulaire, il est possible d'observer une prolifération et une différenciation réduite des interneurones, sans affecter les neurones moteurs et sensoriels (Côté *et al.*, 2011). Les interneurones semblent arrêtés au stade de progéniteur et ne peuvent par conséquent pas étendre d'axones hors de la moelle. Ces progéniteurs ne semblent pas dégénérer, dû à l'absence de mort cellulaire observable dans la moelle à 28hpf, et n'adoptent pas non plus une destinée gliale, considérée comme option la plus probable, mais semblent demeurer indifférenciés (Reynolds *et al.*, 2008).

## **But**

Le rôle crucial de KCC2 dans la différenciation cellulaire et donc dans l'établissement de réseaux neuronaux est évident chez le poisson zèbre. Sa sous-localisation particulière, strictement neuronale, ainsi que son interaction connue avec la kinase WNK1 mutée chez les patients atteints de la NHTA de type 2 en fait une cible intéressante dans l'établissement d'une voie de signalisation pathogène menant au développement de cette

neuropathie dévastatrice. Cette étude vise à identifier le rôle particulier de l'isoforme protéique WNK1/HSN2, également sous-localisée strictement aux neurones, et à définir son interaction avec le co-transporteur KCC2 dans le contexte de la neuropathie humaine NHSA de type 2.

## Résultats

Considérant l'implication développementale de la kinase, la présence très précoce des symptômes chez les patients atteints de la NHTA de type 2 ainsi que le manque d'innervation sensorielle révélé par les biopsies pratiquées chez ces derniers, notre hypothèse de recherche est la suivante. Les mutations tronquantes menant à la NHTA de type 2 causent une perte de fonction de l'isoforme WNK1/HSN2 spécifique au système nerveux entraînant un défaut dans le développement du système nerveux sensoriel périphérique. Dans cette section, la kinase WNK1, plus précisément son isoforme WNK1/HSN2 a d'abord été caractérisée chez le poisson zèbre embryonnaire quant à son expression dans l'espace et dans le temps. Un modèle *knockdown* pour WNK1/HSN2, dont l'efficacité est révélée par RT-PCR et par buvardage de type Western, a été élaboré afin de nous permettre d'observer le développement en l'absence de cette isoforme et d'émettre une hypothèse quant à son rôle. Le phénotype obtenu par injection d'oligonucléotides morpholinos antisens révèle des défauts dans l'établissement du système sensoriel périphérique qu'est la ligne latérale. Un lien avec le co-transporteur KCC2 est alors établi par un phénotype commun, révélant la possibilité d'une voie moléculaire pathogène.

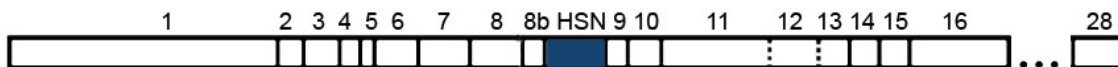
### Identification de WNK1 chez le poisson zèbre

Au début du projet, le génome du poisson n'était pas complètement annoté et il fallut déterminer s'il existait un orthologue de la kinase WNK1. La séquence de la protéine humaine a été utilisée afin de trouver des séquences homologues sur GenBank. Plusieurs orthologues ont été identifiés, dont celui du *Xenopus laevis*, qui a été utilisé dans la recherche de l'assemblage du poisson zèbre par BLAT (*BLAST-like alignment tool, UCSC genome browser*; <http://genome.ucsc.edu/>). Les exons ont été identifiés par alignements de EST (*expressed sequence tag*; marqueur de séquence exprimée) ou par génomique comparative et la séquence d'ADNc a été construite à partir des exons prédits. Les



différents orthologues ont ensuite été alignés par ClustalW afin d'annoter les exons, puis la similarité en acides aminés a été calculée par MatGAT v2.01.

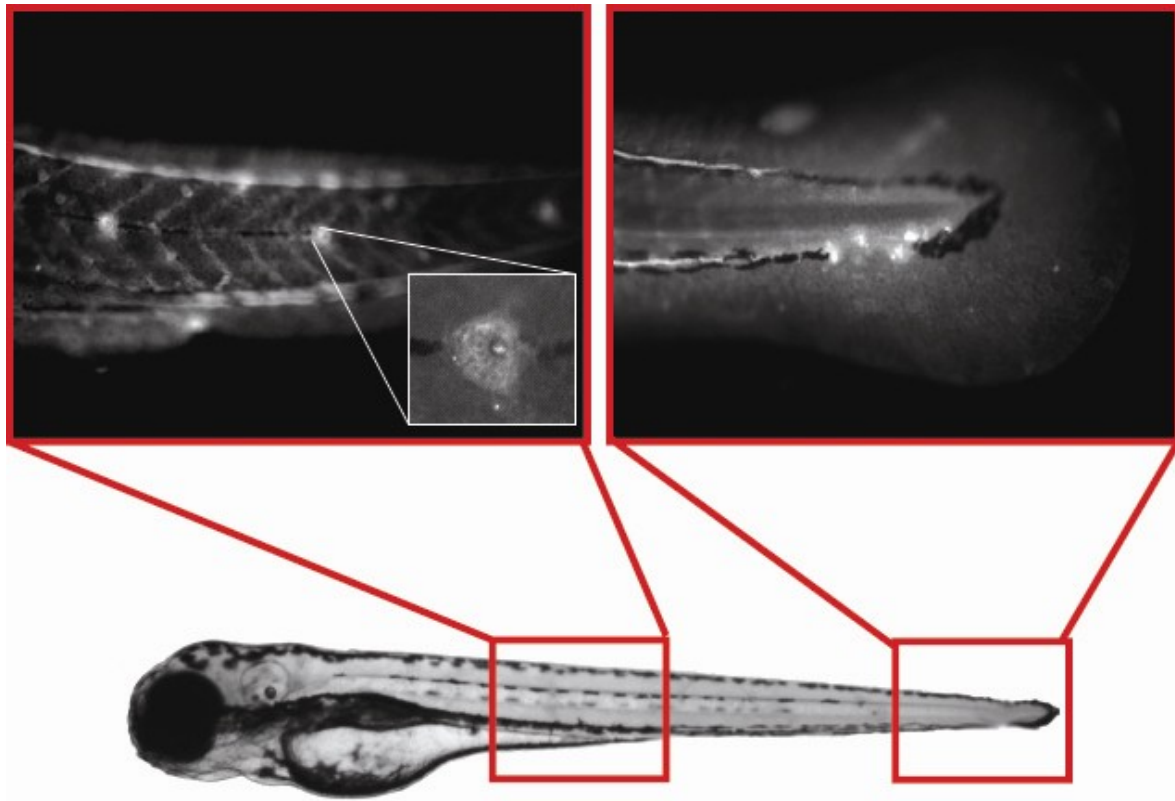
Chez le poisson zèbre, deux loci ont été identifiés comme ayant un haut degré d'homologie avec la séquence peptidique humaine. Ces deux orthologues sont présents sur les chromosomes 4 et 25, quoique seule la copie du chromosome 4 ait conservé l'exon *HSN2* impliqué dans la NHTA de type 2. Cette copie du gène *WNK1* a donc été déterminée comme cible unique au cours des expériences subséquentes (figure 8).



**Figure 7: Structure de *WNK1/HSN2* chez le poisson zèbre.** L'exon HSN2 muté dans les cas de NHTA de type 2 est indiqué en bleu. Il est à noter que les exons 11-13 sont bien conservés mais constituent un seul exon chez le poisson zèbre. (Adapté de Shekarabi *et al.*, 2008)

### ***WNK1/HSN2* est localisé au niveau de la ligne latérale chez le poisson zèbre**

Tout ce qui était connu sur l'isoforme *WNK1/HSN2* tenait à sa localisation particulière et avait été effectué dans le modèle murin. Il était donc impératif de faire un parallèle entre la souris et le poisson zèbre et de montrer une localisation similaire. Aucun anticorps commercial étant disponible alors, des anticorps maison avaient été développés contre la séquence de l'exon HSN2 chez la souris (Shekarabi *et al.*, 2008) et furent conséquemment utilisés chez le poisson. Un marquage en immunohistochimie sur embryon entier révéla la présence de l'isoforme *WNK1/HSN2* dans les neuromastes matures de la ligne latérale, à partir de 48hpf jusqu'à 4dpf (figure 9).

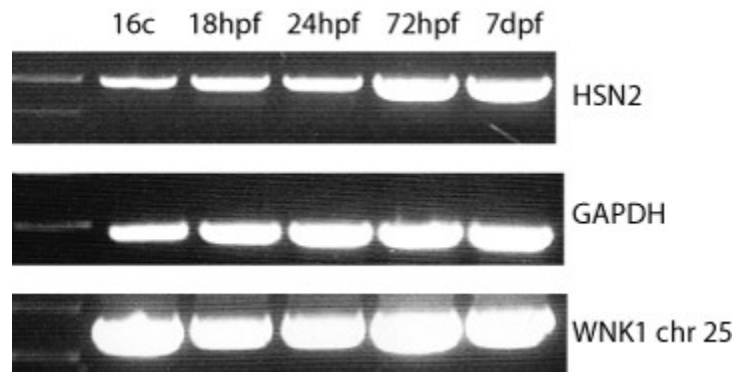


**Figure 8 : Localisation de l'isoforme WNK1/HSN2 par immunohistochimie sur embryon entier.** Des embryons de 4dpf ont été marqués par immunohistochimie, en utilisant un anticorps reconnaissant spécifiquement la séquence de l'exon HSN2. Ceci permet la localisation de l'isoforme WNK1/HSN2 au niveau des neuromastes de la ligne latérale postérieure. Les images ont été capturées en microscopie à fluorescence à magnification 20X.

Des stades plus précoces ne révélèrent aucun signal, laissant présager que l'isoforme n'est pas encore exprimée. Il est possible que WNK1/HSN2 ne soit présente que dans les neuromastes matures par exemple, ou qu'elle y soit en très faible quantité et donc non détectable. Plusieurs anticorps commerciaux contre la kinase WNK1 étaient disponibles, dont celui utilisé précédemment chez la souris, mais aucun d'entre eux n'a donné de résultat notable chez le poisson.

### Expression de l'isoforme WNK1/HSN2 dans le temps

La présence de l'isoforme chez le poisson zèbre est confirmée par détection en immunohistochimie, mais le temps précis de son expression, qui pourrait s'avérer crucial au développement, n'était pas claire. Un patron d'expression temporelle fut dressé, pour l'isoforme WNK1/HSN2 et pour la copie partielle du chromosome 25, par usage de RT-PCR sur extraction d'ARN total. Les amorces furent conçues à partir de la séquence prédite déterminée pour les deux copies de WNK1, afin d'amplifier spécifiquement l'exon HSN2 et le domaine kinase (entre l'exon 1 et 8) de la copie du chromosome 25.



**Figure 9: Expression dans le temps de l'isoforme WNK1/HSN2 et de la copie partielle de WNK1 du chromosome 25 par détection d'ARNm en RT-PCR.** L'ARN total a été extrait d'embryons des stades de 16 cellules (16c), 18, 24 et 72 heures (hpf) et de 7 jours (dpf) après fertilisation. L'ADNc utilisé a été dosé afin de permettre un résultat semi-quantitatif de la quantité d'ARNm présent pour l'isoforme WNK1/HSN2, tel que détectée par la séquence de l'exon HSN2, pour la copie partielle de la kinase WNK1 située sur le chromosome 25, telle que détectée par la séquence contenant le domaine kinase de l'exon 1 à 8, et pour le gène contrôle GAPDH. Des niveaux croissants de WNK1/HSN2 sont détectés, suivant le niveau de GAPDH, alors que la copie partielle de WNK du chromosome 25 semble être fortement exprimée dès la fertilisation.

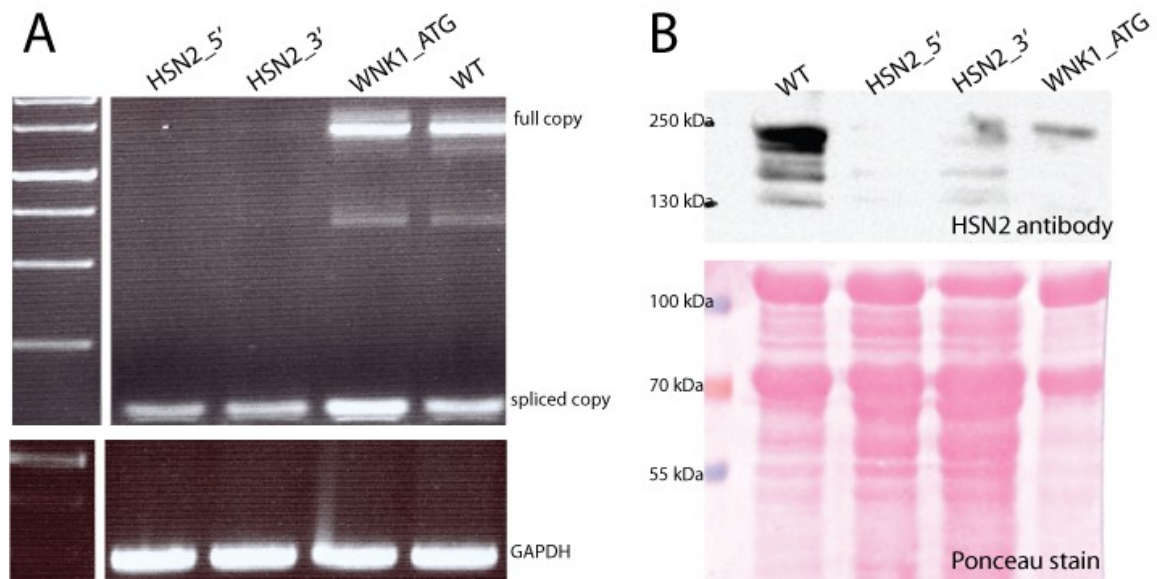
L'ARNm pour les deux cibles est présent dès le stade de 16 cellules (1.5 hpf), indiquant la présence de transcrits maternels (Figure 10). Ceci appuie l'hypothèse que WNK1 et son isoforme WNK1/HSN2 sont impliquées dans le développement. En effet, il a été démontré que les transcrits maternels dirigent le développement embryonnaire avant

l'activation du génome zygotique, qui se produit vers 3.5hpf (Aanes *et al.*, 2011). En plus d'être très précoce, l'expression de l'isoforme WNK1/HSN2 augmente dans le temps, suivant l'expression du contrôle GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, gène domestique) et ce jusqu'au stade de 7dpf, alors que la copie de WNK1 du chromosome 25 semble fortement exprimée dès le stade de 16 cellules.

### **Knockdown de l'isoforme WNK1/HSN2**

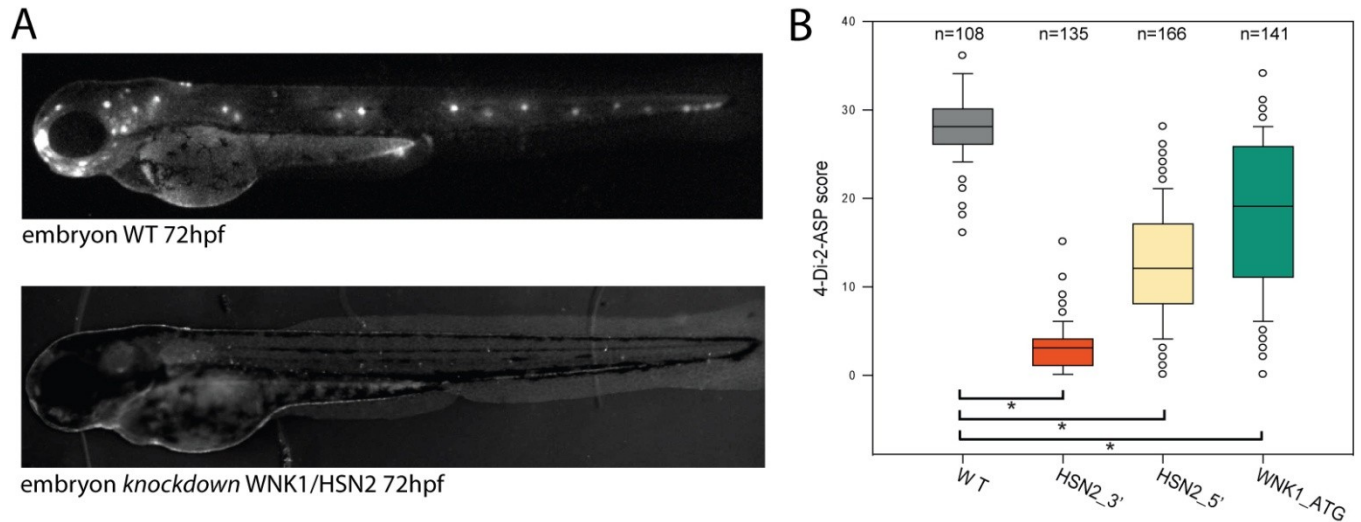
Afin de déterminer le rôle de l'isoforme WNK1/HSN2 au sein du développement du système nerveux du poisson zèbre, un *knockdown* fut produit par usage de nucléotides morpholino antisense (*antisens morpholino oligonucleotides*, AMO). Trois cibles différentes ont été sélectionnées pour la conception des AMO pour permettre une spécificité du phénotype obtenu (Bill *et al.*, 2009). Deux AMO ciblent le site donneur et accepteur d'épissage de part et d'autre de l'exon *HSN2* afin d'inhiber le traitement de l'ARNm par encombrement stérique : *HSN2\_5'* et *HSN2\_3'*, chevauchant respectivement le 5' et le 3' des introns flanquant l'exon cible. Un AMO cible le codon d'initiation de WNK1, bloquant la traduction des ARNm par encombrement stérique du complexe ribosomal : *WNK1\_ATG*. Cette approche permettrait de produire un *knockdown* de toutes les isoformes protéiques issues de la copie de WNK1 située sur le chromosome 4. Considérant le taux élevé de conservation de la copie de WNK1 du chromosome 25 (qui ne contient toutefois pas l'exon *HSN2*) et son expression élevée dès le stade de 16 cellules confirmé par RT-PCR (Figure 10), il est possible d'assumer que celle-ci produit un sauvetage des autres isoformes généralement traduites de la copie WNK1 du chromosome 4. Ceci permettrait donc d'obtenir un *knockdown* efficace de l'isoforme WNK1/HSN2, tout comme par l'usage des AMO modifiant l'épissage.

L'efficacité du *knockdown* par modification de l'épissage a pu être vérifiée en RT-PCR, car cette approche produit un ARNm mature présentant une structure altérée. En effet, en utilisant des amorces flanquant l'exon à sauter (ici HSN2), il fut possible d'observer une réduction dans la taille du produit obtenu. La localisation des amorces à l'intérieur des exons 8 et 9 permet de confirmer qu'aucun intron n'a été inclus suite à la présence de l'AMO, ce qui est une conséquence possible de cette approche (Bill *et al.*, 2009) (figure 11, A). Un buvardage de type Western a été effectué sur des homogénats de protéines extraites d'embryons *knockdown* afin de confirmer la réduction attendue de l'isoforme protéique WNK1/HSN2, tel que détectée par l'anticorps maison utilisé précédemment en immunohistochimie et chez la souris (Shekarabi *et al.*, 2008) (figure 11, B).



**Figure 10: Confirmation de l'efficacité des AMO.** **A-** L'effet des AMO HSN2\_5' et HSN2\_3' sur l'épissage est observable en RT-PCR par usage d'amorces flanquant le gène à sauter, ici HSN2 situant dans l'exon 8 et 9. Deux produits sont visibles, soit la séquence complète (*full copy*) entre l'exon 8 et 9 et la séquence épissée (*spliced copy*) où l'exon HSN2 est manquant. Des embryons de type sauvage et *knockdown* pour WNK1/HSN2 de 72hpf ont été utilisés pour l'extraction d'ARN total. **B-** La baisse de quantité de protéines traduites suite à l'usage des AMO est détectable en immunobuvardage de type Western en utilisant un anticorps reconnaissant l'exon HSN2 spécifiquement, et ce dans les trois conditions AMO. Les homogénats de protéines ont été obtenus d'embryons entiers de 4 jours post fertilisation (dpf), injectés ou non, et dosés par méthode de Bradford. Le marquage Ponceau est présenté comme contrôle de la quantité de protéines chargées dans les puits (75µg/puits).

Les embryons *knockdown* ont présenté une morphologie normale, si ce n'est qu'un léger retard développemental, non détectable après 48hpf. Afin de visualiser l'organe mécanosensoriel du système nerveux périphérique qu'est la ligne latérale postérieure, le colorant vital 4-di-2-ASP (4-(4-diethylaminostyryl)-N-methylpyridinium) fut utilisé (Collazo *et al.*, 1994; Hernandez *et al.*, 2006). Suite à l'incubation dans ce colorant vital, les embryons ont été anesthésiés et observés. Il a ainsi été possible d'observer que les embryons *knockdown* pour les trois différentes AMO présentaient une ligne latérale déficiente (figure 12,A). Afin de quantifier ce phénotype, un pointage a été attribué à chaque neuromaste de la ligne latérale postérieure, selon la méthode du *4-di-2-ASP score* (Harris *et al.*, 2003). Cette méthode permet de tenir compte non seulement de la présence des neuromastes mais aussi de leur taille en accordant deux points à un neuromaste entier et brillant, un point à un neuromaste partiel ou sombre et aucun point aux neuromastes manquants. Les résultats du *4-di-2-ASP score* sont tabulés dans un diagramme à boîtes, car les résultats ne suivent pas une distribution normale (figure 12, B). La méthode de Dunn (comparaisons multiples) a permis de déterminer que chacun des trois groupes *knockdown* a un pointage au *4-di-2-ASP score* statistiquement différent du groupe contrôle ( $P < 0.05$ ).

