



Université de Sherbrooke

**Les protéines NCOR1 et CHD8 ont des rôles fonctionnels communs  
dans des cellules cancéreuses colorectales humaines.**

Par Andréanne Loiselle  
Département d'anatomie et de biologie cellulaire

Travail présenté(e) à la Faculté de médecine et des sciences  
de la santé en vue de l'obtention du grade de maître en science  
(M.Sc) en biologie cellulaire

Sherbrooke, Québec, Canada  
Juin 2017

Membre du jury d'évaluation :  
Pr François Boudreau, Département d'anatomie et de biologie cellulaire, FMSS  
Pr Caroline Saucier, Département d'anatomie et de biologie cellulaire, FMSS  
Pr Xavier Roucou, Département de biochimie, FMSS

©Andréanne Loiselle, 2017

## Résumé

### **Les protéines NCOR1 et CHD8 ont des rôles fonctionnels communs dans des cellules cancéreuses colorectales humaines.**

Par Andréanne Loisel  
Programme de biologie cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître en science (M.Sc.) en biologie cellulaire, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Le corépresseur nucléaire NCOR1 est impliqué dans la régulation transcriptionnelle en interagissant avec les récepteurs à hormones thyroïdiennes et rétinoliques ainsi qu'avec les facteurs de transcription AP-1 et NF- $\kappa$ B au niveau des gènes cibles impliqués dans la réponse inflammatoire intestinale. Par une approche d'immunoprécipitation (IP) couplée à la spectrométrie de masse, CHD8 a été découverte pour agir de manière complémentaire à NCOR1. CHD8 est impliquée dans le remodelage de la chromatine et dans la régulation du cycle cellulaire. Ainsi, le projet de recherche visait à comprendre l'interaction et les rôles fonctionnels de CHD8 et de NCOR1 ainsi que l'impact physiologique de la perte d'expression de NCOR1 face à un stress épithélial. Pour commencer, nous avons confirmé l'interaction entre CHD8 et NCOR1 dans différents types cellulaires tels que les 18Co, Caco-2/15 et HT-29. Ensuite, nous avons diminué l'expression de NCOR1 et CHD8 dans les cellules HT-29 et Caco-2/15 à l'aide de shRNA et nous avons observé une diminution de croissance cellulaire intermédiaire pour la perte de CHD8 comparativement à une diminution plus drastique pour NCOR1. L'effet intermédiaire sur la croissance cellulaire peut être dû à un effet de compensation par la petite forme de CHD8 (CHD8<sub>s</sub>) puisque le shRNA utilisé cible uniquement la grande forme de CHD8 (CHD8<sub>l</sub>). Avec cette diminution commune de croissance cellulaire, une question s'est imposée à savoir quelle est l'implication de l'interaction entre CHD8 et NCOR1 dans ce phénomène. Nous avons séparé NCOR1 en protéines correspondant à ces différents domaines et par IP suivies d'immunobuvardages, nous avons déterminé que le premier domaine de répression de NCOR1 (RD1) interagissait avec la forme complète de CHD8 au niveau du noyau. Nous avons ensuite utilisé un modèle murin où il y a une perte d'expression de NCOR1 (NCOR1 $\Delta$ E11<sup>ACEI</sup>) avec l'aide d'un modèle où la Cre-recombinase est exprimée sous le promoteur de la villine. Nous avons ensuite traité les souris NCOR1 $\Delta$ E11<sup>ACEI</sup> et contrôles au DSS 3% afin d'induire des lésions aux cellules épithéliales intestinales. Ceci permet l'étude de la susceptibilité au DSS des souris contrôles et NCOR1 $\Delta$ E11<sup>ACEI</sup>. Ainsi, CHD8 et NCOR1 ont des rôles fonctionnels communs qui pourrait être attribué à leur interaction, CHD8-NCOR1 (RD1). Cette nouvelle mécanistique permettrait donc de réguler la transcription de certains gènes cibles impliqués dans le cancer colorectal.

**Mots clés :** NCOR1, CHD8, interaction, cancer colorectal, prolifération

# Table des matières

<b>Résumé</b> .....	i
<b>Table des matières</b> .....	ii
<b>Liste des figures</b> .....	v
<b>Liste des tableaux</b> .....	vi
<b>Liste des abréviations</b> .....	vii
<b>Remerciements</b> .....	xiii
<b>Chapitre 1 : Introduction</b> .....	1
1 Le système digestif.....	1
2 Composition de l'épithélium intestinal .....	1
2.1 Types cellulaires de l'épithélium intestinal.....	1
3 Le cancer colorectal .....	4
3.1 Les cancers colorectaux héréditaires .....	4
3.2 Les cancers colorectaux sporadiques .....	4
4 La transcription génique.....	8
4.1 Organisation structurale de la chromatine.....	8
4.2 Modifications épigénétiques.....	9
5. Le corépresseur nucléaire NCOR1 .....	10
5.1 Les différents domaines protéiques de NCOR1 .....	11
5.2 Rôles des récepteurs nucléaires .....	12
5.3 Modèle murin déficient pour NCOR1 .....	13
5.4 Implication du DSS .....	14
5.5 Implication dans le cancer .....	16
6 Nouveaux partenaires d'interaction de NCOR1 .....	16
7 La famille des protéines CHDs .....	17
7.1 Implication des CHD dans le cancer .....	18
7.2 Les différents domaines protéiques de CHD8.....	19
7.3 La protéine CHD8 et son variant.....	20
7.4 Interaction de CHD8 avec CTCF .....	20
7.5 Interaction de CHD8 avec la $\beta$ -caténine.....	21
7.6 Interaction de CHD8 avec p53 .....	22
7.7 Interaction de CHD8 avec BRAF.....	22
7.8 Implication de CHD8 dans le cycle cellulaire.....	23
8 Problématique, hypothèse et objectifs de recherche .....	24

<b>Chapitre 2: Matériel et méthodes</b> .....	26
1. Culture cellulaire.....	26
1.1 HCoEpiC .....	26
1.2 18Co .....	26
1.3 Caco-2/15 .....	26
1.4 HT-29 .....	26
1.5 SW480.....	27
1.6 T84.....	27
1.7 Colo205 .....	27
1.8 DLD-1 .....	27
1.9 HCT116.....	27
1.11 RKO.....	27
1.12 HEK293T .....	27
2. Production d'ARN interférent.....	28
2.1 Transfection des siRNA .....	28
2.2 Production lentivirale .....	28
2.3 Infection lentivirale .....	29
3. Construction des différents segments de NCOR1.....	30
4. Extrait protéique à partir d'une culture cellulaire .....	31
5. Immunobuvardage .....	31
6. Immunoprécipitations .....	33
6.1 Immunoprécipitations d'extraits nucléaires .....	33
6.2 Immunoprécipitations pour extraits cellulaires totaux .....	34
7. Préparation d'extrait d'ARN totaux.....	35
7.1 Extraction d'ARN total à partir d'une culture cellulaire.....	35
7.2 Traitement de l'ARN à la DNase .....	35
7.3 Transcription inverse de l'ARNm .....	35
8. PCR en temps réel.....	36
9. Courbe de croissance par décompte cellulaire .....	37
10. Immunofluorescence .....	37
11. Modèle murin.....	38
11.1 Modèle de souris NCOR1 $\Delta$ Exon11 et génotypage.....	38
11.2. Induction d'une colite expérimentale par traitement au dextran sulfate de sodium .....	39
<b>Chapitre 3: Résultats</b> .....	41
1. Étude de l'interaction entre CHD8 et NCOR1.....	41

1.1 Validation de l'interaction de NCOR1 avec CHD8 comme nouveau partenaire d'interaction protéique .....	41
1.2 Génération et validation de l'expression de protéines recombinantes pour différents domaines de NCOR1 .....	42
1.3 Validation de l'interaction entre les différentes constructions de NCOR1 et de la forme complète de CHD8.....	44
2. Étude des rôles fonctionnels communs entre CHD8 et NCOR1 .....	45
2.1 Effet de la perte d'expression de CHD8 et de NCOR1 sur la croissance cellulaire des cellules épithéliales dérivées de cancer colorectaux .....	45
2.2 Profil d'expression des isoformes de CHD8 dans différentes lignées cellulaires intestinales .....	47
2.3 Génération de nouveaux shRNA afin de cibler la petite forme de CHD8 .....	50
3. Impact physiologique d'un stress cellulaire sur l'épithélium intestinal de souris déficientes pour NCOR1 .....	52
<b>Chapitre 4: Discussion</b> .....	<b>55</b>
1. Composition du complexe de répression de NCOR1 .....	56
1.1 CHD8 un nouveau partenaire d'interaction de NCOR1 .....	56
1.2 Le domaine RD1 de NCOR1 interagit avec la forme complète de CHD8.....	56
1.3 Perspectives de l'objectif 1 .....	59
2. Les rôles fonctionnels de NCOR1 et CHD8 dans des cellules de cancer colorectal .....	60
2.1 CHD8 et NCOR1 sont impliqués dans la régulation de la croissance cellulaire au niveau de cellules de cancer colorectal.....	60
2.2 Diminution d'expression des différentes formes de CHD8 .....	60
2.3 CHD8, une protéine dichotomique.....	62
2.4 Perspective de l'objectif 2 .....	63
3. Induction de lésions épithéliales par le DSS .....	64
3.1 Sensibilité des souris NCOR1 $\Delta$ E11 <sup>ACEI</sup> au DSS 3%.....	64
3.2 Perspectives de l'objectif 3 .....	65
<b>Conclusion et perspectives générales</b> .....	<b>67</b>
<b>Références</b> .....	<b>69</b>
<b>Annexes</b> .....	<b>78</b>

## Liste des figures

### *Introduction*

- Figure 1** : Origine et spécification des cellules épithéliales intestinales.....3
- Figure 2** : Les 3 différentes voies affectées dans le cancer colorectal sporadique ..... 7
- Figure 3** : Les différents domaines protéiques de NCOR1..... 11
- Figure 4** : CHD8 comme nouveau partenaire d'interaction potentielle de NCOR1 ..... 17
- Figure 5**. Les différents domaines protéiques de CHD8..... 19

### *Matériel et méthodes*

- Figure 6** : Les 5 différentes constructions de NCOR1 étiquetées avec V5.....30

### *Résultats*

- Figure 7** : Validation de l'interaction cellulaire entre les protéines CHD8 et NCOR1 .42
- Figure 8** : Validation de l'expression des différentes constructions de NCOR1 dans les cellules HEK293T .....43
- Figure 9** : Mesure de l'interaction entre les domaines de NCOR1 et la forme complète de CHD8 étiquetée avec un épitope Flag .....45
- Figure 10** : Effet de la réduction d'expression de NCOR1 et de CHD8 sur la prolifération cellulaire des lignées Caco-2/15 et HT-29.....47
- Figure 11** : Profil d'expression des 2 isoformes de CHD8 selon le type cellulaire utilisé .....49
- Figure 12** : Analyse de l'effet de plusieurs séquences d'ARN interférents sur l'expression des isoformes de CHD8. ....52
- Figure 13** : Les souris NCOR1 $\Delta$ E11 <sup>$\Delta$ CEI</sup> sont plus susceptibles au traitement DSS 3% que les contrôles. ....53

### *Figures supplémentaires*

- Figure14**: Évidences cliniques que les animaux Ncor1 $\Delta$ ID <sup>$\Delta$ CEI</sup> âgés de 4 à 5 mois sont plus susceptibles à un traitement DSS 3% que les témoins.....83
- Figure 15**: Traitement DSS 3% sur des animaux Ncor1 $\Delta$ ID $\Delta$ CEI âgés de 2 mois .....84

## Liste des tableaux

### *Matériel et méthodes*

<b>Tableau 1:</b> Liste des différents siRNA utilisés .....	28
<b>Tableau 2:</b> Liste des différents shRNA utilisés .....	29
<b>Tableau 3:</b> Liste des anticorps primaires utilisés lors des immunobuvardages .....	33
<b>Tableau 4:</b> Protocole d'amplification des transcrits par PCR en temps réel.....	36
<b>Tableau 5:</b> Liste des amorces utilisées pour l'amplification des transcrits par PCR.....	36
<b>Tableau 6:</b> Réactifs et conditions d'utilisation du PCR semi-quantitatif pour le génotypage des souris. ....	38
<b>Tableau 7:</b> Évaluation du score histologique lors d'un traitement DSS chez la souris .	40
<b>Tableau 8:</b> Évaluation de l'indice de la sévérité de la maladie lors d'un traitement DSS chez la souris.....	40

### *Figures supplémentaires*

<b>Tableau 9:</b> Gènes identifiés lors de l'analyse d'un séquençage d'ARN modulé avec un ratio plus grand que 2 lors de la perte d'expression de CHD8 et NCOR1 dans des HT-19 et des Caco-2/15 .....	82
---	----

## Liste des abréviations

### Symbole

°C	Degré Celsius
µl	Microlitre
µg	Microgramme
M	Molaire
µM	Micromolaire
µg/cm <sup>2</sup>	Microgramme par centimètre carré
mM	Milimolaire
U/ml	Unité par Millilitre
O/N	Overnight
h	Heure
min	Minute
Sec	Seconde

ADN	Acide désoxyribonucléique
AP-1	Activator protein 1
APC	Polypose adénomateuse colique
AR	Récepteur androgène
ASD	Spectre de l'autisme
ATP	Adenosine triphosphate
BACH1	BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 1
BAX	BCL2 Associated X
BAZ1A	Bromodomain Adjacent To Zinc Finger Domain 1A
BCA	BiCinchoninic acid Assay
BCL	B-cell lymphoma
BMP	Bone morphogenetic proteins
BRAF	B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase
BRCA1	Breast cancer 1
BRK	Brahma et Kismet
CBC	Crypt-base columnar
CBF	Core-Binding Factor
CCND1	Cycline D1
CCNE2	Cycline E2
CDC25A	Cell division cycle 25A
CHD	Chromodomain Helicase DNA-binding
CHD8	Chromodomain Helicase DNA binding protein 8
CHD8 <sub>s</sub>	Petite forme de CHD8
CHD8 <sub>L</sub>	Grande forme de CHD8
ChIP	Immunoprecipitation de la chromatine
CIMP	CpG island methylator phenotype
CK1	Casein kinase 1

CoEpiCM	Colonic Epithelial Cell Medium
CRT	Co-régulateurs transcriptionnels
CTCF	CCCTC-Binding Factor
DAD	Deacetylase interaction domain
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNMT3B	DNA methyltransferase 3 beta
DSS	Dextran sulfate de sodium
Dvl	Dishevelled
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
EE	Entéroendocrines
EGF	Epidermal Growth Factor
EHMT2	Euchromatic Histone Lysine Methyltransferase 2
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
ER	Récepteur à l'œstrogène
ETO	RUNX1 Translocation Partner 1
FBS	Fetal Bovine Serum
FT	Facteur de transcription
GCLC	Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic Subunit
GIP	Glucose-dependent insulintropic peptide
GLP1-2	Glucagon-like peptide 1 and 2
GNAT	Gcn5 N-acetyltransferases
GSK3	Glycogen synthase kinase 3
GSP2	G-protein pathway suppressor 2
GTP	Guanosine triphosphate
HAT	Histone acétyltransférases
HDAC	Histone désacétyltransférases
HDAC3	Histone désacétyltransférases 3
HDM	Histone déméthylases
HH	Hedgehog
HID	Histone interaction domain
HP1	Heterochromatin Protein 1
HTMs	Histone methyltransférases
IGF2	Insulin Growth Factor 2
IL-1 $\beta$	Interleukin 1 beta
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
IP	Immunoprécipitation
JNK	C-Jun N-terminal kinases
KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LEF	Lymphoid enhancer factor
LBD	Liaison du ligand
LGR5/6	Receptor related protein 5 or 6
LRC +4	Label-retaining cell +4

MAD	MAX Dimerization Protein
MAFG	Musculoaponeurotic fibrosarcoma homolog G
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MLH1	MutL homolog 1
MMR	DNA mismatch repair
MSH2	MutS protein homolog 2
MSH6	MutS protein homolog 6
MSI	Microsatellites
MSS	MicroSatellite Stability
MYC	V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog
MYOD1	Myogenic Differentiation 1
NaF	Sodium fluoride
NaO	Sodium orthovanadate
NCOR1	Nuclear receptor co-repressor 1
NCOR2N	Nuclear receptor co-repressor 2
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor $\kappa$ B
NO	Nitric oxide
PAF	Polypose adénomateuse familiale
PB	Paire de base
PBS	Phosphate-buffered saline
PC	Polycomb protein
PFA	Paraformaldéhyde
PHD	Plant homeodomain finger
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate-3-kinase
PI3KCA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase catalytic subunit alpha
PIC	Protease inhibitor cocktail
PKA	Protéine kinase A
PMS2	PMS1 homolog 2
PMSF	Phénylméthansulfonyl fluoride
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PVDF	PolyVinylidene Fluoride
RAR	Récepteur à hormone rétinolique
RBL1	Rétinoblastoma-like-1
RD	Domaines de répression
RID	Interaction au récepteur nucléaire
RIPA	Radio Immunoprecipitation Assay
ROS	Reactive oxygen species
RUNX1	Runt Related Transcription Factor 1
RXR	Retinoid X receptor
SANT	Swi3, Ada2, NCoR1, TFIIB
SILAC	Stable isotope labeling with amino acids in cell culture
Sin3a	Transcription Regulator Family Member A
SMAD2	SMAD family member 2

SMAD4	SMAD family member 4)
SMARCA5	SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator Of Chromatin, Subfamily A, Member
SMRT	Silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors
sPLA2	Secretory phospholipase A2
SUV39H1	Suppressor Of Variegation 3-9 Homolog 1
SUV39H2	Suppressor Of Variegation 3-9 Homolog 2
TA	Transit-amplifying
TBL1	Transducin (beta)-like 1
TBL1R	TBL-related 1
TBP	TATA-binding protein
TCF	T-cell factor
TFIIB	Transcription facteur II B
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta
TGF $\beta$ R2	Transforming growth factor beta receptor II
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor alpha
TP	Température pièce
TP53	Tumor Protein P53
TYMS	Thymidylate synthétase
TR	Récepteur à hormone thyroïdienne
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Wnt3	Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 3

*À la mémoire d'une femme qui  
a toujours su se battre pour ce qu'elle  
croyait et pour ceux qu'elle aimait  
-Yolande Daoust Primeau-*

*La volonté aboutit à un ajournement, l'utopie;  
La science aboutit à un doute, l'hypothèse.  
-Victor Hugo-*

## Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier les membres de mon jury pour avoir pris le temps de corriger mon mémoire et pour tous vos commentaires constructifs. J'aimerais aussi remercier ma mentore, la Pr Saucier, pour son enthousiasme lors de nos discussions et pour avoir pris le temps de me partager son point de vue scientifique sur mon projet de recherche.

Je voudrais surtout remercier mon directeur de recherche, le Pr François Boudreau. Merci de m'avoir permis d'ouvrir mon esprit scientifique et critique par nos différentes discussions. Cela m'a permis de prendre une certaine assurance lorsque je dois défendre mon point de vue. Merci de m'avoir permis d'assister à de nombreux congrès dans lesquels j'ai pu découvrir de nouvelles approches scientifiques qui m'ont permis d'agrandir mes connaissances. Tu es un professeur et un mentor exceptionnel qui est toujours à l'écoute de ses étudiants. Pour ma part, chaque fois que j'entre dans ton bureau avec un air un peu désespéré, j'en ressors toujours pleine d'espoir et d'idées. Alors merci pour tes encouragements et ton grand optimiste.

Je voudrais remercier tous mes collègues de travail pour leur écoute et leur support. Je voudrais commencer par remercier Stéphanie qui a été ma mentore dès le début de mes stages. Merci de m'avoir montré et appris tout ce qui était nécessaire à la réussite de ma maîtrise. Je voudrais aussi remercier Christine pour son savoir et son temps puisque, peu importe la situation, tu es toujours là pour nous. Merci pour l'aide que tu m'as apportée et pour ton amour contagieux de la science. Tu es le cœur de ce labo et je suis heureuse d'avoir pu t'y côtoyer. Merci aussi à Mathieu pour les discussions qui m'ont apporté bien des connaissances et qui m'ont souvent porté à mieux réfléchir. Tu es une source incommensurable d'informations et merci d'avoir pris le temps de me les partager. Je voudrais aussi remercier Jean-Philippe pour toute l'aide que tu m'as apportée durant ces années. Merci pour ton savoir, ta patience et tes conseils. Tu es un exemple à suivre pour tous les futurs étudiants à venir. Merci pour ta bonne humeur et ta joie de vivre dans toutes les circonstances. Je voudrais aussi remercier Alexis, mon partenaire anti-HNF4, avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler. Merci à Samuel qui a toujours été présent pour moi et avec qui je pouvais parler de tout. Merci à Romain et ses cheveux porte-bonheur pour toujours avoir su me faire rire. Je crois que la réussite d'une maîtrise n'est pas uniquement due au sujet ou au directeur de recherche, mais elle vient aussi des gens que l'on côtoie chaque jour. Je n'ai pas seulement découvert de merveilleux collègues de travail, mais j'ai aussi découvert de bons amis avec qui l'on peut à la fois s'amuser, discuter et se confier. Je crois que l'on peut dire que les *Boudreau* forment une famille unie qui nous marque à jamais. Ces 2 dernières années n'auraient jamais été pareilles sans vous tous. Vous allez me manquer!

Je voudrais aussi remercier les professeurs, les étudiants et les assistants de recherche des autres laboratoires du Département ainsi que les membres du laboratoire de Xavier Roucou pour leur aide et leur conseil judicieux. Merci pour les belles discussions enrichissantes autant scientifiquement que moralement. Merci pour votre passion de la science. Je voudrais aussi remercier les membres du personnel des différents départements, autant les secrétaires que les responsables des différentes plateformes. Vous avez toujours su nous faciliter les tâches autant administratives que scientifiques. Merci à vous.

Je voudrais remercier ma famille, mais surtout mes parents pour m'avoir soutenue tout au long de mes études. Merci pour les encouragements et la confiance que vous me portez, et cela depuis que je suis toute petite. Merci de m'écouter et de me motiver dans mes périodes d'incertitudes. Ma persévérance et ma réussite, je vous les dois. Merci d'être là pour moi.

Un grand merci à mes amis de m'avoir soutenue tout au long de mes études. Merci de m'avoir écoutée et rassurée, votre amitié m'a été d'un grand soutien. Je voudrais aussi dire un merci spécial à Joël pour toute l'aide, le soutien et l'amour que tu m'as apportés. Merci de m'avoir écoutée et réconfortée lorsque j'étais stressée. Merci de tes conseils scientifiques et de ta grande positivité.

# Chapitre 1 : Introduction

## 1 Le système digestif

Le système digestif permet de donner l'énergie nécessaire à l'organisme pour survivre. Il participe à la digestion, à l'absorption et à l'excrétion des nutriments. L'appareil digestif comprend la cavité buccale (bouche, dents, lèvres et pharynx), l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon) et le gros intestin (caecum, côlon et rectum). Le bon fonctionnement de glandes annexes (vésicule biliaire, foie, glandes salivaires et pancréas) permet de supporter les activités fonctionnelles du tube digestif. Ceci est facilité par la sécrétion respective de la bile, la salive, et les sucs gastriques au niveau du tube digestif (Encyclopaedia Universalis, 2015).

## 2 Composition de l'épithélium intestinal

La paroi du tube digestif est composée de la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse. La muqueuse comprend l'épithélium, les cryptes de lieberkühn, les villosités et le chorion au niveau de l'intestin grêle. Les villosités permettent une meilleure absorption au niveau du grêle en augmentant la surface de contact de l'épithélium avec les nutriments. Celles-ci disparaissent au niveau du côlon. L'épithélium intestinal est capable de se renouveler complètement entre 4 et 5 jours et comprend 5 types cellulaires : les cellules de Paneth, les cellules caliciformes, les cellules entéroendocrines, les entérocytes et les cellules souches intestinales (Barker, 2014).

### 2.1 Types cellulaires de l'épithélium intestinal

Les cellules souches sont regroupées en deux classes; le modèle classique LCR +4 (*label-retaining cell* +4) et le type associé à la zone de cellules souches localisées à la base de la crypte et exprimant le récepteur LGR5 (CBC : *crypt-base columnar*). Les cellules souches CBC ont la capacité de se diviser pour produire une cellule souche CBC ou LCR +4, ainsi qu'une cellule du TA (*transit-amplifying*) (Wong & Jensen, 2012). Les cellules souches de type classique +4 se trouvent toujours en position 4 à partir du fond de la crypte. Les cellules LCR +4 servent généralement de réserve pour restaurer les cellules CBC en cas de bris majeurs de l'épithélium intestinal (Barker, 2014).

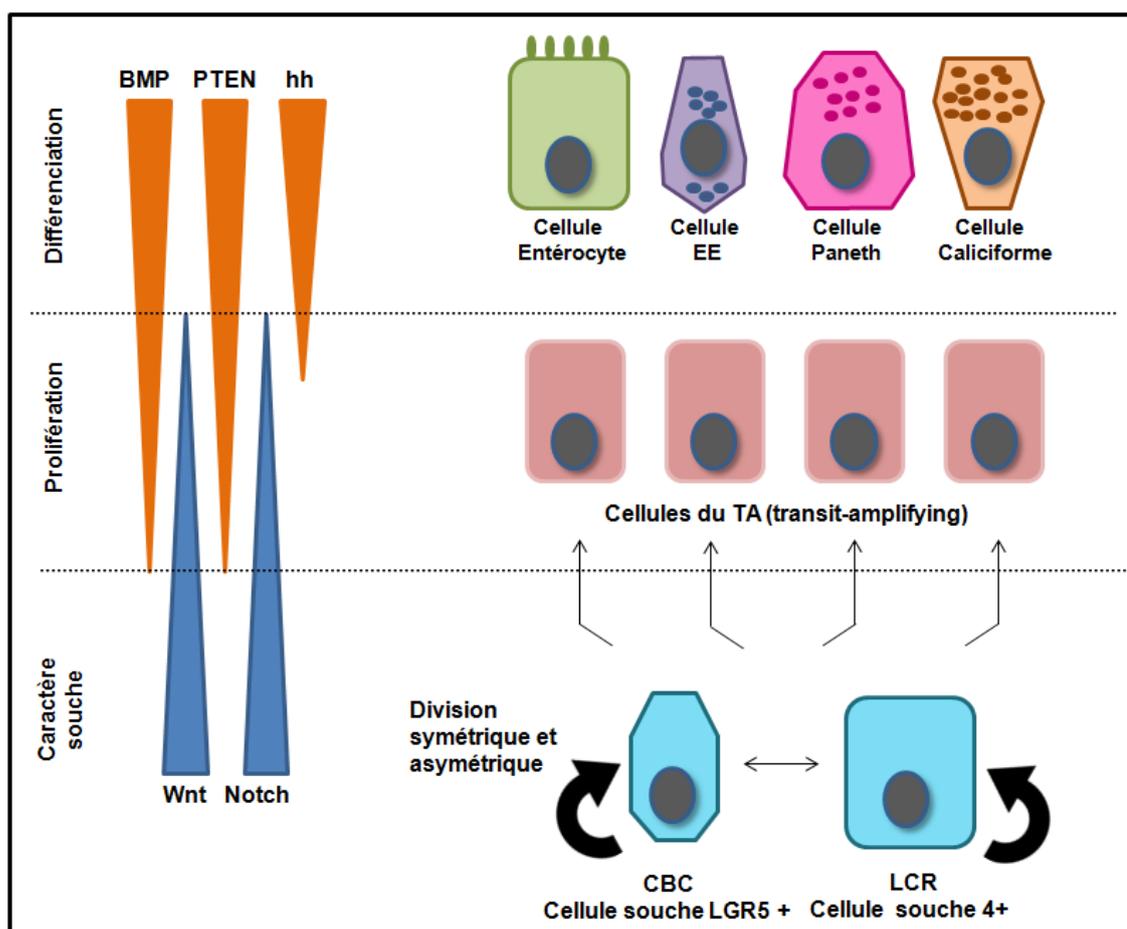
Les cellules de Paneth se retrouvent uniquement au fond des cryptes de l'intestin grêle intercalées entre les cellules souches. En sécrétant des facteurs de croissance tels que EGF (*Epidermal Growth Factor*), TGF $\alpha$  (*Transforming growth factor alpha*), Wnt3 (*Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 3*) et le ligand Notch Dll4 (*Delta-like 4*), les cellules de Paneth participent au maintien de la niche cellulaire. Ainsi, ces facteurs de croissance permettent la survie, la quiescence et le maintien des fonctions des cellules souches dans l'intestin grêle (Rezza *et al.*, 2014; Sato *et al.*, 2011). La présence de cellules apparentées aux cellules de Paneth (*Paneth cell-like*) a aussi été observée dans le côlon (Rothenberg *et al.*, 2012). Les cellules de paneth sécrètent entre autres de nombreux peptides antimicrobiens tels que l' $\alpha$ -défensine, le lysozyme C et le sPLA2 (*secretory phospholipase A2*). Ces peptides sont sécrétés vers la surface de l'épithélium de la muqueuse afin de protéger le tissu d'une invasion de pathogènes. Ceci permet donc de maintenir un équilibre dans la composition naturelle des souches de bactéries composant le microbiote intestinal et aide au maintien des propriétés de la barrière chimique constituée par la couche de mucus adjacente à l'épithélium (Bevins & Salzman, 2011)

Les cellules caliciformes ont la capacité de sécréter des peptides (*trefoil factors* et mucines) vers la surface de l'épithélium afin de maintenir une barrière contre l'invasion bactérienne. Le mucus ainsi formé permet de restreindre l'accès aux bactéries de la lumière intestinale et ainsi protéger l'hôte contre les infections bactériennes. De plus, le nombre de cellules caliciformes par unité de surface est plus élevé dans le côlon où le nombre de bactéries est naturellement beaucoup plus important en comparaison avec l'intestin grêle (McCauley & Guasch, 2015).