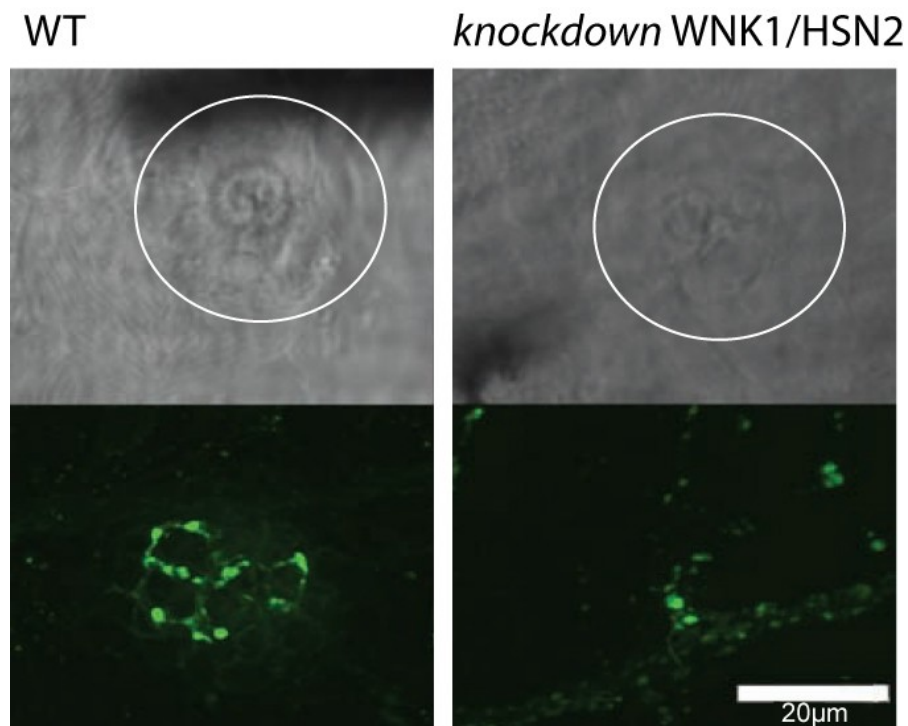


**Figure 11 : Phénotype des embryons knockdown pour WNK1/HSN2.** **A-** Marquage de la ligne latérale des embryons de type sauvage (WT) et des embryons *knockdown* à 72 heures post-fertilisation (hpf) pour WNK1/HSN2 par usage du colorant vital 4-di-2-ASP. L'embryon *knockdown* (par usage de l'AMO HSN2\_3' représentatif des trois conditions de *knockdown*) présente un défaut très apparent dans l'établissement de la ligne latérale. **B-** Diagramme en boîtes pour compte 4-di-2-ASP des embryons *knockdown* pour les trois approches AMO, soit HSN2\_3', HSN2\_5' et WNK1\_ATG, représentés respectivement en orange, beige et vert. Les délimitations de la boîte représentent le 25<sup>e</sup> et le 75<sup>e</sup> rang centile, alors que la barre du centre représente le 50<sup>e</sup> rang centile, et donc, la valeur médiane. Les traits représentent les valeurs minimales et maximales et les valeurs isolées sont représentées par de points. Les embryons *knockdown* présentent un pointage significativement inférieur lorsque comparé avec un groupe contrôle non-injecté (WT, représenté en gris), indiquant de graves défauts de développement de la ligne latérale postérieure.

### Innervation des neuromastes

Le *knockdown* de l'isoforme WNK1/HSN2 entraîne un développement anormal de la ligne latérale postérieure, telle que détectée par le colorant vital 4-di-2-ASP. Ce colorant s'incorpore dans les neuromastes par les canaux de mécanotransduction et permet donc de visualiser les cellules ciliées fonctionnelles (Hernández *et al.*, 2005). Il était par conséquent possible que la ligne latérale soit structurellement établie, mais non fonctionnelle. Ceci pourrait indiquer un défaut dans le mécanisme d'innervation des neuromastes et non dans leur établissement. Pour confirmer que le phénotype obtenu est bien dû à un défaut dans

l'établissement de la ligne latérale, de l'immunohistochimie fut effectuée sur des embryons *knockdown* afin de marquer la protéine SV2 (*synaptic vesicle protein 2*) localisée aux terminaux pré-synaptiques. Suite à l'identification de la structure de neuromastes à la surface de la peau, l'innervation des cellules ciliées par des neurones sensoriels afférents a été observée en fluorescence. Tous les neuromastes observés ont présenté un certain degré d'innervation; les embryons *knockdown* présentaient moins de prolongations et de terminaisons synaptiques bulbeuses des neurones sensoriels afférents que les embryons de type sauvage (figure 13). Il est important de noter que seuls les neurites bulbeux forment des synapses avec les cellules ciliées (Faucherre *et al.*, 2009).

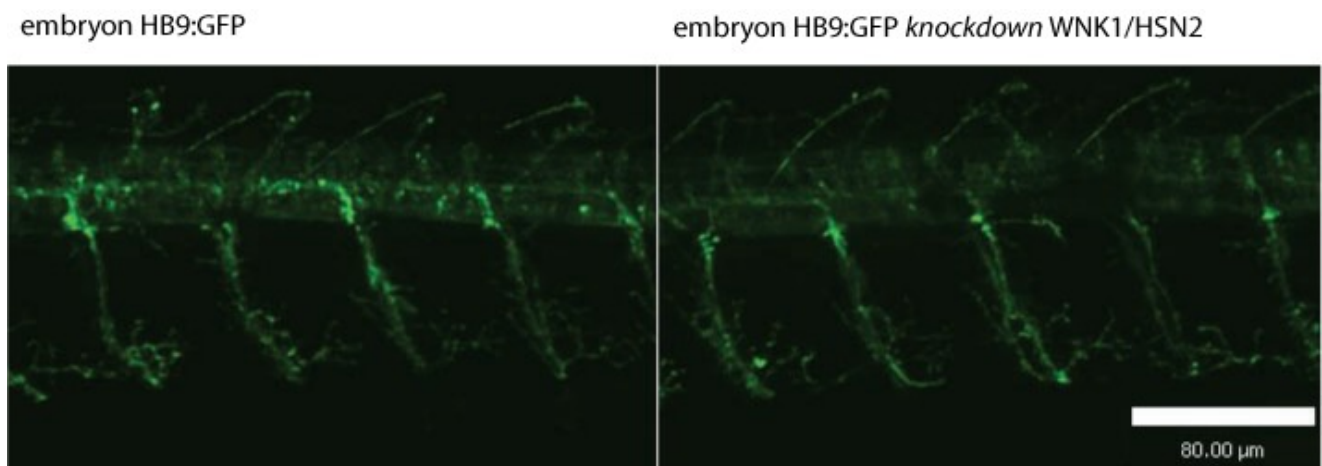


**Figure 12: Innervation des neuromastes chez les embryons *knockdown* par immunohistochimie de la protéine synaptique SV2.** Des embryons de 72 heures post-fertilisation (hpf) de type sauvage ainsi que des embryons *knockdown* pour WNK1/HSN2 (résultat représentatif pour le morpholino HSN2\_5') ont été marqués en immunohistochimie sur embryon entier afin de visualiser la protéine SV2 présente aux vésicules synaptiques. Les images ont été prises en microscopie confocale (40X) et révèlent un neuromaste peu innervé et possédant un nombre restreint de synapses pour l'embryon *knockdown* lorsque comparé avec un embryon de type sauvage (WT).



### Neurones moteurs

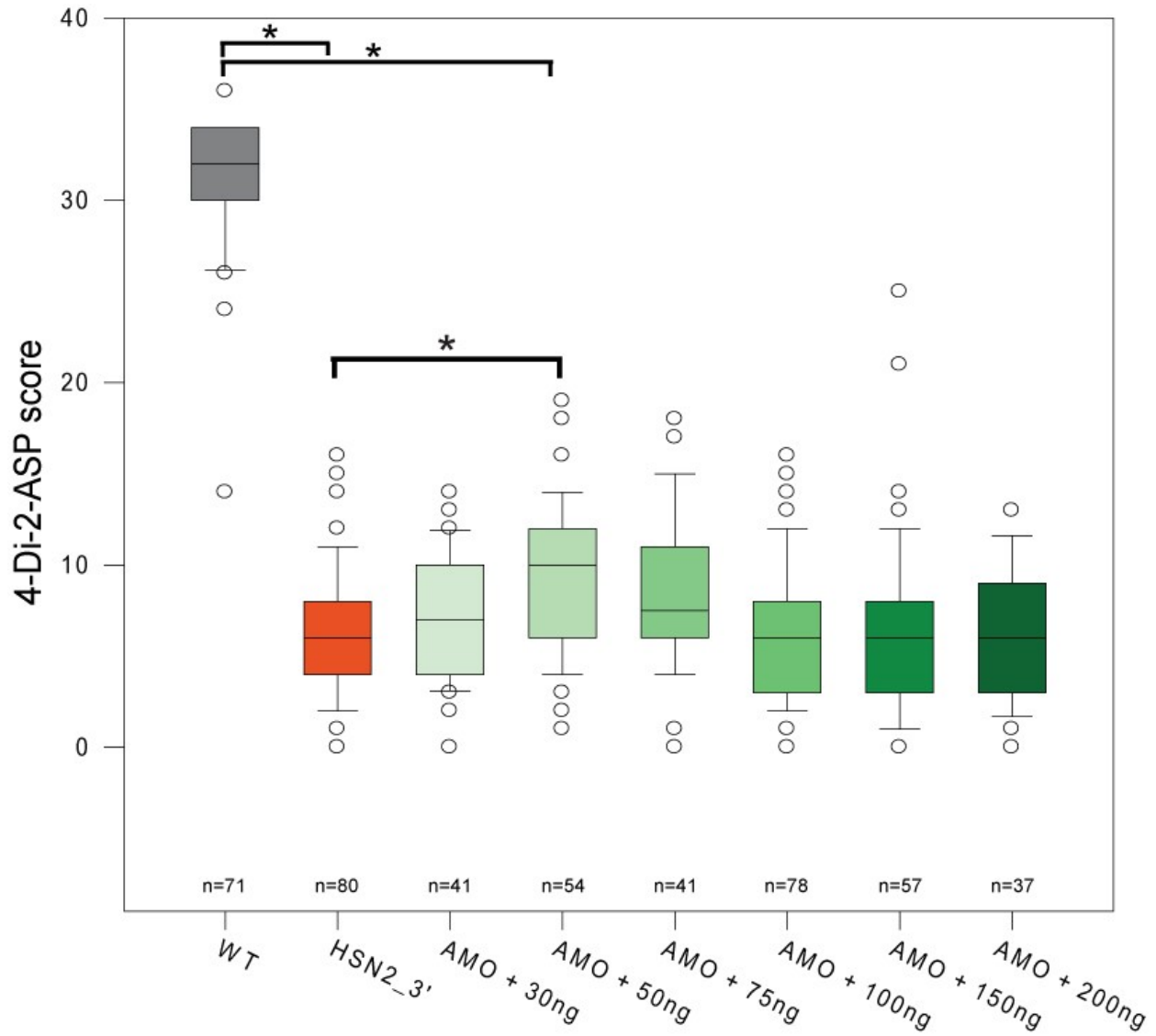
Afin d'observer si le *knockdown* de WNK1/HSN2 affecte le système moteur en plus du système sensoriel périphérique, des injections d'AMO ont été effectuées dans des œufs de poissons transgéniques exprimant le GFP (*green fluorescent protein*) sous le promoteur HB9, produisant des motoneurones fluorescents (figure 14). Le système moteur des embryons *knockdown* n'est semblablement pas affecté au niveau du développement, produisant ainsi un comportement normal. Ces résultats reflètent la présentation clinique des patients atteints de la NHTA de type 2 qui n'ont pas de dysfonction motrice.



**Figure 13: Les embryons knockdown ne présentent pas de défauts d'innervation motrice.** Des embryons de 48 heures post-fertilisation (hpf) de la lignée HB9:GFP exprimant le GFP dans les neurones moteurs ont été injectés afin de produire des embryons *knockdown* pour WNK1/HSN2 (résultat représentatif pour le morpholino WNK1\_ATG). Ces embryons n'ont pas présenté de défauts dans l'établissement de leurs neurones moteurs lorsque comparés avec des embryons HB9:GFP non-injectés. Les images des somites 15-19 ont été prises en microscopie confocale (10X), les embryons étaient immobilisés dans de l'agarose 2% après avoir été anesthésiés avec de la tricaine 0,02 % et orientés la tête vers la gauche et le dos vers le haut.

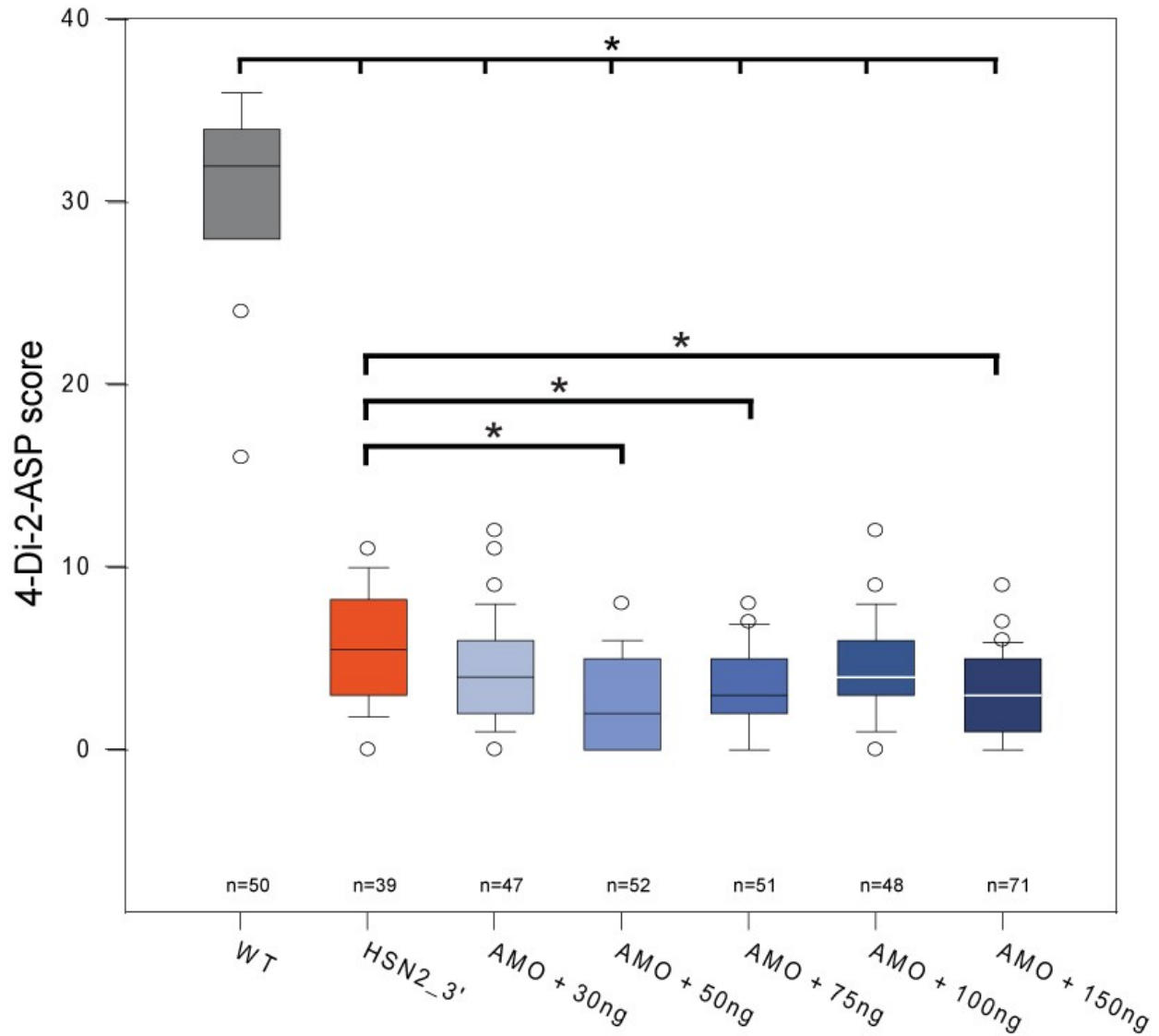
### **Expérience de sauvetage du phénotype *knockdown***

En plus d'utiliser plusieurs AMO ciblant différentes séquences pour obtenir un *knockdown* spécifique, il est préférable d'effectuer un sauvetage du phénotype par injection d'ARN de type sauvage (Eisen et Smith, 2008; Bill *et al.*, 2009). Dans ce cas-ci, comme la séquence de WNK1 n'est pas déterminée définitivement chez le poisson et comme cette kinase produit plusieurs isoformes dont les patrons d'épissages ne sont pas élucidés, deux constructions ont été conçues à partir de clones humains : HY02 (construction partielle WNK1 exon1-HSN2) et IC17 (construction complète WNK1 exons 1-28, sans petits exons 11-12). Afin de réduire le nombre d'expériences individuelles à faire pour effectuer le sauvetage du phénotype, seul l'AMO le plus efficace (HSN2\_3' selon les résultats présentés à la Figure 12) a été sélectionné. La construction complète a d'abord été utilisée car elle possède le plus d'homologie avec la séquence prédite pour l'isoforme WNK1/HSN2 et est donc plus pertinente pour effectuer un sauvetage du phénotype *knockdown*. Des quantités de 30ng/μl à 200ng/μl d'ARN ont donc été co-injectées avec l'AMO et le test du *4-di-2-ASP score* fut effectué (figure 15). Seule une injection de 50ng/μl a révélé un pointage au *4-di-2-ASP score* plus élevé et statistiquement significatif ( $P < 0.05$ ), du groupe contrôle (groupe injecté avec l'AMO seul) et donc un phénotype atténué indiquant un sauvetage partiel par la protéine humaine du *knockdown* de WNK1/HSN2 du poisson zèbre.

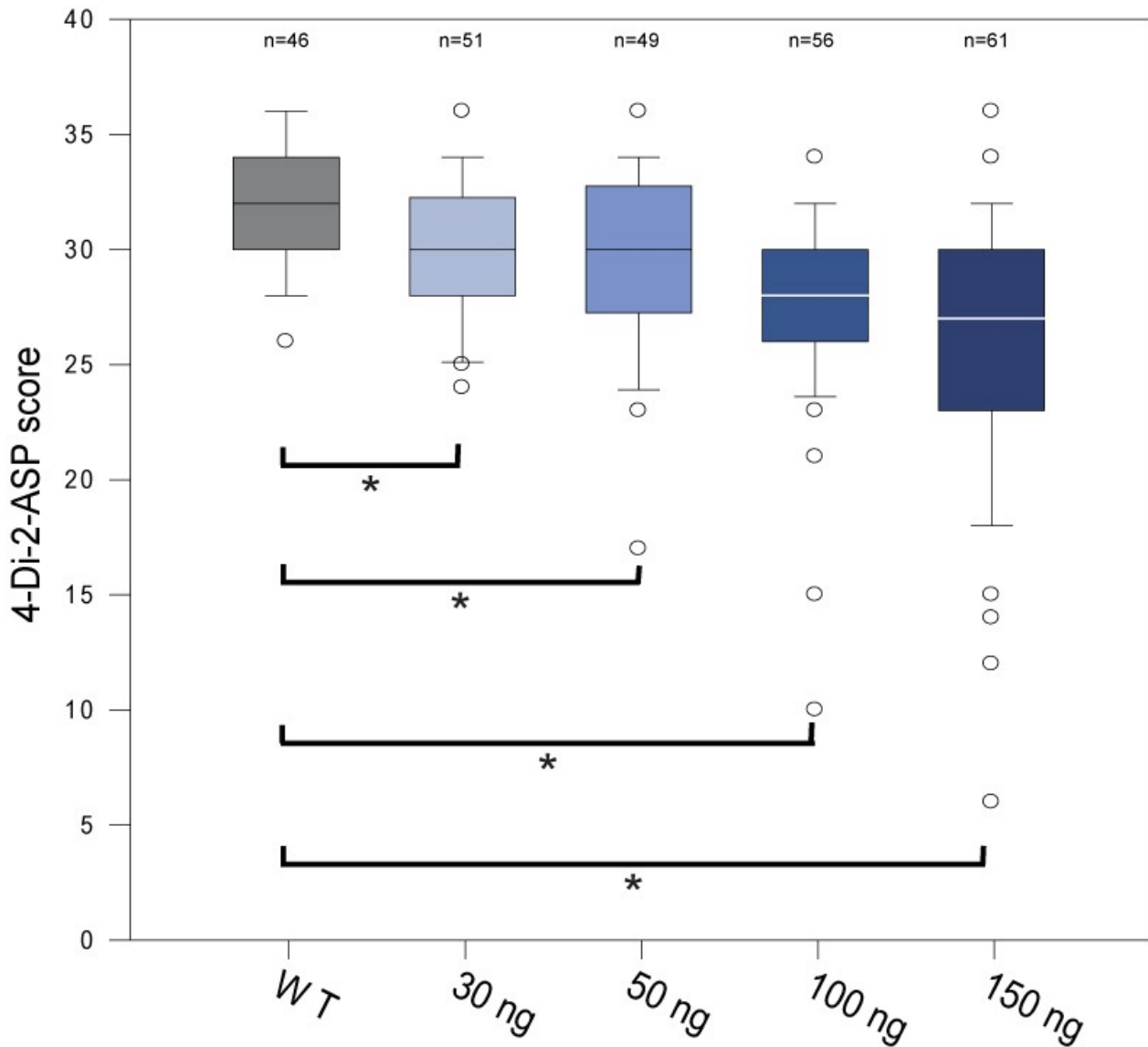


**Figure 14: Diagramme en boîtes du pointage 4-di-2-ASP pour le sauvetage par injection d'ARN de la construction complète de WNK1/HSN2 humain.** Des œufs ont été injectés avec l'AMO HSN2\_3', ainsi qu'avec des quantités croissantes d'ARN de la construction complète de WNK1/HSN2 humain et les embryons produits ainsi ont été marqués au colorant vital 4-di-2-ASP au stade de 72 heures post-fertilisation (hpf) afin de révéler leur ligne latérale postérieure. Le pointage du 4-di-2-ASP score a été attribué tel que mentionné précédemment afin de tenir compte de la présence mais aussi de la taille des neuromastes individuels. Les délimitations de la boîte représentent le 25e et le 75e rang centile, alors que la barre du centre représente le 50e rang centile, et donc, la valeur médiane. Les traits représentent les valeurs minimales et maximales et les valeurs isolées sont représentées par des points. Il est possible d'observer un sauvetage partiel du phénotype *knockdown* pour une co-injection de 50ng/ $\mu$ l d'ARN de la construction complète de WNK1/HSN2 humain, lorsque comparé avec des embryons injectés avec l'AMO seul.

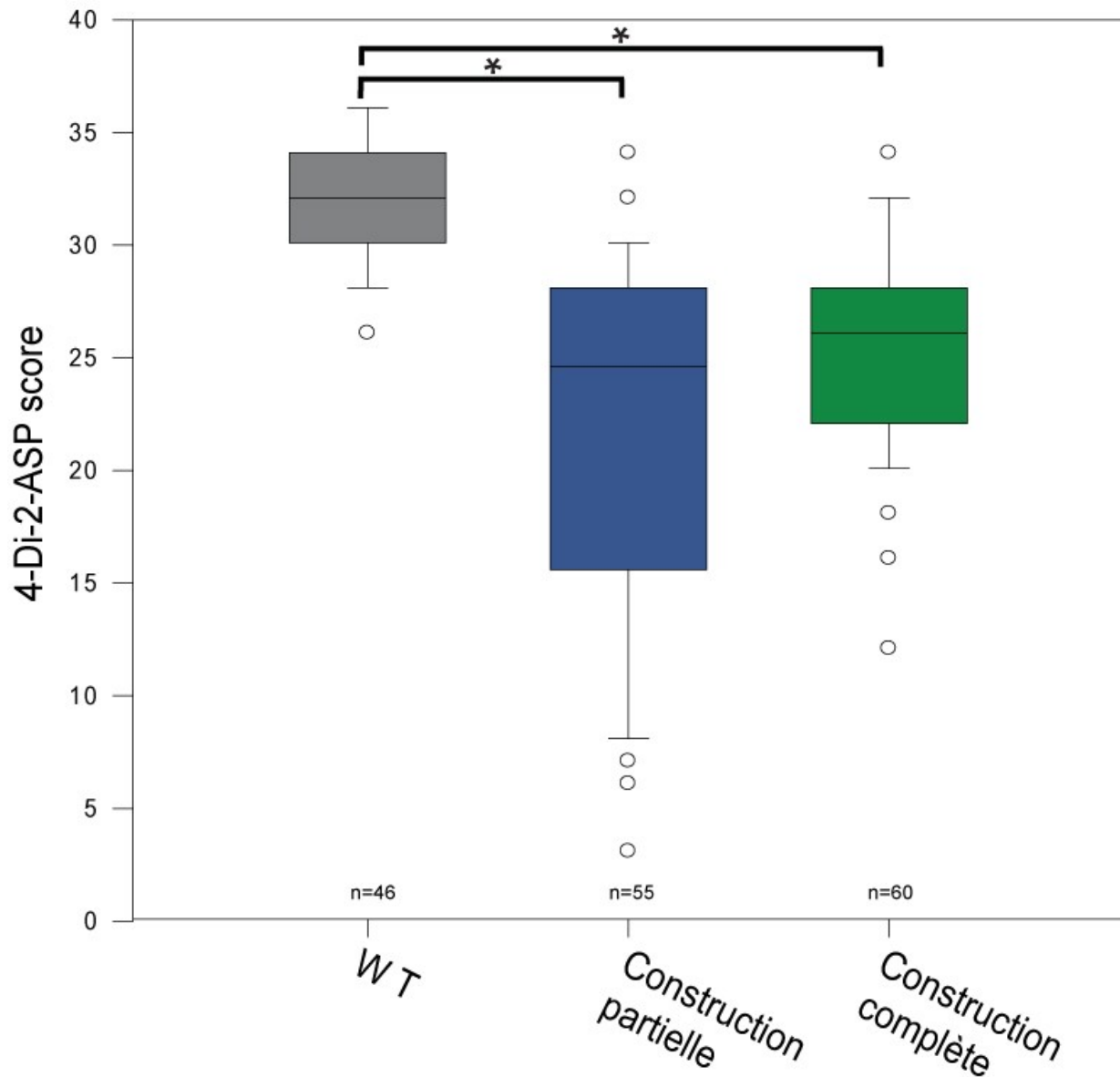
La construction partielle (séquence codant pour WNK1 de l'exon1 à l'exon HSN2 seulement) a ensuite été utilisée afin d'observer si un ARN simulant les mutations tronquantes menant à la NHSA de type 2, considérées comme pertes-de-fonction, pouvait sauver le phénotype. En effet, le domaine kinase de WNK1 se situe à l'exon 1 et il est possible que la protéine tronquée produite en conditions pathogènes soit tout de même fonctionnelle. Des quantités de 30ng/μl à 150ng/μl d'ARN ont donc été co-injectées avec l'AMO et le test du *4-di-2-ASP score* fut effectué (figure 16). Des injections de 50ng/μl, de 75ng/μl et de 150ng/μl ont révélé un pointage au *4-di-2-ASP score* plus bas et statistiquement significatif ( $P < 0.05$ ), du groupe contrôle (groupe injecté avec l'AMO seul). Ceci semblerait indiquer un effet néfaste de l'ARN de la construction partielle, et donc un effet nocif possible de la protéine tronquée. C'est donc dans cette optique qu'un test de sur-expression d'ARN de la construction partielle a été effectué. Des doses de 30, 50, 100 et 150ng/μl ont été injectées et le test du *4-di-2-ASP score* fut effectué (figure 17). Toutes ces doses ont révélé un pointage plus bas statistiquement significatif ( $P < 0.05$ ) lorsque comparés avec des embryons de type sauvage. Ces résultats appuieraient l'hypothèse de toxicité de la protéine tronquée, simulée par l'ARN de la construction partielle. Afin de déterminer si le phénotype observé est causé par la protéine tronquée et non par simplec injection d'ARN étranger chez l'œuf de poisson, des injections de doses massives d'ARN des deux constructions (partielle : 514ng/μl, complète : 562ng/μl) ont été injectées et le test du *4-di-2-ASP score* fut effectué (figure 18). Les deux groupes injectés ont révélé un pointage plus bas statistiquement significatif ( $P < 0.05$ ) lorsque comparés avec le groupe contrôle, mais non significatif lorsque comparés entre eux. Ceci indiquerait que l'injection d'ARN en tant que tel engendrerait un pointage plus bas en ce qui a trait au *4-di-2-ASP score*, et permettrait de supporter l'hypothèse que la protéine tronquée produite en conditions pathogènes est bel et bien non fonctionnelle (mutations perte-de-fonction).



**Figure 15: Diagramme en boîtes du pointage 4-di-2-ASP pour le sauvetage par injection d'ARN de la construction partielle de WNK1/HSN2 humaine.** Des œufs ont été injectés avec l'AMO HSN2\_3', ainsi qu'avec des quantités croissantes d'ARN de la construction partielle de WNK1/HSN2 humain (exons 1 à HSN2 seulement) et les embryons produits ainsi ont été marqués au colorant vital 4-di-2-ASP au stade de 72 heures post-fertilisation (hpf) afin de révéler leur ligne latérale postérieure. Le pointage du 4-di-2-ASP score a été attribué tel que mentionné précédemment afin de tenir compte de la présence mais aussi de la taille des neuromastes individuels. Les délimitations de la boîte représentent le 25e et le 75e rang centile, alors que la barre du centre représente le 50e rang centile, et donc, la valeur médiane. Les traits représentent les valeurs minimales et maximales et les valeurs isolées sont représentées par des points. Il est possible d'observer une aggravation du phénotype *knockdown* pour une co-injection de 50, 75 et 150ng/ $\mu$ l d'ARN de la construction partielle de WNK1/HSN2 humain, lorsque comparé avec des embryons injectés avec l'AMO seul. Ceci indiquerait un effet toxique de l'ARN de la construction partielle de WNK1/HSN2 humain.



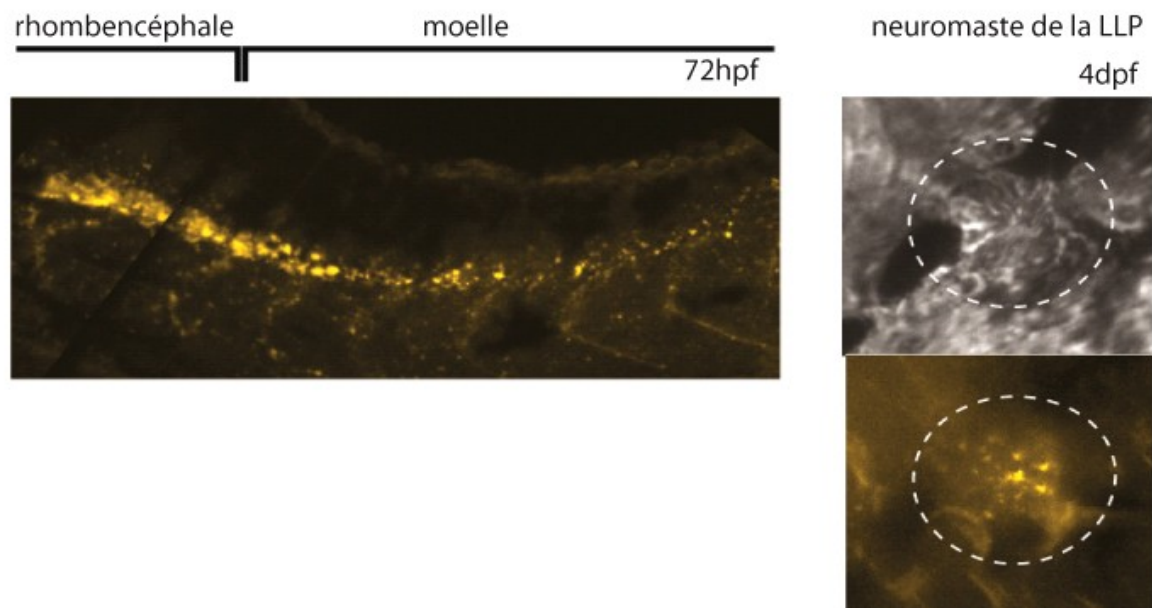
**Figure 16: Diagramme en boîtes du pointage 4-di-2-ASP pour la sur-expression d'ARN de la construction partielle de WNK1/HSN2 humaine.** Des œufs ont été injectés avec des quantités croissantes d'ARN de la construction partielle de WNK1/HSN2 humain (exons 1 à HSN2 seulement) et les embryons produits ainsi ont été marqués au colorant vital 4-di-2-ASP au stade de 72 heures post-fertilisation (hpf) afin de révéler leur ligne latérale postérieure. Le pointage du 4-di-2-ASP score a été attribué tel que mentionné précédemment afin de tenir compte de la présence mais aussi de la taille des neuromastes individuels. Les délimitations de la boîte représentent le 25e et le 75e rang centile, alors que la barre du centre représente le 50e rang centile, et donc, la valeur médiane. Les traits représentent les valeurs minimales et maximales et les valeurs isolées sont représentées par des points. Il est possible d'observer un effet toxique de l'ARN de la construction partielle de WNK1/HSN2 humain lorsque les embryons injectés sont comparés avec des embryons de type sauvage. Ceci renforce l'idée d'un effet toxique de l'ARN de la construction partielle de WNK1/HSN2 humain.



**Figure 17: Diagramme en boîtes du pointage 4-di-2-ASP pour sur-expression massive d'ARN des constructions complète et partielle de WNK1/HSN2 humaine.** Des œufs ont été injectés avec des quantités très élevées d'ARN des constructions partielle (514ng/μl) et complète (562ng/μl) de WNK1/HSN2 humain et les embryons produits ainsi ont été marqués au colorant vital 4-di-2-ASP au stade de 72 heures post-fertilisation (hpf) afin de révéler leur ligne latérale postérieure. Le pointage du 4-di-2-ASP score a été attribué tel que mentionné précédemment afin de tenir compte de la présence mais aussi de la taille des neuromastes individuels. Les délimitations de la boîte représentent le 25e et le 75e rang centile, alors que la barre du centre représente le 50e rang centile, et donc, la valeur médiane. Les traits représentent les valeurs minimales et maximales et les valeurs isolées sont représentées par des points. Il est possible d'observer un effet toxique de l'ARN des deux constructions de WNK1/HSN2 humain lorsque les embryons injectés sont comparés avec des embryons de type sauvage. Ceci permet d'affirmer que l'injection d'ARN a un effet toxique sur la ligne latérale postérieure, mais que cet effet n'est pas attribué à la construction partielle de WNK1/HSN2, et donc que la mutation causant une protéine tronquée n'est pas un gain-de-fonction toxique.

### Localisation de KCC2 chez le poisson zèbre

Notre hypothèse mécanistique quant au développement de la NHSA de type 2 implique une interaction entre la kinase WNK1 et le co-transporteur KCC2 qui avait déjà été rapportée dans la littérature (Khale *et al.*, 2010). Afin de vérifier si cette interaction est envisageable chez le modèle poisson zèbre, la localisation des transcrits du co-transporteur a été vérifiée par hybridation *in situ* (figure 19). Il a été possible de détecter la présence de transcrits au niveau de la moelle, suivant le gradient d'expression rostro-caudal bien connu, ainsi que dans le rhombencéphale et dans les neuromastes matures. C'est la première fois que la présence de KCC2 est observée dans les neuromastes du poisson zèbre et ceci supporte notre hypothèse d'interaction avec WNK1, ou plus précisément l'isoforme WNK1/HSN2, comme la kinase est également localisée au niveau des neuromastes de la ligne latérale.

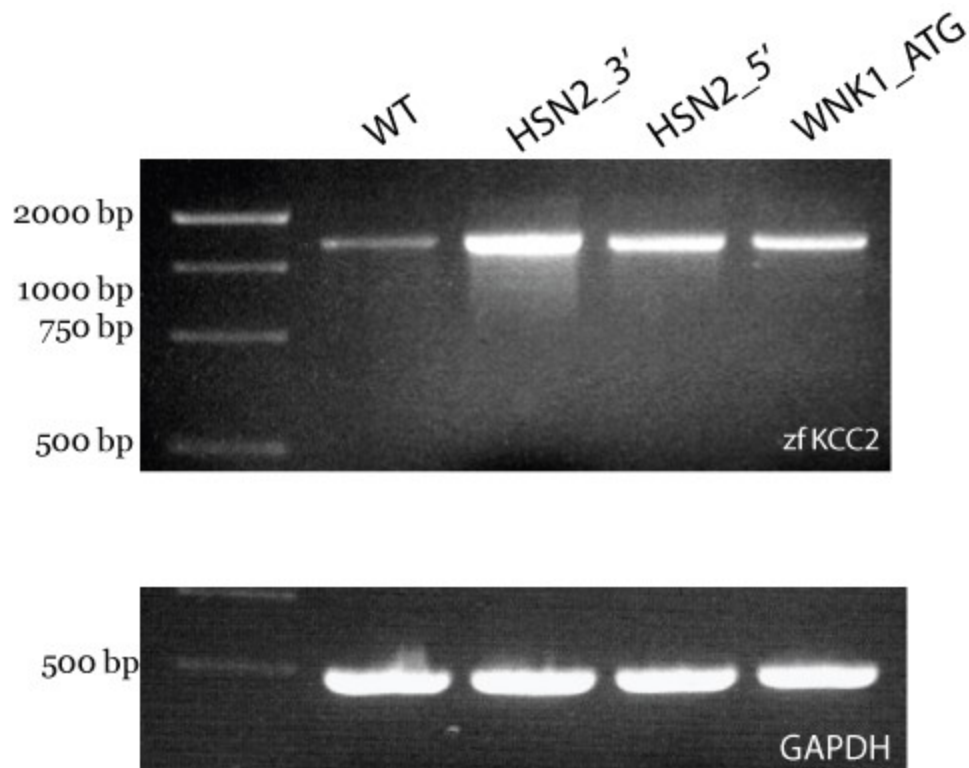


**Figure 18: Hybridation *in situ* du co-transporteur KCC2.** Des embryons de type sauvage de 72 heures post-fertilisation (hpf) et de 4 jours post-fertilisation (dpf) ont été utilisés afin de détecter l'ARN de KCC2 par hybridation *in situ*. Il a été possible d'observer la présence de KCC2 au niveau de la moelle, suivant un gradient rostro-caudal du rhombencéphale vers la queue, ainsi que dans un neuromaste mature de la ligne latérale postérieure (LLP).



### Phénotype KCC2 chez les embryons *knockdown* WNK1/HSN2

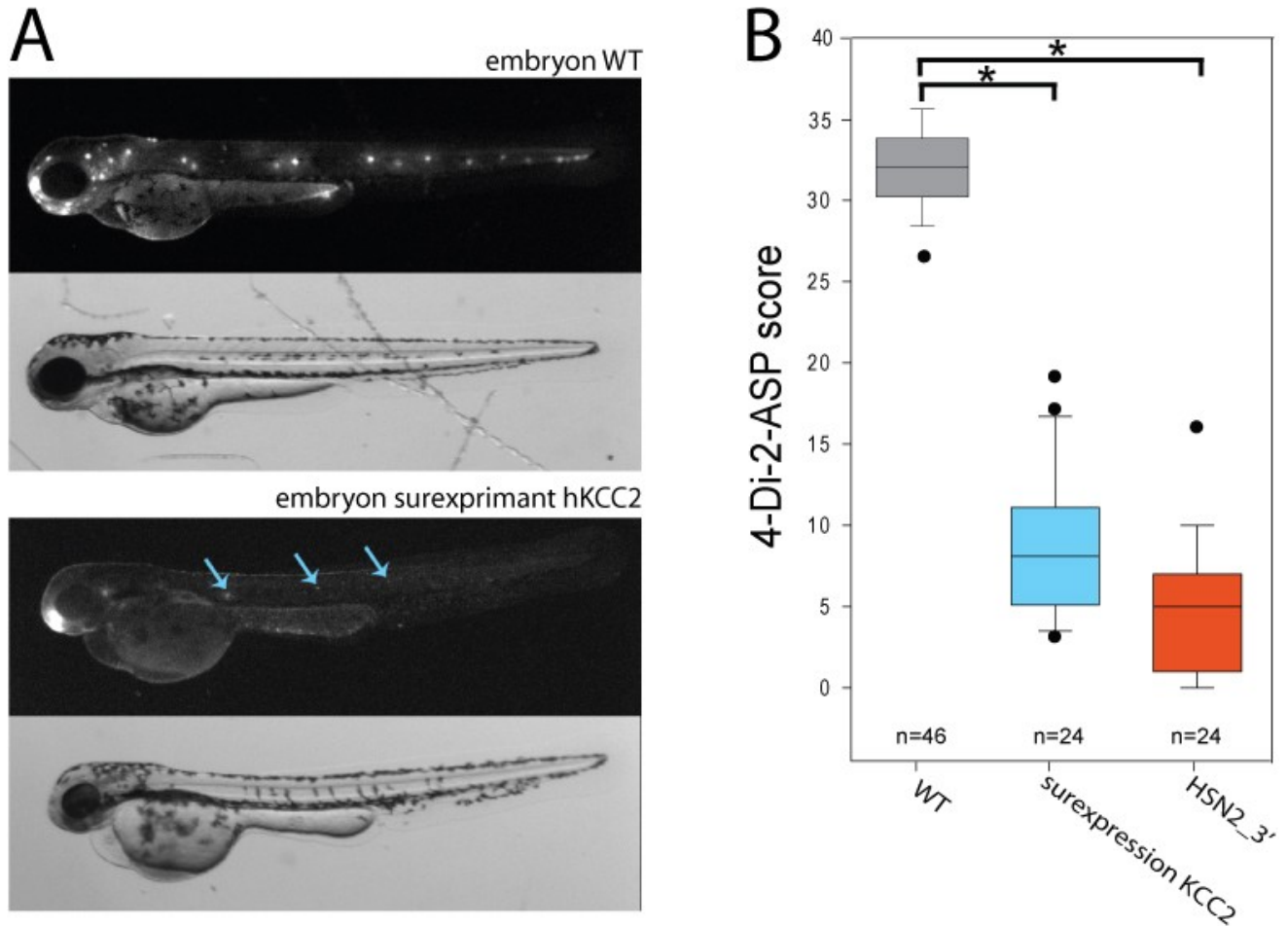
Si une interaction est bien présente entre la kinase WNK1 et le co-transporteur KCC2 et que celle-ci est impliquée dans le développement de la NHSA de type 2 comme le veut notre hypothèse mécanistique, alors il est possible d'envisager un effet sur KCC2 du *knockdown* de l'isoforme WNK1/HSN2. Des embryons *knockdown* ont donc été utilisés afin d'observer l'expression de KCC2 par RT-PCR (figure 20). Une augmentation dans le nombre de transcrits de KCC2 est visible chez les embryons n'exprimant pas l'isoforme WNK1/HSN2.



**Figure 19: Expression du co-transporteur KCC2 chez des embryons *knockdown* pour WNK1/HSN2 par détection d'ARNm en RT-PCR.** Des embryons de type sauvage ainsi que des embryons *knockdown* pour WNK1/HSN2 de 72 heures post-fécondation (hpf) ont été utilisés pour extraire l'ARN total. L'ADNc produit de celui-ci a été dosé afin d'effectuer une RT-PCR semi-quantitative détectant la présence de KCC2. Il est possible d'observer une sur-expression de KCC2 chez les embryons *knockdown* pour les trois approches AMO, soit HSN2\_3', HSN2\_5' et WNK1\_ATG, lorsque comparés à des embryons de type sauvage (WT).