Les cellules entéroendocrines sont responsables d'une sécrétion de plus de 20 hormones, comme par exemple le GIP (*glucose-dependent insulintropic peptide*), le GLP1-2 (*glucagon-like peptide 1 and 2*), la somatostatine et la ghréline, pour ne nommer que ceux-ci. Elles réagissent en fonction des nutriments retrouvés dans la lumière intestinale, tels que le glucose, et elles activent ainsi une réponse hormonale suite à une dépolarisation de la membrane. Ces hormones peuvent être sécrétées de manière autocrine, paracrine et endocrine. Ainsi, les cellules entéroendocrines participent à la régulation de la sécrétion de l'insuline, de la satiété et de l'incorporation des nutriments par les cellules entérocytes (Worthington, 2015; Farré & Tack, 2013).

Les entérocytes sont quant à eux distincts des 3 autres types cellulaires décrits ci-haut par le fait qu'ils ont la capacité d'absorber davantage que de sécréter. Leur surface apicale contient des microvillosités qui leur permettent une meilleure absorption des nutriments. Elles se retrouvent majoritairement dans le haut des cryptes ou des villosités.

Il existe plusieurs facteurs régulant la prolifération, la différenciation et la migration des cellules épithéliales intestinales. Plusieurs ligands des voies de signalisations Notch, Wnt, BMP (*Bone morphogenetic proteins*), Hedgehog, Eph/Ephrin et PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*) en font partie (Crosnier et al., 2006; Piscaglia, 2014) (Figure 1).



**Figure 1 : Origine et spécification des cellules épithéliales intestinales.** Les cellules souches intestinales CBC (crypt-base columnar) et LCR +4 (label-retaining cell) ont la capacité de se diviser de manière symétrique et asymétrique, afin de renouveler les 2 types de cellules souches et de produire des cellules TA (transit-amplifying). Les cellules TA se différencient en cellules de Paneth, entérocytes, entéroendocrines (EE) et caliciformes. Au fond de la crypte, les voies Wnt et Notch sont sollicitées pour réguler le maintien prolifératif des cellules souches. À la jonction crypte/villosité, les voies BMP, PTEN et hedgehog (hh) sont davantage activées pour inhiber la signalisation de Wnt et ainsi favoriser la différenciation cellulaire.

### 3 Le cancer colorectal

Au Canada, le cancer colorectal est le deuxième cancer le plus diagnostiqué. Chez la femme, il s'agit du troisième cancer le plus mortel et du deuxième chez l'homme (Canadian Cancer Society; 2016). Le cancer colorectal peut être soit sporadique ou de type héréditaire. Entre 70-80% des cancers colorectaux sont dits sporadiques, ce qui signifie qu'il n'a pas d'association à des facteurs de risque génétique. Il s'agit d'une accumulation de mutations dans différents gènes (Mundade *et al.*, 2014). Entre 20-30 % des cancers colorectaux sont de type héréditaire (Rustgi, 2007), puisqu'ils sont associés à des facteurs génétiques et à l'environnement familial.

#### 3.1 Les cancers colorectaux héréditaires

Parmi les cancers colorectaux héréditaires, on retrouve, à moins de 1 % de fréquence, la PAF (polypose adénomateuse familiale) (Rustgi, 2007). La PAF contient des mutations spécifiques au niveau du gène APC (polypose adénomateuse colique) dans des cellules germinales (Nishisho *et al.*, 1991). Le gène suppresseur de tumeur APC est impliqué dans le contrôle de la division cellulaire et au niveau de la réparation de l'ADN. Il existe aussi le syndrome de Lynch qui représente environ 3 à 4 % des cancers colorectaux de type héréditaire. Ces cancers sont caractérisés par une mutation dans les cellules germinales des gènes MMR (*DNA mismatch repair*) incluant MLH1 (MutL homolog 1), MSH2 (MutS protein homolog 2), MSH6 (mutS protein homolog 6) et PMS2 (PMS1 homolog 2) (Fishel *et al.*, 1993) (Niessen *et al.*, 2009). Les MMR reconnaissent les erreurs de réplication faites par l'ADN polymérase II et ils facilitent leurs corrections. Une mutation dans les MMR entraîne donc une multitude de mésappariement au niveau de l'ADN. Cela entraîne donc l'altération des gènes impliqués dans la régulation du cancer colorectal, les menant ainsi à leur dysfonctionnement ou à leur perte de fonction (Heinen, 2016).

#### 3.2 Les cancers colorectaux sporadiques

Les cancers colorectaux sporadiques sont engendrés par de nombreuses mutations sur différents gènes. La plupart du temps, ces mutations se retrouvent au niveau de différents gènes suppresseurs de tumeur et d'oncogènes. Un suppresseur de tumeur est un gène dont l'expression favorise l'inhibition de la prolifération cellulaire lors de la détection d'anomalies. Cette inhibition permet de réduire les chances d'une croissance tumorale. Un oncogène est quant à lui une protéine activant de manière incontrôlée l'expression de

gènes impliqués dans la prolifération cellulaire. Un oncogène est capable d'inhiber la mort cellulaire programmée et favorise ainsi le développement de tumeurs. Il existe 3 voies génétiques principales pour les cancers colorectaux sporadiques.

### 3.2.1 Voie de l'instabilité chromosomique

La voie de l'instabilité chromosomique est impliquée dans 70% des cancers colorectaux sporadiques (Pino & Chung, 2010). Cette voie se distingue par l'accumulation de mutations au niveau des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs tels que : APC, KRAS (*V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), PI3KCA (*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha*), BRAF (*B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase*), SMAD4 (*SMAD family member 4*) et TP53 (*Tumor Protein P53*) (Yamagishi et al., 2016). L'initiation des adénomes dans le côlon commence généralement avec un dysfonctionnement du gène *APC* impliqué dans le contrôle de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (Powell et al., 1992). La mutation du gène *APC* mène à une prolifération cellulaire incontrôlée dans environ 80% de toutes les tumeurs du côlon (Kwong & Dove, 2009). La perte d'*APC* ne permet pas à la  $\beta$ -caténine d'intégrer le complexe de destruction ce qui favorise sa translocation au noyau. La  $\beta$ -caténine interagit en tant que co-activateur avec les facteurs de transcription TCF/LEF (*T-cell factor/lymphoid enhancer factor*) afin d'induire la transcription des gènes impliqués dans la croissance et la prolifération cellulaire (Mundade et al., 2014). La plupart du temps, une mutation activatrice du gène *KRAS* est subséquente à celle du gène *APC*. *KRAS* est une GTPase qui une fois mutée, reste en conformation active avec le GTP lié. Grâce à son implication dans différentes voies de signalisation, une mutation activatrice de *KRAS* induit de manière incontrôlée la migration, la différenciation, la survie et la progression du cycle cellulaire favorisant ainsi la tumorigénèse (Berndt et al., 2011). Par la suite, la perte d'un des allèles du chromosome 18 est un marqueur de mauvais pronostic dans le cancer colorectal sporadique (Jen et al., 1994). De ce fait, la perte d'expression des gènes de la région 21 du chromosome 18 s'associe avec une perte de l'expression de *SMAD4*, *SMAD2* (*SMAD family member 2*) et *DCC* (*DCC Netrin 1 receptor*) (Fearon et al., 1990; Salovaara et al., 2002). *SMAD4* est un facteur de transcription en aval de la signalisation TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor beta*) et dont le rôle est de réguler l'apoptose, la différenciation et la prolifération cellulaire (Derynck et al., 2001). Une mutation de *SMAD4* engendre donc une inhibition du contrôle cellulaire. La perte d'un des allèles du chromosome 18 survient juste avant la transition

entre l'adénome et le carcinome. Une mutation de TP53 est quant à elle associée à cette transition vers le carcinome (Walther *et al.*, 2009). Il s'agit d'une mutation assez fréquente dans le cancer colorectal sporadique. Un dysfonctionnement de TP53 engendre l'inhibition du contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose (Figure 2).

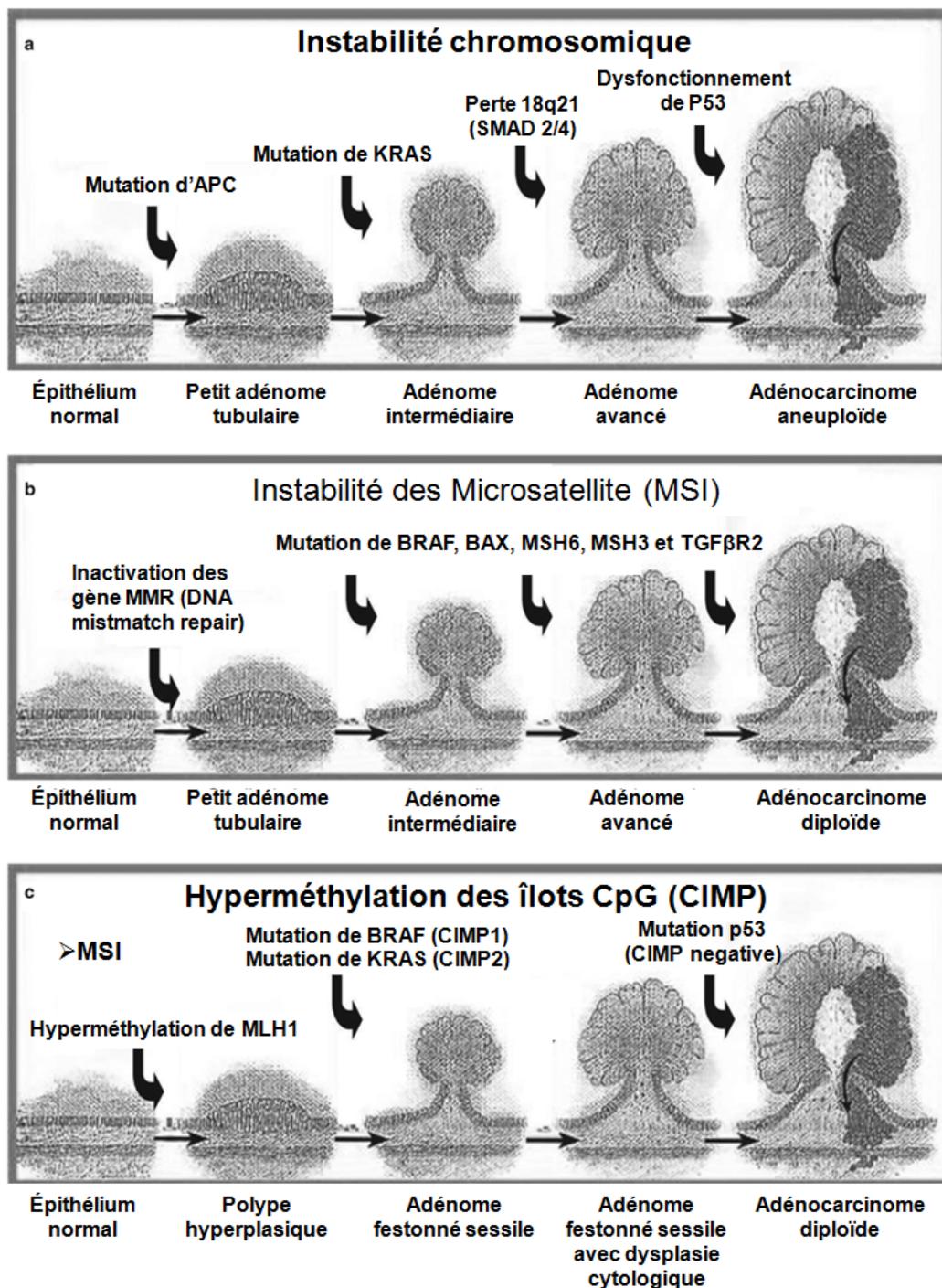
### 3.2.2 Voie de l'instabilité des microsatellites

Une deuxième voie, impliquée de 10 à 15% dans le cancer colorectal sporadique, est celle de l'instabilité des microsatellites (MSI) (répétition courte de nucléotide) (Mundade *et al.*, 2014). Il s'agit de l'inactivation des gènes MMR tel que MLH1 MSH2, MSH6 et PMS2 (Buecher *et al.*, 2013). Ces gènes MMR sont impliqués dans la réparation des erreurs commises par l'ADN polymérase au niveau des microsatellites. Dans 80% des cas de MSI, on retrouve une hyperméthylation des îlots CpG au niveau du promoteur du gène *MLH1* le rendant inactif (Herman *et al.*, 1998). On peut séparer les MSI en 3 groupes: MSI-High, MSI-Low et MSS (*MicroSatellite Stability*). Pour mesurer la gravité de la perte des MMR, 5 marqueurs de microsatellites ont été identifiés: BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 et NR-27 (Buecher *et al.*, 2013). Le MSI-High doit comprendre 2 des 5 marqueurs de microsatellites trouvés anormaux, le MIS-Low un seul microsatellite anormal et le MSS, aucun (Geiersbach & Samowitz, 2011). Dans les MSI-High, il est souvent possible d'observer des mutations au niveau des gènes APC, BRAF, BAX (*BCL2 Associated X*), MSH6, MSH3 et TGF $\beta$ R2 (*Transforming growth factor beta receptor II*) (Yamagishi *et al.*, 2016; Hiroyuki Yamamoto *et al.*, 1997) (Figure 2).

### 3.2.3 Voie de l'hyperméthylation des CIMP

La troisième voie du cancer colorectal sporadique est celle du phénotype de méthylation des îlots CpG (CIMP). Il s'agit d'une séquence répétitive de la guanine et de la cytosine située sur une région promotrice de gène. Une hyperméthylation des îlots CpG favorise un arrêt de l'expression du gène en question. Il est possible de classer les CIMP en 3 catégories : CIMP1, CIMP2 et CIMP négatif. CIMP1 comprend essentiellement une mutation dans le gène *BRAF* et un MSI, principalement causé par l'hyperméthylation du promoteur de *MLH1* (Yamagishi *et al.*, 2016). CIMP2 comprend en majorité une mutation au niveau de *KRAS* et CIMP négatif implique une mutation au niveau de *TP53* (Shen *et al.*, 2007) (Figure 2).

Il faut tenir compte que ces trois types de cancer colorectal sporadique peuvent aussi être cumulatifs et ce, tout dépendant du type de tumeur retrouvé.



**Figure 2 : Les 3 différentes voies affectées dans le cancer colorectal sporadique.** (A) L'instabilité chromosomique. Ce type de cancer résulte de la somme de différentes mutations et perte d'expression d'oncogènes et de suppresseurs de tumeurs. Ceci entraîne une augmentation de la prolifération cellulaire conduisant à un cancer invasif de type aneuploïde. (B) L'instabilité des microsatellites (MSI). Ce type de tumeur résulte de l'accumulation d'anomalies génétiques causées par l'inactivation des gènes de réparation de l'ADN tels que MLH1, MSH2 et MSH6. Une mauvaise régulation de l'apoptose et de la croissance qui en résulte favorise la présence d'un cancer invasif. (C) Hyperméthylation des îlots CpG (CIMP). Ce type de tumeur est causé par l'hyperméthylation de gènes contenant des îlots CpG (tel que MLH1), menant ainsi à leur répression transcriptionnelle. La perte d'expression de ces produits de gènes mène à une instabilité des microsatellites. Des mutations de BRAF (CIMP1) et de KRAS (CIMP2) mènent tout d'abord à des adénomes festonnés. Adapté de (Ahnen, 2011)

## 4 La transcription génique

Chaque cellule d'un organisme contient un génome identique qui doit être décodé de façon particulière afin d'assurer les fonctions spécifiques du type cellulaire donné. En ce sens, la transcription génique s'opère de façon spécifique par l'établissement de complexes transcriptionnels visant à décoder l'information génétique de la cellule en fonction des besoins actuels de celle-ci. La formation de tels complexes est facilitée par la liaison de facteurs de transcription (FT) sur des séquences régulatrices de l'ADN (éléments de liaison à l'ADN) retrouvées au niveau des promoteurs, *enhancers* et *silencers* des gènes. Une fois lié à l'ADN, le FT permet le recrutement de co-régulateurs transcriptionnels (CRT) qui permettront de moduler l'expression du gène auquel le FT est lié. Il peut s'agir là de co-activateurs, de co-répresseurs, comme par exemple NCOR1 (*nuclear receptor co-repressor 1*), ou encore de protéines avec activité enzymatique pouvant modifier la structure de la chromatine. Il existe aussi des isolateurs qui sont des séquences positionnées entre un *enhancer* et un promoteur et qui empêchent leur communication. Cela permet à la chromatine de réagir de façon localisée à partir de signaux spécifiques dans le contexte de la régulation d'un gène précis.

### 4.1 Organisation structurelle de la chromatine

L'hétérochromatine est la forme condensée et non-accessible de la chromatine; c'est l'état où la transcription des gènes est inactive. A l'opposé, l'euchromatine correspond à la forme ouverte de la chromatine, là où les gènes sont accessibles pour être transcrits.

Pour être condensé, l'ADN s'enroule 1,7 fois autour d'un octamère d'histones, formant ainsi le nucléosome. L'octamère d'histones est une double répétition de dimères H3-H4 ainsi que de dimères H2A-H2B. De ce fait, 146 paires de bases d'ADN s'enroulent autour de l'octamère d'histones et sont stabilisées par la liaison de l'histone H1. Par la suite, les nucléosomes se condensent entre eux pour former des solénoïdes d'environ 30 nm de diamètre. La chromatine s'organise finalement pour continuer à se replier sur elle-même jusqu'à ce que chaque chromosome soit d'environ 1400 nm (Felsenfeld & Groudine, 2003).

## 4.2 Modifications épigénétiques

Chaque histone de l'octamère d'histones comprend jusqu'à près de 123 résidus d'acides aminés que l'on nomme queue de l'histone. Chacune des queues des histones peut subir des modifications telles que l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitination, la sumoylation, l'ADP ribosylation et la délamination. Ces changements post-traductionnels permettent de modifier le niveau de compaction de la chromatine et influencent par le fait même la capacité de la transcription des gènes (Lawrence et al., 2016). Pour la suite, il sera davantage question de l'acétylation, de la méthylation et de la phosphorylation des queues des histones.

La méthylation des histones se fait avec l'aide des HTMs (histone methyltransférases) et des HDMs (histone déméthylases) pour influencer la transcription de façon positive ou encore négative. Par exemple, la méthylation en position H3K9me1 est associée avec un statut actif de la transcription et est souvent méthylé par l'enzyme EHMT2 (*Euchromatic Histone Lysine Methyltransferase 2*), tandis que la méthylation en position H3K9me3 est plutôt associée à la répression de la transcription. La triméthylation de H3K9 est souvent effectuée par les enzymes SUV39H1 (Suppressor Of Variegation 3-9 Homolog 1) et SUV39H2 (Suppressor Of Variegation 3-9 Homolog 2) à partir d'une monométhylation de H3K9. La H3K9me3 est aussi souvent associée avec le recrutement de la protéine HP1 (*Heterochromatin Protein 1*), une protéine de la famille des chromodomaines. (Cohen et al., 2011) Enfin, il ne faut pas confondre méthylation des histones avec l'hyperméthylation de l'ADN, qui elle est associée à la répression génique.

L'acétylation des queues des histones entraîne une ouverture de la chromatine, tandis qu'une désacétylation incite à une fermeture de celle-ci. L'acétylation des histones est effectuée par les HATs (histone acétyltransférases) et la désacétylation par les HDACs (histone désacétyltransférases) (Huang & Wen, 2015). Les HAT sont séparées en 3 grandes familles soit les GNATs (*Gcn5 N-acetyltransferases*), les MYST (MOZ, Ybf2, Sas2, and Tip60) et la classe d'orphelin comprenant entre autres p300/CBP. En plus d'avoir une activité catalytique, p300/CBP agit comme cofacteur transcriptionnel en interagissant avec TBP (TATA-binding protein) et TFIIB (Transcription facteur II B). Pour la désacétylation, il existe 4 classes de HDAC, pour la classe I (HDAC1 à 3 et 8), la classe II (HDAC 4 à 7, 9 et 10), la classe III (enzyme NAD relative à la protéine Sir2 dans la levure) et la classe IV (HDAC11). La protéine HDAC3 (histone

désacétyltransférases 3), par exemple, se trouve impliquée dans le complexe de répression de NCOR1 en interagissant avec cette dernière (Cohen *et al.*, 2011).

La phosphorylation de la queue des histones est régulée par les protéines kinases et les phosphatases. La phosphorylation s'associe souvent avec la régulation de la transcription, la mitose, la réparation du dommage à l'ADN et l'apoptose (Pennington & DeAngelis, 2015). La protéinase I $\kappa$ B kinase- $\alpha$ , par exemple, phosphoryle H3S10 ce qui favorise l'ouverture de la chromatine et la translocation au noyau du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B) (Kurita *et al.*, 2014). La phosphatase EYA1 (EYA Transcriptional Coactivator And Phosphatase 1) quant à elle déphosphoryle la Tyr-142 de l'histone H2AX, ce qui promeut le recrutement d'un complexe impliqué dans la réparation de l'ADN (Cohen *et al.*, 2011).

#### 4.2.1 Les readers

Les marques laissées sur les queues des histones peuvent aussi être lues par des protéines que l'on appelle *readers*. Ces protéines comprennent un ou des domaines capables de lier ces marques. Notamment, le chromodomaine permet d'interagir avec les lysines méthylées sur la queue des histones. Il existe aussi le bromodomaine capable de se lier aux lysines acétylées de la queue des histones et le *plant homeodomain finger* (PHD), capable de lier les lysines H3 méthylées. La fonction de ces *readers* est contexte et protéine dépendants (Andrews *et al.*, 2016).

### 5. Le corépresseur nucléaire NCOR1

NCOR1 fait partie de la famille des corépresseurs de récepteur nucléaire qui inclue aussi SMRT (*Silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors*), maintenant nommé NCOR2. La protéine NCOR1 fut découverte en 1995 avec un poids moléculaire de 270 kDa. Afin de déterminer quel mécanisme pouvait réprimer les gènes cibles des récepteurs à hormone thyroïdienne (TR) et rétinoïque (RAR), une biotinylation des récepteurs sur une matrice d'agarose-streptavidine a été effectuée. Ainsi, NCOR1 a été vu en l'absence d'hormones thyroïdes comme s'associant avec les récepteurs à hormone thyroïdienne (TR) et rétinoïque (RAR) lors de la répression de leurs gènes cibles (Horlein *et al.*, 1995).

## 5.1 Les différents domaines protéiques de NCOR1

La protéine NCOR1 contient 3 domaines de répression (RD), deux domaines SANT et 3 domaines d'interaction au récepteur nucléaire (RID) (Figure 3).



**Figure 3 : Les différents domaines protéiques de NCOR1.** Les 3 différents domaines de NCOR1 (domaine de répression (RD), domaine SANT et domaine de liaison aux récepteurs nucléaires (RID)) sont illustrés en fonction de leur position selon la séquence en acides aminés de NCOR1.

Les 3 RD régulent la répression transcriptionnelle à l'aide de séquences hautement spécifiques pour les protéines du complexe de répression. Il a été découvert que la phosphorylation du domaine RD1, par la protéine kinase A (PKA) au niveau de la sérine 70, induit la translocation de NCOR1 au noyau (Choi *et al.*, 2012). La protéine ETO (*RUNX1 Translocation Partner 1*) est capable de se lier aux domaines RD1 et RD3. ETO interagit avec Sin3 (*Transcription Regulator Family Member A*) et les HDAC pour former ainsi un complexe de répression. Le domaine RD1 a aussi la capacité de lier GSP2 (*G-protein pathway suppressor 2*). Il a été démontré qu'une surexpression de GSP2 peut induire une interférence avec l'activité des JNK (c-Jun N-terminal kinases) et ainsi inhiber la régulation du signal de RAS/MAPK (Astapova, 2016; Mottis *et al.*, 2013; Ogawa *et al.*, 2004). La protéine GSP2 est capable de lier TBL1 (*Transducin (beta)-like 1*) et TBL1R (*TBL-related 1*) (Zhang *et al.*, 2002). La portion N-terminale de TBL1/TBL1R est aussi connue pour interagir avec le domaine RD1. TBL1, TBL1R et GSP2 se retrouvent associés à HDAC3 par l'intermédiaire du domaine SANT, formant ainsi un complexe de répression. Il a été montré que le domaine RD3 est aussi capable de lier HDAC4 (Fischle *et al.*, 2002).

Le premier domaine SANT (Swi3, Ada2, NCOR1, TFIIB) contient le domaine DAD (deacetylase interaction domain) alors que le deuxième domaine SANT contient le domaine HID (histone interaction domain). Les 2 domaines SANT sont séparés d'environ 120 acides aminés (Hartman *et al.*, 2005). La portion N-terminale du domaine DAD comprend 16 acides aminés « motif spécifique » situé à l'extérieur du premier domaine SANT, soit en amont du domaine SANT, et sa portion C-terminale corrèle avec la fin du

domaine SANT1 (Codina et al., 2005; Guenther et al., 2001). Le domaine DAD est essentiel pour le recrutement et l'activation de différentes HDAC, mais plus particulièrement pour HDAC3 (Watson et al., 2012). Le domaine HID est davantage reconnu pour lier les queues des histones (Mottis *et al.*, 2013). Cela permet d'induire un mécanisme de répression en favorisant la liaison avec HDAC3, permettant ainsi la désacétylation des queues des histones et donc la fermeture de la chromatine (Yu et al., 2003).

NCOR1 contient 3 domaines RID qui contiennent chacun un domaine hydrophobe riche en isoleucines et qui correspond à la boîte CoRNR. Chaque boîte CoRNR est capable de lier le domaine de liaison du ligand (LBD) du récepteur nucléaire. La séquence consensus de la boîte CoRNR est I/LXXII et les différences observées dans cette séquence sont spécifiques au type de récepteur nucléaire utilisé (Mottis *et al.*, 2013). Il a été montré que la séquence consensus I/LXXII des domaines RID est semblable à celle retrouvée dans le récepteur nucléaire (LXXLL). La séquence LXXLL du récepteur nucléaire est localisée dans le LBD (Webb *et al.*, 2000). C'est ce qui permet l'interaction des récepteurs nucléaires aux domaines RID. C'est par les domaines RID, sujets aux épissages alternatifs, que les différentes isoformes du corépresseur se distinguent. Cet épissage permet entre autre aux différents isoformes de varier la nature d'interaction en fonction des nombreux récepteurs nucléaires dans la cellule (Astapova, 2016).

## 5.2 Rôles des récepteurs nucléaires

NCOR1 est connu pour interagir avec les récepteurs nucléaires tels que les récepteurs à hormones thyroïdiennes et récepteurs à l'acide rétinoïque. Avec cette liaison, il peut inhiber la transcription des gènes associés à ces deux types de récepteurs. Les récepteurs à hormones thyroïdiennes participent à la différenciation des entérocytes (Malo *et al.*, 2004) et à la maturation de la muqueuse intestinale (Sun & Shi, 2012). Pour les récepteurs à l'acide rétinoïque, il a été démontré que son interaction pouvait induire une dégradation de la  $\beta$ -caténine dans des cellules de cancer colorectal, entraînant ainsi l'inhibition de la transcription des gènes cibles de la voie de signalisation des Wnt et donc par le fait même une diminution de la prolifération cellulaire (D'Errico & Moschetta, 2008).

NCOR1 peut aussi lier les récepteurs nucléaires de la famille PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*) (Xu *et al.*, 2002). Pour induire la transcription des gènes cibles, les récepteurs PPAR doivent s'hétérodimériser avec RXR (retinoid X receptor)

sur l'ADN. Dans l'intestin grêle, PPAR $\beta$  et PPAR $\delta$  jouent un rôle dans la différenciation des cellules de Paneth et dans le système immunitaire inné (Peters et al., 2009, 2011).

NCOR1 peut aussi lier des facteurs de transcription tels que MAD/MX11 (*MAX Dimerization Protein*), MYOD1 (*Myogenic Differentiation 1*), RUNX1 (*RUNX1 Translocation Partner 1*), CBF (*Core-Binding Factor*), TFIIB, les membres de la grande famille AP-1 (*Activator protein 1*) et enfin NF- $\kappa$ B (Battaglia et al., 2010). Plus précisément, les facteurs de transcription AP-1 et NF- $\kappa$ B ont la capacité d'induire des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire intestinale (Souza et al., 2005). Cette réponse inflammatoire promeut le développement du système immunitaire acquis. La présence de NCOR1 dans des macrophages favorise la répression des gènes cibles de AP-1 et NF- $\kappa$ B, et induit donc une réponse anti-inflammatoire (Mottis et al., 2013; Ogawa et al., 2004).

### 5.3 Modèle murin déficient pour NCOR1

NCOR1 est une protéine exprimée dans plusieurs types de tissus, tels que la prostate, le côlon, le cortex cérébral et les muscles squelettiques. Des modèles murins ont été créés pour diminuer l'expression protéique de Ncor1 dans ces différents types tissulaires. Tout d'abord, il a été observé qu'une délétion des acides aminés 282 à 308 de *Ncor1* chez des embryons de souris peut mener à leur mort après seulement 15,5 jours de gestation (Jepsen et al., 2000). Pour empêcher la mortalité embryonnaire, des approches ont été établies permettant de cibler la perte de Ncor1 dans des tissus spécifiques. Le système Cre-loxP permet l'excision de séquence spécifique d'ADN dans le génome de la souris. Elle reconnaît les 2 séquences loxP, de part et d'autre de la séquence cible, et favorise une recombinaison. C'est cette recombinaison qui permet l'excision de la séquence désirée (El Marjou et al., 2004). Le premier modèle utilisé pour une délétion de *Ncor1* est celui de Astapova (2008). Il permet une délétion des 2 derniers domaines RID au niveau du foie. Ce modèle laisse la protéine dans un état fonctionnel, mais avec moins d'affinité pour les récepteurs nucléaires. Ce groupe a donc démontré que la protéine NCOR1 participe à la régulation des enzymes impliqués dans le catabolisme du cholestérol et des enzymes lyogéniques en contrôlant la transcription des gènes cibles de TR et LXR (Astapova et al., 2008). Le deuxième modèle utilisé pour la délétion de *Ncor1* est celui de Hiroyasu Yamamoto (2011). Il s'agit d'une délétion de l'exon 11 menant à l'apparition d'un codon stop dans la séquence protéique de Ncor1 dans le

muscle squelettique. Ceci entraîne la perte complète de la fonction de NCOR1 dans le muscle squelettique. Dans ce contexte, les souris démontrent une augmentation de la masse musculaire et du métabolisme oxydatif par l'activation des MEF2 (myocyte enhancer factor-2), PPAR $\beta/\delta$  et les ERR (Estrogen-related receptor) (Hiroyasu Yamamoto *et al.*, 2011).

#### 5.4 Implication du DSS

Le DSS (Dextran sodium sulfate) est un polysaccharide sulfaté hydrosoluble dans l'eau et chargé négativement. Il agit comme détergent induisant un stress au niveau de l'épithélium intestinal. Certains effets de ce polysaccharide toxique sont encore mal compris, mais il a été démontré que le DSS agit directement sur l'épithélium du côlon en créant des lésions au niveau des cellules épithéliales intestinales. Celles-ci perdent tout d'abord leur polarité, deviennent plus aplaties, et migrent pour favoriser un processus de régénération épithéliale. Cette première étape de régénération, soit la restitution épithéliale, ne commence que quelques heures après le début de l'ingestion du DSS chez les souris (Iizuka & Konno, 2011; Sturm & Dignass, 2008). Des lésions au niveau des cryptes intestinales seront alors observées. Pour se faire, des neutrophiles se dirigent au site de la blessure et sécrètent des peptides antimicrobiens, des facteurs de croissance, tels que le VEGF (*Vascular endothelial growth factor*), et des médiateurs lipidiques. Il y a aussi la contribution de facteurs essentiels à la régénération épithéliale, tels que le TGF- $\beta$  et le NO (*Nitric oxide*) qui sont aussi sécrétés dans ce contexte (Aoi *et al.*, 2008). Par la suite, les neutrophiles favorisent le recrutement des monocytes qui se différencient en macrophages. Les macrophages participent à la phagocytose des débris au site de la blessure et aussi à la sécrétion de facteurs de croissance et de cytokines (Leoni *et al.*, 2015). La régénération épithéliale se poursuit, de manière indépendante et simultanée, avec la prolifération cellulaire qui est activée quelques heures ou quelques jours après le début des lésions cellulaires provoquées par le DSS. Le processus de régénération épithélial est finalement conclu avec une différenciation des cellules épithéliales intestinales afin d'assurer un bon fonctionnement de la muqueuse (Iizuka & Konno, 2011; Sturm & Dignass, 2008). Ainsi, ce stress épithélial engendre une diminution de l'intégrité de la barrière épithéliale causant un dérèglement dans l'homéostasie intestinale ce qui favorise une activation du processus inflammatoire. Après un jour de traitement, il est possible d'observer des médiateurs inflammatoires sécrétés par les neutrophiles tels que TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6. Il est aussi possible qu'après un jour de traitement au DSS, des

changements dans l'expression des protéines impliquées dans le maintien des jonctions serrées apparaissent, ce qui augmente la perméabilité membranaire (Chassaing et al., 2014). De manière plus physiologique, il est possible de voir un rétrécissement du côlon après seulement un jour, et après 3 jours de traitement, il est aussi possible d'observer du sang dans les fèces. Plus le traitement est long et plus la concentration du DSS est élevée, plus les changements physiologiques du côlon sont importants (Yan *et al.*, 2009). Pour considérer que l'on induit réellement une colite aiguë chez une souris, on doit au minimum la traiter au DSS durant 5 jours (Stevenson et al., 2006).

Des études antérieures ont démontré que les souris mutées pour 2 domaines de liaison aux récepteurs nucléaires de NCOR1 (NCOR1 $\Delta$ ID<sup>ACEI</sup>) ont un phénotype épithélial intestinal similaire aux souris contrôles (St-Jean *et al.*, non-publié). Ceci nous indique que la structure de l'épithélium intestinal de la souris NCOR1 $\Delta$ ID<sup>ACEI</sup> n'est pas affectée par la perte de deux domaines de récepteur nucléaire. C'est avec l'utilisation d'un carcinogène non-génotoxique créant un stress épithélial, soit le DSS, qu'il a été possible d'étudier l'effet de la perte d'expression de NCOR1 chez les souris NCOR1 $\Delta$ ID<sup>ACEI</sup>. Ces études ont démontré une sensibilité épithéliale importante lors de la perte des deux domaines de liaison au récepteur nucléaire de NCOR1 suite à un traitement au DSS. Ainsi, il a été observé une perte de poids significative après 5 jours de DSS, un index de sévérité de la maladie ainsi qu'un dommage aux cryptes significatif au 7<sup>ième</sup> jour (Figure 14). Ces résultats indiquent donc un niveau de stress cellulaire important et une sensibilité accrue de l'épithélium intestinal, face à un agent toxique pour les souris NCOR1 $\Delta$ ID<sup>ACEI</sup>. Pour évaluer la régénération épithéliale des souris NCOR1 $\Delta$ ID<sup>ACEI</sup>, des essais ont calculé la perte de poids durant 7 jours suivant l'absorption de 7 jours de DSS 3%. Ainsi les souris mutantes, qui ont un taux de survie de 33%, ont démontré une récupération plus lente du poids comparativement aux souris contrôles (Figure 15). Il est donc possible de croire que les 2 domaines de récepteur nucléaire de NCOR1 jouent un rôle important dans la régénération de l'épithélium intestinal puisqu'elle s'y trouve altérée en absence de ceux-ci.

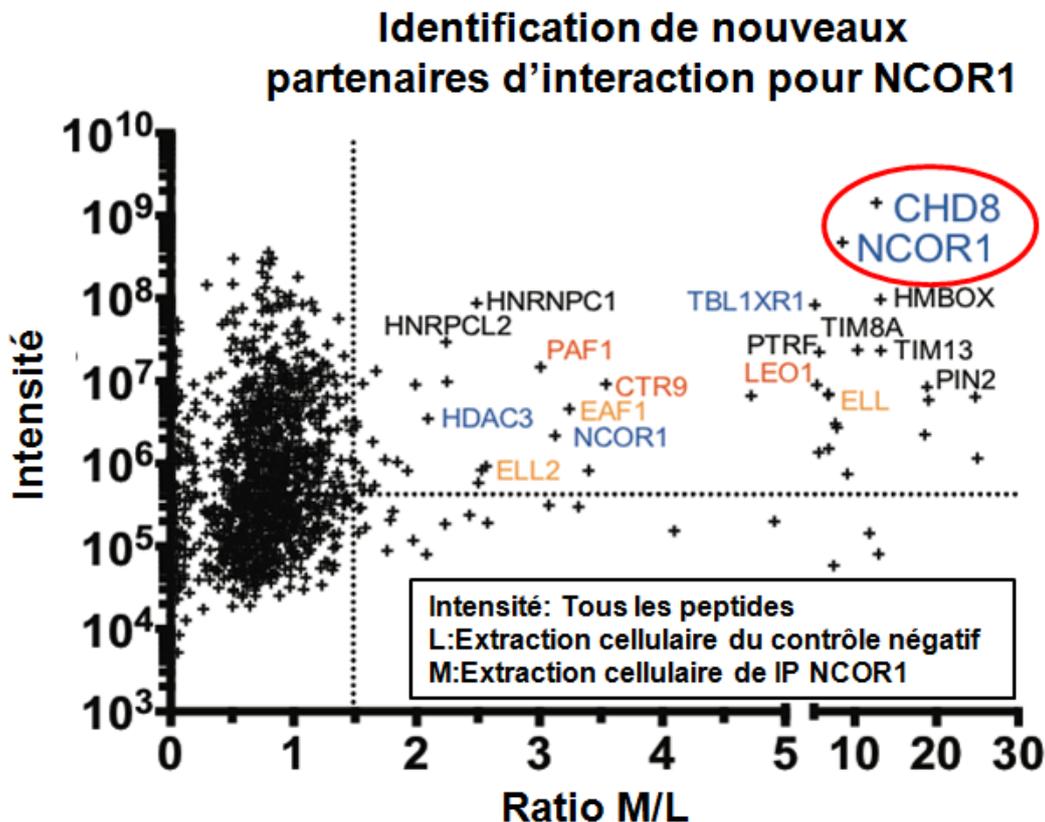
## 5.5 Implication dans le cancer

Une perte d'expression de NCOR1 fut observée dans divers cancers incluant celui de la prostate, du cancer du sein et du cancer colorectal. Au niveau de la prostate, le récepteur androgène (AR) joue un rôle majeur dans la progression et le développement du cancer de la prostate. Une perte d'expression de NCOR1 déloge son interaction avec AR et augmente ainsi l'activité transcriptionnelle de ce récepteur nucléaire (Hodgson *et al.*, 2005). En 2016, le groupe de Lopez a observé une concentration protéique de NCOR1 plus faible dans des échantillons de cancer de la prostate comparativement à des échantillons de prostate normale. Dans le cadre du cancer du sein ER<sup>+</sup> (récepteur à l'œstrogène positif), il a été observé une mutation non-sens de *NCOR1* ainsi qu'une délétion homozygote. Ceci induit donc une dérégulation au niveau de l'activité de répression des gènes liés au récepteur à l'œstrogène (Stephens *et al.*, 2012). Dans des lignées de cancer colorectal, la présence de mutations causant un changement de cadre de lecture dans des séquences microsatellites au niveau du gène *NCOR1* a été observée par le groupe de Ionov (Ivanov, Lo, Hawthorn, Cowell, & Ionov, 2006). NCOR1 se retrouve donc inactif et ne peut plus interagir avec les facteurs de transcription.

## 6. Nouveaux partenaires d'interaction de NCOR1

Lorsque NCOR1 interagit avec les récepteurs nucléaires, l'activation de la transcription est généralement réprimée à l'aide de son complexe de répression. Dans la littérature, il a été montré qu'une stimulation à IL-1 $\beta$  (*Interleukin 1 beta*) favorise le déplacement du complexe de répression jusqu'au protéasome (Baek *et al.*, 2002). Une fois que le ligand interagit avec le récepteur nucléaire, tel que TR, les protéines TBL1 et TBLR1 favorisent le recrutement de la machinerie d'ubiquitylation, menant ainsi le complexe à la dégradation. Des expériences antérieures (St-Jean *et al.*, non-publié) nous ont démontré qu'une stimulation à IL-1 $\beta$  n'induit pas la dégradation de NCOR1 dans des cellules épithéliales intestinales. En plus de cela, un séquençage d'ARN au niveau de la perte d'expression de NCOR1 dans des cellules de cancer colorectal nous a démontré une diminution de l'expression de certains gènes cibles. Ceci nous laisse suggérer la présence de mécanismes additionnels par lesquels NCOR1 puisse réguler la transcription. Afin de déterminer de nouveaux partenaires d'interactions de NCOR1, une immunoprécipitation en milieu SILAC (*Stable isotope labeling with amino acids in cell culture*) suivi d'une spectrométrie de masse a été effectuée. Cette approche a permis d'observer un

enrichissement de peptides correspondant à CHD8 (*Chromodomain Helicase DNA binding protein 8*) aussi important que celui de NCOR1 (Figure 4).



**Figure 4: CHD8 comme nouveau partenaire d'interaction potentielle de NCOR1.** Une immunoprécipitation (IP) de NCOR1 sur des cellules Caco-2/15 cultivées dans un milieu riche en isotope moyen (R6K4) a été effectuée et analysée en spectrométrie de masse. Le graphique représente l'intensité des peptides obtenue dans l'IP de NCOR1(R6K4) en fonction du ratio des peptides trouvés dans l'IP de NCOR1(R6K4) sur le contrôle négatif (IP IgG cultivé dans un milieu R0K0). Cette spectrométrie de masse a démontré un enrichissement de CHD8 comparable à celui de NCOR1. (St-Jean *et al.*, non-publié)

## 7. La famille des protéines CHD

Il existe 9 CHD répertoriés en 3 classes. Dans la littérature, il n'y a pas encore de consensus pour séparer les CHD dans les 3 différentes classes selon leur domaine protéique. Malgré cela, tous s'entendent pour dire que chaque CHD doit comprendre au minimum 2 chromodomaines et 2 domaines hélicases SNF2-ATP-dépendant (Marfella & Imbalzano, 2007; Micucci *et al.*, 2015). La première classe des CHD comprend CHD1 et CHD2. Dans certaines publications, en plus des chromodomaines et des domaines hélicases, un motif de liaison à l'ADN est aussi décrit (Kolla *et al.*, 2014; Marfella & Imbalzano, 2007). La deuxième classe est constituée de CHD3 et CHD4. Cette deuxième classe comprend, en plus des chromodomaines et des domaines hélicases, un domaine

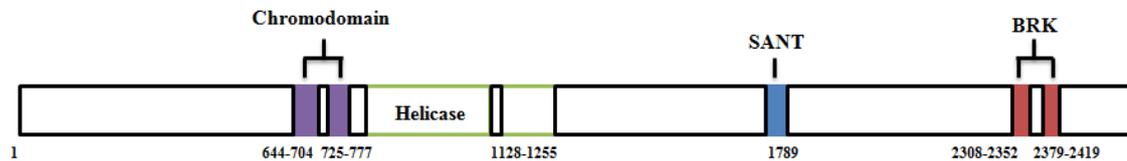
PHD. Dans certaines publications, il est question aussi d'un domaine de fonction inconnue. La position du CHD5 reste ambiguë et elle se retrouve soit dans les classes 2 ou 3 (Kolla *et al.*, 2014). Ceci est dû à la possibilité de CHD5 d'avoir un domaine PHD et un domaine SANT. La troisième classe comprend CHD6, CHD7, CHD8 et CHD9. Cette classe comprend un domaine BRK et un domaine SANT de plus. Dans certaines publications, on retrouve aussi un domaine de liaison à l'ADN (Kolla *et al.*, 2014; Marfella & Imbalzano, 2007).

### 7.1 Implication des CHD dans le cancer

Les différentes protéines CHD (*Chromodomain Helicase DNA-binding*) ont été rapportées pour être impliquées dans plusieurs maladies. La protéine CHD7 est impliquée dans le syndrome de CHARGE (*Coloboma, Heart defects, Atresia of the choanae, Retardation of growth and development, Genital hypoplasia, and Ear abnormalities*). Une mutation dominante dans le gène de CHD7 mène en général à des aberrations congénitales (Basson & van Ravenswaaij-Arts, 2015). Un dysfonctionnement du gène CHD5 est souvent impliqué dans le neuroblastome, mais aussi dans le cancer du sein, du poumon et du côlon (Kolla *et al.*, 2014). Une mutation menant à une perte de fonction de CHD8 est souvent associée au spectre de l'autisme (ASD). Il a été démontré que de manière directe ou indirecte, CHD8 peut réguler les gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation des neurones. Ces mêmes gènes sont aussi impliqués dans le développement de l'ASD. Il a aussi été remarqué que CHD1, CHD2, CHD3, CHD4, CHD7, CHD8 et CHD9 ont des répétitions de mononucléotides dans leur séquence codante. Ces petites répétitions de nucléotides peuvent être la cible de mutations somatiques dans le cancer colorectal MSI (Kim *et al.*, 2011). De nombreuses mutations au niveau des gènes CHD7 et CHD8 dans le cancer colorectal CIMP1 ont été détectées suggérant une aberration du remodelage de la chromatine (Tahara *et al.*, 2014). Plusieurs des mutations de CHD8 se retrouvent au niveau du 31 et 37 ième exons, soit en amont du domaine SANT et BRK (montré ci-dessous).

## 7.2 Les différents domaines protéiques de CHD8

CHD8 est une protéine d'environ 290 kDa. Elle comprend 2 chromodomaines, un domaine hélicase SWI2/SNF2, un domaine SANT et un domaine BRK (Brahma et Kismet) (Figure 5).



**Figure 5. Les différents domaines protéiques de CHD8.** Les 5 différents domaines de CHD8 (chromodomaine, domaine hélicase SWI2/SNF2, domaine SANT et domaine BRK) sont illustrés en fonction de leur position selon la séquence en acides aminés de CHD8.

Il existe 3 principales familles pour les chromodomaines : les HP1, les PC (*Polycomb protein*) et le plus important dans notre contexte, les CHD. Les chromodomaines sont capables de lier les lysines méthylées sur la queue des histones (Margueron et al., 2005). Ils sont organisés sous la forme de 3 feuillets Bêta antiparallèles supportés par une hélice alpha. Ainsi, CHD1 est capable de lier l'histone H3 lysine 4 monométhylée (H3K4me) plus facilement que l'histone H3 lysine 4 triméthylée (H3K4me3) (Flanagan *et al.*, 2005) et ce, via ses 2 chromodomaines. H3K4me est souvent associé à l'activation de la transcription du gène cible. Il a aussi été démontré que CHD7 peut lier la mono, di ou triméthylation de H3K4 (Schnetz *et al.*, 2009).

Le domaine SWI2/SNF2 est retrouvé parmi 6 superfamilles d'hélicases qui contiennent chacune des motifs de séquences protéiques spécifiques. La superfamille 2 contient 9 séquences de motif conservées. La superfamille 2 peut être séparée en 3 sous-familles : Req-Q-like, DEAD-box RNA hélicases et Snf2-like enzyme (Singleton et al., 2007). Dans le cas des CHD, on retrouve le domaine SWI2/SNF2-ATPase hélicase qui contient environ 70% d'homologie avec la superfamille 2 (Hall & Georgel, 2007). Le domaine SWI2/SNF2-ATPase hélicase conserve les 9 séquences, mais avec 3 motifs spécifiques *RecA-like* qui sont intercalés dans l'hélicase (Delmas et al., 1993; Eisen et al., 1995). Ce type d'hélicase ne sépare pas les brins d'ADN, mais induit une torsion superhéliçoïdale au brin d'ADN grâce à l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP.

Le domaine SANT comprend généralement 3 hélices alpha contenant chacune un résidu d'acide aromatique, donnant ainsi un corps hydrophobique essentiel à la structure. Ce domaine est reconnu pour moduler la chromatine, en participant à la liaison des queues des histones (Boyer et al., 2004).

Le rôle du domaine BRK n'est pas encore bien compris dans la littérature. Néanmoins, ce domaine est connu pour être impliqué dans le remodelage de la chromatine. Il a été démontré que le premier des 2 domaines de BRK est constitué de 3 feuillets Bêta, intercalés par une hélice alpha, et finissant en c-terminal par une grande hélice alpha (Allen et al., 2007). Des études ont suggéré que le domaine BRK soit fonctionnel uniquement dans les eucaryotes supérieurs puisqu'il semble interagir avec un élément de la chromatine spécifique aux eucaryotes (Marfella & Imbalzano, 2007). Il a aussi été démontré que les 2 domaines BRK sont capables de lier le domaine en doigts de zinc de CTCF (*CCCTC-binding factor*) (Allen et al., 2007).

### 7.3 La protéine CHD8 et son variant

La protéine CHD8, préalablement désigné Duplin (*axis duplication inhibitor*) a été découvert en 2000 (Sakamoto et al., 2000). Duplin est en fait un épissage alternatif dans l'exon 9 du transcrit de la forme complète de CHD8. Il s'agit d'un épissage entraînant l'apparition d'un codon *stop* permettant la formation de la petite forme de CHD8. CHD8<sub>s</sub> est une protéine de 749 acides aminés ne contenant que les 2 chromodomaines en N-terminal de la protéine. Cette protéine contient aussi un site de localisation nucléaire en aval du chromodomaine, soit approximativement entre les positions 500 et 584 en acides aminés (Herrera et al., 1986; Kobayashi et al., 2002). CHD8<sub>s</sub> est reconnu pour lier la  $\beta$ -caténine, entre les acides aminés 668 et 749, P53 entre les acides aminés 1 à 200 et enfin l'histone H1, entre les acides aminés 500 à 600 (Nishiyama et al., 2009, 2012; Yamashina et al., 2006). De par ces interactions protéiques, la petite forme de CHD8 semble impliquée dans l'inhibition de la voie de Wnt et de l'apoptose.

### 7.4 Interaction de CHD8 avec CTCF

CTCF est un facteur de transcription à 11 doigts de zinc pouvant lier les séquences isolatrices. Il aide à définir les limites entre l'euchromatine et l'hétérochromatine. Ce principe s'applique surtout pour les gènes à proximité et disposés dans le sens contraire pour la transcription. Ceci s'applique aussi pour l'inhibition de l'expression d'un gène

entre 2 allèles. CTCF peut homodimériser et former une boucle dans la chromatine créant ainsi un ancrage dans des régions localisées dans le nucléole ou encore dans la lamina nucléaire. Comme mentionné précédemment, CHD8 est capable d'interagir avec CTCF via son domaine BRK. La liaison entre CHD8 et CTCF peut s'effectuer près du promoteur de *BRCA1* (*breast cancer 1*) et de *MYC* (*V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog*), au niveau de la région méthylée de *IGF2* (*Insulin Growth Factor 2*) et de *H19* et finalement au niveau du 5'HS5 (*5' DNase hypersensitive site 5*) de la  $\beta$ -globine. La présence de CHD8 et de CTCF dans ce contexte est essentielle au bon fonctionnement de la régulation épigénétique. CHD8 agit comme une protéine dichotomique au niveau de la régulation épigénétique. La perte d'expression de CHD8 peut induire l'acétylation ou encore la désacétylation des histones de même que la méthylation et l'hyperméthylation de l'ADN (Damaschke et al., 2014; Ishihara et al., 2006).

### 7.5 Interaction de CHD8 avec la $\beta$ -caténine

L'activation de la voie des Wnt influence la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire. Il existe plusieurs gènes cibles de la voie des Wnt qui sont fonctionnellement impliqués dans la progression du cancer colorectal tels que *CD44*, *MYC* et *CCND1* (cyclin D1).

L'activation de la voie Wnt canonique est initiée par la liaison d'un ligand tel que Wnt3a aux récepteurs Frizzled et LGR5/6 (*receptor related protein 5 or 6*). Par la suite, Dvl (*Dishevelled*) se lie à Frizzled et CK1 (*Casein kinase 1*) vient phosphoryler LGR5/6. Axin et APC sont recrutés aux LGR5/6 phosphorylés et deviennent inactifs. La  $\beta$ -caténine se retrouve alors non phosphorylée et ainsi libérée du complexe. Ceci permet le déplacement de Groucho, pour lier LEF/Tcf-1, et activer la transcription des gènes cibles.

En absence des Wnt, il y a formation d'un complexe avec Axin, APC, GSK3 (*Glycogen synthase kinase 3*) et CK1. GSK3 vient phosphoryler la  $\beta$ -caténine en positions sérine 33, sérine 37 et thréonine 41. Elle phosphoryle aussi CK1 dans le cytoplasme en position sérine 45. La E3 ubiquitine ligase reconnaît la  $\beta$ -caténine aux sérines 33 et 37, ce qui la mène à son ubiquitination et donc à sa dégradation par le protéasome. Une fois la  $\beta$ -caténine dégradée, la protéine Groucho reste fixée à LEF/Tcf-1 et la transcription des gènes cibles n'est plus possible (Komiya & Habas, 2008; MacDonald et al., 2009).

Une étude a démontré que CHD8 régule la  $\beta$ -caténine dans le noyau en se liant à son site Amardillo. Cette même étude a démontré que CHD8 pouvait inhiber la transcription des gènes cibles de la voie des Wnt en interagissant avec l'histone H1 et la  $\beta$ -caténine. L'histone H1 se trouve recrutée en N-terminal de CHD8, entre les acides aminés 500 et 600 (Nishiyama *et al.*, 2009). Ce complexe lié au promoteur des gènes cibles des Wnt vient favoriser la condensation de la chromatine et ainsi réprimer la transcription (Nishiyama *et al.*, 2012).

### **7.6 Interaction de CHD8 avec p53**

Le suppresseur de tumeur P53 est impliqué dans l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire, la différenciation, la réparation de l'ADN et dans la sénescence. P53 est activé entre autres lors de stress oxydatif ou de dommage à l'ADN. Une étude a démontré que la perte de CHD8 au niveau embryonnaire pouvait induire une suractivation de p53 menant ainsi à une apoptose généralisée (Nishiyama *et al.*, 2004). Par la suite, il a été démontré que la région N-terminale de CHD8 (entre les acides aminés 1 et 300) peut interagir avec p53. Avec l'aide de l'histone H1, ils forment un complexe menant à la répression transcriptionnelle des gènes cibles de p53. Comme mentionné plus haut, l'histone H1 est impliquée dans la régulation de la condensation de la chromatine et donc de la transcription (Nishiyama *et al.*, 2009).