**La sur-expression d'ARN humain KCC2 phénotopie le *knockdown***

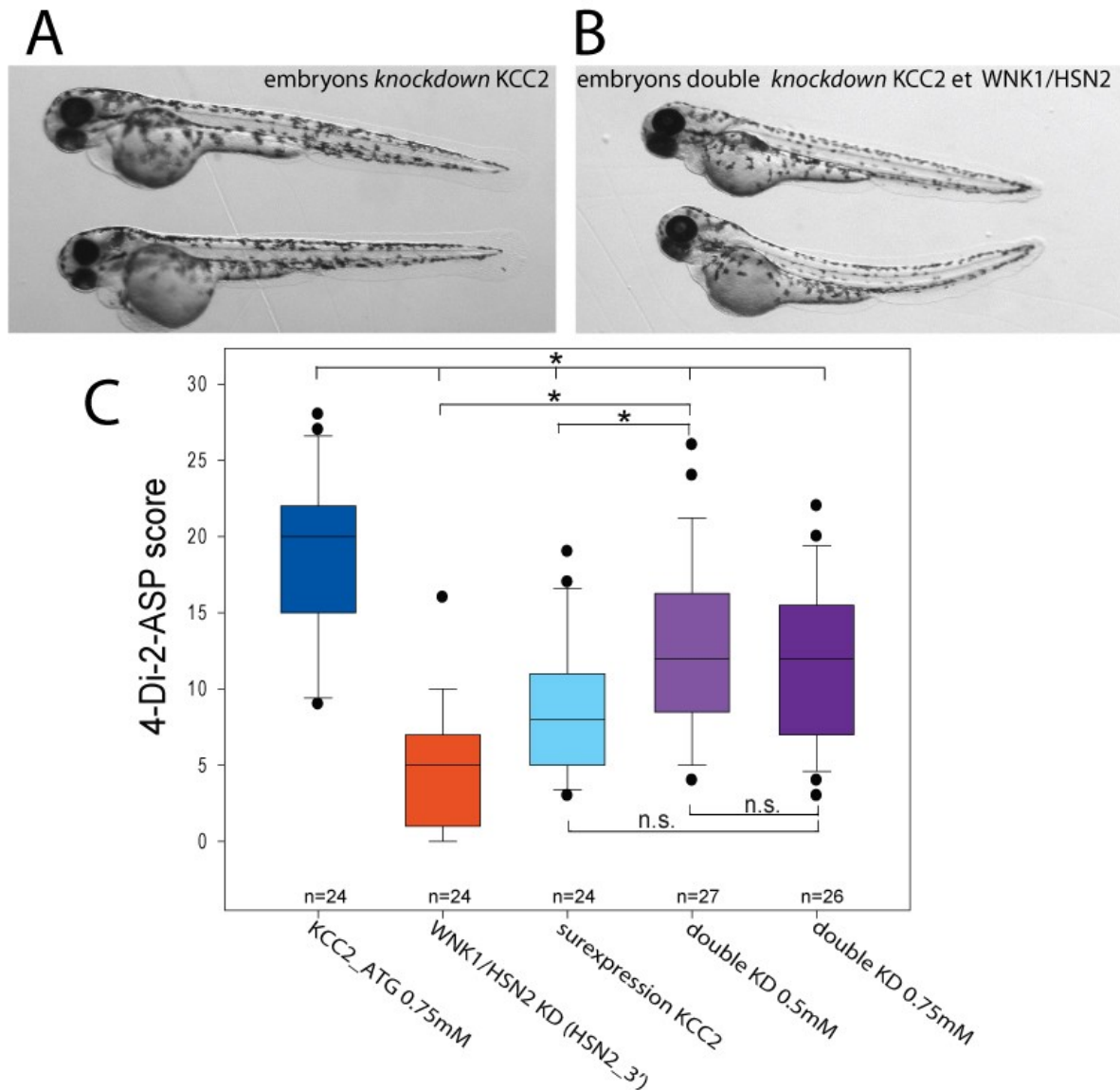
Afin de solidifier le lien s'établissant entre KCC2 et WNK1/HSN2, des injections d'ARN humain de KCC2 (Reynolds *et al.*, 2008; Côté *et al.*, 2011) furent effectuées, dans le but de mimer la sur-expression du co-transporteur révélée par RT-PCR (Figure 20). Ceci eut pour effet de phénotopier le *knockdown* de WNK1/HSN2 en causant des défauts de développement au niveau de la ligne latérale, telle que détectée par le colorant vital 4-di-2-ASP (figure 21-A). En appliquant le test du *4-di-2-ASP score*, il fut possible de quantifier le phénotype obtenu par sur-expression d'ARN KCC2 humain et ainsi de le comparer avec celui obtenu par injection d'AMO (figure 21-B). La sur-expression de KCC2 a permis un phénotype équivalent lorsque comparé avec le phénotype *knockdown* de WNK1/HSN2.



**Figure 20: Phénocopie du knockdown de WNK1/HSN2 par sur-expression d'ARN humain KCC2.** **A-** Des œufs ont été injectés avec de l'ARN de KCC2 humain à une concentration utilisée ultérieurement suffisante pour induire une sur-expression (Reynolds *et al.*, 2008; Côté *et al.*, 2011), tel que démontré par la courbature de la moelle y indiquant une hausse de la neurogenèse consécutive. La ligne latérale des embryons de 72 heures post-fertilisation (hpf) a été visualisée à l'aide du colorant vital 4-di-2-ASP. Les embryons surexprimant l'ARN de KCC2 humain présentent une ligne latérale défectueuse, phénocopiant les embryons knockdown pour WNK1/HSN2. Des flèches indiquent la présence de neuromastes déficients chez les embryons surexprimant KCC2 humain. **B-** Diagramme en boîtes du pointage 4-di-2-ASP indiquant un phénotype similaire pour le *knockdown* de WNK1/HSN2 par usage de l'AMO HSN2\_3' et pour la sur-expression d'ARN de KCC2 humain. La sur-expression a été modulée afin d'obtenir un phénotype de sévérité équivalente. Les délimitations de la boîte représentent le 25e et le 75e rang centile, alors que la barre du centre représente le 50e rang centile, et donc, la valeur médiane. Les traits représentent les valeurs minimales et maximales et les valeurs isolées sont représentées par de points.

### Sauvetage par double *knockdown* de KCC2 et de WNK1/HSN2

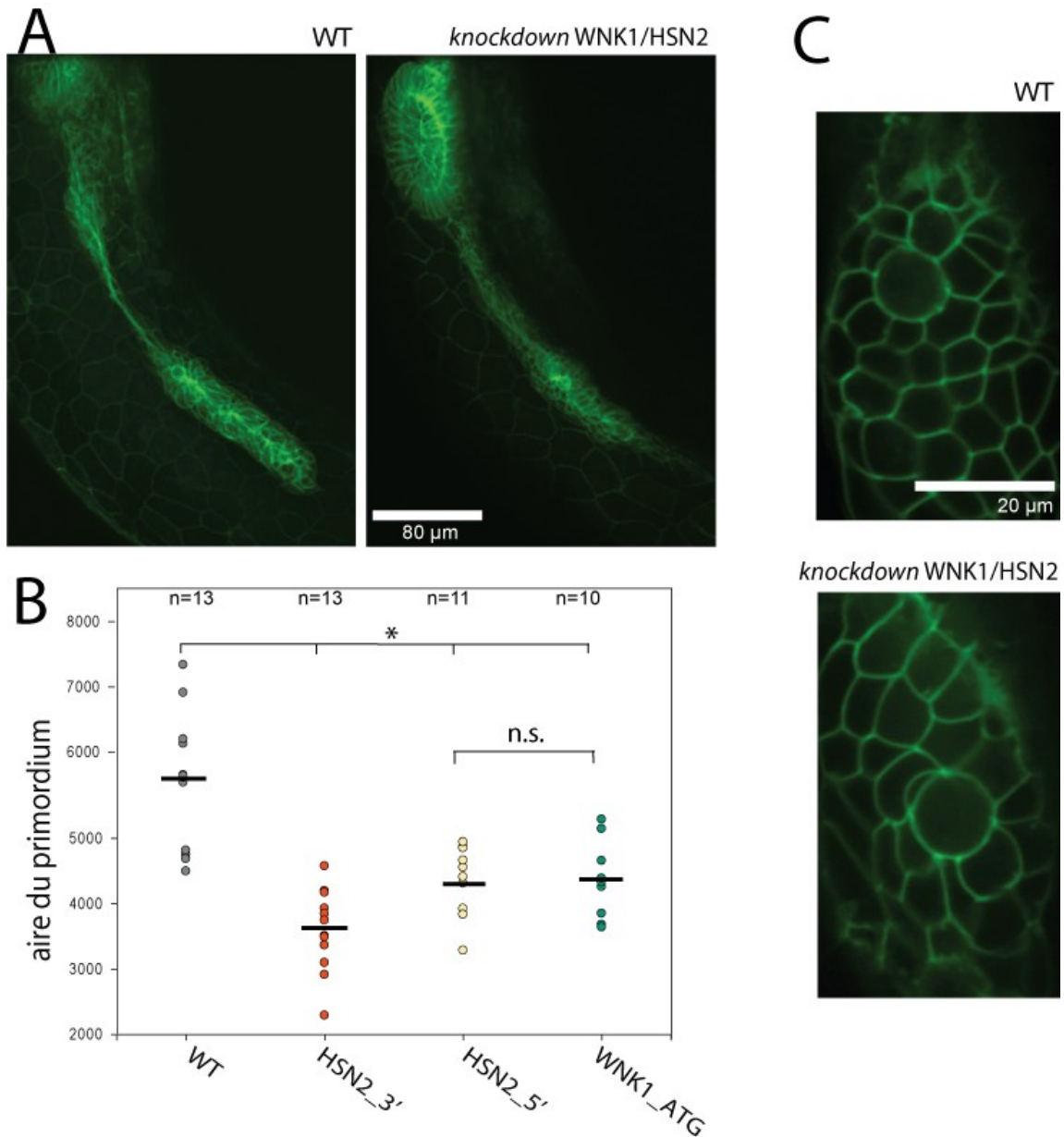
Les résultats présentés jusqu'ici soutiennent l'hypothèse d'interaction inhibitrice entre WNK1/HSN2 et KCC2 dans le développement du phénotype *knockdown* chez le modèle poisson zèbre. Comme les résultats de RT-PCR indiquent une sur-expression de KCC2 en conditions de *knockdown* de WNK1/HSN2 (figure 20), et que la sur-expression d'ARN humain de KCC2 phénocopie ce même *knockdown* (figure 21), l'hypothèse mécanistique évolue afin de définir une voie moléculaire possible plaçant WNK1/HSN2 en amont de KCC2. Un sauvetage de la sur-expression de KCC2 causée par le *knockdown* de l'isoforme WNK1/HSN2 est effectué par *knockdown* de KCC2, autrement dit, par un double *knockdown*. L'AMO utilisé pour effectuer le *knockdown* de KCC2 avait antérieurement été utilisé chez le poisson zèbre dans l'étude du revirement de la signalisation GABAergique au sein des cellules du ganglion rétinien mais aucun phénotype particulier n'avait été rapporté (Zhang *et al.*,2010). Les embryons *knockdown* pour KCC2 produits par injection de cet AMO ont présenté une morphologie différente des embryons contrôle (figure 22-A). En effet, ceux-ci affichaient une queue plus courte et parfois courbée ainsi qu'une moelle semblablement moins épaisse. Un nombre plus élevé d'embryons malformés étaient également présents dans le groupe *knockdown* que par rapport au groupe contrôle. Au niveau de la ligne latérale, telle que détectée par le colorant vital 4-di-2-ASP, le développement semble normal, si ce n'est que du moins grand nombre de neuromastes présents quoique régulièrement espacés, probablement dû à la taille réduite de la queue. Les embryons double *knockdown*, soit *knockdown* pour WNK1/HSN2 et pour KCC2, ont également présenté une morphologie altérée, quoique moins gravement que les embryons *knockdown* pour KCC2 seulement (figure 22-B). Ceci, en plus de la quantification obtenue en appliquant le test du 4-di-2-ASP score, indiquerait un sauvetage du phénotype *knockdown* WNK1/HSN2 par *knockdown* de KCC2 où les embryons des deux conditions de double *knockdown* obtiendraient un pointage statistiquement significatif ( $P < 0.05$ ) lorsque comparés avec les deux groupes contrôle (HSN2\_3' et sur-expression KCC2), mais non significatif lorsque comparés entre eux. (figure 22-C).



**Figure 21: Sauvetage de la sur-expression de KCC2 par double knockdown WNK1/HSN2 et KCC2.** **A-** La morphologie des embryons *knockdown* KCC2 est différente d'un embryon de type sauvage, présentant une queue plus courte et une tête un peu plus petite à 72 heures post-fertilisation. **B-** La morphologie des embryons double *knockdown* est très similaire à celle des embryons *knockdown* pour KCC2 (AMO KCC\_MO1), et présentent une queue légèrement courbée, similaire aux embryons surexprimant KCC2. **C-** Le diagramme en boîtes du pointage 4-di-2-ASP révèle que le double *knockdown* produit un sauvetage partiel du phénotype *knockdown* WNK1/HSN2 pour une dose de 0.5mM d'AMO contre KCC2. Les délimitations de la boîte représentent le 25e et le 75e rang centile, alors que la barre du centre représente le 50e rang centile, et donc, la valeur médiane. Les traits représentent les valeurs minimales et maximales et les valeurs isolées sont représentées par de points.

### **Effet du *knockdown* de WNK1/HSN2 sur les progéniteurs de la LLP**

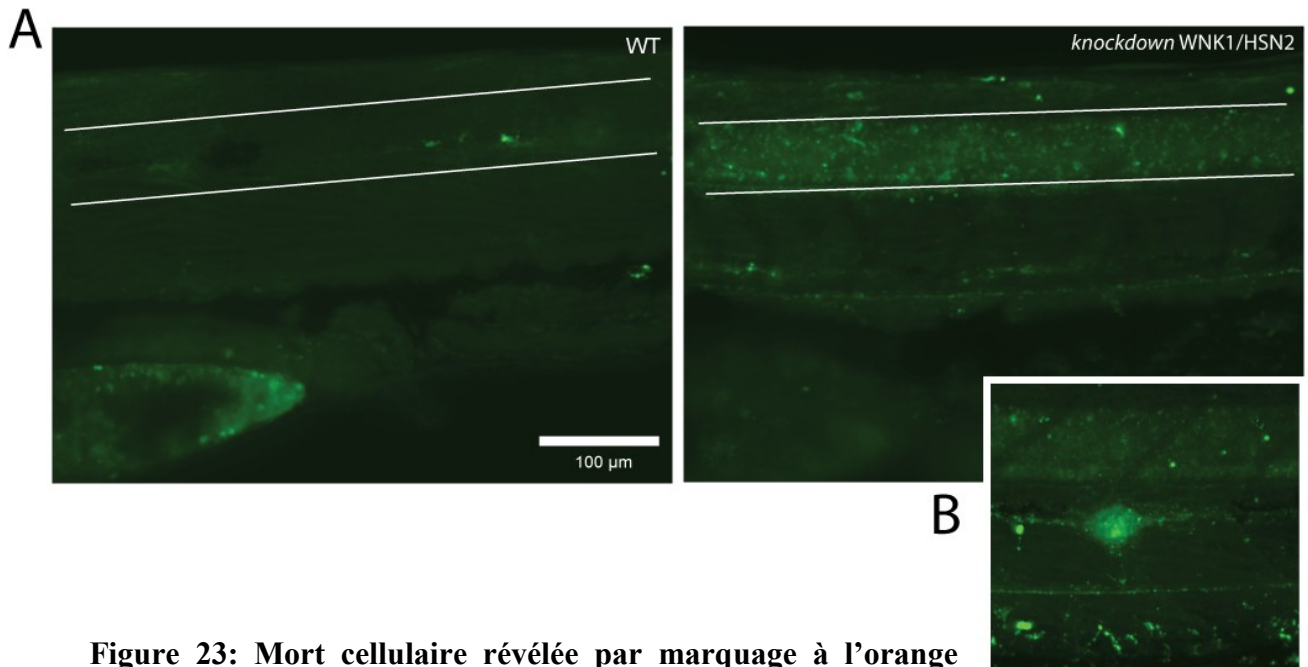
L'expression temporelle appropriée du KCC2 est absolument essentielle à sa fonction : sa présence précoce entraînant des défauts dans la neurogenèse, autant au niveau de la prolifération des interneurons que de la différenciation neuronale (Reynolds *et al.*, 2008; Côté *et al.*, 2011). Tel que présenté précédemment, le *knockdown* de l'isoforme WNK1/HSN2 cause une sur-expression de KCC2. Ceci pourrait vraisemblablement causer un déséquilibre dans la régulation de l'expression temporelle du co-transporteur et influencer la prolifération des progéniteurs neuronaux. Pour vérifier cette hypothèse, des embryons de poissons *cldnb*:GFP ont été injectés afin de produire des embryons *knockdown* dont le primordium est fluorescent ; le GFP étant sous l'expression du promoteur de la claudine B, exprimée dans la membrane des cellules du primordium migrant, ainsi que dans les cellules ciliées des neuromastes. Comme le primordium de la LLP est une structure motile très dynamique, il est très difficile de comptabiliser les cellules le constituant dans des embryons vivants. Les embryons ont donc été disposés sur le côté, permettant une vue d'ensemble du primordium et de sa structure arborant trois rosettes, et des images ont été prises. L'aire du primordium a été mesurée en unités arbitraires avant la déposition du premier pro-neuromaste (figure 23-A) et ces mesures ont été regroupées dans un diagramme de dispersion (figure 23-B). Les embryons *knockdown* pour WNK1/HSN2 ont présenté un primordium de taille plus petite statistiquement significative ( $P < 0.05$ ) que par rapport aux embryons du groupe contrôle. L'organisation en rosettes des cellules au sein du primordium, ainsi que leur taille, n'a cependant pas semblé affectée, indiquant un effet probable du *knockdown* de WNK1/HSN2 sur la prolifération des cellules progénitrices de la LLP (figure 23-C).



**Figure 22: Baisse de la prolifération des progéniteurs de la LLP.** **A**-Des embryons de poissons *cldnb :GFP* ont été injectés pour produire un *knockdown* de WNK1/HSN2 chez des embryons exprimant la GFP dans les cellules du primordium migrant. Les images du primordium ont été prises en microscopie confocale (10X) entre 22 et 24 heures post-fertilisation afin de permettre la visualisation du primordium avant le premier dépôt de pro-neuromaste. Les embryons étaient disposés sur le côté, la tête vers la gauche et le dos vers le haut. Il est possible d'observer un primordium de taille réduite chez l'embryon *knockdown* lorsque comparé avec un embryon contrôle. **B**- La taille du primordium a été mesurée en unités arbitraires pour les embryons de type sauvage et pour les embryons *knockdown* pour WNK1/HSN2 et ces mesures ont été compilées dans un diagramme de dispersion. Il est possible d'observer que l'aire du primordium est plus petite chez les embryons *knockdown* pour WNK1/HSN2 que chez les embryons contrôles. La moyenne est indiquée par un trait. **C**-Afin de confirmer que la taille réduite du primordium est bien due à une baisse de prolifération et non à une morphologie altérée des cellules composant celui-ci, la taille et l'organisation des cellules au sein du primordium a été observée (Magnification 20X). Aucune différence n'est notée entre les cellules du primordium des embryons *knockdown* pour WNK1/HSN2 et celles des embryons contrôles.

### Sort des progéniteurs de la LLP

Antérieurement, la sur-expression de KCC2 humain chez le poisson n'avait pas révélé une hausse de mort cellulaire à des stades précoces de développement, et ce, malgré le fait que les progéniteurs neuronaux ne se différencient pas (Reynolds *et al.*, 2008; Côté *et al.*, 2011). Il est cependant probable que ces progéniteurs affectés par la sur-expression de KCC2 meurent à un stade plus avancé, à défaut de se différencier. Un marquage à l'orange d'acridine a donc été effectué à un stade de 72hpf chez des embryons *knockdown* pour WNK1/HSN2 et a révélé de la mort cellulaire au niveau de la moelle (figure 24,A) et de la LLP (figure 24,B) pour toutes les approches AMO, mais pas chez les embryons contrôle. Ceci indiquerait que suite à un arrêt dans la différenciation neuronale, les progéniteurs alors inutiles sont supprimés.



**Figure 23: Mort cellulaire révélée par marquage à l'orange d'acridine.** **A-** Vue de la moelle d'un embryon de type sauvage versus un embryon *knockdown* pour WNK1/HSN2 dont la mort cellulaire est marquée par orange d'acridine. Les embryons de 72 heures post-fertilisation (hpf) ont été disposés sur le côté, la tête vers la gauche et le dos vers le haut et les images ont été prises en microscopie confocale (10X). La moelle est délimitée par deux lignes blanches. **B-** Vue d'un neuromaste présentant de la mort cellulaire chez un embryon *knockdown* pour WNK1/HSN2. Il est aussi possible d'apercevoir de la mort cellulaire au niveau du nerfs de la ligne latérale postérieure, formant une ligne de part de d'autre du neuromaste.



## **Matériel et Méthodes**

Les lignées de type sauvage de poissons zèbres ont été croisées et élevées à 28.5 °C selon les procédures préalablement établies (Westerfield, 1995) et les manipulations ont été réalisées en respect du Conseil Canadien de Protection des Animaux selon les directives établies par le laboratoire de pathologie et de biologie cellulaire du Dr Pierre Drapeau. Tous les produits chimiques proviennent de Sigma sauf si indications contraires.