### **7.7 Interaction de CHD8 avec BRAF**

La sérine thréonine kinase BRAF est un proto-oncogène de la voie des MAPKs et est impliquée dans le contrôle de la prolifération, de la différenciation et de la survie cellulaire. *BRAF* est muté dans le cancer colorectal à une fréquence de 8 à 15%. Près de 90% de ces mutations affectent les nucléotides au résidu 600, changeant ainsi la valine pour un glutamate [BRAF(V600E)] (Ascierto *et al.*, 2012). Cette mutation entraîne une activité constitutive de la kinase et donc une phosphorylation constante de la voie des MAPK (Mitogen-activated protein kinases). Il a été montré que BRAF(V600E) était capable d'entraîner une augmentation de la phosphorylation de MAFG (*musculoaponeurotic fibrosarcoma homolog G*) sur la sérine 124. Ainsi, MAFG est une protéine régulatrice permettant soit l'activation ou la répression de la transcription. Dans un contexte de cancer colorectal, MAFG agit en tant que répresseur transcriptionnel. Une fois que la protéine MAFG est phosphorylée, elle peut prévenir la polyubiquitination et donc la dégradation protéolytique. La protéine MAFG phosphorylée est ensuite capable

de se lier à l'ADN et d'y recruter un complexe transcriptionnel comprenant BACH1 (*BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 1*), CHD8 et DNMT3B (*DNA methyltransferase 3 beta*). Dans ce contexte, DNMT3B hyperméthyle les promoteurs des gènes *CIMP1-2*, réprimant ainsi la transcription. Dans ce contexte, CHD8 agit comme intermédiaire de liaison entre BACH1 et DNMT3B au niveau de l'ADN et il participe au recrutement de DNMT3B (Fang *et al.*, 2016).

### **7.8 Implication de CHD8 dans le cycle cellulaire**

La protéine CHD8 participe à la régulation du cycle cellulaire en favorisant l'expression de la thymidylate synthétase (TYMS) et de la cycline E2 (CCNE2), qui sont toutes les deux exprimées au niveau de la phase G1/S. TYMS est une enzyme synthétisant le dUMP en TMP et donc très essentielle à la synthèse de l'ADN. CCNE2 phosphoryle la protéine RB, libérant ainsi le facteur de transcription E2F afin d'initier la transcription des gènes nécessaire pour l'entrée en phase S. CCNE2 phosphoryle aussi les inhibiteurs de kinases dépendantes des cyclines (CDK), soit p21 et p27. CHD8 est capable de lier la région promotrice des gènes *CCNE2* et *TYMS* durant la phase G1. CHD8 et l'ARN polymérase II phosphorylée ont été observé ensemble au niveau du promoteur des gènes *CCNE2* et *TYMS*. Ceci laisse croire que CHD8 est impliqué dans l'initiation de l'élongation de la transcription de *CCNE2* et *TYMS*. Il faut aussi tenir compte que CHD8 peut lier la marque de méthylation H3K4m2 lorsque *CCNE2* est inactif. Lorsque la transcription de *CCNE2* est active, la protéine CHD8 se retrouve liée à la marque de méthylation H3K4m3 (Rodríguez-Paredes *et al.*, 2009). CHD8 est aussi capable de se lier sur les promoteurs des gènes cibles du facteur de transcription E2F1 qui, comme mentionné plus haut, est impliqué dans l'initiation de la transcription des gènes nécessaire pour l'entrée en phase S (Subtil-Rodríguez *et al.*, 2014).

## 8. Problématique, hypothèse et objectifs de recherche

Les cellules épithéliales intestinales sollicitent plusieurs mécanismes contribuant à l'homéostasie intestinale comprenant la migration, la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. Pour contribuer à ce bon fonctionnement, plusieurs récepteurs nucléaires et facteurs de transcription sont impliqués dans la régulation de ces mécanismes. Les récepteurs à hormone thyroïdienne sont par exemple impliqués dans la différenciation des entérocytes (Malo *et al.*, 2004) et dans la maturation de la muqueuse intestinale (Sun & Shi, 2012). Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B est quant à lui impliqué dans la régulation de divers gènes au niveau de la prolifération cellulaire tels que la cyclin D et c-Myc. Ainsi, une activation constitutive de NF- $\kappa$ B peut contribuer à la progression du cancer colorectal (Wang *et al.*, 2009).

L'activité de différents facteurs de transcription peut être régulée par le corépresseur NCOR1. Lors d'une étude précédente du laboratoire, il a été montré que NCOR1 était impliqué dans la régulation positive de la prolifération des cellules épithéliales intestinales (Doyon *et al.*, 2009). NCOR1 est capable de réguler la transcription des gènes cibles avec l'aide de son complexe de répression. Ce complexe comprend principalement les protéines HDAC3, GPS2 et TBL1/TBLR1 qui sont liées au domaine RD1 et SANT de NCOR1. Afin de découvrir de nouveau partenaire d'interaction de NCOR1, une spectrométrie de masse sur des cellules de cancer colorectal a été effectuée. L'analyse de ce résultat nous suggère une nouvelle interaction avec la protéine CHD8, impliquée dans le remodelage de la chromatine et dans la régulation transcriptionnelle.

Nous avons posé comme hypothèse de recherche que NCOR1 est impliqué dans des processus liés au cancer colorectal et que son interaction avec CHD8 permet des rôles fonctionnels communs. Nous avons fixé les trois objectifs suivants :

**Objectif 1** : Étudier l'interaction entre CHD8 et NCOR1.

A) Confirmer l'interaction entre CHD8 et NCOR1 au niveau des cellules de cancer colorectal, Caco-2/15 et HT-29, et au niveau de cellule colorectale non cancéreuse, les 18co.

B) Déterminer le(s) domaine(s) protéique(s) responsables de l'interaction entre CHD8 et NCOR1.

**Objectif 2** : Déterminer si les 2 formes de CHD8 ont des rôles fonctionnels différents au niveau des cellules de cancer colorectal.

**Objectif 3** : Étudier l'impact physiologique d'un stress cellulaire induit par un traitement au DSS sur l'épithélium intestinal du côlon chez les souris déficientes pour Ncor1.

## Chapitre 2: Matériel et méthodes

### 1. Culture cellulaire

**1.1 HCoEpiC:** Les cellules HCoEpiC (Human Colonic Epithelial Cells) sont des cellules épithéliales intestinales du côlon (Cederlane: #2950, Burlington, Canada). Elles sont cultivées dans du milieu CoEpiCM-prf (Colonic Epithelial Cell Medium) (Cederlane #2951). Le milieu est supplémenté en facteurs de croissance, 0,01 M HEPES (*Wisent, St-Bruno, Canada*), 100 U/ml pénicilline (*Wisent,*), 100 µg/ml streptomycine (*Wisent*) et de bicarbonate. Les cellules sont cultivées dans des Pétris de polystyrène (BD falcon Tewksbury, États-Unis) recouvert de 2 µg/cm<sup>2</sup> de poly-D-lysine (Sigma Aldrich, Oakville, Canada) dans un incubateur à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu des cellules est changé tous les 2-3 jours et les cellules sontensemencées à 5000 cellules/cm<sup>2</sup> à 90% de confluence.

Pour la suite, toutes les cellules utilisées ont été cultivée dans des milieux supplémenté avec 10% FBS (Fetal Bovine Serum) (*Wisent*), 2 mM de glutamine (*Wisent*), 0,01 M HEPES, 100 U/ml pénicilline et 100 µg/ml streptomycine et incubées à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> dans des Pétris de polystyrène. Le changement de milieu des cellules s'effectue tous les 2-3 jours.

**1.2 18Co:** Les 18Co sont des cellules mésenchymateuses [ATCC® (American Type Culture Collection) CRL-1459™] provenant d'un côlon humain normal d'un fœtus fille de 2,5 mois. Elles sont cultivées dans du milieu EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) et elles sont passées 1:3, environs tous les 5 jours, jusqu'à confluence.

**1.3 Caco-2/15:** Les cellules Caco-2/15 proviennent d'un clone dérivé de la lignée Caco-2 (ATCC® HTB-37™) qui sont des cellules épithéliales intestinales extraites d'un adénocarcinome de côlon d'un homme de 72 ans. Elles sont cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) et elles sont passées 1:5 lorsque la confluence atteint près de 80%.

**1.4 HT-29:** Les cellules HT-29 sont des cellules épithéliales intestinales (ATCC® HTB-38™) extraites d'un adénocarcinome de côlon d'une femme de 44 ans. Elles sont

cultivées dans le milieu modifié McCoy's et elles sont passées 1:6 lors de l'atteinte de la confluence.

**1.5 SW480:** Les cellules SW480 (ATCC® CCL-228™) sont des cellules épithéliales intestinales extraites d'adénocarcinome de côlon d'un homme de 50 ans. Elles sont cultivées dans du milieu Leibovitz's L-15 supplémenté et elles sont passées 1:4 lors de l'atteinte de la confluence.

**1.6 T84:** Les cellules T84 (ATCC® CCL-248™) sont des cellules épithéliales intestinales de carcinome de côlon d'un homme de 72 ans. Elles sont cultivées dans du DMEM/F12 et elles sont passées 1:4 lors de l'atteinte de la confluence.

**1.7 Colo205:** Les cellules Colo205 (ATCC® CCL-222™) sont des cellules épithéliales intestinales extraites d'un adénocarcinome de côlon d'un homme de 70 ans. Elle sont cultivées dans du milieu RPMI-1640 et elles sont passées 1:4 lors de l'atteinte de la confluence.

**1.8 DLD-1:** Les cellules DLD-1 (ATCC® CCL-221™) sont des cellules épithéliales intestinales extraites d'un adénocarcinome de côlon d'un homme adulte. Elles sont cultivées dans le milieu RPMI-1640 et elles sont passées 1:10 lors de l'atteinte de la confluence.

**1.9 HCT116:** Les cellules HCT116 (ATCC® CCL-247™) sont des cellules épithéliales intestinales extraites d'un carcinome de côlon d'un homme adulte. Elles sont cultivées dans le milieu modifié McCoy's et elles sont passées 1:10 lors de l'atteinte de la confluence.

**1.10 LoVo:** Les cellules LoVo (ATCC® CCL-229™) sont des cellules épithéliales intestinales extraites d'un adénocarcinome de côlon de grade 4 chez un homme de 56 ans. Elles sont cultivées dans le milieu F-12K et elles sont passées 1:4 lors de l'atteinte de la confluence.

**1.11 RKO :** Les cellules RKO (ATCC® CRL2577) sont des cellules épithéliales extraites d'un carcinome de côlon humain. Elles sont cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) et elles sont passées 1:4 lors de l'atteinte de la confluence.

**1.12 HEK293T :** Les cellules HEK293T (ATCC® CRL-3216) sont des cellules épithéliales transformées de fœtus de rein humain. Elles sont cultivées dans du milieu

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) et elles sont passées 1:6 lors de l'atteinte de la confluence.

## 2. Production d'ARN interférent

### 2.1 Transfection des siRNA

Au moment de la transfection, les cellules HT-29 et Caco-2/15 ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits dans un ratio respectif de 130 000 cellules/puits (HT-29) et 150 000 cellules/puits (Caco-2/15). La transfection est initiée par une incubation de 5 min à TP (température pièce) avec 200 µl du milieu opti-MEM (Life Technologies, Burlington, Canada) et 2 µl de lipofectamine RNAiMax (Life Technologies,). Une incubation de 20 min à TP s'en est suivie avec l'ajout de 1 µl des siRNA (Tableau 1) au mélange opti-MEM-lipofectamine. Le mélange opti-MEM-lipofectamine-siRNA est ajouté aux cellules nouvellementensemencées pour une incubation de 48 heures à 37°C.

**Tableau 1:** Liste des différents siRNA utilisés

Nom	Isoformes	Début de la position dans la séquence (pb)	Compagnie	# référence
siCHD8-87	CHD8 <sub>S</sub>	632	Sigma	SASI_Hs02_00354287
siCHD8-89	CHD8 <sub>S</sub>	1272	Sigma	SASI_Hs02_00354289
siCHD8-45	CHD8 <sub>L</sub>	4680	Sigma	SASI_Hs01_00194445
siCHD8-43	CHD8 <sub>L</sub>	3805	Sigma	SASI_Hs01-00194443
siCHD8-7	CHD8 <sub>S</sub>	Environ 300	Qiagen	SI04196871
siCHD8-5	CHD8 <sub>L</sub>	Environ 6300	Qiagen	SI03190488
AllStars Negative Control siRNA	-	-	Qiagen	SI03650318
AllStars Hs Cell Death siRNA	-	-	Qiagen	SI04381048

### 2.2 Production lentivirale

Les cellules HEK-293T sont passées dans des Pétris de 100 mm afin d'obtenir une confluence de 90% le lendemain. Pour chaque production lentivirale, 1,5 ml de milieu opti-MEM (Life Technologies,) est mélangé à 48 µl de lipofectamine 2000 (Life Technologies,) et sont incubés 5 min à TP. À ce mélange est ajouté respectivement 6 µg

des vecteurs pLP1, pLP2, pLP/VSVG (Life Technologies) ainsi que du vecteur d'intérêt (Tableau 2) pour une incubation de 20 min à TP. Le milieu des cellules est alors remplacé par 5 ml d'opti-MEM. Le mélange ADN-lipofectamine-opti-MEM est tranquillement ajouté sur le 5 ml d'opti-MEM et est incubé durant 4 heures à 37°C. Par la suite, un changement de milieu est effectué avec du DMEM (10% FBS) et les cellules sont à nouveau incubées pour une période de 48 heures à 37°C. Le milieu de culture contenant les lentivirus est récolté avec un filtre (0,45 µM) et congelé à -80°C jusqu'à utilisation.

**Tableau 2:** Liste des différents shRNA utilisés

Nom du vecteur	Séquence	# référence
pLKO.1-puroshNCOR1_655	CCGGCGCAGTATTGTCCAAATTATTCTCGAGAATAATTTGGACAA TACTGCGTTTTG	TRCN000006 0655 (Sigma Aldrich)
pLKO.1-puroshCHD8_8	CCGGTAGACATCCTAGAGGATTATTCTCGAGAATAATCCTCTAGG ATGTCTATTTTTG	TRCN000036 0108 (Sigma Aldrich)
pLKO.1-puroshCHD8_9	CCGGGCAGATTGGATCCGGAATATCTCGAGATATTTCCGGATCC AATCTGCTTTTTG	TRCN000036 0109 (Sigma Aldrich)
pLKO.1-puroshCHD8_96	CCGGCCGTGAAGCTTGCCATATTATCTCGAGATAATATGGCAAGC TTCACGGTTTTG	TRCN000036 7896 (Sigma Aldrich)
pLKO.1-puroshNonTarget	CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGCTCTTCAT CTTGTTGTTTT	SHC002 (Sigma Aldrich)
pLKO.1-puroshCHD8_351	(AGE1) CCGGGATAATGGGACCAGGACAAAGCTCGAGCTTTGTCCTGGTCC CATTATCTTTTT (ECOR1) AATTAAAAAGATAATGGGACCAGGACAAAGCTCGAGCTTTGTCCT GGTCCCATTATC	Laboratoire Boudreau
pLKO.1-puroshCHD8_561	(AGE1) CCGGGGAACACCAGAAGAAGCAAGACTCGAGTCTTGCTTCTTCTG GTGTTCTTTTT (ECOR1) AATTAAAAAGGAACACCAGAAGAAGCAAGACTCGAGTCTTGCTT CTTCTGGTGTTCC	Laboratoire Boudreau
pLKO.1-puro-CMV-TurboGFP		SHC003 (Sigma Aldrich)

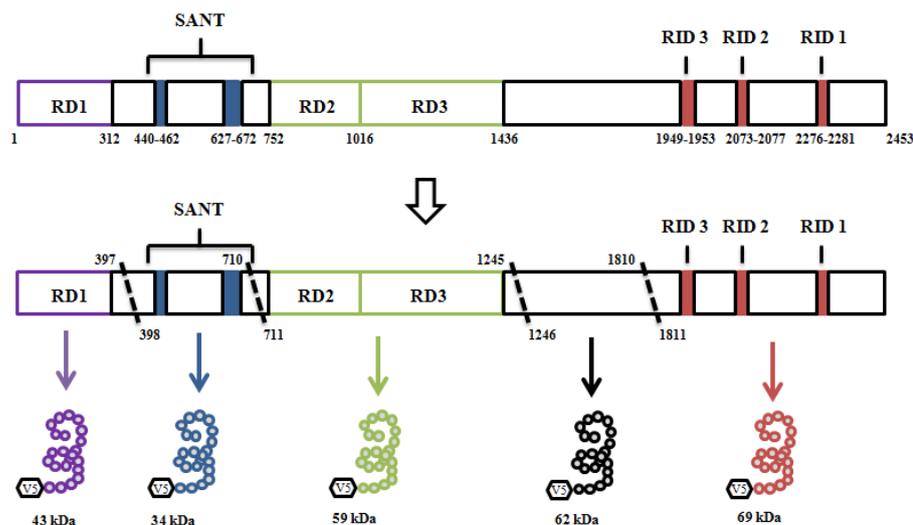
### 2.3 Infection lentivirale

Les cellules sont passées dans une plaque 6 puits de manière à avoir une confluence de près de 60% lors de l'infection. Les virus et le polybrène (4 µg/µl) (hexadiméthrine bromide) (Sigma Aldrich) sont décongelés dans un bain chauffant à 37°C juste avant utilisation. Une fois le milieu enlevé, chaque puit reçoit 350 µl de virus, 350 µl de milieu

et 0,7 µl de polybrène pour une incubation de 60 min à 37°C. Suite à cette incubation, le milieu est complété à 2 ml/puit, en ajoutant 1,3 ml de milieu et 1,3 µl de polybrène, pour une infection de 48 heures à 37°C. Par la suite, les cellules sont soumises à une sélection afin de conserver les cellules ayant intégrées le plasmide contenant le gène de résistance à l'antibiotique. Le vecteur pLKO.1-puro, dans ce cas-ci, contient un gène de résistance à la puromycine. La puromycine (Wisent) est ajoutée lors du changement de milieu à tous les 2-3 jours, pour une durée de 7 jours, avec une concentration finale variant entre 2 et 5 µg/ml. À chaque infection lentivirale, le virus contenant le vecteur pLKO.1-puro-CMV-Turbo-GFP est utilisé pour s'assurer de l'efficacité et de l'intégrité des particules lentivirales lors de l'infection.

### 3. Construction des différents segments de NCOR1

NCOR1 a été séparé en 5 parties, soit 5 séquences, auquel a été ajouté la séquence de V5. Ces séquences ont été clonées dans le vecteur pcDNA3.1 zeo(+) par *Gene Biosynthesis-Bio Basic* (Bio Basic, Markham, Canada).



**Figure 6 :** Les 5 différentes constructions de NCOR1 étiquetées avec V5. Schéma illustrant les différentes séparations en acides aminés selon les domaines de NCOR1. Chacune des constructions étiquetées avec V5 présentent différents poids moléculaires.

Les cellules HEK293T, à une confluence de 90% dans des plaques de 6 puits, ont été transfectées avec les différentes constructions de NCOR1 (Figure 6). Pour chaque construction de NCOR1 est ajoutée la forme complète de CHD8 étiquetée avec Flag (pcDNA3.1-CHD8-Flag). La transfection a débuté par une incubation de 5 min à TP avec 250 µl du milieu opti-MEM et 10 µl de lipofectamine 2000. À ce mélange est ajouté 2 µg

de l'une des constructions de NCOR1 et 2 µg du vecteur pcDNA3.1-CHD8-Flag pour une incubation de 20 min à TP. Le milieu a ensuite été enlevé pour ajouter 1 ml de milieu opti-MEM auquel le mélange opti-MEM-lipofectamine-construction est joint. Une incubation de 4 heures à 37°C a été effectuée avant de faire un changement de milieu avec du DMEM (10% FBS) pour une incubation de 48 heures à 37°C.

#### **4. Extrait protéique à partir d'une culture cellulaire**

Le milieu des cellules a été aspiré et les cellules ont été lavées 2 fois au PBS 1X (*Phosphate-buffered saline*) (137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, à pH 7,4). Les cellules sont ensuite récoltées des Pétris à l'aide d'un grattoir et mélangées dans une solution de lyse, le RIPA (*Radio Immunoprecipitation Assay*) (50 mM de Tris-HCl à pH 7,4, 150 mM de NaCl, 1% Nonidet P-40, 0,5% de Triton x-100, 1 mM EDTA, 0,2% SDS, 0,5% Sodium déoxycholate). Des inhibiteurs de protéase sont ajoutés au RIPA tel que 1% PIC (*Protease inhibitor cocktail*) (Sigma Aldrich), 50 mM NaF (*Sodium fluoride*) (Sigma Aldrich), 2 mM NaO (*Sodium orthovanadate*) (Sigma Aldrich,) et 1% PMSF (*Phénylméthanesulfonyl fluoride*) (Sigma Aldrich). Durant la lyse, les microtubes contenant les cellules sont placés sur une plaque agitatrice durant 30 min à 4°C. Les cellules sont ensuite soniquées, environ 10 secondes sur glace, avec le *Sonic Dismembrator Model 120* (Fisher Scientific, Ottawa, Canada) à une puissance de 20 à 30%. Ceci permet d'enlever la viscosité de l'échantillon et de permettre la libération des protéines de la chromatine. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 16 000 g durant 10 min à 4°C. Le surnageant est alors récolté et transféré dans un autre microtube pour être congelé à -80°C jusqu'à utilisation. Les protéines sont dosées au BCA (*BiCinchoninic acid Assay*) (Thermo Scientific, Wilmington, États-Unis), une méthode colorimétrique basée sur la réaction de l'acide bicinchonique et la réduction des ions cuivriques. Cette réaction forme une coloration pourpre ayant une absorbance maximale à 562 nm et qui est lue par un spectrophotomètre.

#### **5. Immunobuvardage**

Les échantillons sont préparés avec 1X de NuPAGE *Sample Reducing Agent* (10X) et du NuPAGE LDS (10X) (NuPage, Life Technologies,) afin de briser les ponts disulfures et de maintenir les protéines dans un état de réduction. Une fois préparés, les échantillons sont incubés à 70°C durant 10 min pour favoriser leur dénaturation. Les protéines sont

séparées selon la méthode d'électrophorèse sur gels de polyacrylamide dénaturant. Des gels Bis-Tris d'un gradient de polyacrylamide de 4 à 12% (NuPage, Life Technologies,) ont été utilisés avec un tampon de migration MOPS 1X [NuPAGE *MOPS SDS Running Buffer* (20X)] pour une séparation de protéines à plus faible poids moléculaires. Des gels Tris-acétate d'un gradient de 3 à 8% (NuPage, Life Technologies) ont été utilisés avec un tampon de migration Tris-Acétate 1X (NuPAGE *Tris-Acetate SDS Running Buffer* (20X)) pour une séparation de protéines à haut poids moléculaires. De l'antioxydant (NuPage, Life Technologies) a été ajouté aux différents tampons, afin de garder les protéines dans un état réduit et pour empêcher la réoxydation des acides aminés. Avant la migration, les gels sont rincés à l'eau et les puits sont nettoyés avec leur tampon respectif. Les échantillons sont alors déposés dans le gel, ainsi que 5 µl de marqueur de poids moléculaire (Novex Sharp *Pre-stained Protein Standard*). La migration est faite selon leur type de gel, soit 200 volts durant 60 min, pour les gels Bis-Tris 4 à 12%, et 150 volts durant 65 min, pour les gels Tris-acétate 3 à 8%. Le transfert s'effectue sur une membrane de PVDF (*PolyVinylidene Fluoride*) à 30 volts, entre 90 min (gel 4 à 12%) et 2 heures (gel 3 à 8%), dans une cuve entourée de glace, et remplie de tampon de transfert (1X) (NuPAGE *Transfer Buffer* (20X)) (NuPage, Life Technologies) et d'antioxydant. La membrane est par la suite colorée au rouge de ponceau (Sigma Aldrich) durant 5 min, décolorée 1 min au méthanol et 1 min à l'eau afin de vérifier l'efficacité du transfert. La membrane est ensuite bloquée avec la solution de blocage (10% de lait écrémé en poudre, PBS 1X et 0,01% de tween 20) durant environ 30 min à TP. L'anticorps primaire (Tableau 3) est dilué dans le tampon de blocage et ajouté à la membrane pour une incubation sur une plaque agitatrice à 4°C durant toute la nuit. Le lendemain matin, la membrane est lavée au moins 3 fois par fraction de 1 heure avec la solution de lavage (PBS 1X et 0,1% de tween 20) à TP. L'anticorps secondaire est ajouté à la membrane dans la solution de blocage pour une incubation de 1 heure à TP (Tableau 3). La membrane est à nouveau lavée au moins 3 fois par fraction de 1 heure avec la solution de lavage à TP. La révélation des antigènes associés à la protéine est effectuée avec le ECL prime (Amersham ECL Prime) (GE Healthcare Life Science, Mississauga, Canada) après une incubation de 1-2 min dans cette solution. La membrane est exposée dans une cassette avec un film autoradiographique et elle est révélée dans une chambre noire.

**Tableau 3:** Liste des anticorps primaires utilisés lors des immunobuvardages

Protéines	Compagnie	Ac primaire	Poids (kDa)	Ac secondaire
NCOR1	Abcam #Ab3482	1 µg/ml (1 :1000), lait 10% écrémé O/N à 4°C	270	Anti-Rabbit-HRP (Cell signaling #7074) (1:10000), lait 10% écrémé 1h à TP
CHD8	Abcam #114126	1 µg/ml (1 :2000), lait 10% écrémé O/N à 4°C	290	Anti-Rabbit-HRP (Cell signaling #7074) (1:10000), lait 10% écrémé 1h à TP
V5	Sigma # V8012	1 µg/ml (1 :1000), lait 10% écrémé O/N à 4°C	-	Anti-Mouse-HRP (Cell signaling #7076) (1:10000), lait 10% écrémé 1h à TP
Flag	Sigma # F1804	1 µg/ml (1 :1000), lait 10% écrémé O/N à 4°C	-	Anti-Mouse-HRP (Cell signaling #7076) (1:10000), lait 10% écrémé 1h à TP
β-actine	Millipore Mab1501R	(1 :10000), lait 10% écrémé O/N à 4°C	43	Anti-Mouse-HRP (Cell signaling #7076) (1:10000), lait 10% écrémé 1h à TP

## 6. Immunoprécipitations

### 6.1 Immunoprécipitations d'extraits nucléaires

Les cellules Caco-2/15 et HT-29 sont récoltées à 70% de confluence dans des Pétris de 150 mm avec la trypsine (Life Technologies). Elles sont centrifugées 5 min à 1000 g et ensuite lavées 2 fois au PBS 1X stérile. Les cellules sont resuspendues dans 1 ml de tampon A (1 M Hepes, pH 7,9, 1 M MgCl<sub>2</sub>, 2,5 M KCl, 1 M DTT, 1% PIC) par Pétri à 70% confluent avec 1% de PIC, et incubées 10 min sur glace. L'échantillon est mis dans un homogénéisateur Dounce (Fisher Scientific) de 1 ml afin de briser les membranes cellulaires et centrifugé à 1000 rpm 5 min à 4°C. Le culot nucléaire est solubilisé dans le tampon S1 (2,5 M Sucrose, 1 M MgCl<sub>2</sub>, 1% PIC) dans un ratio de 600 µl par Pétri de 150 mm à 70% confluent. La solution contenant le tampon S1 est ajoutée au tampon S3 (2,5 M sucrose, 1 M MgCl<sub>2</sub>, 1% PIC) au même volume et est centrifugée à 3500 rpm 15 min à 4°C. Le culot est solubilisé dans 1 ml de RIPA par Pétri de 150 mm à 70% confluent. Les échantillons sont soniqués avec le *Sonic Dismembrator Model 120* 10 fois 10 secondes à une puissance de 30% avec une pause de 20 secondes entre chaque sonication. Les échantillons sont dosés au BCA à l'aide d'un spectrophotomètre afin d'obtenir entre

1 et 0,5 mg de protéines par IP dans 1 ml de RIPA. Afin de réduire les liaisons non spécifiques des protéines aux billes, chaque IP reçoit 20 µl de billes et est placée sur une plaque agitatrice à 4° durant 2 heures. Les billes sont enlevées des microtubes avec un support magnétique. Pour chaque IP, 4 µg d'anticorps anti-CHD8 (Abcam 114126 (1 µg/ml)), anti-NCOR1 (Abcam 3482 (1 µg/ml)) et anti-IgG (Millipore PP64) sont ajoutés afin d'être incubés sur une plaque agitatrice à 4°C pour toute la nuit. Le lendemain matin, 20 µl de billes sont ajoutés dans chaque IP afin d'être incubés sur une plaque agitatrice à 4°C durant 4 heures. Chaque IP est lavée au moins 3 fois avec le tampon RIPA sur une plaque agitatrice à 4°C durant 5 min. L'éluion est préparée avec 1X de *NuPAGE Sample Reducing Agent* (10X) et 1X de NuPAGE LDS (4X) pour avoir un volume final de 50 µl. Les échantillons sont chauffés 5 min à 95°C et prêts à être utilisés ou à être conservés à -80°C.

## 6.2 Immunoprécipitations pour extraits cellulaires totaux

Les cellules HEK293T et 18Co sont récoltées à confluence avec la trypsine. Elles sont centrifugées 5 min à 1000 g et ensuite lavées 2 fois au PBS 1X stérile. Les cellules sont ensuite lysées dans le tampon RIPA (50 mM Tris pH 7,5, 150 mM de NaCl, 1% NP-40, 0,5% sodium deoxycholate, 1% PIC) et sont conservées à -80°C jusqu'à utilisation. Le lysat cellulaire est soniqué avec le *Sonic Dismembrator Model 120* 3 fois 10 secondes à une puissance de 30%. Les échantillons sont centrifugés 10 min à 10 000 g et le surnageant est transféré dans un microtube pour être dosé au BCA avec un spectrophotomètre. Pour chaque IP, les échantillons sont ajustés à une concentration de 500 µg et complété avec un total de 1 ml de RIPA 1% PIC. Pour s'assurer de la spécificité de liaison des billes magnétiques (*Magna ChIP Protein G Magnetic Beads*) (EMD millipore, Etobicoke, Canada), entre 10 et 20 µl de billes sont ajoutées pour chaque IP durant 2 heures avec une agitation à 4°C. Les billes sont par la suite enlevées des microtubes avec un support magnétique. Pour chaque IP, entre 2 et 4 µg d'anticorps anti-V5 (Monoclonal Anti-V5 (1 mg/ml)) (Sigma Aldrich) ou anti-Flag (Monoclonal Anti-Flag M2, clone M2 (1 mg/ml)) (Sigma Aldrich) sont ajoutés avec 20 µl de billes et ils sont placés sur une plaque agitatrice à 4°C pour toute la nuit. Le lendemain, chaque IP est lavée au moins 3 fois avec le tampon RIPA sur une plaque agitatrice à 4°C durant 5 min. L'éluion est effectuée avec 1X de *NuPAGE Sample Reducing Agent* (10X) et 1X de NuPAGE LDS (4X) pour un volume final de 50 µl. Les échantillons sont chauffés 5 min à 95°C et prêts à être utilisés ou conservés à -80°C.

## **7. Préparation d'extrait d'ARN totaux**

### **7.1 Extraction d'ARN total à partir d'une culture cellulaire**

Le milieu des cellules est aspiré et les cellules lavées 2 fois au PBS 1X. Les cellules sont ensuite récoltées du Pétri à l'aide d'un grattoir après avoir mis la solution de lyse [Tampon RLT (RNeasy kit, QIAGEN, Toronto, Canada) et 1%  $\beta$ -mercaptoéthanol]. Le lysat est alors placé dans un microtube à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation. La trousse commerciale RNeasy kit (QIAGEN) est utilisée exactement selon les recommandations du fournisseur. L'ARN est élué dans 40  $\mu\text{l}$  d'eau *RNase free* et l'échantillon est conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation.

### **7.2 Traitement de l'ARN à la DNase**

Le traitement à la DNase permet d'éliminer la présence d'ADN dans l'échantillon en ajoutant 1 unité de l'enzyme DNase (Roche, Laval, Canada) avec du tampon DNase 1X (Roche, Laval, Québec) et une incubation de 30 min à  $37^{\circ}\text{C}$ . Par la suite, 5 mM d'EDTA (Acide éthylène diamine tétra-acétique) est ajouté pour inhiber l'action de la DNase durant une incubation de 10 min à  $70^{\circ}\text{C}$ . L'ARN est alors dosé à l'aide d'un Nanodrop (Thermo Scientific) et l'échantillon est conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation.

### **7.3 Transcription inverse de l'ARNm**

L'ARNm est transcrit en ADN complémentaire à l'aide d'une enzyme, soit la transcriptase inverse (Roche). Pour ce faire, 1  $\mu\text{g}$  d'ARN à un volume final de 10  $\mu\text{l}$  d'eau est utilisé. L'échantillon est chauffé à  $70^{\circ}\text{C}$  pendant 5 min et est incubé sur glace durant 5 min. Celui-ci est par la suite complété avec 10  $\mu\text{l}$  d'une solution composée de 4  $\mu\text{l}$  de tampon AMV-RT (5X) (Roche), de 0,7  $\mu\text{l}$  d'eau DEPC, de 0,8  $\mu\text{l}$  de dNTP 25 mM (Amersham Biosciences, Laval, Canada), de 2,4  $\mu\text{l}$  d'oligo dT 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Amersham Biosciences), de 0,6  $\mu\text{l}$  d'inhibiteur d'ARNase 40 unités/ $\mu\text{l}$  (Roche) et 1,5  $\mu\text{l}$  d'enzyme AMV-RT 20 unités/ $\mu\text{l}$  (Roche). Une incubation de 60 min dans un bain chauffant à  $42^{\circ}\text{C}$  est effectuée afin de permettre l'activation de l'enzyme. Une incubation à  $95^{\circ}\text{C}$  durant 5 min a permis l'arrêt de l'activité de l'enzyme AMV-RT. Dans le but de faire un PCR en temps réel, l'échantillon est dilué 10 fois, soit en ajoutant 180  $\mu\text{l}$  d'eau stérile à 20  $\mu\text{l}$  d'ADNc. L'échantillon est conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation.

## 8. PCR en temps réel

Le Light Cycler 96 (Roche) est l'appareil utilisé pour le PCR quantitatif en temps réel en utilisant le *Fast Start SYBR green Master* (Roche). Ce dernier est utilisé selon les recommandations du fabricant, soit en utilisant 10 µl de la solution par réaction. Les oligonucléotides ont été commandés chez IDT (*Integrated DNA Technologies*) (IDT, Toronto, Canada) et ils sont utilisés à une concentration de 10 µM pour un volume de 1 µl par amorce (Tableau 5). Pour arriver à un volume final de 20 µl, 2 µl d'ADNc et 6 µl d'eau stérile sont ajoutés. Le protocole d'amplification des transcrits utilisés est décrit au tableau 4.

**Tableau 4 :** Protocole d'amplification des transcrits par PCR en temps réel

Étapes	Nombre de cycles	Température (°C)	Durée (seconde)
Préincubation	1	95	600
Dénaturation	45	95	10
Hybridation		60	10
Élongation		72	15
		95	10
Courbe de fusion	1	65	10
		97	1
		37	30
Refroidissement	1	37	30

**Tableau 5:** Liste des amorces utilisées pour l'amplification des transcrits par PCR

Nom des amorces	Amorce sens	Amorce anti-sens	Taille (pb)
CHD8L	AAGGTACTGTTGCGGGTACG	TCCAATGAGCAGCGACTTGT	183
CHD8L+S	TAATGGGACCAGGACAAAAGC	CCACTTCACTGGCACTCAGA	135
NCOR1	GCTAAAATGGTGGAACGAA	CAGAAACAGTGGAAGCGACA	171
TBP	GGGGAGCTGTGATGTGAAGT	GGAGAACAATTCTGGGTTTGA	132
Souris			
NCOR1ΔE11	TTGGCCTTGAGTAAATGCTGTGAG	GGAAACTACCTACCTGAATCCATGG	346 (allèle LoxP) 207 (allèle type sauvage)
NCOR1ΔID	TTTAGCCTCGACTAGCCCCCA	TCTTGTGGATAAAATCCCCGGGG	445 (allèle LoxP) 359 (allèle type sauvage)
VilCre	GCGGCATGGTGCAAGTTGAAT	CGTTCACCGGCATCAACGTTT	232

## 9. Courbe de croissance par décompte cellulaire

Les cellules Caco-2/15 et HT-29 ont été infectées avec des shCHD8 et shNCOR1 et ensuite sélectionnées à la puromycine durant 7 jours comme mentionné à la Figure 7A. Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 6 puits selon un ratio de  $2 \times 10^5$  cellules/puits pour les Caco-2/15 et  $1,5 \times 10^5$  cellules/puits pour les HT-29. Pour chaque jour de décompte (0, 1, 2, 4, 6, 8, 10) les cellules sont lavées, trypsinisées et comptées avec l'appareil *Countness<sup>TM</sup>* (Life Technologies). Chaque jour de décompte sont effectués en triplicata, soit 3 puits pour chacune des conditions expérimentales, et chacun des puits est dénombré 2 fois.

## 10. Immunofluorescence

Les cellules HEK293T ont étéensemencées sur des lamelles 1,5 mm stérilisées une journée avant de faire une transfection de 48 heures (VWR, Cederlane, Burlington, Canada). Par la suite, les cellules sont nettoyées au PBS 1X, fixées avec 2 ml de paraformaldéhyde (PFA) 4% (Fisher Scientific) dilués dans du PBS 1X et incubées sur une plaque agitatrice à TP durant 20 min. Après avoir enlevé le PFA, 2 ml de tampon glycine (Sigma Aldrich) sont ajoutés 3 fois 5 min sur plaque agitatrice à TP. Les lamelles sont ensuite lavées au PBS 1X et incubées avec 2 ml de triton X-100 à 0,15% (Fisher Scientific) durant 5 min à TP. Les lamelles sont lavées au PBS 1X 2 fois 5 min sur une plaque agitatrice à TP. Une solution de blocage (PBS 1X, triton X-100 0,2% et BSA 2%) de 2 ml est ajoutée aux lamelles durant 20 min à TP. Dans une chambre humide, l'anticorps anti-V5 (1 :1000) a été solubilisé dans 100  $\mu$ l de solution de blocage et ajouté aux cellules durant 3 heures à TP. Les lamelles sont lavées 3 fois 5 min sur une plaque agitatrice à TP. L'anticorps secondaire Alexa fluor 488 (Ab150105, Donkey anti-mouse, Abcam), solubilisé dans 100  $\mu$ l de solution de blocage, a été ajouté sur les cellules pour une incubation de 1 heure à la noirceur. Les lamelles sont ensuite lavées 3 fois 5 min sur une plaque agitatrice à TP. Une incubation est effectuée avec 100  $\mu$ l de DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) 1  $\mu$ g/ml (Life Technologies) à 2  $\mu$ g/ml durant 5 min à TP à la noirceur. Le milieu de montage est effectué avec les lames Superfrost (Fisher Scientific) et avec environ 20  $\mu$ l d'Immu-Mount (Fisher Scientific).

## 11. Modèle murin

### 11.1 Modèle de souris NCOR1ΔExon11 et géotypage

Le modèle de souris NCOR1ΔExon11 a été obtenu en collaboration avec le Dr. Auwerx (Yamamoto *et al.*, 2011) (École polytechnique fédérale de Lausanne, *Laboratory of integrative systems physiology*, Lausanne, Suisse). Les souris *Ncor1ΔExon11*<sup>ΔCEI</sup> sont croisées avec des souris C57BL/6 exprimant la Cre-recombinase sous le promoteur de la villine et spécifique aux cellules épithéliales intestinales (Madison *et al.*, 2012., El Marjou *et al.*, 2004). Ce croisement (*Ncor1ΔExon 11*<sup>loxP/loxP</sup> x C57BL/6 VilCre) induit une délétion partielle du gène menant à l'instabilité de la protéine NCOR1 et ce, spécifiquement au niveau de l'épithélium intestinal. Une phalange d'orteil est coupée pour tous les souriceaux entre 7 et 11 jours après leur naissance afin de les géotyper et de les numéroter. L'ADN est extrait de ce bout d'orteil avec une trousse commerciale (Gerard Biotech, Oxford, États-Unis) selon les recommandations du fabricant. Il est ainsi possible de déterminer la présence des séquences LoxP et de la Cre-recombinase grâce à l'analyse sur gel d'agarose d'un PCR semi quantitatif (Tableau 6). Toutes les expériences faites avec ces souris ont été préalablement approuvées par le comité d'éthique de la recherche sur les animaux de la Faculté de médecine et des sciences de la santé de l'Université de Sherbrooke.

**Tableau 6:** Réactifs et conditions d'utilisation du PCR semi-quantitatif pour le géotypage des souris.

Réactifs	VilCre	NCOR1ΔID	NCOR1ΔExon11
Tampon Thermo Pol (10X) (NEB, Whitby, Canada)	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
dNTP (25 mM) (Amersham Biosciences, Laval, Canada)	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl
Amorce sens (10 µM) (IDT, Toronto, Canada)	1 µl	1 µl	1 µl
Amorce anti-sens (10 µM) (IDT, Toronto, Canada)	1 µl	1 µl	1 µl
Enzyme Taq (5 U/µl) NEB, Whitby, Canada)	0,2 µl	0,2 µl	0,5 µl
ADN génomique	1 µl	0,5 µl	1,5 µl
H <sub>2</sub> O	19,1	19,6 µl	18,3 µl
Volume final	25 µl	25 µl	25 µl
Conditions utilisations	Température et temps (secondes)		
Dénaturation initiale	94°C (180 sec)	94°C (240 sec)	94 °C (300 sec)
Nombre de cycles	25	30	40
Dénaturation	94°C (30 sec)	94°C (30 sec)	94°C (30 sec)
Hybridation	56°C (30 sec)	62°C (30 sec)	62°C (30 sec)
Élongation	72°C (30 sec)	72°C (60 sec)	72°C (30 sec)
Élongation terminale	72°C (300 sec)	72°C (420 sec)	72°C (300 sec)
Conservation	12°C	12°C	12°C

## 11.2. Induction d'une colite expérimentale par traitement au dextran sulfate de sodium

Le traitement au dextran sulfate de sodium (DSS) permet d'induire une colite chez les rongeurs (Dieleman *et al*, 1996). Les souris sont exposées au DSS 3% qui est solubilisé dans l'eau de boisson des souris. Cette expérience a été effectuée sur 4 souris contrôles et 4 souris mutantes (*Ncor1*Δ*Exon 11*<sup>ΔCE1</sup>). Les souris sont pesées et leurs saignements rectaux analysés à chaque jour de traitement. La durée du traitement, qui est généralement de 7 jours, s'est étalée sur une période de 4 jours puisque certaines souris se rapprochaient de la perte de poids maximal autorisée par le comité d'éthique, soit une perte de 20 %. Les souris avec traitement ont donc été sacrifiées au 4<sup>ième</sup> jour, avec des souris mutantes et contrôles (N=4) n'ayant subi aucun traitement et auxquels le côlon a été extrait pour être analysé. Cette expérience a été répétée 2 fois. Lors du sacrifice, l'index de sévérité de la maladie a été analysé à l'aveugle par 2 évaluateurs indépendants selon la grille de Cooper (Cooper *et al*, 1993) (Tableau 7). Afin d'analyser le score histologique du côlon des souris coloré à l'hématoxyline et à l'éosine, des images de coupes histologiques ont été générées au Nanozoomer et analysées avec le logiciel NPD.view 2 (Hamamatsu, Middlesex, États-Unis). Plusieurs champs visuels ont été observés sur toute la longueur du tissu afin de permettre une évaluation des scores histologiques avec la grille (Tableau 8) (Dieleman *et al*, 1996).

**Tableau 7** : Évaluation de l'indice de la sévérité de la maladie lors d'un traitement DSS chez la souris

	Scores	Critère d'évaluation
Perte de poids	0	Pas de perte de poids
	1	Perte de 1 et 5%
	2	Perte de 6 à 10%
	3	Perte de 11 à 20%
	4	Plus de 20%
Saignements anaux	0	Pas de sang
	1	Anus humide
	2	Saignement modéré
	4	Saignement important
Longueur du côlon	0	100-96 % de la longueur des contrôles jour 0
	1	95-86 % de la longueur des contrôles jour 0
	2	85-76 % de la longueur des contrôles jour 0
	3	75-66 % de la longueur des contrôles jour 0
	4	65 % et moins de la longueur des contrôles jour 0
Consistance des fèces	0	Fèces bien formés
	1	Fèces molle n'adhérant pas à l'anus
	2	Fèces molle adhérant à l'anus
	3	Diarrhée
	4	Diarrhée sévère et liquide

**Tableau 8** : Évaluation du score histologique lors d'un traitement DSS chez la souris

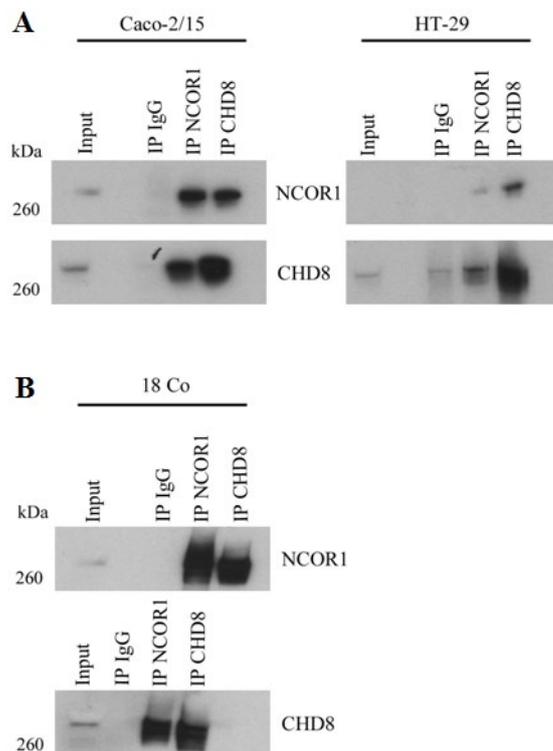
	Scores	Critère d'évaluation
Sévérité de l'inflammation	0	aucune
	1	Quelques endroits < 25% du tissu
	2	Modéré 25% > 50% du tissu
	3	Sévère 50% > 100% du tissu
Étendue de l'inflammation	0	Aucune
	1	Muqueuse
	2	Muqueuse et sous-muqueuse
	3	Transmural
Domage aux cryptes	0	Aucun
	1	Premier 1/3 du bas atteint
	2	Les 2/3 du bas atteint
	2	Seulement l'épithélium du bas restant
	4	Aucun épithélium sain

# Chapitre 3: Résultats

## 1. Étude de l'interaction entre CHD8 et NCOR1

### 1.1 Validation de l'interaction de NCOR1 avec CHD8 comme nouveau partenaire d'interaction protéique

Une analyse quantitative par spectrométrie de masse, préalablement effectuée dans le laboratoire, a permis d'identifier plusieurs protéines potentielles d'interaction avec NCOR1 (Figure 4). De par cette analyse, la protéine CHD8 fut identifiée comme un partenaire de NCOR1 avec une prédiction d'un ratio équivalent de détection de peptides pour chacune de ces protéines. Cette observation suggérait une interaction forte et équimolaire entre les protéines NCOR1 et CHD8. Nous avons donc entrepris de valider l'interaction physique entre ces deux protéines. Pour ce faire, nous avons effectué des co-IP de NCOR1 et CHD8 à partir d'extraits nucléaires isolés des cellules de cancer colorectal Caco-2/15 et HT-29 (Figure 7A) ainsi qu'à partir d'extraits nucléaires isolés des cellules mésenchymateuses de côlon non cancéreux CCD-18Co (Figure 7B). Suite à l'IP des protéines respectives, des immunobuvardages sont effectués pour valider la présence des protéines NCOR1 et CHD8 immunoprécipitées ainsi que la présence du partenaire co-immunoprécipité. Pour chacune de ces conditions, des anticorps contre CHD8 et NCOR1 ont été utilisés. L'utilisation des IgGs comme contrôle négatif confirme l'absence de protéines immunoprécipitées dans ces conditions expérimentales (Figure 7A et B).

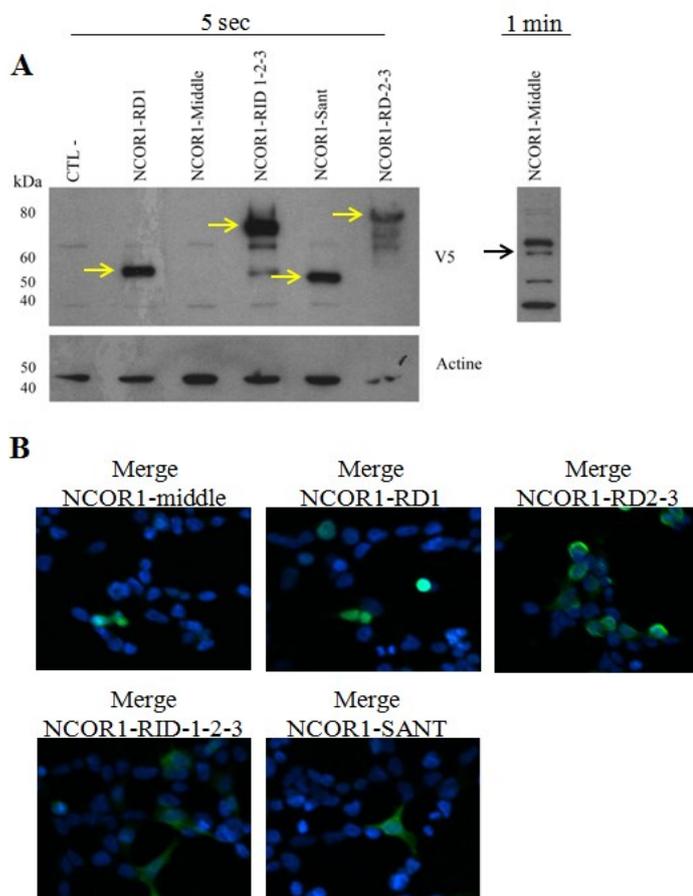


**Figure 7 : Validation de l'interaction cellulaire entre les protéines CHD8 et NCOR1.** A) Immunobuvardage des co-IP de NCOR1 et de CHD8 avec les anticorps anti-CHD8 et anti-NCOR1 dans les cellules Caco-2/15 et HT-29. L'utilisation des IgG sert de contrôle négatif pour les co-IP. Cette expérience est représentative de trois expériences indépendantes. B) Immunobuvardage des co-IP de NCOR1 et de CHD8 avec les anticorps anti-CHD8 et anti-NCOR1 dans les cellules non cancéreuses de côlon CCD-18Co (N=1).

## 1.2 Génération et validation de l'expression de protéines recombinantes pour différents domaines de NCOR1

Tel que démontré plus haut, CHD8 et NCOR1 peuvent interagir ensemble. Afin d'explorer la nature mécanistique de cette interaction, nous avons choisi de produire des protéines recombinantes toutes liées à l'épitope V5 et couvrant différentes régions de la partie codante pour NCOR1 (Figure 6). Afin de valider la production des fragments de protéine NCOR1, les différentes constructions ont été transfectées de façon transitoire dans les cellules HEK293T. Un immunobuvardage effectué à partir d'extraits totaux de ces cellules transfectées nous indique que la majorité des constructions, soit NCOR1-RD1, NCOR1-RID1-2-3, NCOR1-SANT et NCOR1-RD-2-3, sont exprimées dans ces conditions (Figure 8A). Pour la construction de NCOR1-middle, nous avons remarqué une expression protéique beaucoup plus faible comparée aux autres constructions (Figure 8A). Une surexposition de la membrane révélée a quand même permis de détecter

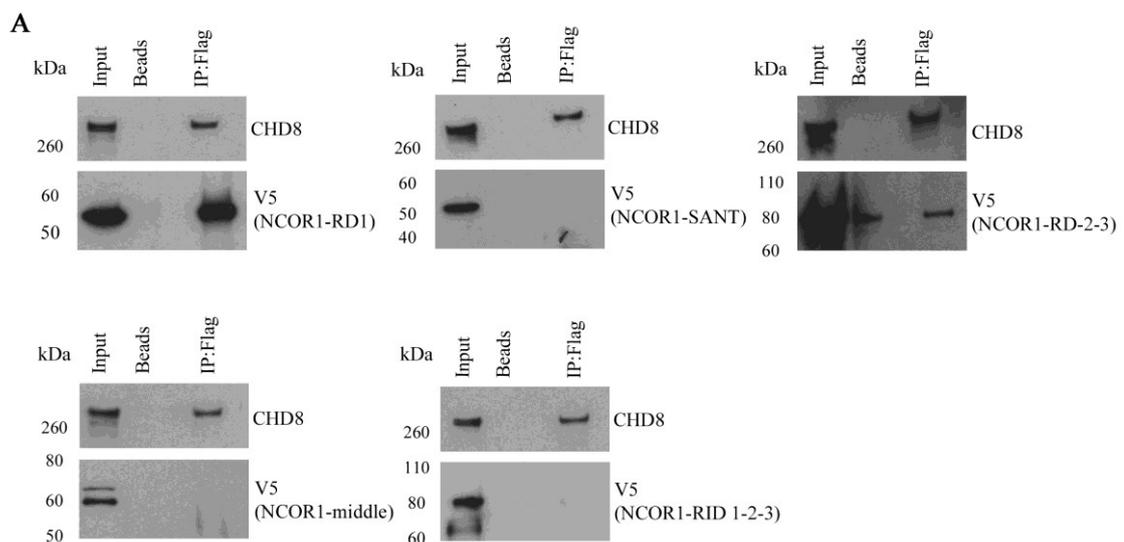
l'expression protéique de la construction de NCOR1-middle (Figure 8A). Nous avons par la suite vérifié la localisation intracellulaire pour chacune de ces protéines recombinantes par immunofluorescence. À l'aide d'un microscope confocal, nous avons été en mesure de déterminer que les protéines produites à partir des différentes constructions de NCOR1 sont généralement exprimées au niveau du noyau des cellules (Figure 8B). Parmi les cinq différentes constructions de NCOR1, nous avons observé que NCOR1-RD2-3 semble aussi se localiser au pourtour de la membrane nucléaire (Figure 8B). En plus d'être au noyau, NCOR1-RID-1-2-3 et NCOR1-SANT sont aussi localisés au niveau du cytoplasme (Figure 8B).

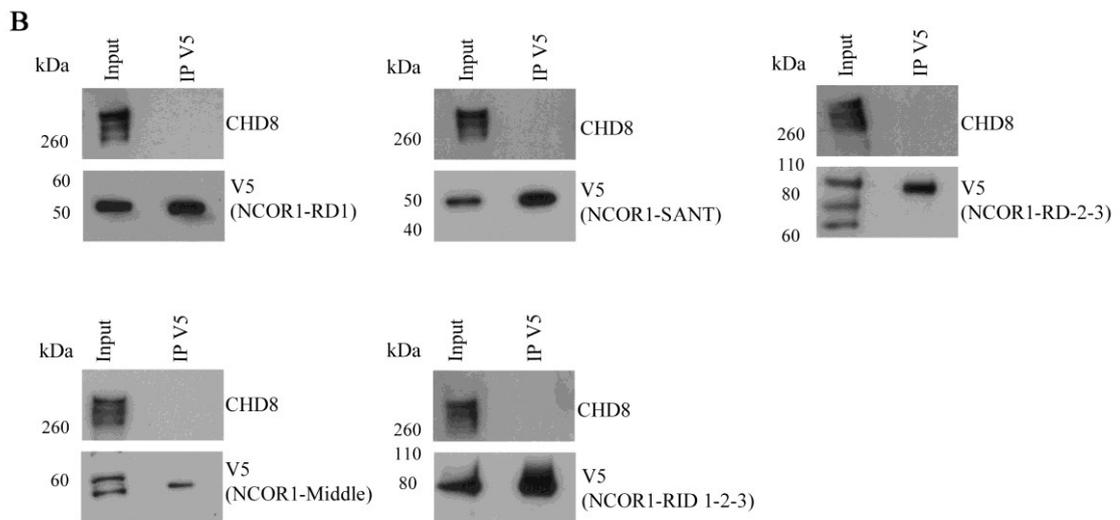


**Figure 8 : Validation de l'expression des différentes constructions de NCOR1 dans les cellules HEK293T.** A) Immunobuvardages des extraits protéiques isolés des cellules HEK293T transfectées durant 48h avec les différentes constructions des domaines spécifiques de NCOR1. Un anticorps anti-V5 fut utilisé pour la détection des protéines recombinantes suivi une hybridation successive avec un anticorps dirigé contre l'actine afin de mesurer les niveaux relatifs de protéines déposées sur gel. Différents temps d'expositions ont été utilisés ; soit de 1 min pour la construction NCOR1-middle et de 5 sec pour les autres constructions. B) Immunofluorescence des 5 différentes constructions de NCOR1 surexprimées dans les cellules HEK293T. Une superposition des images entre la détection du DAPI nucléaire (en bleu) et l'anticorps anti-V5 (en vert) fut effectuée à l'aide d'un microscope confocal.