### **Lignées transgéniques**

La lignée transgénique [*HB9:GFP*] a gracieusement été obtenue du Zebrafish International Resource Center (University of Oregon, Eugene, OR; Flanagan-Street *et al.*, 2005). Cette lignée permet de visualiser les axones des neurones moteurs qui sont marqués par le GFP membranaire (mGFP), exprimé sous le contrôle du promoteur du gène *hb9* provenant du poisson zèbre.

La lignée transgénique [*cldnb:lynGFP*] a gracieusement été offerte par Haas et Gilmour (2006). La claudine B, ici marquée par GFP, est fortement exprimée au niveau de la ligne latérale, marquant les cellules du primordium, les pro-neuromastes et les cellules inter-neuromastes. À 4dpf, la claudine B se retrouve restreinte aux cellules de support dans tous les neuromastes (López-Schier *et al.*, 2004).

### **Injections d'oligonucléotides morpholino antisens**

Les deux AMO interférant avec l'épissage (soit HSN2\_3' et HSN2\_5') et l'AMO bloquant la traduction (soit WNK1\_ATG) ont été injectés à des concentrations respectives de 1.5mM, 2mM et 0.9mM avec un total de 0.2% de colorant vital Fast Green afin de permettre la visualisation du volume injecté. Ces concentrations optimales ont été établies suite à un essai de dose-réponse menant à un équilibre, réduisant le nombre d'embryons

morts (semblable aux portées WT) en conservant toutefois un grand nombre de poissons phénotypiques. Les séquences des AMO ont été déterminées à partir de la séquence prédite du gène WNK1 comprenant l'exon HSN2, tel que décrit dans la section résultats et synthétisées par Gene Tools (Philomath, OR, USA).

**HSN2\_3'** : 5'-CGAGAACGAGTATTTCTAGGTACCA-3'

**HSN2\_5'** : 5'-TGCAGTGACAATAACATACAGCATC-3'

**WNK1\_ATG** : 5'-TTGGGATTTCCGATGACATCTTC-3'

Deux AMO ont été synthétisés afin de bloquer l'expression du gène KCC2 chez le poisson zèbre. La séquence du premier AMO a été obtenue de la littérature (Zhang et al., 2010) et cible le codon départ du gène. Depuis la publication de cet article, la séquence du gène KCC2 du poisson zèbre a été revue et nous avons donc sélectionné une seconde cible près du codon départ qui semblait promettre de meilleurs résultats. Ces deux morpholinos servent donc de contrôle interne, où deux cibles différentes mènent à un phénotype commun qui est donc plus fiable. Les séquences pour ces deux AMO, injectés à une concentration de 0.75mM sont :

**KCC2\_AMO1** : 5'-CTCCTTTGATCTCCAGTGTCTGCAT-3'

**KCC2\_AMO2** (Zhang et al., 2010) : 5'-TGGATGTTGCATCTCCTGTGAACAT-3'

Le même phénotype a été obtenu pour des injections de ces deux AMO, cependant seul KCC2\_AMO1 a été utilisé pour la suite des expériences (double *knockdown* WNK1/HSN2 et KCC2).

Les injections ont été effectuées dans des œufs fertilisés au stade de développement 2-4 cellules à l'aide d'un système d'injection à pression Picospritzer III (Parker Hannifin Corp). Des tubes capillaires tirés ont été utilisés comme aiguille (Flaming/Brown type micropipette /patch pipette puller).

## **Injection d'ARNm**

### **Sur-expression de Kcc2 humain**

L'ARNm de KCC2 humain a été transcrit d'une construction en vecteur pCS2 qui fut linéarisé avec l'enzyme de restriction KpnI en utilisant le kit *SP6 polymerase mMACHINE* (Ambion). L'ARNm ainsi produit a ensuite été dilué dans de l'eau sans nucléases (Ambion). L'ARNm de KCC2 humain a été injecté à une concentration de 150ng/μl additionné de 0.2% de colorant vital Fast Green pour juger du volume d'injection ; cette même concentration avait été utilisée précédemment pour produire une sur-expression (Côté *et al.*, 2011). Les injections ont été effectuées dans des œufs fertilisés au stade de développement 1-2 cellules à l'aide d'un système d'injection à pression Picospritzer III (Parker Hannifin Corp). Des tubes capillaires tirés ont été utilisés comme aiguille (Flaming/Brown type micropipette /patch pipette puller).

### **Constructions de WNK1/HSN2 humain**

Les deux constructions de la kinase WNK1 humaine ont été produites dans le vecteur poisson zèbre pCS2 avec un promoteur CMV (cytomégalovirus) et une région UTR de b-glotine de xéopus. Les ARNm de ces constructions ont été produits tel que décrit précédemment. Ces constructions contenaient toutes deux une étiquette myc (6x *myc-tag*) à la fin de leur séquence codante. La construction humaine WNK1/HSN2 partielle comprenait la séquence codant pour l'exon1 du gène WNK1 humain, l'exon 2 à 8 provenant du clone CF142377 et l'exon *HSN2* amplifié du gène humain. La construction humaine WNK1/HSN2 complète comprenait toute la séquence codante incluse dans la construction partielle, additionnée de l'exon 9 du clone CF142377 et des exons 10-28 (sans les petits exon 11-12) du clone BC141881. L'ARNm pour les constructions complètes et partielles, une fois dilué dans de l'eau sans nucléases (Ambion), a produit des stocks de concentrations respectives de 562ng/μl et 514ng/μl. Ces stocks furent utilisés à des concentrations de 50, 75, 100, 150 et 200 ng/μl lorsque co-injectés avec l'AMO HSN2\_3' à

une concentration de 1.5mM, le tout additionné de 0.2% de Fast Green pour juger du volume d'injection.

## **Immunohistochimie**

Les embryons ont été déchorionés et anesthésiés dans du 0,02 % tricaine dilué dans du milieu Evans (Saint-Amant & Drapeau 2000) au pH 7,8. Ils ont ensuite été fixés dans une solution de 4% paraformaldéhyde (PFA, dans du PBS) toute une nuit à 4°C. Ces embryons ont ensuite été lavés dans du PBST (PBS : 0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.02% PO<sub>4</sub> dans de l'eau distillée ; PBST : 0.001% Tween-20 ajouté) pendant 3 séries de 15 minutes, où 3 rinçage étaient effectués au début. Les embryons furent entreposés à -20°C dans du méthanol pendant au moins une nuit. Suite à la congélation, les embryons ont été lavés dans des solutions de 75%, 50%, 25% et 0% de méthanol dans de l'eau distillée pour 15 minutes (chaque condition), puis 30 minutes dans de l'eau distillée pour réhydrater. Ils furent par la suite incubés pendant 1h dans la solution de blocage (2% sérum de chèvre, 1% BSA, 1% DMSO et 0.1% Triton X-100 dans du PBS), puis incubé toute la nuit à 4°C dans l'anticorps primaire avec de la solution de blocage fraîche. Les anticorps primaires ont été utilisés aux concentrations suivantes : anti-HSN2, 1 :1000 (Shekarabi *et al.*, 2008) ; anti-SV2, 1 :200 (Developmental Studies Hybridoma). Les anticorps secondaires furent ajoutés dans de la solution de blocage fraîche après un lavage au PBST de 2x15 min et 1x30min, dans une concentration de 1 :1000. Ces anticorps sont est de type chèvre anti-lapin et anti-souris (IgG H+L, Alexa Fluor 488, Invitrogen). Les embryons ont ensuite été incubés pour 1h dans du glycérol 80% puis montés sur lame.

## **Buvardage de type Western**

Les homogénats de protéines ont été obtenus d'embryons entiers de 4 jours post fertilisation (dpf), de type sauvage et *knockdown* pour WNK1/HSN2 (AMO HSN2\_3',

HSN2\_5' et WNK1\_ATG) par trituration dans du tampon d'échantillon SDS (SDS sample buffer ; 63 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glycérol, 5%  $\beta$ -mercaptoéthanol, 3.5% sodium dodecyl sulfate, dans de l'eau distillée). Les homogénats ont été gardés sur glace, puis centrifugés à 13000 RPM pendant 10 minutes. Le surnageant fut conservé puis les homogénats furent dosés par méthode de Bradford (Bio-Rad Protein assay kit). Pour chaque condition, 75 $\mu$ g de protéines ont été déposés dans les puits d'un gel SDS/PAGE d'acrylamide 8%, migré pendant 2h30 à 90V puis transféré pendant 2h à 230mA sur une membrane de nitrocellulose Hybond-ECL (Amersham Biosciences). La membrane a ensuite été récupérée et bloquée dans du TBS (20mM Tris, pH 7.5, et 500mM NaCl dans de l'eau distillée) contenant 5% de lait en poudre pendant 1h à température pièce. Elle fut par la suite incubée tout une nuit à 4°C dans l'anticorps primaire (ici, un anti-HSN2 obtenu de Shekarabi *et al.*, 2008) dilué dans de la solution de blocage fraîche. La membrane a été rincée 3x15 minutes dans du TBST (TBS additionné de 0.05% Tween-20) puis incubées 2h à température pièce dans 1 :2000 de l'anticorps secondaire, un IgG (H+L) de chèvre anti-lapin conjugué à la peroxydase (Affini Pure, Jackson ImmunoResearch). Les membranes ont été exposées en utilisant la trousse de substrat Lumi-Light Western Blot Substrate (Roche). Le marquage Ponceau a été effectué sur la membrane subséquemment rincé au TBST et est présenté comme contrôle de la quantité de protéines chargées dans les puits.

### **Hybridation in situ**

Des amorces ont été synthétisées pour cibler l'ARN de KCC2 du poisson zèbre. Des embryons de 72hpf et de 4dpf ont été utilisés pour la détection en hybridation *in situ* par fluorescence (FastRed) selon le protocole précédemment établi (adapté de Jowett, 2001).

### **RT-PCR (reverse transcriptase)**

L'ARN total du poisson zèbre à différents stades de développement (16 cellules, 18hpf, 24hpf, 72hpf et 7dpf), et de poissons *knockdown* pour WNK1/HSN2 (AMO HSN2\_3',

HSN2\_5' et WNK1\_ATG) de 72hpf a été extrait en utilisant du Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) par extraction au guanidinium thiocyanate-phénol-chloroform. L'ADNc a été synthétisé avec le kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas). Cet ADNc a été dosé et a par la suite été utilisé dans la réaction de RT-PCR selon le protocole fourni avec l'enzyme Expand Long Template (Roche) pour un volume réactif final de 20µl. Les incubations ont été faites selon le programme suivant : **dénaturation** à 94°C, 2 minutes; **10 cycles** de 94°C, 10s pour dénaturation, température d'hybridation spécifique aux amorces, 30s, élongation à 68°C, 1min; **25 cycles** de 94°C, 15s pour dénaturation, température d'hybridation spécifique aux amorces, 30s, élongation à 68°C, 2min; **élongation finale** à 68°C pendant 7 minutes; **refroidissement et maintien** à 8°C.

Les amorces utilisées pour amplifier la séquence de KCC2 du poisson zèbre furent les suivantes : amorce sens KCC2 : TTTCACCGAGGGCCACATTGACG; amorce antisens KCC2 : TCCACCTCCACGCACAAGAAGGAC (synthétisées pour Reynolds *et al.*, 2008)

Les amorces utilisées pour la confirmation du *knockdown* par interférence avec l'épissage (AMO HSN2\_3' et HSN2\_5') ont été synthétisées pour amplifier séquence flanquant l'exon HSN2, soit de l'exon 8 à l'exon 9 (séquence incluant donc une partie de l'exon 8, l'exon épissé alternativement 8b, l'exon HSN2 et une partie de l'exon 9) et furent les suivantes : amorce sens (WNK1 exon 8) : GAACATCCCAACAACAGCAGGTC, amorce antisens (WNK1 exon 9) : GTAGACTGAGGAATGGGGACTTGAACC.

Les échantillons ont été observés sur gel d'agarose 1%, dépôts de 10µl additionné de bromure d'éthidium contre un contrôle du gène domestique GAPDH.

### **Marquage de la ligne latérale**

La ligne latérale a été marquée à l'aide du colorant vital 4-(4-diéthylaminostyryl)-N-méthylpyridinium (4-di-2-ASP ; Invitrogen) dilué à 0.5mM dans de la solution d'Evans. L'incubation a été effectuée au noir à 28.5°C pendant 30 minutes. Les embryons ont ensuite été rincés dans de la solution d'Evans fraîche pendant 3x10minutes puis l'imagerie

a été effectuée sur un microscope à dissection (Olympus) équipé d'une lampe à épi-fluorescence. Ce protocole a été adapté de Collazo *et al.*, 1994 ; Ledent, 2002 et Hernández *et al.*, 2005.

## **Détection de mort cellulaire**

Les embryons ont été incubés pendant 30 minutes à 28.5°C dans une solution 1X d'orange d'acridine dans de la solution d'Evans préparée à partir d'un stock 100X (1mg/ml dans de l'eau nanopure sans RNAase). Ils ont ensuite été rincés successivement dans de la solution d'Evans fraîche 3x10 minutes et 1x30 minutes avant d'être anesthésiés à l'aide de tricaine (0.02% dans de la solution d'Evans) puis observés en microscopie confocale

## **Microscopie**

### **Confocale**

L'imagerie a été effectuée sur un système de microscopie confocale (*spinning disk*) Quorum WaveFX (Quorum technologie Inc Ghelph, On, Canada) sur une base de Yokogawa CSU-10 (Yokogawa Electric) modifiée et monté sur un microscope droit Olympus BX61WI. L'acquisition des images a été faite à l'aide d'une caméra Hamamatsu ORCA-ER et du logiciel Volocity (PerkinElmer).

### **Fluorescence**

L'imagerie sur microscope à fluorescence a été effectuée sur un microscope droit (Nikon) équipé d'une lampe à épi-fluorescence.

## **Statistiques**

Le programme Sigma Stat (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) a été utilisé pour l'analyse statistique sur les données recueillies. Les ensembles de données qui n'étaient pas distribuées normalement ont été soumises au test ANOVA (*on ranks*), puis au test de Kurskal-Wallis (*One Way Analysis of Variance on Ranks*). Les différents groupes ont ensuite été comparés entre eux par la méthode de Dunn (*Multiple Comparisons*) pour identifier les groupes significativement différents des autres. Le seuil de significativité a été établi à  $p < 0.05$  pour tous les tests statistiques.



## Discussion

La NHTA de type 2 est caractérisée par une perte de perception sensorielle, pour toutes modalités, dans les membres distaux généralement associée à un diagnostic dans les deux premières décennies de vie. Contrairement aux autres types de NHTA, le type 2 n'implique pas de dysfonctions motrices, mais se présente avec plusieurs troubles autonomes comme la perte des réflexes tendineux et autres complications telles qu'ulcères, infections, joints de Charcot et amputations accidentelles (Murray, 1973; Auer-Grumbach *et al.*, 2005; Axelrod et Gold-von Simson, 2007; Kurth, 2010). Une étude de cas s'est même penchée sur l'aspect du nerf sural suivant une biopsie, rapportant un manque marqué de fibres myélinisées et une diminution du nombre de fibres non myélinisées (Johnson et Spalding, 1964).

Suivant la découverte des mutations responsables de la NHTA de type 2 au sein d'un exon particulier du gène WNK1, le groupe du Dr Guy Rouleau s'était intéressé à la caractérisation de cette isoforme protéique. Ils ont découvert que toutes les mutations associées à la NHTA de type 2 causaient la production d'une protéine tronquée présumée non fonctionnelle. Cette protéine serait une isoforme particulière de la kinase WNK1, contenant l'exon à épissage alternatif HSN2, issu d'un second promoteur (détecté chez la souris et chez l'humain; Delaloy *et al.*, 2003). La présence de cette isoforme spécifique fut détectée par buvardage de type Western et il fut établi que son expression était restreinte au système nerveux, au contraire de la kinase WNK1 qui est ubiquitaire. WNK1/HSN2 est donc présente dans le système nerveux périphérique, dont le ganglion spinal et le nerf sciatique, mais aussi dans le système nerveux central (détection au niveau du cerveau). En immunohistochimie il fut possible de voir qu'au niveau du ganglion spinal, le signal détectant WNK1/HSN2 était présente chez les cellules satellites enveloppant les neurones sensoriels et dans les cellules de Schwann entourant le nerf sciatique en plus du corps cellulaire des neurones. Au niveau du système nerveux central, WNK1/HSN2 était détectée

au niveau des zones marginales de Lissauer, responsables du relai de l'information associée à la douleur et à la température. Une autre expérience en immunohistochimie sur des neurones murins adultes révéla que l'isoforme WNK1/HSN2 était localisée dans le corps cellulaire et dans les axones des neurones sensoriels alors que les autres isoformes étaient restreintes au corps cellulaire (Shekarabi *et al.*, 2008). Essentiellement, tout ce qui était connu sur l'isoforme WNK1/HSN2 était sa spécificité au système nerveux, mais rien n'avait été avancé en ce qui a trait à sa fonction ou les mécanismes pouvant l'impliquer qui mèneraient à la NHSA de type 2.

Suivant ce qui avait été proposé dans plusieurs articles, et en considérant la présence précoce des symptômes associés à la NHSA de type 2 en plus du manque marqué de fibres nerveuses myélinisées observé lors de biopsies du nerf sural, nous avons émis l'hypothèse que la NHSA de type 2 découle d'un développement inadéquat, plutôt que d'une dégénérescence, du système nerveux sensoriel périphérique due à l'absence de l'isoforme WNK1/HSN2. C'est dans cette optique que nous avons entrepris la caractérisation de cette isoforme spécifique dans l'embryon du poisson zèbre.

Dans cette section, j'aborderai les résultats obtenus en ce qui a trait à la caractérisation de l'isoforme protéique WNK1/HSN2 dans le système nerveux de l'embryon du poisson zèbre. Je présenterai également les résultats justifiant le lien établi avec le co-transporteur neuronal KCC2 et le mécanisme moléculaire proposé qui fut élaboré de ceux-ci. Finalement, je discuterai des retombées importantes des découvertes faites au cours de ce projet et je proposerai différents objectifs pour le futur de la recherche sur la NHSA de type 2, plus précisément sur l'isoforme protéique WNK1/HSN2 et son rôle dans l'établissement de cette neuropathie rare.

### **Le poisson zèbre comme modèle développemental**

Le génome du poisson zèbre contient deux copies du gène WNK1, dont seule la copie située sur le chromosome 4 a conservé l'exon HSN2. Cette duplication permet donc une manipulation génique aisée, en compensant toute perte de WNK1 par l'expression du gène situé sur le chromosome 25. Considérant le système nerveux complexe présent dès le stade embryonnaire du poisson zèbre, ce modèle constitue un excellent choix pour la caractérisation de l'isoforme WNK1/HSN2 quant à son rôle dans le développement de la NSHA de type 2. Cependant, une certaine limite s'impose quant aux méthodes utilisées. Effectivement, quoique le poisson zèbre possède la plupart des gènes présents chez l'humain, leur homologie peut restreindre l'usage d'anticorps développés pour d'autres modèles.

Afin d'établir un lien avec les résultats préalablement obtenus quant à l'isoforme WNK1/HSN2 chez la souris, nous avons dressé un profil d'expression de cette isoforme spécifique chez l'embryon du poisson zèbre. Les anticorps utilisés ultérieurement chez la souris (Shekarabi *et al.*, 2008) ont permis l'observation de WNK1/HSN2 en immunohistochimie sur embryon entier. L'isoforme spécifique se retrouvait alors localisée au niveau la ligne latérale postérieure (LLP), plus précisément au sein des neuromastes, les organes mécanosensoriels la constituant. Cette localisation concorde avec ce qui avait été observé préalablement (Shekarabi *et al.*, 2008), dans la mesure où la LLP est un système sensoriel périphérique, bien qu'il soit spécifique au modèle poisson zèbre.

Il fut aussi possible de détecter l'expression embryonnaire de WNK1 et de WNK1/HSN2 par RT-PCR dès le stade de 16 cellules (soit 1.5 hpf). Cette expression précoce, indiquant la présence de transcrits maternels, présage l'implication de WNK1 dans le développement. En effet, les transcrits maternels dirigent le développement de l'embryon avant l'activation du génome zygotique, qui se produit vers 3.5 heures après la fertilisation.

L'expression de WNK1/HSN2 semble également augmenter avec le temps, suivant le développement de l'embryon, au contraire de la kinase WNK1 (toutes isoformes confondues) qui est fortement exprimée très tôt et jusqu'au stade de 7 jours post-fertilisation (terme du stade embryonnaire).

Ces résultats indiquent donc la présence de l'isoforme protéique WNK1/HSN2 dans le système nerveux périphérique, en accord avec ce qui avait été démontré précédemment chez la souris (Shekarabi *et al.*, 2008), et l'expression précoce de l'isoforme telle que détectée par RT-PCR appuie notre hypothèse suggérant un rôle de WNK1/HSN2 dans le développement.

### **Le *knockdown* de WNK1/HSN2 cause un défaut spécifique de la ligne latérale postérieure**

L'approche utilisée dans ce projet pour déterminer le rôle de WNK1/HSN2 chez l'embryon du poisson zèbre implique la désactivation ou la modification post-transcriptionnelle des ARNm produisant des embryons *knockdown* pour l'isoforme ciblée. L'usage d'oligonucléotides morpholino antisens (AMO) interfère avec le complexe ribosomal pour inhiber la traduction (dans le cas de WNK1\_ATG) ou modifier l'épissage (dans le cas de HSN2\_3' et HSN2\_5') d'ARNm immatures, permettant le développement des embryons en l'absence de WNK1/HSN2. Le phénotype observé chez ces embryons *knockdown* permet par la suite de déduire le rôle que joue cette isoforme dans le développement. Afin d'assurer une spécificité du phénotype, trois AMO ciblant différents sites de WNK1 ont été conçus; de cette façon, la discrimination entre les effets spécifiques et non de l'injection d'AMO est possible. Les trois approches AMO ont été utilisées pour les expériences de caractérisation du phénotype, quoique seul un résultat (représentatif du lot, pour les trois conditions) soit présenté pour les expériences subséquentes.