### 1.3 Validation de l'interaction entre les différentes constructions de NCOR1 et de la forme complète de CHD8

Suite à la confirmation que les différentes constructions de NCOR1 sont capables de produire des protéines recombinantes localisées au noyau, nous avons voulu déterminer avec quel(s) domaine(s) d'interaction(s) NCOR1 interagit avec la forme complète de CHD8. Il est important de se rappeler que NCOR1 est étiqueté avec la séquence V5 et que CHD8 est étiqueté avec la séquence Flag. Nous avons effectué une IP de l'épitope Flag dans des cellules HEK293T où chacune des constructions de NCOR1 ont été surexprimées en présence de CHD8-Flag. L'analyse en immunobuvardage nous a démontré que seul le domaine RD1 de NCOR1 pouvait être recruté par l'IP de la forme complète de CHD8 (Figure 9A). Afin de valider cette interaction, nous avons effectué l'IP inverse, soit en utilisant l'anticorps V5 dans les mêmes conditions expérimentales. Surprenamment, l'analyse en immunobuvardage n'a révélé aucune interaction positive dans ce contexte (Figure 9B).





**Figure 9 : Analyse de l'interaction entre les domaines de NCOR1 et la forme complète de CHD8 étiquetée avec un épitope Flag.** A) IP de l'épitope Flag à partir d'extraits totaux de cellules HEK293T transfectées avec les différentes constructions de NCOR1-V5 et de CHD8-Flag. L'analyse s'effectue en immunobuvardage avec les anticorps dirigés contre CHD8 ou V5. Représentatif de 2 expériences indépendantes. B) IP de l'épitope V5 à partir d'extraits totaux de cellules HEK293T transfectées avec les différentes constructions de NCOR1-V5 et de CHD8-Flag. L'analyse s'effectue en immunobuvardage avec les anticorps dirigés contre CHD8 ou V5. Représentatif de 2 expériences indépendantes.

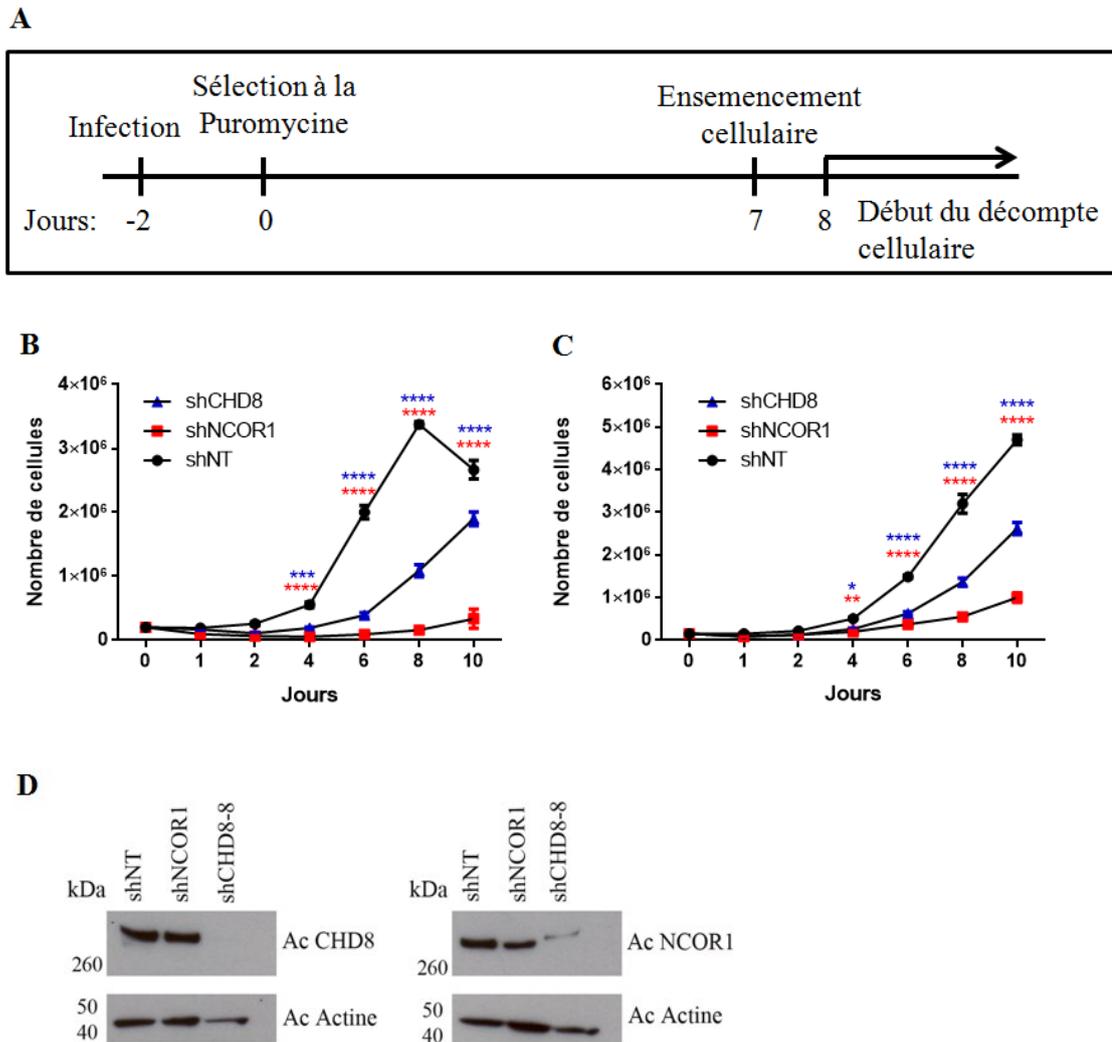
## 2. Étude des rôles fonctionnels communs entre CHD8 et NCOR1

### 2.1 Effet de la perte d'expression de CHD8 et de NCOR1 sur la croissance cellulaire des cellules épithéliales dérivées de cancer colorectaux

NCOR1 est un corépresseur transcriptionnelle préférentiellement exprimé dans les cellules prolifératives de l'épithélium intestinal (Doyon *et al.*, 2009). Son interaction avec différentes protéines contribue à former un complexe de répression et ainsi jouer un rôle important au niveau de la répression transcriptionnelle des gènes cibles (Mottis *et al.*, 2013). Tel que présenté auparavant, les analyses quantitatives de spectrométrie de masse ont identifié une interaction potentielle entre les protéines NCOR1 et CHD8 (Figure 4).

À la suite de ces observations, nous nous sommes intéressés à explorer s'il y avait une concordance fonctionnelle entre les rôles biologiques de NCOR1 et de CHD8 dans le contexte des cellules épithéliales dérivées de cancer colorectaux. Pour ce faire, nous avons utilisé une stratégie de réduction d'expression ciblée pour ces protéines par l'utilisation de l'interférence à l'ARN. Suite à l'introduction stable de lentivirus

exprimant des shRNA dirigés contre les ARNm de NCOR1 ou de CHD8<sub>L</sub> dans les cellules Caco-2/15 et HT-29, les populations cellulaires ont été sélectionnées à la puromycine durant 7 jours (Figure 10A). Le décompte cellulaire des populations de cellules Caco-2/15 (Figure 10B) et HT-29 (Figure 10C) s'est effectué sur une période de 10 jours post-sélection. La diminution d'expression de NCOR1 entraîne une forte inhibition significative et soutenue de la prolifération des Caco-2/15 et HT-29 lorsque comparée aux cellules contrôles ayant intégré un shNT (Figure 10B et C). La diminution d'expression de CHD8 mène à une réduction intermédiaire de la prolifération cellulaire lorsque comparée dans les mêmes conditions (Figure 10B et C). Ces observations suggèrent un rôle similaire pour NCOR1 et CHD8 au niveau du contrôle de la croissance cellulaire bien que cet effet soit plus marqué pour la perte d'expression de la protéine NCOR1.

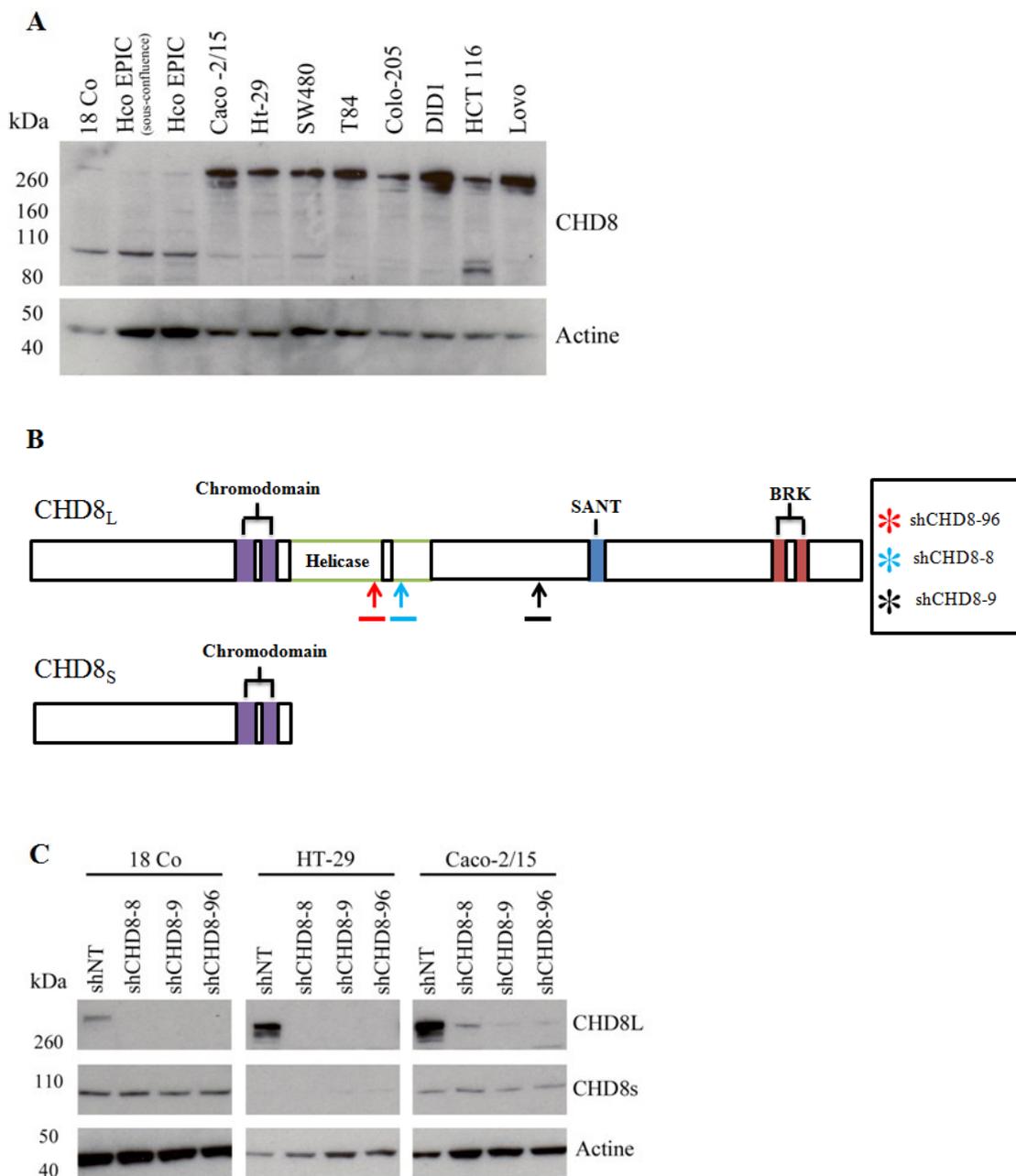


**Figure 10 : Effet de la réduction d'expression de NCOR1 et de CHD8 sur la croissance cellulaire des lignées Caco-2/15 et HT-29.** (A) Schéma récapitulatif des étapes expérimentales incluant l'infection avec lentivirus (shNT, shCHD8 et shNCOR1), la sélection de 7 jours et le décompte cellulaire. (B) Décompte cellulaire des populations Caco-2/15(B) ou HT-29 (C) ayant intégré un shNT (trait noir), un shCHD8 (trait bleu) ou un shNCOR1 (trait rouge) (N=3, moyenne  $\pm$  écart type). Des tests ANOVA à deux facteurs ont été utilisés pour mesurer la significativité (\*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0,0001$ ). D) Validation en immunobuvardage de l'efficacité des différents shRNA ciblant CHD8 et NCOR1 dans les Caco-2/15. Des anticorps anti-CHD8 et anti-NCOR1 ont été utilisé pour la détection des protéines suivi d'une hybridation successive avec un anticorps dirigé contre l'actine afin de mesurer les niveaux relatifs de protéines déposées sur gel.

## 2.2 Profil d'expression des isoformes de CHD8 dans différentes lignées cellulaires intestinales

Il existe 2 formes protéiques de CHD8 rapportées dans la littérature, soit la grande forme qui a un poids moléculaire de 290 kDa, et une autre plus petite qui a un poids moléculaire de 110 kDa. La petite forme de CHD8 a préalablement été observée dans plusieurs types de lignées cellulaires cancéreuses tels que les HCT116, HeLa, U2OS-2 et SaOS-2 ainsi

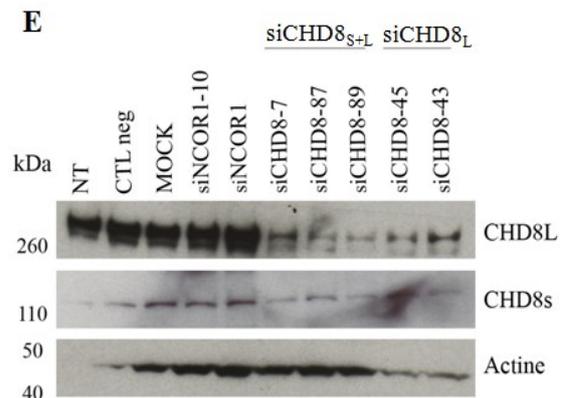
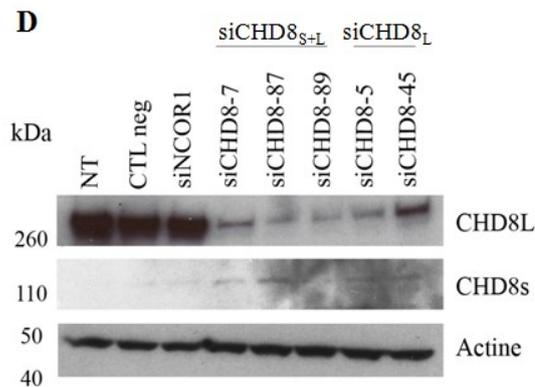
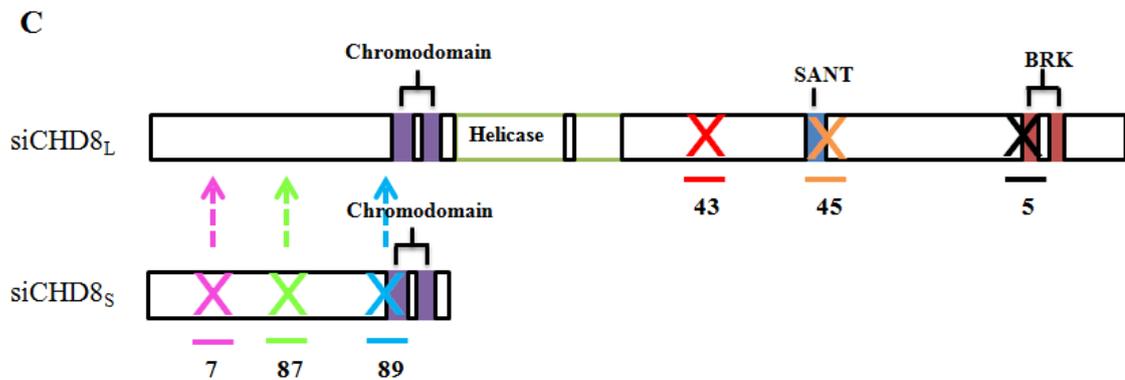
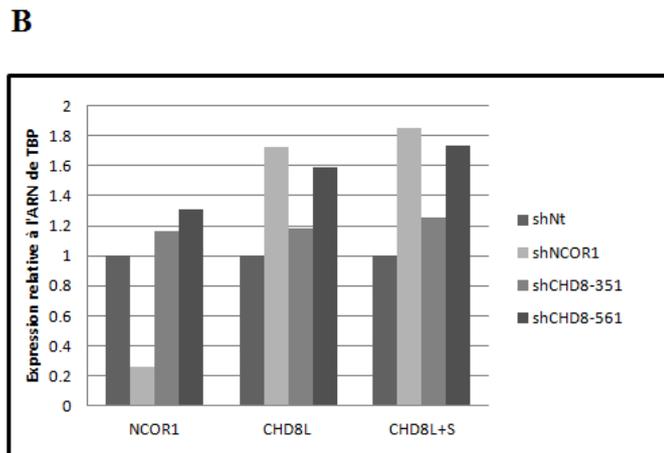
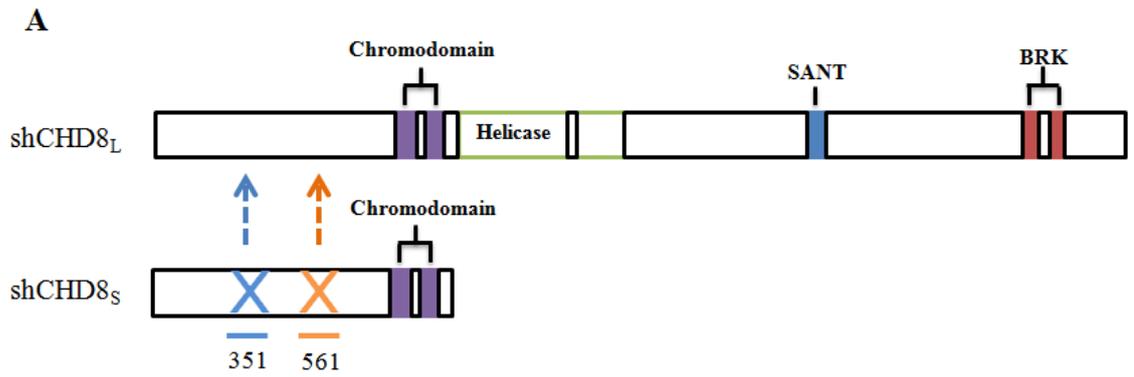
que dans des lignées cellulaires fibroblastiques normales tels que les NIH3T3 et MEF. Cette petite forme a aussi déjà été observée comme étant impliquée dans le contrôle de la prolifération cellulaire, notamment chez la lignée cellulaire HeLa (Nishiyama *et al.*, 2009). Différentes lignées cellulaires colorectales non cancéreuses (18Co et HcoEpic) et cancéreuses (Caco-2/15, HT-29, SW480, T84, Colo-205, DLD-1, HCT116 et Lovo) ont donc été utilisées afin de vérifier le profil d'expression protéique des isoformes CHD8 dans ce contexte. Les deux isoformes de CHD8 ont été détectées dans plusieurs des lignées cellulaires étudiées avec un profil différent entre les lignées cancéreuses et non cancéreuses (Figure 11A). En effet, la plus petite forme de CHD8 se trouve davantage exprimée au niveau des cellules non cancéreuses comparativement à la plus grande forme de CHD8 qui est davantage détectée au niveau des lignées cancéreuses (Figure 11A). Plus spécifiquement, les cellules HT-29 et Caco-2/15 ont montré la présence des deux isoformes de CHD8, même si la plus grande forme se trouve relativement plus fortement exprimée dans ces lignées (Figure 11A). Puisque nous avons observé une réduction partielle de la prolifération des cellules HT-29 et Caco-2/15 suite à la réduction d'expression de CHD8 en comparaison avec la réduction d'expression de NCOR1 (Figure 10A et B), nous avons posé l'hypothèse que cette différence de phénotype pourrait s'expliquer par une expression résiduelle de la plus petite forme de CHD8. Nous avons donc vérifié par immunobuvardage si l'utilisation de l'ensemble des différents shRNA commerciaux (shCHD8-8-9 et 96), tous prédits pour cibler CHD8 (Figure 11B), pouvaient affecter l'expression des deux isoformes CHD8 dans les cellules HT-29, Caco-2/15 et 18Co. Suite à l'infection et à la sélection des populations ayant intégré les lentivirus, une extraction protéique et un immunobuvardage ont permis d'observer une forte diminution d'expression de la grande forme de CHD8 dans chacune des lignées 18Co, Caco-2/15 et HT-29 et ce, pour chacun des shRNA ciblant CHD8 en comparaison avec le shNT contrôle (Figure 11C). Cependant, chacun de ces shRNAs n'ont pas affecté l'expression de la plus petite forme de CHD8 dans ces conditions (Figure 11C).



**Figure 11 : Profil d'expression des 2 isoformes de CHD8 selon le type cellulaire utilisé.** A) Immunobuvardage à partir d'extraits protéiques totaux de différentes lignées cellulaires colorectales non cancéreuses et cancéreux par l'utilisation d'un anticorps anti-CHD8 comparée à l'anticorps anti-actine. B) Schéma représentant les différents shRNAs commerciaux utilisés pour cibler la grande forme de CHD8. C) Immunobuvardage de CHD8 à partir d'extraits protéiques totaux de 18Co, HT-29 et Caco2/15 suite à l'intégration de 3 différents shRNA dirigés contre CHD8<sub>L</sub> (shCHD8-8, -9 ou -96) et d'une sélection à la puromycine de 7 jours. Cet immunobuvardage est analysé à l'aide de l'anticorps anti-CHD8 que l'on compare au niveau de l'expression de l'actine.

### 2.3 Génération de nouveaux shRNA afin de cibler la petite forme de CHD8

Puisque l'utilisation des shRNA commerciaux n'ont pas permis de moduler l'expression de la petite forme de CHD8 (CHD8<sub>s</sub>), nous avons entrepris le clonage de shRNA prédisant l'interférence contre des régions contenues dans l'ARNm de CHD8<sub>s</sub> dans le vecteur lentiviral PLKO.1-puro (Figure 12A). Ces shCHD8<sub>s+L</sub> visent à diminuer l'expression de la petite forme de CHD8, mais aussi à diminuer l'expression de la grande forme de CHD8 (Figure 12A). Nous avons dans un premier temps mesuré l'efficacité de ces nouveaux shCHD8<sub>s+L</sub> dans les cellules Caco-2/15 en évaluant le niveau d'expression des transcrits de CHD8 en ciblant une région spécifique à la région codante de CHD8<sub>L</sub> ainsi qu'une région commune aux deux isoformes de CHD8. Un PCR en temps réel préliminaire n'a démontré aucune diminution des transcrits de CHD8, autant ceux encodant pour la petite que la grande forme, et ce, en comparaison aux cellules contrôle infectées avec le shNT (N=1) (Figure 12B). L'utilisation d'un shNCOR1 comme contrôle d'efficacité d'infection a démontré une réduction de l'expression des transcrits de NCOR1 dans ces conditions (Figure 12B). Suite à cet insuccès, nous avons utilisé plusieurs séquences de siRNA prédites pour cibler à la fois la grande forme et la petite forme ou encore seulement la grande forme de CHD8 (Figure 12C). Suite à la transfection des différents siRNAs dans les cellules Caco-2/15 et HT-29, nous avons mesuré l'efficacité de ces siRNA en fonction du niveau protéique résiduel de CHD8. Nous observons une diminution d'expression de la grande forme de CHD8 pour tous les siCHD8 utilisés, autant dans les Caco-2/15 (Figure 12D) que dans les HT-29 (Figure 12E). Les siCHD8-7, -87 et -89, tous prédits pour cibler les deux isoformes de CHD8, n'ont pas entraîné de diminution significative de l'expression de CHD8<sub>s</sub> en comparaison aux siCHD8-5, -43 et -45 qui ciblent uniquement CHD8<sub>L</sub> (Figure 12D et E). Ces résultats nous démontrent que malgré l'efficacité des siCHD8-7-87-89 à réduire l'expression de CHD8<sub>L</sub>, aucune diminution protéique de CHD8<sub>s</sub> n'est observée. Ceci nous laisse donc douter de la nature des bandes observées près de 110 kDa.

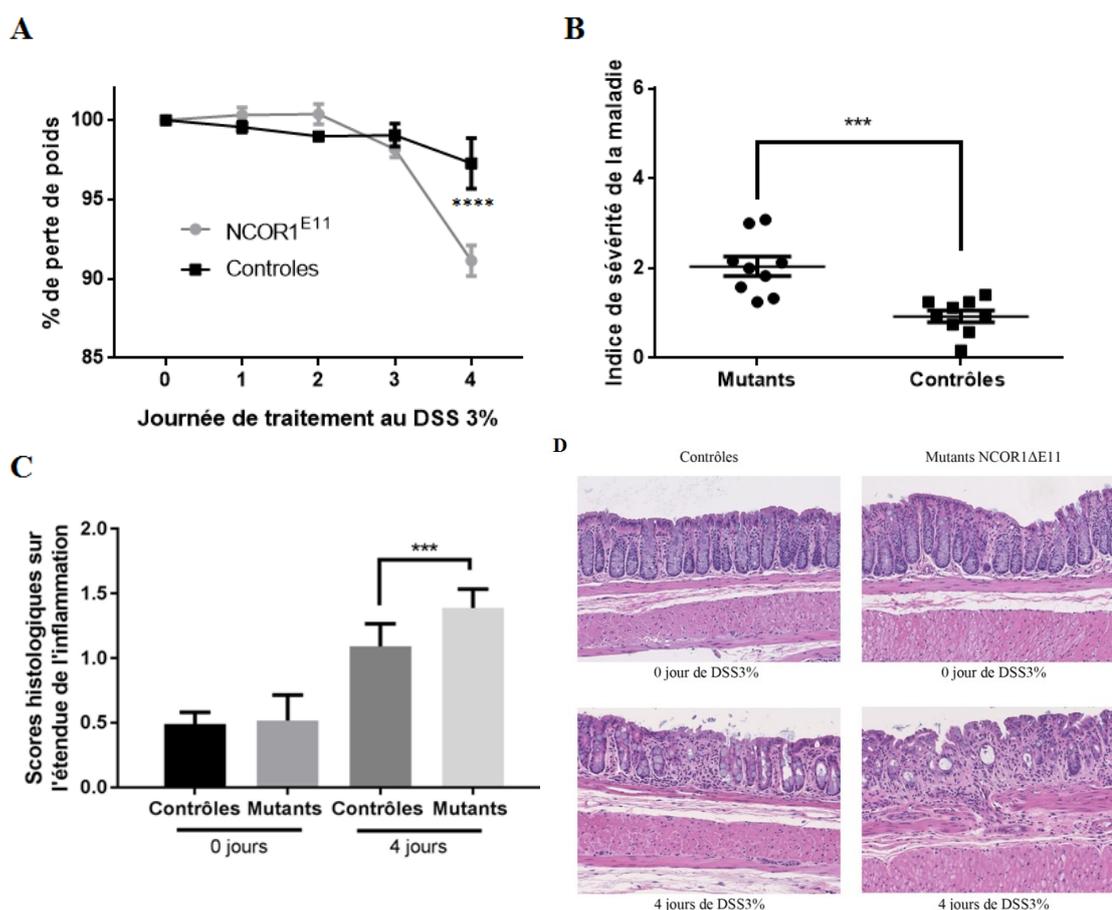


**Figure 12 : Analyse de l'effet de plusieurs séquences d'ARN interférents sur l'expression des isoformes de CHD8.** A) Schéma représentant les différents shRNA utilisés pour cibler CHD8<sub>L</sub> et CHD8<sub>S+L</sub>. B) PCR en temps réel pour mesurer l'expression des ARNm de NCOR1 et de CHD8 suite à l'infection et sélection des populations ayant intégré les divers shRNAs. C) Schéma représentant les différents siRNAs utilisés pour cibler uniquement la grande forme de CHD8 et pour ceux ciblant les 2 formes de CHD8. D) Immunobuvardage à partir d'extraits protéiques totaux de cellules Caco-2/15 suite à la transfection de différents siRNAs ciblant CHD8<sub>L</sub> et CHD8<sub>L+S</sub>. Cet immunobuvardage est analysé à l'aide de l'anticorps anti-CHD8 que l'on compare au niveau de l'expression de l'actine. E) Immunobuvardage à partir d'extraits protéiques totaux de cellules HT-29 suite à la transfection de différents siRNAs ciblant CHD8<sub>L</sub> et CHD8<sub>L+S</sub>. Cet immunobuvardage est analysé à l'aide de l'anticorps anti-CHD8 que l'on compare au niveau de l'expression de l'actine.

### 3. Impact physiologique d'un stress cellulaire sur l'épithélium intestinal de souris déficientes pour NCOR1

Les souris NCOR1 $\Delta$ E11<sup>ACEI</sup> présentent peu de différence avec les souris contrôles au niveau du phénotype de l'épithélium intestinal (St-Jean *et al.*, non-publié). De plus, aucune inflammation spontanée n'a été remarquée dans ce contexte. Cependant, des analyses sur le transcriptome des côlons distaux des souris NCOR1 $\Delta$ E11<sup>ACEI</sup> démontrent une différence du nombre de gènes modulés plus de 1,5 fois entre des souris âgées de 2 mois (411 gènes modulés) et de 10 mois (728 gènes modulés) lorsque comparées aux contrôles (St-Jean *et al.*, non-publié). Peu de gènes sont communément modulés entre les souris NCOR1 $\Delta$ E11<sup>ACEI</sup> de 2 mois et de 10 mois. Cependant, une diminution de l'expression de IL-10 et du facteur de transcription TRIM24 de même qu'une augmentation des cytokines IL-2, TNF et IL-5 suggèrent une légère réponse inflammatoire dans ces deux modèles (St-Jean *et al.*, non-publié). Pour mieux étudier l'effet de la perte d'expression de NCOR1 dans l'épithélium intestinal, des lésions aux cellules épithéliales ont été induites par le DSS afin d'évaluer son rôle lors de la régénération épithéliale. Ce processus implique la prolifération cellulaire et nous pouvons ainsi étudier l'effet de la perte d'expression de NCOR1 en lien avec la prolifération cellulaire tel qu'observé dans les cellules de cancer colorectal. Nous avons utilisé des souris mutantes (NCOR1 $\Delta$ E11<sup>ACEI</sup>) et contrôles (9 souris pour chaque conditions), entre 8 et 10 mois, qui ont reçu du DSS 3% dans l'eau de boisson durant 4 jours. Lors de ces 4 jours, nous avons pesé les souris et analysé leurs saignements rectaux. Nous avons ainsi remarqué qu'il y avait une perte de poids significative et drastique au 4<sup>ième</sup> jour au niveau des souris mutantes comparativement aux contrôles (Figure 13A). Nous avons dû arrêter l'expérimentation au jour 4 puisque nous craignons que le lendemain les souris atteignent la perte de poids maximal autorisée par le comité d'éthique animal de l'Université de Sherbrooke, soit une perte de 20%. Nous avons remarqué un indice de sévérité de la

maladie significativement (Tableau 7) plus élevée pour les souris mutantes indiquant que les souris  $NCOR1\Delta E11^{ACEI}$  réagissent de manière plus importante à ce traitement (Figure 13B). Nous avons ensuite effectué des coupes histologiques au niveau du côlon chez des souris à 0 et à 4 jours de traitement et nous avons observé que l'étendue de l'inflammation intestinale (Tableau 8) était significativement plus élevée chez les mutants au 4<sup>ème</sup> jour que chez les contrôles (Figure 13C et D).



**Figure 13 : Les souris  $NCOR1\Delta E11^{ACEI}$  sont plus susceptibles au traitement DSS 3% que les contrôles.** A) Courbe représentant le pourcentage de perte de poids entre les souris mutantes ( $NCOR1\Delta E11^{ACEI}$ ) et les souris contrôles, traitée au DSS 3% durant 4 jours. Un test Anova à 2 facteurs a été effectué pour nous montrer une significativité de  $P < 0,0001$ . B) Graphique représentant l'indice de sévérité de la maladie suite à un traitement DSS 3% en sacrifiant des animaux, 9 pour chaque condition, au jour 4. Un test de t student a été réalisé pour donner une significativité de  $P < 0,001$ . C) Graphique représentant le score histologique pour l'étendue de l'inflammation suite à un traitement DSS 3%, en sacrifiant entre 6 et 9 souris par conditions, au jour 0 et 4 de traitement. Un test de t student a été réalisé pour donner une significativité de  $P < 0,001$ . D) Coupes histologiques représentatives de côlon de souris mutantes ( $NCOR1\Delta E11^{ACEI}$ ) et de souris contrôles, colorées à l'hématoxyline et à l'éosine, non traitées ou traitées au DSS 3% durant 4 jours.



## Chapitre 4: Discussion

La protéine NCOR1 est connue pour interagir avec les récepteurs nucléaires, tels que les récepteurs à hormones thyroïdiennes et rétinoïques. Elle interagit aussi avec des facteurs de transcription, tels que NF- $\kappa$ B et AP-1, jouant un rôle dans la régulation des gènes cibles impliquée dans la réponse inflammatoire. NCOR1 est aussi connu pour former un complexe de répression avec HDAC3, TBL1/TBLR1 et GPS2, ce qui permet la répression transcriptionnelle des gènes cibles. Suite à l'induction de la réponse inflammatoire chez le macrophage, NCOR1 est dégradé afin de dissocier ce complexe de répression (Ogawa *et al.*, 2004). Cependant, des expériences antérieures de notre laboratoire ont démontré une induction protéique de NCOR1 lors de l'activation des facteurs de transcription, tels que NF- $\kappa$ B et AP-1, suite à une stimulation à IL-1 $\beta$  (St-Jean *et al.*, non-publié). Un séquençage de l'ensemble du transcriptome cellulaire a aussi été effectué suite à la diminution d'expression de NCOR1 démontrant une hausse et une baisse d'expression de plusieurs produits de gènes (St-Jean *et al.*, non-publié). Ces résultats nous laissent croire qu'il pourrait y avoir une variété de mécanismes impliqués dans le mode de répression qu'exerce NCOR1. Afin de mieux comprendre ces mécanismes de régulation transcriptionnelle associés à NCOR1, de nouveaux partenaires d'interaction ont été découverts. Pour ce faire, une spectrométrie de masse enrichie dans un milieu SILAC a été effectuée dans des cellules de cancer colorectal. Cette spectrométrie de masse a permis d'observer un enrichissement de peptides comparable à celui de NCOR1 et correspondant à la protéine CHD8. Nous avons donc stipulé que la protéine CHD8 puisse interagir avec NCOR1. Lors de cette étude, nous avons exploré l'implication de NCOR1 et de CHD8 dans le cancer colorectal ainsi que de leur interaction mutuelle permettant ainsi d'en savoir plus sur leurs rôles fonctionnels communs. C'est à travers l'étude de l'interaction entre CHD8 et NCOR1, des différences fonctionnelles lors de la perte d'expression de NCOR1 et CHD8, et enfin grâce à l'induction d'un stress épithélial chez des souris NCOR1 $\Delta$ E11<sup>ACEI</sup>, qu'il nous a été possible de vérifier notre hypothèse.

## **1. Composition du complexe de répression de NCOR1**

### **1.1 CHD8 un nouveau partenaire d'interaction de NCOR1**

Une co-IP entre CHD8 et NCOR1 confirme l'hypothèse émise à la suite d'une analyse en spectrométrie de masse, soit que ces 2 protéines interagissent ensemble et ce, dans différentes lignées cellulaires. Une supposition a été émise que cette interaction, indépendante au cancer, est impliquée au niveau de la régulation transcriptionnelle. Cette supposition supporte le fait que certains domaines protéiques de NCOR1 et CHD8 ont des fonctions au niveau du remodelage de la chromatine et de la liaison à l'ADN. Il s'agit maintenant d'explorer quels sont les domaines d'interactions protéiques impliqués, quels sont les gènes cibles et quels sont les rôles fonctionnels induits par l'interaction entre CHD8 et NCOR1.

### **1.2 Le domaine RD1 de NCOR1 interagit avec la forme complète de CHD8**

Parmi les 5 différentes protéines recombinantes associées aux domaines de la protéine NCOR1, le domaine RD1 est celui ayant la capacité d'interagir avec CHD8 au noyau dans nos conditions expérimentales. Le domaine RD1 est principalement connu pour interagir avec des protéines impliquées au niveau du complexe de répression associé à NCOR1. Le complexe de répression de NCOR1 intervient dans plusieurs contextes tissulaires. Par exemple, dans un contexte de leucémie myéloïde aiguë, la protéine ETO, fusionnée avec le facteur de transcription hétérodimérique RUNX1, est capable de lier le domaine RD1 (entre les acides aminés 254 et 407) et le domaine RD3 (entre les acides aminés 950 et 1275) de NCOR1. La protéine ETO interagit aussi avec Sin3A et avec différents HDAC tel que HDAC1 ou HDAC2. Ainsi, le complexe HDAC-NCOR1-Sin3 favorise la répression des gènes cibles de ETO/RUNX1 (Lausen et al., 2004; Lutterbach et al., 1998).

Le complexe de répression de NCOR1-HDAC3 est d'avantage connu et comprend souvent les protéines TBL1, TBLR1 et GPS2 associés au domaine RD1. Les protéines TBL1/TBLR1 se lient au domaine RD1 entre les acides aminés 246 et 256 tandis que GPS2 se lie approximativement entre les acides aminés 167 et 207 (Kruusvee *et al.*, 2017; Oberoi *et al.*, 2011). Les trois différentes protéines liées au domaine RD1 sont aussi capables de se lier entre eux. Les protéines TBL1 et TBLR1 sont impliqués à la fois dans la répression transcriptionnelle et dans l'activation transcriptionnelle. Le N-terminal de

protéines TBL1 et TBLR1 interagissent avec les histones H2B et H4 hypoacétylées, ce qui favorise la répression transcriptionnelle (Yoon *et al.*, 2003). D'un autre côté, la phosphorylation de TBL1/TBLR1 par PKC, CK1 et GSK3 permet la dégradation de NCOR1 en favorisant son ubiquitination. Ceci entraîne donc une activation transcriptionnelle des gènes cibles impliqués dans ce contexte (Perissi *et al.*, 2008). La protéine GPS2 est, quant à elle, impliquée dans la régulation négative de la voie JNK, empêchant ainsi la formation du facteur de transcription AP-1 (Zhang *et al.*, 2002). En sachant que le domaine RD1 lie souvent des protéines en lien avec le complexe de répression de NCOR1, il est tentant de spéculer que CHD8 en fasse partie. De ce fait, il est possible que le chromodomaine de CHD8 pourrait, par exemple, se lier à H3K9me3 puisque cette méthylation s'associe souvent à un statut répressif de la transcription. Quant au domaine hélicase de CHD8, il pourrait induire une torsion au brin d'ADN ce qui permettrait le glissement du nucléosome pour maintenir sa répression transcriptionnelle.

Le complexe NCOR1-HDAC3 a aussi été observé pour interagir indirectement avec une protéine ayant un domaine hélicase, soit SNF/SWI ATPase. Il s'agit de la protéine SMARCA5 (*SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator Of Chromatin, Subfamily A, Member*). En plus d'un domaine SNF/SWI, la protéine SMARCA5 contient aussi un domaine SANT tout comme CHD8 (Marfella & Imbalzano, 2007). Ainsi, le complexe NCOR1-HDAC3 permet de désacétyler la queue de l'histone 4 afin que SMARCA5 s'y lie. Une fois cette liaison accomplie, le domaine hélicase de SMARCA5 vient favoriser le glissement du nucléosome avec l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP. Cela permet donc de maintenir la répression transcriptionnelle en favorisant la stabilité du nucléosome. Il n'en reste pas moins que le recrutement de SMARCA5 est dépendant de l'activité du complexe HDAC3-NCOR1. Cet article nous démontre aussi que la déacétylation de H4K16 favorise un effet inhibiteur, ce qui nous laisse supposer que ce site a une grande importance au niveau de la condensation de la chromatine (Alenghat *et al.*, 2006). Dans la littérature, une interaction de SMARCA5 avec BAZ1A a aussi été observée (*Bromodomain Adjacent To Zinc Finger Domain 1A*). Le C-terminal de BAZ1A se lie avec une forte affinité au niveau du domaine RD1 de NCOR1 et aussi au niveau des histones (Aydin *et al.*, 2014; Ewing *et al.*, 2007).

Une comparaison de la séquence en acides aminés des protéines CHD8 et SMARCA5 montre une homologie de près de 60% au niveau de leur domaine hélicase respectif. Ceci

nous suggère un mécanisme d'action de CHD8 potentiellement similaire à celui de SMARCA5 lors de la répression transcriptionnelle. CHD8 pourrait être en mesure de se lier au complexe NCOR1-HDAC3 de manière indirecte via une protéine intermédiaire au niveau du domaine RD1 de NCOR1. L'activité enzymatique de HDAC3 favoriserait la désacétylation d'une queue d'histone et faciliterait ainsi la formation d'hétérochromatine. Avec l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP de son hélicase, CHD8 favoriserait le glissement du nucléosome afin de maintenir une répression transcriptionnelle et non une activation. Avec son chromodomaine, il serait possible que CHD8 s'ancre sur la lysine méthylée d'une queue d'histone pour favoriser sa stabilité afin de permettre son activité. En faisant partie de ce complexe, CHD8 prend une plus grande importance au niveau de la régulation transcriptionnelle des gènes cibles de NCOR1, ce qui pourrait les mener à avoir des rôles fonctionnels communs. La structure de la chromatine est unique pour chaque promoteur donc cela ne permet pas de confirmer un réel mécanisme, mais uniquement de le supposer. Il n'est pas non plus impossible de penser que CHD8 a d'autres effets sur la chromatine qui va à l'encontre de la répression transcriptionnelle, tout comme SMARCA5. CHD8 pourrait par exemple interagir au même site de liaison que GPS2 et empêcher ainsi sa liaison, ce qui favoriserait l'activité transcriptionnelle des gènes cibles du facteur de transcription AP-1. Il serait aussi possible que CHD8 se lie à la marque H3K9me1, une méthylation souvent associée à un statut actif de la transcription.

Nous avons observé que contrairement au recrutement du domaine RD1 par l'immunoprécipitation de la protéine entière CHD8, l'immunoprécipitation par l'utilisation de l'anticorps anti-V5 du domaine RD1 n'est pas efficace à immunoprécipiter la protéine entière CHD8. Il faut comprendre que NCOR1 est en constante interaction avec plusieurs protéines ayant des affinités différentes et bien spécifiques. Dans le cas, par exemple, de l'interaction de NCOR1 avec les récepteurs nucléaires, il s'agit d'une liaison de faible affinité puisqu'elle est associée à de fréquent changement. Entre la protéine CHD8 et la protéine recombinante du domaine RD1 de NCOR1, il s'agit peut-être d'une interaction ou l'affinité de liaison est plus faible à cause de la forme incomplète de NCOR1. Ce qui laisse supposer que la force d'attraction d'une petite région de la protéine NCOR1, soit le domaine RD1, ne soit pas assez élevée pour attirer la forme complète de CHD8 dans nos conditions expérimentales.

### 1.3 Perspectives de l'objectif 1

Le domaine RD1 est maintenant connu pour interagir avec la protéine CHD8. Il s'agira maintenant de déterminer quel(s) domaine(s) de CHD8 interagissent avec NCOR1. Pour ce faire, il suffirait de répéter ce qui a été fait avec NCOR1, mais cette fois-ci avec les différents domaines de CHD8. Ainsi, CHD8 pourrait être séparé en 5 différentes constructions, étiquetées avec l'épitope HA, et transfecté dans des HEK293T avec la forme complète de NCOR1. Ensuite des IP en alternance avec les anticorps Flag et HA seraient analysées en immunobuvardage. En connaissant les domaines d'interactions entre NCOR1 et CHD8, une analyse similaire serait effectuée dans les cellules Caco-2/15 et HT-29. Ceci permettrait de confirmer que les différents domaines obtenus interagissent bel et bien ensemble dans des lignées cellulaires de cancer colorectal. Il serait aussi intéressant de connaître les séquences de liaison des domaines d'interactions entre NCOR1 et CHD8, afin de les invalider par mutation ou par délétion dans ce cas-ci par la méthode de CRISPR/cas9. Ainsi, en immunoprécipitant les protéines CHD8 et NCOR1 modifiées au niveau de leur sites d'interactions, nous serions capables de confirmer si l'interaction entre CHD8 et NCOR1 est réelle ou non. Par la suite, une surexpression de la forme complète de CHD8 avec NCOR, modifié au niveau de son site d'interaction avec CHD8, serait intéressant à obtenir. Cela permettrait de voir si le CHD8 endogène se lie au NCOR1 modifié ou bien au NCOR1 endogène. Une liaison avec la protéine NCOR1 endogène permettrait la transcription de gènes cibles et indiquerait si l'interaction est réelle ou non. Pour confirmer si l'interaction est directe ou non, un essai de double hybride pourrait être effectué en regardant l'efficacité de l'expression du gène rapporteur. De manière in situ, un essai de proximité de ligation pourrait aussi être effectué en regardant l'intensité de fluorescence obtenue. Il serait aussi intéressant de confirmer si l'interaction entre ces deux protéines s'effectue lorsque l'ADN est sous forme d'euchromatine ou hétérochromatine. Pour ce faire, une analyse de séquençage de bisulfite, sur le promoteur des gènes cibles régulé par l'interaction de NCOR1 et CHD8, pourrait être effectuée. Cela permettrait d'observer le niveau de méthylation du promoteur et de déterminer le niveau de compaction de la chromatine.

En sachant qu'NCOR1 agit en tant que corépresseur transcriptionnel et que CHD8 agirait en tant qu'hélicase et qu'une interaction entre NCOR1 et CHD8 a été démontrée, il est possible de croire que ces deux protéines régulent, de manière complémentaire, la transcription. Il serait donc intéressant de déterminer leurs cibles transcriptionnelles

potentielles. Certains gènes auraient préalablement été ciblés lors d'un séquençage d'ARN effectué lors de la perte d'expression de CHD8 ou de NCOR1 dans des cellules Caco-2/15 et HT-29. L'analyse de ce séquençage a démontré une modulation d'expression commune à la perte de NCOR1 et CHD8 au niveau de certains gènes impliqués dans la survie, la migration et la prolifération cellulaire (St-Jean *et al.*, non publié). À la lumière de ces résultats, des ChIPs de NCOR1 et CHD8 pourraient être effectués afin de déterminer leurs profils d'interaction communs avec la chromatine et ainsi les comparer aux gènes communément modulés lors du séquençage d'ARN préalablement obtenu.

## **2. Les rôles fonctionnels de NCOR1 et CHD8 dans des cellules de cancer colorectal**

### **2.1 CHD8 et NCOR1 sont impliqués dans la régulation de la croissance cellulaire au niveau de cellules de cancer colorectal**

Nous avons observé une diminution intermédiaire de la croissance cellulaire lors de la perte d'expression de CHD8 comparativement à la perte d'expression de NCOR1 dans les lignées cellulaires HT-29 et Caco-2/15. Cette observation pourrait à priori s'expliquer par le fait que nous ciblons uniquement la perte de la grande forme de CHD8. La petite forme de CHD8 comprend uniquement les 749 premiers acides aminés de CHD8. Cette section protéique est à la source de plusieurs interactions, telles que la liaison à la  $\beta$ -caténine et à l'histone H1 (Nishiyama *et al.*, 2012). Le complexe regroupant la  $\beta$ -caténine, CHD8 et l'histone H1 favorise la répression des gènes cibles de la voie des Wnt, tel que la *CCND1*. La *CCND1*, qui encode pour la protéine cycline D1, joue un rôle important dans la transition de la phase G1 à la phase S durant le cycle cellulaire. La répression directe de la *CCND1*, par la présence de la petite forme de CHD8, favorise donc une diminution de croissance cellulaire. Ainsi, il est possible de penser qu'une expression résiduelle de la petite forme de CHD8, dans un contexte où la grande forme est inhibée, peut présenter un effet compensatoire lors de la croissance cellulaire au niveau des cellules de cancer colorectal.

### **2.2 Diminution d'expression des différentes formes de CHD8**

Nous avons visé une stratégie permettant d'obtenir une perte d'expression de toutes les formes de CHD8 afin de déterminer si la présence de la petite forme de CHD8 pouvait soutenir le maintien d'une certaine prolifération cellulaire à l'opposé de l'arrêt drastique

de prolifération observé lors de la perte d'expression de NCOR1. Afin de diminuer l'expression des 2 formes de CHD8, nous avons utilisé différentes méthodes d'interférence à l'ARN, soit l'introduction cellulaire de shRNA ou encore de siRNA. L'utilisation de différents shRNA contre CHD8 s'est avérée non efficace pour diminuer l'expression des 2 formes de CHD8. Une des explications des plus probables est que les séquences utilisées pour cibler la grande et la petite forme de CHD8 ne sont pas optimales. Le séquençage des amorces insérées dans le vecteur pLKO.1 puro a confirmé l'intégrité de celles-ci excluant la possibilité d'une erreur dans les séquences nucléotidiques ainsi insérées. Cela nous amène donc à suggérer que les séquences utilisées ciblent une région de CHD8 où l'ARNm pourrait être encombré par des protéines régulatrices de la transcription ou de la stabilité plaçant l'ARNm dans une conformation inadéquate pour le ciblage. Pour de prochains clonages, il serait judicieux d'utiliser plusieurs séquences ciblant différentes régions des produits du gène désiré.

Par la suite, l'utilisation des siRNA s'est avérée fonctionnelle pour cibler uniquement la grande forme de CHD8. Ceci nous indique que les séquences ciblées par les siRNA sont efficaces. À la lumière de cette observation, il est tentant de mettre en doute la réelle existence de la petite forme de CHD8 dans ce contexte. Par-contre, dans l'article du Dr Nishiyama (2009), des immunobuvardages à partir d'extraits de différents types de lignées cellulaires ont démontré la présence des 2 formes de CHD8. Parmi ces lignées, les cellules épithéliales de carcinome colorectal humain HCT116 ont montré l'expression de ces deux formes. Nous avons remarqué que les cellules HCT116 expriment plus fortement la soi-disant petite forme de CHD8 comparativement aux autres lignées cellulaires que nous avons analysées. Il est possible que la petite forme de CHD8 n'existe que dans des types cellulaires particuliers. Il est aussi possible que les bandes visualisées à la taille normalement prédite pour la petite forme de CHD8 ne soient que des bandes non spécifiques détectées par l'anticorps de CHD8 (ab114126) utilisé dans notre étude. Il existe peu de groupes scientifiques qui ont démontré la présence de la petite forme de CHD8 par immunobuvardage. Les études qui rapportent cette forme ont toutes utilisé les anticorps maison du Dr. Kikuchi (Sakamoto *et al.*, 2000). Il faut aussi considérer qu'il est peut-être plus difficile d'apercevoir une diminution d'expression protéique lorsqu'il y a une faible quantité endogène de la protéine. Une moindre modification ou erreur affectant les niveaux d'expressions protéiques peut fausser les résultats obtenus. Ainsi, il

est plus facile d'observer une diminution d'expression protéique à partir d'une forte expression endogène de la protéine cible.

### 2.3 CHD8, une protéine dichotomique

D'autres mécanismes peuvent expliquer l'effet intermédiaire de la réduction de prolifération cellulaire lors de la perte d'expression de CHD8 lorsque comparé à la perte d'expression de NCOR1. Il faut tout d'abord comprendre que NCOR1 n'est pas la seule protéine avec laquelle CHD8 est capable d'interagir. L'interaction de CHD8 avec plusieurs autres protéines vient favoriser ou inhiber la prolifération cellulaire. L'interaction de CHD8 avec la  $\beta$ -caténine intervient dans la voie de signalisation canonique des Wnt. Le complexe formé de l'histone H1-CHD8- $\beta$ -caténine empêche l'activité de la  $\beta$ -caténine, ce qui entraîne la stabilité du groupement Groucho sur les facteurs de transcription LEF/Tcf-1. La présence de CHD8 permet donc l'inhibition de la transcription des gènes de la voie des Wnt impliqués dans la prolifération cellulaire, tels que *MYC* et *CCND1*. (Adhikary & Eilers, 2005). CHD8 interfère aussi au niveau de l'hyperméthylation des îlots CpG dans le promoteur des gènes CIMP grâce à une mutation de BRAF(V600E). Cette mutation favorise la suractivation de la voie des MAPK et favorise une liaison de DNMT3B à l'ADN par l'intermédiaire de CHD8, BACH1 et MAFG. L'activité méthyltransférase de DNMT3B permet donc une répression transcriptionnelle constitutive des gènes cibles (Fang *et al.*, 2014). En plus de réprimer, CHD8 peut aussi favoriser la transcription en facilitant l'activation du gène *CCNE2* et de la protéine E2F1. La Cycline E2 aide au passage de la phase G1 à la phase S durant le cycle cellulaire en phosphorylant la protéine RB et en libérant le facteur de transcription E2F. La protéine E2F1, par exemple, est nécessaire à la transcription des gènes impliqués dans le passage de la phase G1 à S tels que *RBL1* (rétinoblastoma-like-1) et *CDC25A* (cell division cycle 25A). CHD8 est aussi capable d'interagir avec le facteur de transcription CTCF qui est lié sur différentes séquences isolatrices de l'ADN. L'interaction entre CHD8 et CTCF empêche la propagation de l'hétérochromatine sur le génome, ce qui favorise la transcription des gènes cibles. La perte de CHD8 favorise l'hyperméthylation des îlots CpG ainsi que l'hypoacétylation de l'ADN près des sites de liaison de la protéine CTCF. Il est donc possible de constater que la protéine CHD8 peut favoriser autant que réprimer la prolifération cellulaire selon le contexte et c'est ce qui en fait une protéine dichotomique pouvant peut-être expliquer l'effet intermédiaire de la prolifération cellulaire observé lors de la perte d'expression de CHD8. Dans un autre

ordre d'idée, les lignées cellulaires Caco-2/15 et HT-29 deviennent sénescents lors de la perte d'expression de NCOR1 en contraste avec la perte d'expression de CHD8 (St-Jean *et al.*, non-publié). Ceci pourrait aussi contribuer à expliquer le phénotype intermédiaire observé lors du décompte cellulaire. Au final, la perte d'expression de CHD8 et NCOR1 mène à un rôle biologique commun, soit une diminution de prolifération cellulaire dans un contexte de lignées provenant de cancers colorectaux. Cette diminution proliférative pourrait être attribuable, en partie, à des mécanismes de régulation communs entre CHD8 et NCOR1 et ce, en fonction de leur interaction.

## 2.4 Perspective de l'objectif 2

En sachant qu'il existe une diminution de croissance cellulaire lors de la perte d'expression de CHD8 et NCOR1, il serait intéressant de vérifier s'il ne s'agit pas d'une diminution de prolifération cellulaire. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en effectuant une cytométrie de flux sur des cellules marquées au 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) ainsi qu'à l'iodure de propidium suite à un arrêt du cycle cellulaire. Pour voir si la perte de CHD8 et NCOR1 n'affecterait pas l'adhésion cellulaire, une mesure de la viabilité des cellules en suspension avec du trypan bleu pourrait être effectuée. La survie cellulaire pourrait aussi être mesurée en incubant nos cellules avec l'alar blue qui est un colorant indicateur d'oxydo-réduction. Par la suite, une faible présence de la petite forme de CHD8 aurait pu s'expliquer par un phénomène de dégradation. Cela aurait été possible de le prouver en utilisant des inhibiteurs de protéasome, tel que le MG-132. Il aurait aussi été intéressant de valider les différents siRNA pour la perte d'expression de la petite forme de CHD8 dans un contexte de cellules colorectales non cancéreuses. En effet, cette petite forme semble s'y retrouver en plus grande concentration comparativement aux cellules de cancer colorectal. L'article démontrant différents types cellulaires pouvant exprimer les 2 formes de CHD8, dont les cellules HCT116 (Nishiyama *et al.*, 2009), sont des cellules où P53 est de type sauvage ou encore absent. Les cellules HT-29 et Caco-2/15, que nous avons utilisé, sont quant à elles mutées pour P53. Il serait donc intéressant de comparer le niveau d'activation des différentes voies de signalisations affecté par les principales mutations de produits de gènes impliqués dans le cancer colorectal (P53, APC, BRAF et SMAD4/2) parmi les différentes lignées de cellules cancéreuses exprimant ou non pas la petite forme de CHD8. Pour la suite du projet, il serait aussi intéressant de communiquer avec les différents groupes relatant l'existence de la petite forme de CHD8 tel que le Dr. Kikuchi (Sakamoto *et al.*, 2000). Il serait ainsi

possible d'utiliser leur anticorps maison ainsi que leur shRNA ciblant la grande et la petite forme de CHD8 (Kobayashi *et al.*, 2002; Nishiyama *et al.*, 2012). Cela nous permettrait de valider la présence réelle ou non de la petite forme de CHD8 dans les différentes lignées cellulaires utilisées. En sachant la présence d'un phénotype sénescence, il serait intéressant d'aller vérifier si la perte d'expression de NCOR1 ou de CHD8 pourrait induire la mort cellulaire. Pour ce faire, il serait possible d'effectuer un essai à l'annexine 5 que l'on analyserait en FACS et un immunobuvardage avec des anticorps dirigés contre la caspase-3 clivée, BCL et Bax.