Suivant la détection par immunobuvardage de l'isoforme WNK1/HSN2 dans les neuromastes de la ligne latérale, le phénotype des embryons *knockdown* fut observé à ce niveau à l'aide du colorant vital 4-di-2-ASP. Lorsqu'appliqué dans le milieu, le 4-di-2-ASP pénètre dans les neuromastes en passant directement par les canaux à transduction présents sur les cellules ciliées mécanosensorielles, marquant ainsi les cellules ciliées fonctionnelles présentes dans les neuromastes et permettant une visualisation de la LLP sous fluorescence (Collazo *et al.*, 1994; Hernandez *et al.*, 2006).. Les embryons *knockdown* pour les trois conditions d'injections AMO ont présenté un même phénotype, soit un défaut d'établissement de la ligne latérale postérieure telle que détectée par le 4-di-2-ASP. Ce phénotype a été quantifié selon une méthode utilisée précédemment dans la littérature (Harris *et al.*, 2003) qui permet de prendre en compte à la fois la constitution des neuromastes et leur présence. Les embryons *knockdown* pour WNK1/HSN2 sont donc significativement différents des embryons de type sauvage.

Comme le 4-di-2-ASP ne s'incorpore que dans les neuromastes fonctionnels, il était impératif d'observer de plus près les neuromastes présents chez les embryons *knockdown* pour WNK1/HSN2 et de déterminer d'abord si le phénotype découle d'un défaut dans le dépôt des pro-neuromastes par le primordium migrant. Un marquage de la protéine SV2 (*synaptic vesicle protein 2*, protéine pré-synaptique) a permis de révéler peu d'innervation par les axones afférents chez les cellules ciliées des neuromastes d'embryons *knockdown*. Il est également intéressant de noter que l'observation de l'innervation a été possible suite à l'identification sur fond clair de la structure en rosette du neuromaste, indiquant une certaine conservation dans le nombre de cellules déposées et dans leur organisation particulière. Les embryons *knockdown* pour WNK1/HSN2 présentent donc un phénotype particulier, où il y a défaut dans l'établissement de la LLP, système nerveux sensoriel périphérique spécifique au poisson zèbre.

### Spécificité du phénotype *knockdown* de WNK1/HSN2

De plus, l'efficacité des AMO a été vérifiée par buvardage de type Western, où la baisse de quantité de l'isoforme protéique WNK1/HSN2 a été détectée chez les trois conditions de *knockdown* lorsque comparé avec des embryons de type sauvage. Pour ce qui est de l'efficacité des morpholinos modifiant l'épissage chez les ARNm immatures (HSN2\_3' et HSN2\_5'), leur efficacité a été vérifiée par RT-PCR, où un peut voir la disparition de la bande représentant le transcrit incluant l'exon HSN2.

Il est commun d'effectuer une expérience de sauvetage, par injection d'ARN de type sauvage lors d'expériences de *knockdown* par AMO, afin de confirmer la spécificité du phénotype. Une construction complète avait été synthétisée à partir de clones de la protéine WNK1 humaine, incluant l'exon HSN2 et avait été injectée à des doses variables afin de doser l'effet obtenu. Une concentration de 50ng/μl, injectée en parallèle avec l'AMO HSN2\_3' (dont l'effet était plus prononcé) permit un sauvetage partiel du phénotype *knockdown* pour WNK1/HSN2, confirmant l'attribution du phénotype à l'absence de l'isoforme spécifique. La faible efficacité du sauvetage peut être due au fait que la construction complète ne représentait pas la protéine produite en temps normal, autant au niveau de l'épissage que de l'homologie entre la séquence de WNK1 chez l'humain et chez le poisson zèbre. Le sauvetage permet néanmoins de confirmer la spécificité du phénotype. Dans l'expérience suivante, l'ARN de la construction partielle (dont la séquence couvre les exons 1 à HSN2) est injectée pour tenter un sauvetage. Comme les mutations rapportées dans l'exon HSN2 mènent à la production d'une protéine tronquée, il a été généralement accepté que ces mutations causent une perte de fonction de l'isoforme. Toutefois, le domaine kinase de WNK1 se situe avant l'exon HSN2 (de l'exon 1 à 4; Shekarabi *et al.*, 2008) et il était donc envisageable que la fonction soit conservée chez la protéine tronquée, les mutations lui conféreraient alors un rôle toxique (par gain de fonction) menant au développement de la NHSA de type 2. Non seulement un sauvetage ne fut pas obtenu lors de l'injection de la construction partielle en parallèle avec l'AMO, mais les embryons

présentèrent un phénotype plus accentué que celui observé chez les embryons *knockdown*. L'ARN partiel fut donc injecté seul, à doses croissantes, ce qui permit de déterminer un certain effet néfaste sur la ligne latérale des embryons lorsque ceux-ci furent comparés avec des embryons de type sauvage (non injectés). Des injections de doses plus importantes des deux constructions en parallèle permirent de déterminer que l'injection même d'ARN cause des défauts dans l'établissement de la LLP, peu importe que la construction soit partielle ou complète. Les résultats obtenus lors de l'injection de la construction partielle ne prouvent donc pas un gain de fonction toxique de la protéine WNK1/HSN2 tronquée, mais bien un certain effet toxique des injections d'ARN sur le développement de la LLP.

En bref, le phénotype observé chez les embryons *knockdown* s'est révélé spécifique au système nerveux périphérique (la LLP) et une copie de WNK1/HSN2 humaine a réussi à sauver ce phénotype, confirmant la spécificité. La perte de fonction prédite de l'isoforme mutée dans les cas de NHSA de type 2 a été confirmée par l'injection d'ARN de la protéine tronquée chez des embryons *knockdown* dont le phénotype ne fut pas sauvé.

Afin de vérifier que le phénotype *knockdown* pour WNK1/HSN2 est bien spécifique au système nerveux sensoriel et non dû à un effet général sur le développement, des embryons transgéniques exprimant la GFP dans les neurones moteurs (HB9 :GFP) *knockdown* pour WNK1/HSN2 ont été produits. Ceux-ci ont révélé un système moteur tout à fait normal, malgré la présence de défauts dans la LLP, indiquant que le phénotype est bel et bien spécifique au système nerveux sensoriel. Ceci établit un parallèle entre le phénotype du poisson *knockdown* pour WNK1/HSN2 et les symptômes associés à la NHSA de type 2.

### **Le co-transporteur KCC2 et WNK1/HSN2**

Après avoir défini le phénotype présent chez les embryons *knockdown* pour WNK1/HSN2, nous avons débuté l'élaboration d'un mécanisme moléculaire sous-tendant à ces déficits développementaux. Comme WNK1 est une kinase ayant la capacité de lier un grand nombre d'interacteurs, plusieurs cibles de phosphorylation pourraient être impliquées dans la pathophysiologie de la NSHA de type 2.

Le co-transporteur KCC2 attira notre attention lorsqu'il fut identifié comme cible d'interaction avec la kinase WNK1 (Kahle *et al.*, 2010). Considérant le fait que KCC2, exprimé uniquement dans les neurones, avait préalablement été lié aux douleurs neuropathiques (Coull *et al.*, 2003; Cramer *et al.*, 2008; Kahle *et al.*, 2008; Hasbargen *et al.*, 2010; Janssen *et al.*, 2011) et que son rôle dans le développement du système nerveux était bien connu (Delpire, 2000; Kanaka *et al.*, 2001; Payne *et al.*, 2003; Stein *et al.*, 2004), ce co-transporteur également étudié chez le poisson zèbre (Reynolds *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010; Côté *et al.*, 2011) semblait une cible parfaite pour l'identification d'une voie moléculaire menant à la NSHA de type 2.

Malgré la grande variété d'études portant sur les co-transporteurs KCC, aucune ne s'intéressait spécifiquement au rôle que pourrait exercer ceux-ci au sein d'un système mécanosensoriel comme la ligne latérale postérieure. Afin d'établir si KCC2 était véritablement impliquée dans une voie de signalisation pathogène menant à la NSHA de type 2, il fallait d'abord en détecter la présence au sein de la LLP. C'est donc par hybridation *in situ* que nous avons pu détecter l'ARN de KCC2 au niveau d'un neuromaste mature (4 jours après la fertilisation) et ainsi d'en confirmer la présence non seulement dans la moelle, ce qui était déjà connu, mais dans la LLP. WNK1/HSN2 et KCC2 sont donc tous deux présents au niveau des neuromastes de la LLP.



Pour ce qui est de la nature de l'interaction possible entre WNK1/HSN2 et KCC2, la kinase à sérine/thréonine WNK1 régulerait le co-transporteur par phosphorylation, induisant sa désactivation (Kahle *et al.*, 2010). L'activation de KCC2 est dépendante de sa déphosphorylation, ce qui entraîne son adressage à la membrane, où le co-transporteur fonctionnel module la concentration intracellulaire de chlorure. Les mécanismes entourant le contrôle de l'activation et de la transcription de KCC2 sont mal connus, mais il fut rapporté que ces deux mécanismes pourraient être liés. En effet, le stress neuronal induit la désactivation de KCC2 et la régulation à la baisse de son expression chez des neurones de l'hippocampe en culture (Wake *et al.*, 2007). Suivant cette logique et puisqu'aucun anticorps ne permet de détecter KCC2 spécifiquement en buvardage de type Western chez le poisson zèbre, une RT-PCR fut effectuée pour déterminer les niveaux de KCC2 chez les embryons *knockdown* pour WNK1/HSN2. Il fut ainsi possible d'observer une sur-expression de l'ARN de KCC2 chez les embryons *knockdown* pour WNK1/HSN2 lorsque comparés avec des embryons de type sauvage, et ce, pour les trois approches AMO. La perte de l'isoforme WNK1/HSN2 induirait donc une sur-expression du co-transporteur neuronal KCC2.

Afin de confirmer l'implication de la sur-expression de KCC2 dans le phénotype observé chez les embryons *knockdown* pour WNK1/HSN2, de l'ARN humain KCC2 fut sur-exprimé chez des embryons de type sauvage. Cette méthode de sur-expression précoce avait déjà été effectuée chez le poisson zébré, mais seul l'effet sur les progéniteurs neuronaux de la moelle avait été examiné (Reynolds *et al.*, 2008; Côté *et al.*, 2011). La LLP des embryons sur-exprimant KCC2 humain fut observée tel que précédemment, soit par détection au colorant vital 4-di-2-ASP, et il fut ainsi possible d'observer un défaut dans l'établissement de la LLP similaire à ce qui avait été détecté chez les embryons *knockdown* pour WNK1/HSN2. La sur-expression de l'ARN de KCC2 humain phénocopie donc le *knockdown* de WNK1/HSN2. Ces résultats indiquent que l'isoforme WNK1/HSN2 agirait

dans le développement de la LLP par l'entremise du co-transporteur KCC2 en régulant son activation et possiblement son expression.

Dans le but de valider cette voie de signalisation nouvellement établie, plaçant WNK1/HSN2 en amont de KCC2, une expérience de sauvetage par double *knockdown* fut tentée. En effet, si une perte de fonction de l'isoforme spécifique au système nerveux WNK1/HSN2 mène au développement de la NHSA de type 2, que les mutations liées à la NHSA de type 2 causent une perte de fonction de l'isoforme induite chez le poisson zèbre par l'usage d'AMO, que les embryons *knockdown* pour WNK1/HSN2 affichent un défaut dans l'établissement de la LLP (système sensoriel périphérique), que ces mêmes embryons *knockdown* pour WNK1/HSN2 sur-expriment le co-transporteur KCC2, alors le *knockdown* de WNK1/HSN2 en parallèle avec celui de KCC2 (freinant ainsi la sur-expression) devrait rétablir le phénotype. Comme le phénotype *knockdown* de KCC2 n'avait pas été caractérisé préalablement chez le poisson zèbre, nous avons tout d'abord testé notre approche AMO et observé son effet sur la LLP avant d'effectuer le double *knockdown*. Bien entendu il faut prendre en considération le rôle essentiel de KCC2 dans la neurogenèse et dans l'homéostasie cellulaire; des *knockdown* de KCC2 ont préalablement été rapportés comme compromettant la survie neuronale chez des neurones de l'hippocampe (Pellegrino *et al.*, 2011). Il n'est alors pas surprenant d'obtenir des embryons *knockdown* pour KCC2 qui sont morphologiquement différents des embryons contrôles, en ayant toutefois LLP bien développée. C'est pour cette raison que seul l'effet du double *knockdown* sur l'établissement de la LLP est examiné. À ce niveau, les embryons double *knockdown* pour WNK1/HSN2 et KCC2 ont présenté un phénotype atténué, ayant une ligne latérale en meilleur état que les embryons soit *knockdown* pour WNK1/HSN2 seul ou sur-exprimant KCC2.

Considérant l'implication de KCC2 dans le développement neural, et l'importance de la régulation temporelle de son expression (Horn *et al.*, 2010; Côté *et al.*, 2011), il n'est

pas étonnant d'obtenir seulement un sauvetage partiel du phénotype *knockdown*. Effectivement, le rôle de KCC2 dans la prolifération des progéniteurs neuronaux est bien connu (Reynolds *et al.*, 2008; Côté *et al.*, 2011) et il est probable que la sur-expression entraînée par le *knockdown* de WNK1/HSN2 ait un effet néfaste sur la prolifération des cellules progénitrices constituant le primordium migrant, responsable du développement de la LLP. Pour valider cette hypothèse, des embryons *knockdown* pour WNK1/HSN2 exprimant le GFP dans la membrane des cellules du primordium (GFP membranaire sous le promoteur de la claudine-B) ont été utilisés. Ces embryons ont été observés alors que le primordium a entamé sa migration, mais avant qu'il ait déposé son premier pro-neuromaste, permettant une vue du primordium entier avant le début de son processus de mitose palliant aux dépôts. Il est ainsi possible d'observer que le primordium des embryons *knockdown* pour WNK1/HSN2 a une aire réduite par rapport aux embryons de type sauvage (non injectés) et ce, malgré le fait que la taille et l'organisation des cellules du primordium soient conservées. Ces résultats indiquent que la prolifération au sein du primordium même est affectée par la sur-expression de KCC2 entraînée par le *knockdown* de WNK1/HSN2.

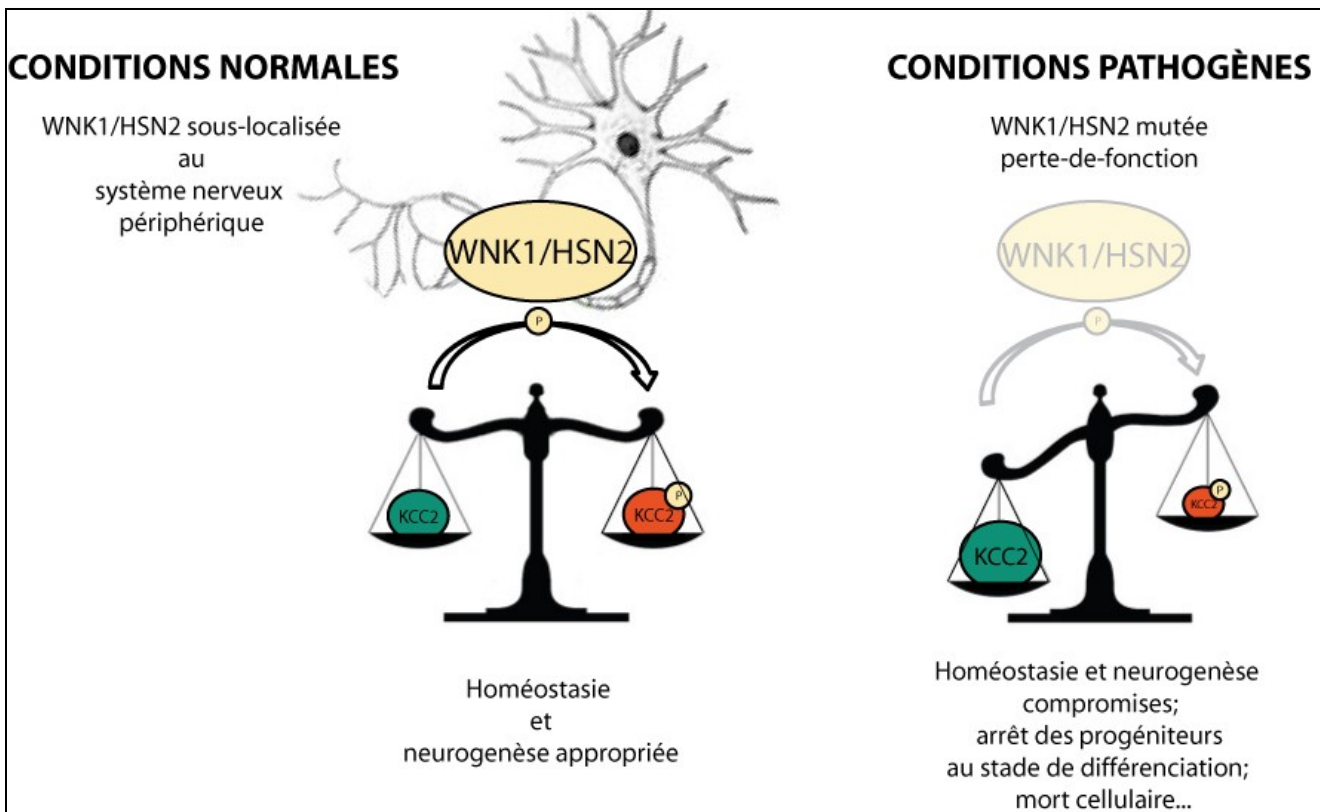
En bref, la sur-expression de KCC2 causée par la perte de l'isoforme WNK1/HSN2 agirait de deux façons pour produire le phénotype observé. Premièrement, elle entraînerait une baisse de la prolifération au niveau du primordium de la LLP (cellules progénitrices), diminuant le nombre de cellules pouvant être déposées en tant que pro-neuromastes. Deuxièmement, l'expression précoce du co-transporteur au niveau des neuromastes agirait comme frein à leur différenciation. En effet, la présence de KCC2 permet le revirement de la réponse GABAergique chez les neurones, participant ainsi à leur maturation, et il a été rapporté que l'expression précoce du co-transporteur interfère avec la différenciation des progéniteurs neuronaux, ces-derniers demeurant au stade de progéniteurs (Reynolds *et al.*, 2008; Côté *et al.*, 2011). Le *knockdown* de WNK1/HSN2 induirait donc une sur-expression de KCC2 au niveau des pro-neuromastes, dont le dépôt peut avoir été perturbé par le manque de cellules dans le primordium, qui interférerait avec leur différenciation. Les pro-

neuromastes sur-exprimant KCC2 seraient ensuite maintenus au stade de progéniteurs, ne pouvant pas débiter leur différenciation.

Quant au sort de ces progéniteurs indifférenciés, nous suggérons qu'ils sont par la suite éliminés par apoptose; l'embryon en pleine croissance effectuant un remodelage, éliminant les cellules inutiles. Nous avons d'ailleurs observé un marquage à l'orange d'acridine au niveau de la moelle, des neuromastes et du nerf de la ligne latérale postérieure chez nos embryons *knockdown* pour WNK1/HSN2, appuyant notre hypothèse quant au sort des progéniteurs indifférenciés. Alors que les études antérieures n'avaient détecté aucune mort cellulaire suite à une sur-expression de KCC2 à 24hpf (Reynolds *et al.*, 2008; Côté *et al.*, 2011), nous avons observé des embryons de stades développementaux plus avancés (72hpf versus 17hpf et 22hpf dans les études précédentes), suggérant que les mécanismes de mort cellulaire seraient déclenchés plus tardivement.

### **Mécanisme moléculaire possible**

À la lumière des résultats présentés précédemment, il a été possible d'élaborer un mécanisme moléculaire possible découlant des mutations tronquantes chez WNK1/HSN2 et menant au développement de la NHSA de type 2 (Figure 25).



**Figure 24: Mécanisme moléculaire proposé.** Le co-transporteur KCC2 activé est représenté en vert alors que KCC2 inhibé est représenté en rouge.

La kinase WNK1 a comme cible de phosphorylation le co-transporteur KCC2 à spécificité neuronale qui est impliqué dans le maintien de l'homéostasie et dans la neurogenèse. Également, lors d'un knockdown de WNK1/HSN2, l'isoforme de la kinase qui est spécifique au système nerveux, il se produit une sur-expression de KCC2, détectée par RT-PCR. Considérant que la phosphorylation de KCC2 par WNK1 permet sa désactivation, il est possible d'envisager que WNK1/HSN2 régule le niveau de KCC2 qui est activé, permettant une neurogenèse appropriée en maintenant KCC2 désactivée au début du développement, puis en permettant une activation plus tard, afin de permettre une différenciation neuronale. Il est également possible que WNK1/HSN2 soit impliquée dans la régulation de la transcription de KCC2 en plus de réguler son expression, ce qui expliquerait la sur-expression lors d'un *knockdown* de WNK1/HSN2. En conditions pathogènes (patients atteints de NHSA de type 2), l'isoforme WNK1/HSN2 est mutée et non fonctionnelle, ce qui entraînerait un déséquilibre dans le niveau de KCC2 activé. Ceci induirait une expression précoce du co-transporteur qui viendrait, comme démontré précédemment (Reynolds *et al.*, 2008; Horn *et al.*, 2010; Côté *et al.*, 2011) perturber la

prolifération (au niveau du primordium) et la différenciation neuronale (au niveau même des pro-neuromastes), créant un système nerveux sensoriel déficient. L'atteinte particulière au système nerveux sensoriel périphérique chez les patients atteints de la NHSA de type 2 découlerait du fait que l'isoforme WNK1/HSN2 a une sous-localisation particulière par rapport aux isoformes majoritaires de WNK1 (Shekarabi *et al.*, 2008) et que la perte de fonction de la kinase mutante, entraînant donc la sur-expression de KCC2, est également sous-localisée.

### **Travaux futurs**

Le mécanisme proposé ici est un premier aperçu dans la pathophysiologie de la NHSA de type 2, et plusieurs autres expériences seront nécessaires à sa validation. Tout d'abord, le développement de la ligne latérale postérieure devra être observé avec plus grande attention car pour l'instant, l'effet de la sur-expression de KCC2 sur son établissement demeure encore nébuleux : il en tient du fait que les mécanismes de signalisation et d'expression sous-tendant ce système mécanosensoriel complexe sont encore mal compris. Plus précisément, il serait essentiel d'élucider comment la baisse de prolifération initiale chez le primordium migrant, produite par la sur-expression de KCC2, affecte le dépôt de pro-neuromastes, et donc le développement de la LLP. Il serait aussi grandement intéressant d'observer comment la différenciation s'effectue au niveau des pro-neuromastes afin de confirmer le rôle qu'y joue KCC2.

De plus, le marquage en immunohistochimie de WNK1/HSN2 chez l'embryon du poisson zèbre est restreint à la LLP et n'est pas visible au niveau de la moelle, où se retrouvent les corps cellulaires des neurones sensoriels embryonnaires (les Rohon-Beards, présents dès 17 heures suivant la fertilisation). Les neurones Rohon-Beards sont responsables de la réponse au toucher de l'embryon grâce à leurs innervations qui s'étendent jusqu'à la surface de la peau (Svoboda *et al.*, 2001; Reyes *et al.*, 2004).

Considérant la présence de WNK1/HSN2 au niveau du nerfs sciatique, des cellules du ganglion spinal, du cerveau et de la moelle chez la souris (Shekarabi *et al.*, 2008) on pourrait s'attendre à un marquage dans la moelle du poisson zèbre. Il est toutefois important de noter que les neuromastes constituant la LLP sont des structures superficielles, facilement accessible aux anticorps, au contraire de la moelle, dont le marquage nécessite une perméabilisation plus rigoureuse. Suite à plusieurs tentatives infructueuses de marquage WNK1/HSN2 dans la moelle par immunohistochimie la technique d'hybridation *in situ* fut tentée. Deux sondes furent synthétisées contre l'exon HSN2 à partir de clones poisson zèbres (produits RT-PCR) et l'hybridation se déroula sur embryon entier à plusieurs stades du développement (48hpf, 72hpf et 4dpf). Les résultats furent non concluants; les embryons marqués présentaient un haut niveau de signal de fond et un profil d'expression de WNK1/HSN2 ne pouvait en être déduit (résultats non montrés). Ceci pourrait être dû à la faible expression de l'isoforme WNK1/HSN2 par rapport aux autres isoformes de la kinase WNK1 et à sa localisation restreinte : le signal émis par l'hybridation à l'exon HSN2 serait perdu dans le signal de fond, qui n'est pas négligeable lors d'une hybridation sur embryon entier de plus de 48hpf. Il est par conséquent impossible avec les techniques disponibles en ce moment d'établir un profil d'expression plus détaillé que ce qui est présenté ici.

Sur un autre plan, il pourrait être intéressant de déterminer par quelle façon la perte de WNK1/HSN2 entraîne une sur-expression de KCC2, en plus de confirmer les résultats présentés ici par une qPCR. Bien que la régulation de l'expression de KCC2 ait été liée avec sa désactivation fonctionnelle (Wake *et al.*, 2007) la façon dont ceci se produit est encore inconnue.

### **Autres hypothèses**

Il est également possible que d'autres interacteurs soient impliqués dans ce mécanisme pathogène. En effet, WNK1 est une kinase qui a la capacité de lier et d'interagir avec un grand nombre de cibles, dont plusieurs ont été rapportées dans la littérature. Certaines de ces cibles pourraient avoir un lien avec des procédés impliqués dans la NHSA de type 2, dont la neurogenèse, l'extension neurale, la douleur ou même la myélinisation.

Par exemple, la présence de l'isoforme WNK1/HSN2 dans les cellules de Schwann (Shekarabi *et al.*, 2008) et le manque de fibres myélinisées observé en biopsie du nerf sural de patients atteints de la NHSA de type 2 (Dyck, 1966) indiquent une implication des mécanismes de myélinisation dans l'établissement de la neuropathie. Quoique très intéressant, cet aspect n'a pas été étudié chez notre modèle poisson zèbre, pour la simple et bonne raison que la myélinisation ne débute pas avant 3 jours post-fertilisation chez l'embryon (Buckley *et al.*, 2010), ce qui dépasse la limite temporelle de notre approche AMO. Il faut également attendre jusqu'à 7 jours post-fertilisation pour que les axones soient entourés de myéline compactée (Pogoda *et al.*, 2006). Considérant la nature temporaire de notre *knockdown*, l'implication de la myélinisation dans le développement de la NHSA de type 2 fut impossible à déterminer. Il pourrait cependant être intéressant de vérifier si l'absence de l'isoforme WNK1/HSN2 a un effet au niveau des progéniteurs des oligodendrocytes, comme c'est le cas pour les progéniteurs neuronaux de la ligne latérale.

La kinase WNK1 interagirait entre autres avec LINGO-1, (*leucine rich repeat and Ig domain containing 1*), une protéine transmembranaire contenant un domaine de répétitions riche en leucine. LINGO-1 est un médiateur de la signalisation intracellulaire en réponse aux inhibiteurs associés à la myéline et est impliqué dans la régulation de l'extension des neurites (Zhang *et al.*, 2009; Kurth, 2010; McCormick et Ellison, 2011). Elle serait aussi liée à la régénération axonale, à la survie neuronale et à la différenciation



des oligodendrocytes, mécanismes important dans l'établissement et le maintien du système nerveux (Mi *et al.*, 2008). En effet, LINGO-1 est une composante du complexe NgR/LINGO-1/p75 qui est responsable de l'activité des inhibiteurs de myéline afin de réguler la croissance axonale au sein du système nerveux central (Zhang *et al.*, 2009). Son interaction avec WNK1 a été rapportée au niveau des neurones corticaux. Effectivement, le domaine cytoplasmique de LINGO-1 contient un site canonique de phosphorylation semblable à celui retrouvé sur EGFR et WNK1, qui a été identifiée comme étant un partenaire de liaison. En effet, lorsque l'expression de WNK1 est inhibée, l'extension neurale a été favorisée; lorsqu'elle est surexprimée, l'inhibition de l'extension neurale par l'entremise de Nogo est atténuée. WNK1 serait donc impliquée dans la régulation de la signalisation par Nogo durant la différenciation neuronale (Zhang *et al.*, 2009). Ceci pourrait indiquer que les déficits sensoriels sont non seulement dus au manque de différenciation neuronale, comme nous le suggérons, mais aussi à des défauts dans l'extension des neurites pour les neurones qui se seraient différenciés.

Une autre protéine identifiée comme cible de phosphorylation par la kinase WNK1 est la synaptotagmin 2 (Lee *et al.*, 2004). La synaptotagmin 2 (Syt2) est une protéine membranaire associée aux vésicules synaptiques agissant comme senseur calcique pour la libération rapide de neurotransmetteurs des terminaux pré-synaptiques (Fox et Sanes, 2007). Elle a également un rôle dans le trafic membranaire et régule la fusion vésiculaire, contrôlant ainsi l'exocytose et l'endocytose. La phosphorylation de Syt2 par WNK1 causerait des changements dans la dépendance calcique de sa liaison avec les vésicules, agissant comme un interrupteur d'interaction (Lee *et al.*, 2004). En effet, lorsque le niveau de calcium est bas, Syt2 interagit avec WNK qui viendra la phosphoryler si elle est activée. Lorsque le niveau de calcium est plus élevé, la synaptotagmine interagit avec la membrane, empêchant la phosphorylation par la kinase, cependant, si la synaptotagmine a déjà interagit avec WNK1, le niveau de calcium nécessaire pour l'interaction membranaire sera plus élevé. Ceci permet de conclure que la phosphorylation par WNK1 régule Syt2 en modulant

ses interactions avec la membrane, qui elles, sont dépendantes du niveau de calcium (McCormick et Ellison, 2011). WNK1 aurait donc la capacité, par régulation de Syt2, d'inhiber ou de promouvoir la libération de neurotransmetteur par la fusion vésiculaire, ce qui pourrait être impliqué dans la transmission des signaux nociceptifs absents chez les patients atteints de la NHSA de type 2. Cette hypothèse serait indépendante du lien que nous montrons entre WNK1/HSN2 et le co-transporteur KCC2. Il est possible qu'il s'agisse d'un mécanisme se déroulant dans les neurones ayant pu se différencier, interférant donc avec la transmission des signaux et non dans le développement du système nerveux sensoriel.

WNK1 a aussi été identifiée comme étant un substrat pour la protéine kinase B (Akt/PKB), comme un élément en aval de la voie impliquant la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) (Vitari *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2005). Il a été suggéré que cette phosphorylation ne régule pas l'activité de la kinase ou n'agit pas directement sur sa localisation cellulaire (Vitari *et al.*, 2004). Cependant, l'activation de PKB a été liée à la douleur neuropathique dans le ganglion spinal des rats ayant subi une ligature du nerf spinal (Xu *et al.*, 2007) ainsi qu'à la douleur périphérique liée à la capsaïcine (Sun *et al.*, 2007). Ceci pourrait donc indiquer un rôle pour WNK1 dans une voie de signalisation impliquée dans la douleur.

Une autre hypothèse de l'établissement de la NHSA de type 2 implique une kinésine, la KIF1A (*kinesin family member 1A*), responsable du transport antérograde des précurseurs de vésicules synaptiques le long des axones. En effet, le groupe du Dr Guy Rouleau a récemment identifié des mutations dans le gène de KIF1A, chez des patients atteints de NHSA de type 2 qui n'avaient pas de mutations dans le gène WNK1 (Rivière *et al.*, 2011). Bien qu'ils aient démontré un lien entre une isoforme particulière de la kinésine et l'isoforme WNK1/HSN2, leurs résultats suggèrent une hypothèse qui demeure non validée : KIF1A serait responsable du transport antérograde de WNK1/HSN2 le long des

axones. Ceci permettrait d'expliquer la sous-localisation particulière de WNK1/HSN2 par rapport aux autres isoformes de la kinase WNK1. Il est alors possible que la kinésine KIF1A soit aussi impliquée dans le mécanisme moléculaire menant au développement de la NHSA de type 2 lors d'une mutation causant la perte de fonction de l'isoforme WNK1/HSN2.

En bref, il est clair qu'en identifiant d'autres interacteurs de WNK1/HSN2, il sera possible d'élaborer un mécanisme moléculaire plus détaillé. Celui-ci pourra éventuellement être validé dans des modèles animaux supérieurs, dont le système nerveux est plus complexe. De plus, la découverte d'autres interacteurs pourra également permettre d'identifier des cibles thérapeutiques qui pourront un jour façonner un traitement pour la NHSA de type 2.

## Conclusion

Les expériences présentées ici constituent un premier aperçu du rôle neuronal de la kinase WNK1 et du mécanisme d'action de la NHSA de type 2. Il fut montré, à l'aide du modèle animal poisson zèbre, que les mutations chez WNK, plus précisément au sein de son exon à épissage alternatif HSN2, mènent à une perte de fonction. Afin de répliquer cette perte de fonction, des embryons *knockdown* pour WNK1/HSN2 furent produits et révélèrent un défaut dans l'établissement de la ligne latérale postérieure (LLP), un système mécanosensoriel périphérique unique. Un lien fut ensuite établi avec le co-transporteur KCC2, dont la phosphorylation par WNK1 permet une désactivation. L'expression de KCC2 fut observée au niveau des neuromastes matures de la LLP et une expérience de RT-PCR révéla une augmentation dans l'expression du co-transporteur chez des embryons *knockdown* pour WNK1/HSN2. Une sur-expression d'ARN humain de KCC2 produit le même phénotype que le *knockdown* de WNK1/HSN2, admettant une voie de signalisation plaçant WNK1/HSN2 en amont de KCC2. L'implication de KCC2 dans le phénotype obtenu lors de *knockdown* de WNK1/HSN2 fut par la suite confirmée par un double *knockdown* pour WNK1/HSN2 et KCC2 qui produit un phénotype atténué. Il fut ensuite avancé que l'implication du co-transporteur dans le phénotype peut prendre place au niveau même du primordium migrant, progéniteur de la LLP.

Ces résultats permirent d'établir un premier mécanisme pathogène induit par les mutations dans l'exon HSN2 de la kinase WNK1 qui passerait par une sur-expression de KCC2. En effet, WNK1 agirait en régulant l'activation et possiblement l'expression du co-transporteur et le *knockdown* de WNK1/HSN2 induirait donc une sur-expression de KCC2 au niveau des pro-neuromastes. Le dépôt de pro-neuromastes pourrait préalablement avoir été perturbé par le manque de cellules dans le primordium, autre conséquence de la sur-expression de KCC2. Au niveau des neuromastes, celle-ci interférerait avec la différenciation, produisant une LLP défectueuse. Les pro-neuromastes surexprimant KCC2 seraient ensuite maintenus au stade de progéniteurs, ne pouvant pas débiter leur différenciation, puis supprimés par apoptose. WNK1/HSN2 aurait donc bel et bien un rôle développemental.

## Bibliographie

- Aanes, H., Winata, C.L., Lin, C.H., Chen, J.P., Srinivasan, K.G., Lee, S.G., Lim, A.Y., Hajan, H.S., Collas, P., Bourque, G., Gong, Z., Korzh, V., Aleström, P., Mathavan, S. 2011. Zebrafish mRNA sequencing deciphers novelties in transcriptome dynamics during maternal to zygotic transition. *Genome Res.* 21(8):1328-38
- Auer-Grumbach, M., Mauko, B., Auer-Grumbach, P., Pieber, T.R. 2005. Molecular Genetics of Hereditary Sensory Neuropathies, *Neuromolecular Medicine*, 8(1-2):147-58
- Axelrod, F.B., Gold-von Simson, G. 2007. Hereditary sensory and autonomic neuropathies : type II, III and IV. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 2 :39
- Bandmann, O. et Burton, E.A. 2010. Genetic zebrafish models of neurodegenerative disease. *Neurobiology of Disease* 40:58-65
- Ben-Ari, Y., Cherubini, E., Corradetti, R., Gaiarsa, J.L. 1989. Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurones. *J Physiol.* 416: 303–325.
- Bertram, S., Cherubino, F., Bossi, E., Castagna, M., Peres, A. 2011. GABA reverse transport by the neuronal cotransporter GAT1 : Influence of internal chloride depletion. *Am J Physiol Cell Physiol* doi:10.1152/jajpcell.00120.2011
- Bill, B.R., Petzold, A.M., Clark, K.J., Schimmenti, L.A., Ekker, S.C. 2009. A Primer for Morpholino Use in Zebrafish. *Zebrafish*, 6(1):69-77
- Brustein, E., Saint-Amant, L., Buss, R.R., Chong, M., McDearmid, J.R., Drapeau, P. 2003. Steps during the development of the zebrafish locomotor network. *Journal of Physiology*, 97:77-86
- Buckley, C.C., Marguerie, A., Alderton, W.K., Franklin, R.J.M. 2010. Temporal Dynamics of Myelination in the Zebrafish Spinal Cord. *Glia* 58: 802-812
- Coen, K., Pareyson, D., Auer-Grumbach, M., Buyse, G., Goemans, N., Claeys, K.G., Verpoorten, N., Laurà, M., Scaioli, V., Salmhofer, W., Pieber, T.R., Nelis, E., De Jonghe, P., Timmerman, V. 2006. Novel mutations in the HSN2 gene causing hereditary sensory and autonomic neuropathy type II. *Neurology* 66:748-751
- Collazo, A., Fraser, S.E., Mabee, P.M. 1994. A Dual Embryonic Origin for Vertebrate Mechanoreceptors. *Science*, 264:426-430
- Côté, S. 2011. *Developmental Biology* (Sous presse)

- Coull, J.A., Boudreau, D., Bachand, K., Prescott, S.A., Nault, F., Sk, A., De Koninck, P., De Koninck, Y. 2003. Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature* 424(6951): 938-42
- Cramer, S.W., Baggott, C., Cain, J., Tilghman, J., Allcock, B., Miranpuri, G., Rajpal, S., Sun, D., Resnick, D. 2008. The role of cation-dependent chloride transporters in neuropathic pain following spinal cord injury. *Mol Pain*. 4:36
- Dambly-Chaudière, C., Sapède, D., Soubiran, F., Decorde, K., Gompel, N., Ghysen, A. 2003. The lateral line of zebrafish: a model system for the analysis of morphogenesis and neural development in vertebrates. *Biology of the Cell* 95:579-587
- Delaloy, C., Lu, J., Houot, A-M., Disse-Nicodeme, S., Gasc, J-M., Corvol, P., Jeunemaitre, X. 2003. Multiple promoters in the WNK1 gene: one controls expression of a kidney-specific kinase-defective isoform. *Mol. Cell. Biol.* 23: 9208-9221
- Delpire, E. 2000. Cation-Chloride Cotransporters in Neuronal Communication. *News Physiol. Sci.* 15: 309-312
- Dyck, P.J. 1966. Histologic measurements and fine structure of biopsied sural nerve: normal, and in peroneal muscular atrophy, hypertrophic neuropathy, and congenital sensory neuropathy. *Mayo Clin. Proc.* 41:742-774
- Dyck, P.J. 1993. Neuronal atrophy and degeneration predominantly affecting peripheral sensory neuropathy and autonomic neurons, in *Peripheral Neuropathy*, 3<sup>rd</sup> Edition, Dyck, P.J., Thomas, P.K., Griffin, J.W., Low, P.A., Poduslo, J.F. Editors. Editions Saunders, Philadelphie, pp. 1065-1093
- Eisen, J.S. et Smith, J.C. 2008. Controlling morpholino experiments: don't stop making antisens. *Development*, 135 :1735-1743
- Faucherre, A., Pujol-Martí, J., Kawakami, K., López-Schier, H. 2009. Afferent Neurons of the Zebrafish Laterla Line Are Strict Selectors of Hair-Cell Orientation. *PLoS ONE*, 4(2): e4477 Epub 2009 Feb 18 (doi: 10.1371/journal.pone.0004477)
- Flanagan-Steet, H., Fox, M.A., Meyer, D., Sanes, J.R. 2005. Neuromuscular synapses can form in vivo by incorporation of initially aneural postsynaptic specializations. *Development*, 132:4471-4481
- Fox, M.A. and Sanes, J.R. 2007. Synaptotagmin I and II Are Present in Distinct Subsets of Central Synapses. *The Journal of Comparative Neurology*, 503 : 280-296

- Ghysen, A. et Dambly-Chaudière, C. 2003. Le développement du système nerveux : de la mouche au poisson, du poisson à l'homme... *Médecine/Sciences*, 19 :575-581
- Ghysen, A. et Dambly-Chaudière, C. 2007. The lateral line microcosmos. *Genes & Development*, 21:2118-2130
- Haas, P. et Gilmour, D. 2006. Chemokine signaling mediates self-organizing tissue migration in the zebrafish lateral line. *Dev. Cell.* 10(5):673-680
- Hasbargen, T., Ahmed, M.M., Miranpuri, G., Li, L., Kahle, K., Resnick, D., Sun, D. 2010. Role of NKCC1 and KCC2 in the development of chronic neuropathic pain following spinal cord injury. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1198: 168-172
- Harris, J.A., Cheng, A.G., Cunningham, L.L., MacDonald, G., Raible, D.W., Rubel, E.W. 2003. Neomycin-Induced Hair Cell Death and Rapid Regeneration in the Lateral Line of Zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the Association for Research in Otolaryngology*, 4: 219-234
- Heller, I.H., et Robb, P. 1955. Hereditary sensory neuropathy. *Neurology*, 5 :15-29
- Hernández, P.P., Moreno, V., Olivari, F.A., Allende, M.L. 2005. Sub-lethal concentrations of waterborne copper are toxic to lateral line neuromasts in zebrafish (*Danio rerio*). *Hearing Research*, 213:1-10
- Horn, Z., Ringstedt, T., Blaesse, P., Kaila, K., Herlenius, E. 2010. Premature expression of KCC2 in embryonic mice perturbs neural development by an ion transport-independent mechanism. *European Journal of Neuroscience* 31:2142-2155
- Howard, H.C., Mount, D.B., Rochefort, D., Byun, N., Dupré, N., Lu, J., Fan, X., Song, L., Rivière, J-B., Prévostl, C., Horst, J., Simonati, A., Lemcke, B., Welch, R., England, R., Zhan, F.Q., Mercado, A., Siesser, W.B., George, A.L. Jr, McDonald, M.P., Bouchard, J-P., Mathieu, J., Delpire, E., Rouleau, G.A. 2002. The K-Cl cotransporter KCC3 is mutant in a severe peripheral neuropathy associated with agenesis of the corpus callosum. *Nature Genetics* 32:384-392
- Hübner, C.A., Stein, V., Hermans-Borgmeyer, I., Meyer, T., Ballanyi, K., Jentsch, T.J. 2001. Disruption of KCC2 reveals an essential role of K-Cl cotransport already in early synaptic inhibition. *Neuron* 30(2): 515-524

- Janssen, S.P.M., Truin, M., Van Kleef, M., Joosten, E.A.J. 2011. Differential GABAergic disinhibition during the development of painful peripheral neuropathy. *Neuroscience* doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.03.060
- Jiang, Z.Y., Zhou, Q.L, Holik, J., Patel, S., Leszyk, J., Coleman, K., Chouinard, M., Czech, M.P. 2005. Identification of WNK1 as a Substrate of Akt/Protein Kinase B and a Negative Regulator of Insulin-stimulated Mitogenesis in 3T3-L1 Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 280(22): 21622-21628
- Johnson, R.H. et Spalding, M.K. 1964. Progressive sensory neuropathy in children. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 27:125-130
- Jowett, T. 2001. Double in situ hybridization techniques in zebrafish. *Methods* 23: 345–358
- Kabashi, E., Champagne, N., Brustein, E., Drapeau, P. 2010. In the swim of things : recent insights to neurogenetic disorders from zebrafish. *Trends in Genetics* 26:373-381
- Kahle, K.T., Rinehart, J., Lifton, R.P. 2010. Phosphoregulation of the Na-K-2Cl and K-Cl cotransporters by the WNK kinases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1802(12): 1150-1158
- Kahle, K.T., Staley, K.J., Nahed, B.V., Gamba, G., Hebert, S.C., Lifton, R.P., Mount, D.B. 2008. Roles of the cation-chloride cotransporters in neurological disease. *Nat Clin Pract Neurol.* 9 :490-503
- Kanaka, C., Ohno, K., Okabe, A., Kuriyama, K., Itoh, T., Fukuda, A., Sato, K. 2001. The differential expression of patterns of messenger RNAs encoding K-Cl transporters (KCC1,2) and Na-K-2Cl cotransporter (NKCC1) in the rat nervous system. *Neuroscience*, 104(4):933-946
- Kurth, I. 2010. Hereditary Sensory and Autonomic Neuropathy Type II in GeneReviews [Internet], Pagon, R.A., Bird, T.D., Dolan, C.R., Stephens, K., Editors. Seattle, University of Washington, Seattle, 1993-2011
- Lafrenière, R.G., MacDonald, M.L.E., Dubé, M-P., MacFarlane, J., O’Driscoll, M., Brais, B., Meilleur, S., Brinkman, R.R., Dadvivas, O., Pape, T., Platon, C., Radomski, C., Risler, J., Thompson, J., Guerra-Escobio, A-M., Davar, G., Breakefield, X.O., Pimstone, S.N., Green, R., Pryse-Phillips, W., Goldberg, Y.P., Younghusband, H.B., Hayden, M.R., Sherrington, R., Rouleau, G.A., Samuels, M.E. 2004. Identification of a Novel Gene (HSN2) Causing Hereditary Sensory Neuropathy Type II through the Study of Canadian Genetic Isolates, *Am. J. Hum. Genet.*, 74:1064-1073



- Laguerre, L., Ghysen, A., Dambly-Chaudière, C. 2009. Mitotic Patterns in the Migrating Lateral Line Cells of Zebrafish Embryos. *Developmental Dynamics*, 238: 1042-1051
- Ledent, V. 2002. Postembryonic development of the posterior lateral line in zebrafish. *Development*, 129:597-604
- Lee, B-H., Min, X., Heise, C.J., Xu, B-e., Chen, S., Shu, H., Luby-Phelps, K., Goldsmith, E.J., Cobb, M.H. 2004. WNK1 Phosphorylates Synaptotamin 2 and Modulates Its Membrane Binding. *Molecular Cell*, 15: 741-751
- Lee, H.H.C., Walker, J.A., Williams, J.R., Goodier, R.J., Payne, J.A., Moss, S.J. 2007. Direct Protein Kinase C-dependent Phosphorylation Regulates the Cell Surface Stability and Activity of the Potassium Chloride Cotransporter KCC2. *The Journal of Biological Chemistry* 282(41):29777-29784
- Lee, S-S., Lee, S-H., Han, S-H. 2002. Terminal changes in hereditary sensory and autonomic neuropathy: a long-term follow-up of a sporadic case. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 105:175-179
- Lee, B-H., Min, X., Heise, C.J., Xu, B-E., Chen, S., Shu, H., Luby-Phelps, K., Goldsmith, E.J., Cobb, M.H. 2004. WNK1 Phosphorylates Synaptotagmin2 and Modulates Its Membrane Binding. *Molecular Cell*, 15: 741-751
- Liao, J.C. 2010. Organization and physiology of posterior lateral line afferent neurons in larval zebrafish. *Biol. Lett.* 6:402-405
- Loggia, M.L., Bushnell, M.C., Tétrault, M., Thiffault, I., Bhérer, C., Mohammed, N.K., Kuchinad, A.A., Laferrière, A., Dicaire, M-J., Loisel, L., Mogil, J.S., Brais, B. 2009. Carriers of Recessive *WNK1/HSN2* Mutations for Hereditary Sensory and Autonomic Neuropathy Type 2 (HSAN2) Are More Sensitive to Thermal Stimuli. *J. Neurosci.* 29(7):2162-2166
- López-Schier, H., Starr, C.J., Kappler, J.A., Kollmar, R., Hudspeth, A.J. 2004. Directional Cell Migration Establishes the Axes of Planar Polarity in the Posterior Lateral-line Organ of the Zebrafish. *Dev. Cell.* 7(3):401-412
- Ludwig, A., Uvarov, P., Soni, S., Thomas-Crussels, J., Airaksinen, M.S., Rivera, C. 2011. Early Growth Response 4 Mediates BDNF Induction of Potassium Chloride Cotransporter 2 Transcription. *The Journal of Neuroscience* 31(2):644-649
- Ma, E.Y. et Raible, D.W. 2009. Signaling pathways regulating zebrafish lateral line development. *Current Biology*, 19(9):R381-R386

- Mathur, P. et Guo, S. 2010. Use of zebrafish as a model to understand mechanisms of addiction and complex neurobehavioral phenotypes. *Neurobiology of Disease* 40:66-72
- McCormick, J.A., Ellison, D.H. 2011. The WNKs : Atypical Protein Kinases With Pleiotropic Actions. *Physiol. Rev.* 91:177-219
- Mi, S., Sandrock, A., Miller, R.H. 2008. LINGO-1 and its role in CNS repair. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40: 1971-1978
- Murray, T.J. 1973. Congenital Sensory Neuropathy. *Brain*, 96:387-394
- Naito, S., Ohta, A., Sohara, E., Ohta, E., Rai, T., Sasaki, S., Uchida, S. 2010. Regulation of WNK1 kinase by extracellular potassium. *Clin Exp Nephrol*, 15(2):195-202
- Náray-Fejes-Tóth, A., Snyder, P.M., Fejes-Tóth, G. 2004. The kidney-specific WNK1 isoform is induced by aldosterone and stimulates epithelial sodium channel-mediated Na<sup>+</sup> transport. *PNAS* 101(50):17434-17439
- Ogryzlo, M.A. 1946. A Familial Peripheral Neuropathy of unknown Etiology Resembling Morvan's Disease. *Canad. M.A.J.*, 54:547-553
- Pacheco-Cuellar, G., González-Huerta, L.M., Valdés-Miranda, J.M., Peláez-González, H., Zenteno-Bacheron, S., Cazarin-Barrientos, J., Cuevas-Covarrubias, S.A. 2011. Hereditary sensory and autonomic neuropathy II due to novel mutation in the HSN2 gene in Mexican families, *J Neurol* 258(10): 1890-1892
- Payne, J.A., Rivera, C., Voipio, J., Kaila, K. 2003. Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends in Neurosciences* 26(4):199-206
- Pellegrino, C., Gubkina, O., Shaefer, M., Becq, H., Ludwig, A., Mukhtarov, M., Chudotvorova, I., Corby, s., Salyha, Y., Salozhin, S., Bregestobski, P., Medina, I. 2011. Knocking down of the KCC2 in rat hippocampal neurons increases intracellular chloride concentration and compromises neuronal survival. *The Journal of Physiology*, 589(10):2475-2496
- Pogoda, H-M., Sternheim, N., Lyons, D.A., Diamond, B., Hawkins, T.A., Woods, I.G., Bhatt, D.H., Franzini-Armstrong, C., Dominguez, C., Arana, N., Jacobs, J., Nix, R., Fetcho, J.R., Talbot, W.S. 2006. A genetic screen identifies genes essential for

- development of myelinated axons in zebrafish. *Developmental Biology*, 298: 118-131
- Reyes, R., Haendel, M., Grant, D., Melancon, E., Eisen, J.S. 2004. Slow degeneration of zebrafish Rohon-Beard neurons during programmed cell death. *Dev Dyn* 229:30-41
- Reynolds, A., Brustein, E., Liao, M., Mercado, A., Babilonia, E., Mount, D.B., Drapeau, P. 2008. Neurogenic Role of the Depolarizing Chloride Gradient Revealed by Global Overexpression of KCC2 from the Onset of Development. *The Journal of Neuroscience*, 28(7):1588-1597
- Rivière, J-B., Ramalingam, S., Lavastre, V., Shekarabi, M., Holbert, S., Lafontaine, J., Srour, M., Merner, N., Rochefort, D., Hince, P., Gaudet, R., Mes-Masson, A-M., Baets, J., Houlden, H., Brais, B., Nicholson, G.A., Van Esch, H., Nafissi, S., De Jonghe, P., Reilly, M.M., Timmerman, V., Dion, P.A., Rouleau, G.A. 2011. KIF1A, an Axonal Transporter of Synaptic Vesicles, Is Mutated in Hereditary Sensory and Autonomic Neuropathy Type 2. *The American Journal of Human Genetics*, doi:10.1010/j.ajhg.2011.06.013
- Rivière, J-B, Verlaan, D.J., Shekarabi, M., Lafrenière, R.J., Bénard, M., Der Kaloustian, V.M., Shbaklo, Z., Rouleau, G.A. 2004. A Mutation in the HSN2 Gene Causes Sensory Neuropathy Type II in a Lebanese Family. *Ann Neurol*, 56:572-575
- Roddiar, K., Thomas, T., Marleau, G., Gagnon, A.M., Dicaire, M.J., St-Denis, A., Gosselin, I., Sarrazin, A.M., Larbrisseau, A., Lambert, M., Vanasse, M., Gaudet, D., Rouleau, G.A., Brais, B. 2005. Two mutations in the HSN2 gene explain the high prevalence of HSN2 in French Canadians. *Neurology*, 64:1762-1767
- Rotthier, A., Baets, J., De Vriendt, E., Jacobs, A., Auer-Grumbach, M., Lévy, N., Bonello-Palo, N., Sebnem Kilic, S., Weis, J., Nascimento, A., Swinkels, M., Kruyt, M.C., Jordanova, A., De Jonghe, P., Timmerman, V. 2009. Genes for hereditary sensory neuropathies: a genotype-phenotype correlation. *Brain*, 132(Pt 10):2699-71
- Saint-Amant, L., Drapeau, P. 2000. Motoneuron activity patterns related to the earliest behavior of the zebrafish embryo. *J Neurosci*, 20:3964-72
- Salin-Cantegrel, A., Shekarabi, M., Holbert, S., Dion, P., Rochefort, D., Laganière, J., Dacal, S., Hince, P., Karemera, L., Gaspar, C., Lapointe, J-Y., Rouleau, G.A. 2008. HMSN/ACC truncation mutation disrupt brain-type creatine kinase-dependent activation of K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> co-transporter 3. *Human Molecular Genetics* 17(17):2703-2711

- Schuster, K., Dambly-Chaudière, C., Ghysen, A. 2010. Glial cell line-derived neurotrophic factor defines the path of developing and regenerating axons in the lateral line system of zebrafish. *PNAS*, 107(45):19531-19536
- Shekarabi, M., Girard,, N., Rivière, J-B., Dion, P., Houle, M., Toulouse, A., Lafrenière, R.G., Vercauteren, F., Hince, P., Laganière, J., Rochefort, D., Faivre, L., Samuels, M., Rouleau, G.A. 2008. Mutations in the nervous system-specific *HSN2I* exon of *WNK1* cause hereditary sensory neuropathy type II, *J. Clin. Invest.* 118(7):2496-505
- Stein, V., Hermans-Borgmeyer, I., Jentsch, T.J., Hübner, C.A. 2004. Expression of the KCl Cotransporter KCC2 Parallels Neuronal Maturation and the Emergence of Low Intracellular Chloride. *The Journal of Comparative Neurology* 468:57-64
- Sun, X., Gao, L., Yu, R.K., Zeng, G. 2006. Down-regulation of WNK1 protein kinase in neural progenitor cells suppresses cell proliferation and migration. *Journal of Neurochemistry*, 99: 1114-1121
- Sun, Y-T., Lin, T-S., Tzeng, S-F., Delpire, E., Shen, M-R. 2010. Deficiency of Electroneutral K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> Cotransporter 3 Causes a Disruption in Impulse Propagation Along Peripheral Nerves. *Glia* 58:1544-1552
- Sun, R., Yan, J., Willis, W.D. 2007. Activation of protein kinase B/Akt in the periphery contributes to pain behavior induced by capsaicin in rats. *Neuroscience*, 144(1):286-94
- Svoboda, K.R., Linares, A.E., Ribera, A.B. 2001. Activity regulates programmed cell death of zebrafish Rohon-Beard neurons. *Development* 128:3511-3520
- Takagi, M., Ozawa, T., Hara, K., Naruse, S., Ishihara, T., Shimbo, J., Igarashi, S., Tanaka, K., Onodera, O., Nishizawa, M. 2006. New HSN2 mutation in Japanese patient with hereditary sensory and autonomic neuropathy type 2. *Neurology* 66:1251-1252
- Trapani, J.G. et Nicolson, T. 2011. Mechanism of spontaneous activity in afferent neurons of the zebrafish lateral-line organ. *J. Neurosci.* 31(5): 1614-1623
- Veldman, M.B. et Lin, S. 2008. Zebrafish as a Developmental Model Organism for Pediatric Research. *Pediatric Research*, 64(5):470-476
- Veríssimo, F., Jordan, P. 2001. WNK kinases, a novel protein kinase subfamily in multi-cellular organisms. *Oncogene* 20:5562-5569
- Vitari, A.C., Deak, M., Collins, B.J., Morrice, N., Prescott, A.R., Phelan, A., Humphreys, S., Alessi, D.R. 2004. WNK1, the kinase mutated in an inherited high-blood-

- pressure syndrome, is a novel PKB (protein kinase B)/Akt substrate. *Biochem. J.* 378: 257-268
- Wake, H., Watanabe, M., Moorhouse, A.J., Kanematsu, T., Horibe, S., Matsukawa, N., Asai, K., Ojika, K., Hirata, M., Nabekura, J. 2007. Early Changes in KCC2 Phosphorylation in Response to Neuronal Stress Result in Functional Downregulation. *The Journal of Neuroscience* 27(7):1642-1650
- Westerfield, M. 1995. *The Zebrafish Book : A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*, 3<sup>rd</sup> Edition, Eugene, Oregon, University of Oregon Press, 385p.
- Wilson, F.H., Disse-Nicodème, S., Choate, K.A., Ishikawa, K., Nelson-Williams, C., Desitter, I., Gunel, M., Milford, D.V., Lipkin, G.W., Achard, J-M., Feely, M.P., Dussol, B., Berland, Y., Unwin, R.J., Mayan, H., Simon, D.B., Zarfel, Z., Jeunemaitre, X., Lifton, R.P. 2001. Human Hypertension Caused by Mutations in WNK Kinases. *Science* 293:1107-1112
- Woo, N.S., Lu, J., England, R., McClellan, R., Dufour, S., Mount, D.B., Deutch, A.Y., Lovinger, D.M., Delpire, E. 2002. Hyperexcitability and epilepsy associated with disruption of the mouse neuronal-specific K-Cl cotransporter gene. *Hippocampus* 12(2): 258-568
- Xie, J., Wu, T., Xu, K, Huang, I.K., Cleaver, O., Huang, C-L. 2009. Endothelial-Specific Expression of WNK1 Kinase Is Essential for Angiogenesis and Heart Development in Mice. *The American Journal of Pathology* 175(3): 1315-1327
- Xu, J.T., Tu, H.Y., Xin, W.J., Liu, X.G., Zhang, G.H., Zhai, C.H. 2007. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B/Akt in dorsal root ganglia and spinal cord contributes to the neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in rats. *Exp Neurol.* 206(2): 269-79
- Zagórska, A., Pozo-Guisado, E., Boudeau, J., Vitari, A.C., Rafiqi, F.H., Thastrup, J., Deak, M., Campbell, D.G., Morrice, N.A., Prescott, A.R., Alessi, D.R. 2007. Regulation of activity and localization of the WNK1 protein kinase by hyperosmotic stress. *The Journal of Cell Biology* 176(1):89-100
- Zambrowicz, B.P., Abuin, A., Ramirez-Solis, R., Richter, L.J., Piggott, J., BeltrandelRio, H., Buxtion, E.C., Edwards, J., Finch, R.A., Friddle, C.J., Gupta, A., Hansen, G., Hu, Y., Huang, W., Jaing, C., Key, B.W.Jr, Kipp, P., Kohlhauff, B., Ma, Z-Q., Markesich, D., Payne, R., Potter, D.G., Qian, N., Shaw, J., Schrick, J., Shi, Z-Z., Sparks, M.J., Van Sligtenhorst, I., Vogel, P., Walke, W., Xu, N., Zhu, Q., Pearson, C., Sands, A.T. 2003. Wnk1 kinase deficiency lowers blood pressure in mice: A

gene-trap screen to identify potential targets for therapeutic intervention. *PNAS* 100(24): 14109-14114

Zhang, R-W., Wei, H-P., Xia, Y-M., Du, J-L. 2010. Development of light response and GABAergic excitation-to-inhibition switch in zebrafish retinal ganglion cells. *The Journal of Physiology*, 588(14):2557-2569

Zhang, Z., Xu, X., Zhang, Y., Zhou, J., Yu, Z., He, C. 2009. LINGO-1 Interacts with WNK1 to Regulate Nogo-induced Inhibition of Neurite Extension. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(23): 15717-15728

## Annexes

**Tableau 1. Identification de l'orthologue WNK1 chez le poisson zèbre**

identity	chromosome	strand	start	end	span
91.4%	4	++	5472390	5572542	100153
91.3%	25	++	12353844	12388133	34290

**Tableau 2. Résultats des alignements d'orthologues variés de WNK1**

		Identity			
		1	2	3	4
1. WNK1_Human	Similarity		53.9	46	38.3
2. WNK1_Xenopus		64.2		49.8	42
3. WNK1_chr4 Zebrafish		56.8	62.9		47
4. WNK_chr25 Zebrafish		47.4	53.4	58.4	

**Tableau 3. Résultats des alignements d'orthologues variés de WNK1 pour HSN2 seul**

		Identity			
		1	2	3	4
1. HSN_Chimp	Similarity		89.2	67.5	38.2
2. HSN_Mouse		93.6		65.3	38.1
3. HSN_Chick		80.2	77.3		38.3
4. HSN_Zebrafish		54.7	54.5	54.5	

**Tableau 4. Statistiques pour la figure 12-B**

Group	N	Missing	Median	25%	75%
WT	108	1	28,000	26,000	30,000
HSN2_3'	135	1	3,000	1,000	4,000
HSN2_5'	166	1	12,000	8,000	17,000
WNK1_ATG	141	1	19,000	11,000	25,500

**Tableau 5. Statistiques pour la figure 15**

Group	N	Missing	Median	25%	75%
WT	71	1	32,000	30,000	34,000
HSN2_3'	80	1	6,000	4,000	8,000
AMO + 30ng complète	41	1	7,000	4,000	10,000
AMO + 50ng complète	54	1	10,000	6,000	12,000
AMO + 75ng complète	41	1	7,500	6,000	11,000
AMO + 100ng complète	78	1	6,000	3,000	8,000
AMO + 150ng complète	57	1	6,000	3,000	8,000
AMO + 200ng complète	37	1	6,000	3,000	9,000

**Tableau 6. Statistiques pour la figure 16**

Group	N	Missing	Median	25%	75%
WT	50	1	32,000	28,000	34,000
HSN2_3'	39	1	5,500	3,000	8,000
AMO + 30ng partielle	47	1	4,000	2,000	6,000
AMO + 50ng partielle	52	1	2,000	0,250	5,000
AMO + 75ng partielle	51	1	3,000	2,000	5,000
AMO + 100ng partielle	48	1	4,000	3,000	6,000
AMO + 150ng partielle	71	1	3,000	1,000	5,000

**Tableau 7. Statistiques pour la figure 17**

Group	N	Missing	Median	25%	75%
WT	46	1	32,000	30,000	34,000
30ng partielle	51	1	30,000	28,000	32,000
50ng partielle	49	1	30,000	27,500	32,500
100ng partielle	56	1	28,000	26,000	30,000
150ng partielle	61	1	27,000	23,000	30,000

**Tableau 8. Statistiques pour la figure 18**

Group	N	Missing	Median	25%	75%
WT	46	1	32,000	30,000	34,000
sur-expression partielle	55	1	24,500	16,000	28,000
sur-expression complète	60	1	26,000	22,000	28,000

**Tableau 9. Statistiques pour la figure 21-B**

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
WT	46	1	32,000	30,000	34,000
HSN2_3'	24	1	4,652	3,938	0,821
sur-expression hKCC2	24	1	8,454	4,616	0,962



**Tableau 10. Statistiques pour la figure 22-C**

<b>Group Name</b>	<b>N</b>	<b>Missing</b>	<b>Mean</b>	<b>Std Dev</b>	<b>SEM</b>
KCC2_ATG 0.75mM	24	1	18,826	5,598	1,167
HSN2_3'	24	1	4,652	3,938	0,821
sur-expression hKCC2	24	1	8,454	4,616	0,962
double knockdown 0.5 mM	27	1	12,731	5,717	1,121
double knockdown 0.75mM	26	1	11,600	5,284	1,057

**Tableau 11. Statistiques pour la figure 23-B**

<b>Group Name</b>	<b>N</b>	<b>Missing</b>	<b>Mean</b>	<b>Std Dev</b>	<b>SEM</b>
WT	13	1	5645,167	890,796	257,151
HSN2_3'	13	1	3592,250	628,820	181,525
HSN2_5'	11	1	4364,000	537,896	170,098
WNK1_ATG	10	1	4359,111	594,635	198,212