### 3. Induction de lésions épithéliales par le DSS

#### 3.1 Sensibilité des souris NCOR1 $\Delta$ E11<sup>ACEI</sup> au DSS 3%

À la suite d'études antérieures réalisées sur les souris NCOR1 $\Delta$ ID<sup>ACEI</sup>, le modèle murin NCOR1 $\Delta$ E11<sup>ACEI</sup> a été priorisé afin d'évaluer les effets de la perte de complète de NCOR1 au niveau de l'épithélium intestinal. Ainsi, des études précédentes, sur les souris NCOR1 $\Delta$ E11<sup>ACEI</sup>, ont démontré un phénotype épithélial intestinal similaire aux souris contrôles (St-Jean *et al.*, non-publié). Tout comme il est possible de l'observer chez les souris NCOR1 $\Delta$ ID<sup>ACEI</sup>, la perte d'expression de NCOR1, au niveau de l'épithélium de la souris, n'affecte pas le maintien de la structure épithéliale intestinale. Afin de mieux étudier l'effet de la perte d'expression de NCOR1 chez les souris NCOR1 $\Delta$ E11<sup>ACEI</sup>, nous avons induit un stress épithélial à l'aide d'un carcinogène non-génotoxique, le DSS. Ces résultats ont démontré que les souris NCOR1 $\Delta$ E11<sup>ACEI</sup> ont une perte de poids significatif, un index de sévérité de la maladie élevé et une inflammation s'étendant jusqu'à la muqueuse.

En faisant le parallèle des résultats obtenus entre les NCOR1 $\Delta$ ID<sup>ACEI</sup>, qui sont des souris où la protéine NCOR1 est fonctionnelle, mais où il ne reste plus que le premier domaine RID, et les souris NCOR1 $\Delta$ E11<sup>ACEI</sup>, nous observons, dans les 2 cas, une perte de poids significatif. Cela permet d'affirmer que la perte de NCOR1 est plus sensible lors d'un stress épithélial, ce qui favorise un changement dans la réponse physiologique. Cette sensibilité se retrouve plus importante chez les souris NCOR1 $\Delta$ E11<sup>ACEI</sup> que les NCOR1 $\Delta$ ID<sup>ACEI</sup> et elle peut être attribuée à l'importance de la présence du premier domaine RID, des domaines de répression ainsi que de SANT. Cette sensibilité plus importante pourrait aussi être attribuée à un âge plus élevé. Les souris plus âgées (NCOR1 $\Delta$ E11<sup>ACEI</sup> entre 8 et 10 mois) ont tendance à consommer plus de nourriture et

d'eau que des souris plus jeunes (NCOR1 $\Delta$ ID $\Delta$ CEI entre 4 et 5 mois). Les souris NCOR1 $\Delta$ ID $\Delta$ CEI démontrent aussi un problème au niveau de la régénération épithéliale qui pourrait aussi être attribuée aux souris NCOR1 $\Delta$ E11 $\Delta$ CEI, mais de manière encore plus drastique. En comparant avec la diminution de la croissance cellulaire lors de la perte de NCOR1, il est possible de croire en un dérèglement de la régénération épithéliale. Ainsi une mauvaise croissance cellulaire pourrait expliquer une diminution de prolifération cellulaire. Malheureusement, l'éthique associée à la perte de poids chez la souris nous a empêché d'observer l'effet de la régénération des cellules épithéliales intestinales lors de l'arrêt du traitement au DSS. Cette susceptibilité au DSS chez les souris NCOR1 $\Delta$ E11 $\Delta$ CEI serait peut-être dû à un dérèglement de la microflore. Il a déjà été vu que la présence ou l'absence de l'expression de certains gènes impliqués dans la composition du microbiote des souris pourrait faciliter le désordre homéostatique lors d'un stress épithélial. Par exemple, la transplantation fécale du microbiote démontre que l'acide gras oméga-6 a un pouvoir protecteur contre le DSS et que l'induction de l'anticorps anti-CXCL3 a aussi un effet protecteur contre le DSS (Nagy-Szakal *et al.*, 2015). Cette susceptibilité au DSS chez les souris NCOR1 $\Delta$ E11 $\Delta$ CEI pourrait aussi être attribuable à un phénotype sécrétoire associé à la sénescence. Il ne faut pas oublier que la perte d'expression de NCOR1 dans les cellules de cancer colorectal démontre un phénotype sénescence. Nous savons que les souris NCOR1 $\Delta$ E11 $\Delta$ CEI ne démontrent pas de sénescence de façon spontanée (St-Jean *et al.*, non-publiée), mais si l'on induit une toxine chimique favorisant un stress et que lors d'un stress épithélial, le phénotype inflammatoire associé à la sénescence apparaissait, cela pourrait contribuer à expliquer la susceptibilité accrue de l'épithélium face au DSS.

En plus de cela, une inflammation à long terme des cellules épithéliales intestinales favorise l'accumulation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) entraînant ainsi des dommages oxydatifs à l'ADN pouvant causer des mutations dans les gènes *KRAS*, *TP53* et parfois *APC* (Meira *et al.*, 2008; Roessner *et al.*, 2008). Bien que la protéine NCOR1 soutient la prolifération cellulaire, il serait donc possible de croire qu'un stress épithélial à long terme pourrait mener à la croissance d'un adénocarcinome et même au cancer colorectal chez les souris NCOR1 $\Delta$ E11 $\Delta$ CEI.

### 3.2 Perspectives de l'objectif 3

Pour mesurer l'effet de la régénération épithéliale, une induction de DSS durant 7 jours, avec une plus faible concentration (moins de 3%), suivant une période de récupération

sur les souris NCOR1 $\Delta$ E11<sup>ACEI</sup> pourrait être effectué. Afin de mieux caractériser le modèle NCOR1 $\Delta$ E11<sup>ACEI</sup>, il serait intéressant d'effectuer des immunofluorescences sur différents marqueurs de prolifération cellulaire, tels que Ki-67, topoisomérase II et cycline E. Des injections au Bromodésoxyuridine chez la souris pourront aussi être effectuées. Il serait intéressant d'effectuer ces immunofluorescences à travers différentes sections du côlon durant le traitement au DSS ainsi qu'avant et après les 7 jours de la période de récupération. Nous pourrions ainsi voir l'effet progressif de la perte et du renouvellement des cellules épithéliales lors de l'induction d'un stress. Afin de poursuivre la caractérisation du modèle, des immunohistochimies pourraient être effectuées afin de localiser l'expression de marqueurs inflammatoires, tels que l'IL-2, l'IFN- $\beta$ 1, l'IL-15 et l'IL-18, à travers les différentes sections du côlon. De plus, une analyse du microbiote des souris NCOR1 $\Delta$ E11<sup>ACEI</sup>, sans et avec DSS, nous aiderait à voir s'il n'y a pas une espèce bactérienne particulière qui pourrait expliquer cette susceptibilité au DSS. Il serait aussi intéressant de refaire un stress épithélial causé par le DSS, mais avec des souris plus jeunes (2 mois), afin de voir si les changements épithéliaux seraient aussi drastiques. De plus, il serait aussi intéressant d'effectuer à plus long terme un stress épithélial avec une plus faible quantité de DSS pour voir si cela nous amène à une l'obtention d'un adénocarcinome ainsi qu'à un certain nombre de mutations impliquant les gènes *Tp53*, *Apc*, *Kras* et *Smad2/4*.

La mise en culture d'entéroïdes dérivés du modèle murin NCOR1 $\Delta$ E11<sup>ACEI</sup> faciliterait aussi sa caractérisation. Ainsi, dans les conditions de culture des entéroïdes, il serait plus facile d'étudier le rôle prolifératif associé à la perte d'expression de *Ncor1* et ce, avec et sans stress épithélial, afin de comparer si une diminution de prolifération cellulaire est observée de façon similaire aux lignées de cellules de cancer colorectal. Il serait aussi plus simple d'analyser la présence de cellules sénescents dans l'épithélium de côlon suite à un stress. Ainsi, il n'y aurait plus d'interférence entre la préparation histologique des tissus et la  $\beta$ -galactosidase, qui est l'enzyme nécessaire à la détection de la sénescence. Nous pourrions aussi poursuivre la caractérisation du modèle NCOR1 $\Delta$ E11<sup>ACEI</sup> en déterminant la source cellulaire principale de l'expression de *Ncor1* et *Chd8* au niveau du côlon dans les souris contrôles et mutantes. Cela permettrait d'observer si la diminution de *Ncor1* entraîne une diminution d'expression de *Chd8*. Nous pourrions aussi observer si l'expression de *Chd8* change en fonction d'un stress épithélial lors de la perte d'expression de *Ncor1*.

## Conclusion et perspectives générales

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons voulu déterminer l'implication de l'interaction de CHD8 et NCOR1 dans des lignées de cancer colorectal afin de mieux comprendre leurs rôles fonctionnels communs. Nous avons confirmé que cette interaction était présente dans un contexte de lignées de cancer colorectal et que celle-ci implique le domaine RD1 de NCOR1. L'implication de ce domaine nous laisse supposer une participation du complexe de répression de NCOR1, connu pour favoriser la répression transcriptionnelle. En fonction des résultats obtenus et de l'intégration de la littérature, il est possible de croire que le complexe de répression de NCOR1-HDAC3 favoriserait l'activation de la protéine CHD8 par l'intermédiaire d'une protéine pour le moment inconnue dans les cellules de cancer colorectal. Ce serait grâce à l'action du domaine hélicase de CHD8, permettant la stabilité du nucléosome, qu'il serait possible de faciliter la répression transcriptionnelle. L'implication du chromodomaine de CHD8 dans cette mécanistique agirait d'avantage comme maintien du niveau répressif de la transcription. Cependant, il n'est pas établi hors de tout doute que le domaine hélicase et le chromodomaine favorisent la transcription. Pour bien comprendre cette mécanistique, il serait intéressant d'investiguer sur la présence ou non d'une protéine qui pourrait agir en tant qu'intermédiaire entre CHD8 et NCOR1 ainsi que sur sa fonctionnalité dans un contexte de cancer colorectal.

La nature des résultats du transcriptome, établie par séquençage d'ARN dans des cellules de cancer colorectal où l'expression de CHD8 ou de NCOR1 fut diminuée, a suggéré une variété de nouveaux rôles tels que la survie, la migration et la prolifération cellulaire (St-Jean *et al.*, non-publié). Ceci nous laisse croire à une grande variété de mécanismes impliqués dans le mode de répression qu'exerce NCOR1 sur les gènes. Ainsi, une diminution de la prolifération cellulaire lors de la réduction d'expression de CHD8 et NCOR1 corrèle bien avec le fait que NCOR1 est préférentiellement exprimée dans les cellules prolifératives de l'épithélium intestinal (Doyon *et al.*, 2009). Dans le contexte présenté, la réduction intermédiaire de croissance cellulaire lors de la perte d'expression de CHD8, comparativement à celle de NCOR1, est possiblement due à l'action dichotomique de CHD8 et non à la présence de CHD8<sub>s</sub>. Pour bien comprendre quels sont les rôles fonctionnels de CHD8 et NCOR1 dans le cancer colorectal, des ChIPs pour

chacune de ces protéines devront être complétées afin d'établir le profil de liaison commun pour ces régulateurs sur le génome entier.

Finalement, nous avons observé un dérèglement de l'homéostasie de l'épithélium intestinal suite à l'induction du DSS dans un modèle murin invalidé pour *Ncor1* dans l'épithélium intestinal. Il serait possible que ce changement inflammatoire induise chez ces souris un dérèglement au niveau de la régénération épithéliale. Il serait intéressant de comprendre si l'induction d'un stress accentuerait les mécanismes favorisant une diminution de prolifération cellulaire, comme l'on retrouve dans les cellules de cancer colorectal.

## Références

- Adhikary, S., & Eilers, M. (2005). Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 6(8), 635–45.
- Ahnen, D. J. (2011). The American College of Gastroenterology Emily Couric Lecture—the adenoma-carcinoma sequence revisited: has the era of genetic tailoring finally arrived?. *The American Journal of Gastroenterology*, 106(2), 190–198.
- Alenghat, T., Yu, J., & Lazar, M. A. (2006). The N-CoR complex enables chromatin remodeler SNF2H to enhance repression by thyroid hormone receptor. *The EMBO Journal*, 25(17), 3966–74.
- Allen, M. D., Religa, T. L., Freund, S. M. V, & Bycroft, M. (2007). Solution Structure of the BRK Domains from CHD7. *Journal of Molecular Biology*, 371(5), 1135–1140.
- Andrews, F. H., Strahl, B. D., & Kutateladze, T. G. (2016). Insights into newly discovered marks and readers of epigenetic information. *Nature Chemical Biology*, 12(9), 662–668.
- Aoi, Y., Terashima, S., Ogura, M., Nishio, H., Kato, S., & Takeuchi, K. (2008). Roles of nitric oxide (NO) and no synthases in healing of dextran sulfate sodium-induced rat colitis. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 59(2), 315–336.
- Ascierto, P. a, Kirkwood, J. M., Grob, J.-J., Simeone, E., Grimaldi, A. M., Maio, M., Palmieri, G., Testori, A., Marincola, F. M., & Mozzillo, N. (2012). The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *Journal of Translational Medicine*, 10(1), 85.
- Astapova, I. (2016). Role of co-regulators in metabolic and transcriptional actions of thyroid hormone. *Journal of Molecular Endocrinology*.
- Astapova, I., Lee, L. J., Morales, C., Tauber, S., Bilban, M., & Hollenberg, A. N. (2008). The nuclear corepressor, NCoR, regulates thyroid hormone action in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(49), 19544–19549.
- Aydin, ??zge Z., Vermeulen, W., & Lans, H. (2014). ISWI chromatin remodeling complexes in the DNA damage response. *Cell Cycle*.
- Baek, S. H., Ohgi, K. A., Rose, D. W., Koo, E. H., Glass, C. K., & Rosenfeld, M. G. (2002). Exchange of N-CoR corepressor and Tip60 coactivator complexes links gene expression by NF- $\kappa$ B and  $\beta$ -amyloid precursor protein. *Cell*, 110(1), 55–67.
- Barker, N. (2014). Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(1), 19–33.
- Basson, M. A., & van Ravenswaaij-Arts, C. (2015). Functional Insights into Chromatin Remodelling from Studies on CHARGE Syndrome. *Trends in Genetics*.
- Battaglia, S., Maguire, O., & Campbell, M. J. (2010). Transcription factor co-repressors in cancer biology: Roles and targeting. *International Journal of Cancer*.
- Berndt, N., Hamilton, A. D., & Sebt, S. M. (2011). Targeting protein prenylation for cancer therapy. *Nature Reviews. Cancer*, 11(11), 775–91.
- Bevins, C. L., & Salzman, N. H. (2011). Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nature Reviews. Microbiology*, 9(5), 356–368.

- Boyer, L. a, Latek, R. R., & Peterson, C. L. (2004). The SANT domain: a unique histone-tail-binding module? *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 5(2), 158–163.
- Buecher, B., Cacheux, W., Rouleau, E., Dieumegard, B., Mitry, E., & Lièvre, A. (2013). Role of microsatellite instability in the management of colorectal cancers. *Digestive and Liver Disease*.
- Chassaing, B., Aitken, J. D., Malleshappa, M., & Vijay-Kumar, M. (2014). Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Current Protocols in Immunology*, (SUPPL.104).
- Choi, H.-K., Yoo, J.-Y., Jeong, M.-H., Park, S.-Y., Shin, D.-M., Jang, S.-W., Yoon, H.-G., & Choi, K.-C. (2012). Protein Kinase A phosphorylates NCoR to enhance its nuclear translocation and repressive function in human prostate cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*, (October), 1–15.
- Codina, A., Love, J. D., Li, Y., Lazar, M. A., Neuhaus, D., & Schwabe, J. W. R. (2005). Structural insights into the interaction and activation of histone deacetylase 3 by nuclear receptor corepressors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(17), 6009–14.
- Cohen, I., Poręba, E., Kamieniarz, K., & Schneider, R. (2011). Histone modifiers in cancer: friends or foes? *Genes & Cancer*, 2(6), 631–47.
- Crosnier, C., Stamatakis, D., & Lewis, J. (2006). Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nature Reviews. Genetics*, 7(5), 349–59.
- D’Errico, I., & Moschetta, A. (2008). Nuclear receptors, intestinal architecture and colon cancer: An intriguing link. *Cellular and Molecular Life Sciences*.
- Damaschke, N. A., Yang, B., Blute, M. L., Lin, C. P., Huang, W., & Jarrard, D. F. (2014). Frequent disruption of chromodomain helicase DNA-binding protein 8 (CHD8) and functionally associated chromatin regulators in prostate cancer. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 16(12), 1018–27.
- Delmas, V., Stokes, D. G., & Perry, R. P. (1993). A mammalian DNA-binding protein that contains a chromodomain and an SNF2/SWI2-like helicase domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(6), 2414–8.
- Derynck, R., Akhurst, R. J., & Balmain, a. (2001). TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nature Genetics*, 29(2), 117–29.
- Doyon, G., St-Jean, S., Darsigny, M., Asselin, C., & Boudreau, F. (2009). Nuclear receptor co-repressor is required to maintain proliferation of normal intestinal epithelial cells in culture and down-modulates the expression of pigment epithelium-derived factor. *Journal of Biological Chemistry*, 284(37), 25220–25229.
- Eisen, J. A., Sweder, K. S., & Hanawalt, P. C. (1995). Evolution of the SNF2 family of proteins: Subfamilies with distinct sequences and functions. *Nucleic Acids Research*, 23(14), 2715–2723.
- El Marjou, F., Janssen, K. P., Chang, B. H. J., Li, M., Hindie, V., Chan, L., Louvard, D., Chambon, P., Metzger, D., & Robine, S. (2004). Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *Genesis*, 39(3), 186–193.
- Ewing, A. K., Attner, M., & Chakravarti, D. (2007). Novel Regulatory Role for Human Acl1 in Transcriptional Repression of Vitamin D3 Receptor-Regulated Genes.

*Molecular Endocrinology*, 21(8), 1791–1806.

Fang, M., Hutchinson, L., Deng, A., Green, M. R., Luo, J., & Prasanth, S. G. (2016). Common BRAF(V600E)-directed pathway mediates widespread epigenetic silencing in colorectal cancer and melanoma. *Pnas*, 113(5), 1–6.

Fang, M., Ou, J., Hutchinson, L., & Green, M. R. (2014). The BRAF Oncoprotein Functions through the Transcriptional Repressor MAFK to Mediate the CpG Island Methylator Phenotype. *Molecular Cell*, 55(6), 904–915.

Farré, R., & Tack, J. (2013). Food and symptom generation in functional gastrointestinal disorders: physiological aspects. *The American Journal of Gastroenterology*, 108(5), 698–706.

Fearon, E., Cho, K., Nigro, J., Kern, S., Simons, J., Ruppert, J., Preisinger, A., Thomas, G., Kinzler, K., & Et, A. (1990). Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science*, 247(4938), 49–56.

Felsenfeld, G., & Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature*, 421(6921), 448–453.

Fischle, W., Dequiedt, F., Hendzel, M. J., Guenther, M. G., Lazar, M. A., Voelter, W., & Verdin, E. (2002). Enzymatic activity associated with class II HDACs is dependent on a multiprotein complex containing HDAC3 and SMRT/N-CoR. *Molecular Cell*, 9(1), 45–57.

Fishel, R., Lescoe, M. K., Rao, M. R. S., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Garber, J., Kane, M., & Kolodner, R. (1993). The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell*, 75(5), 1027–1038.

Flanagan, J. F., Mi, L.-Z., Chruszcz, M., Cymborowski, M., Clines, K. L., Kim, Y., Minor, W., Rastinejad, F., & Khorasanizadeh, S. (2005). Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail. *Nature*, 438(7071), 1181–5.

Geiersbach, K. B., & Samowitz, W. S. (2011). Microsatellite Instability and Colorectal Cancer. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 135(10), 1269–1277.

Guenther, M. G., Barak, O., & Lazar, M. A. (2001). The SMRT and N-CoR Corepressors Are Activating Cofactors for Histone Deacetylase 3. *Molecular and Cellular Biology*, 21(18), 6091–6101.

Hall, J. A., & Georgel, P. T. (2007). CHD proteins: a diverse family with strong ties. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, 85(4), 463–76.

Hartman, H. B., Yu, J., Alenghat, T., Ishizuka, T., & Lazar, M. A. (2005). The histone-binding code of nuclear receptor co-repressors matches the substrate specificity of histone deacetylase 3. *EMBO Reports*, 6(5), 445–451.

Heinen, C. D. (2016). Mismatch repair defects and Lynch syndrome: The role of the basic scientist in the battle against cancer. *DNA Repair*, 38, 127–134.

Herman, J. G., Umar, a, Polyak, K., Graff, J. R., Ahuja, N., Issa, J. P., Markowitz, S., Willson, J. K., Hamilton, S. R., Kinzler, K. W., Kane, M. F., Kolodner, R. D., Vogelstein, B., Kunkel, T. a, & Baylin, S. B. (1998). Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(12), 6870–5.

Herrera, L., Kakati, S., Gibas, L., Pietrzak, E., & Sandberg, A. A. (1986). Gardner

syndrome in a man with an interstitial deletion of 5q. *American Journal of Medical Genetics*, 25(3), 473–476.

Hodgson, M. C., Astapova, I., Cheng, S., Lee, L. J., Verhoeven, M. C., Choi, E., Balk, S. P., & Hollenberg, A. N. (2005). The androgen receptor recruits nuclear receptor corepressor (N-CoR) in the presence of mifepristone via its N and C termini revealing a novel molecular mechanism for androgen receptor antagonists. *Journal of Biological Chemistry*, 280(8), 6511–6519.

Horlein, A. J., Naar, A. M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., & Glass, C. K. (1995). Ligand independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*, 377(6548), 397–404.

Huang, C., & Wen, B. (2015). "Identification Card": Sites on Histone Modification of Cancer Cell. *Chinese Medical Sciences Journal = Chung-Kuo I Hsüeh K'o Hsüeh Tsa Chih / Chinese Academy of Medical Sciences*, 30(4), 203–9.

Iizuka, M., & Konno, S. (2011). Wound healing of intestinal epithelial cells. *World Journal of Gastroenterology*, 17(17), 2161–2171.

Ishihara, K., Oshimura, M., & Nakao, M. (2006). CTCF-Dependent Chromatin Insulator Is Linked to Epigenetic Remodeling. *Molecular Cell*, 23(5), 733–742.

Ivanov, I., Lo, K. C., Hawthorn, L., Cowell, J. K., & Ionov, Y. (2006). Identifying candidate colon cancer tumor suppressor genes using inhibition of nonsense-mediated mRNA decay in colon cancer cells. *Oncogene*, 26(20), 2873–2884.

Jen, J., Kim, H., Piantadosi, S., Liu, Z. F., Levitt, R. C., Sistonen, P., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Hamilton, S. R. (1994). Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *The New England Journal of Medicine*, 331(4), 213–221.

Jepsen, K., Hermanson, O., Onami, T. M., Gleiberman, A. S., Lunyak, V., McEvelly, R. J., Kurokawa, R., Kumar, V., Liu, F., Seto, E., Hedrick, S. M., Mandel, G., Glass, C. K., Rose, D. W., & Rosenfeld, M. G. (2000). Combinatorial roles of the nuclear receptor corepressor in transcription and development. *Cell*, 102(6), 753–763.

Kim, M. S., Chung, N. G., Kang, M. R., Yoo, N. J., & Lee, S. H. (2011). Genetic and expressional alterations of CHD genes in gastric and colorectal cancers. *Histopathology*, 58(5), 660–668.

Kobayashi, M., Kishida, S., Fukui, A., Michiue, T., Miyamoto, Y., Okamoto, T., Yoneda, Y., Asashima, M., & Kikuchi, A. (2002). Nuclear localization of Duplin, a beta-catenin-binding protein, is essential for its inhibitory activity on the Wnt signaling pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(8), 5816–5822.

Kolla, V., Zhuang, T., Higashi, M., Naraparaju, K., & Brodeur, G. M. (2014). Role of CHD5 in human cancers: 10 years later. *Cancer Research*.

Komiya, Y., & Habas, R. (2008). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*, 4(2), 68–75.

Kruusvee, V., Lyst, M. J., Taylor, C., Tarnauskaitė, Ž., Bird, A. P., & Cook, A. G. (2017). Structure of the MeCP2-TBLR1 complex reveals a molecular basis for Rett syndrome and related disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(16), E3243–E3250.

- Kurita, H., Schnekenburger, M., Ovesen, J. L., Xia, Y., & Puga, A. (2014). The ah receptor recruits IKK?? to its target binding motifs to phosphorylate serine-10 in histone H3 required for transcriptional activation. *Toxicological Sciences*, *139*(1), 121–132.
- Kwong, L. N., & Dove, W. F. (2009). APC and its modifiers in colon cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *656*, 85–106.
- Lausen, J., Cho, S., Liu, S., & Werner, M. H. (2004). The nuclear receptor co-repressor (N-CoR) utilizes repression domains I and III for interaction and co-repression with ETO. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(47), 49281–49288.
- Lawrence, M., Daujat, S., & Schneider, R. (2016). Lateral Thinking: How Histone Modifications Regulate Gene Expression. *Trends in Genetics*.
- Leoni, G., Neumann, P.-A., Sumagin, R., Denning, T. L., & Nusrat, A. (2015). Wound repair: role of immune–epithelial interactions. *Mucosal Immunology*, *8*(5), 959–968.
- Lutterbach, B., Westendorf, J. J., Linggi, B., Patten, A., Moniwa, M., Davie, J. R., Huynh, K. D., Bardwell, V. J., Lavinsky, R. M., Rosenfeld, M. G., Glass, C., Seto, E., & Hiebert, S. W. (1998). ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, interacts with the N-CoR and mSin3 corepressors. *Molecular and Cellular Biology*, *18*(12), 7176–84.
- MacDonald, B. T., Tamai, K., & He, X. (2009). Wnt/??-Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Developmental Cell*.
- Malo, M. S., Zhang, W., Alkhoury, F., Pushpakaran, P., Abedrapo, M. a, Mozumder, M., Fleming, E., Siddique, A., Henderson, J. W., & Hodin, R. a. (2004). Thyroid hormone positively regulates the enterocyte differentiation marker intestinal alkaline phosphatase gene via an atypical response element. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *18*(8), 1941–62.
- Marfella, C. G. A., & Imbalzano, A. N. (2007). The Chd family of chromatin remodelers. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *618*(1–2), 30–40.
- Margueron, R., Trojer, P., & Reinberg, D. (2005). The key to development: Interpreting the histone code? *Current Opinion in Genetics and Development*.
- McCauley, H. A., & Guasch, G. (2015). Three cheers for the goblet cell: Maintaining homeostasis in mucosal epithelia. *Trends in Molecular Medicine*.
- Meira, L. B., Bugni, J. M., Green, S. L., Lee, C.-W., Pang, B., Borenshtein, D., Rickman, B. H., Rogers, A. B., Moroski-Erkul, C. A., McFaline, J. L., Schauer, D. B., Dedon, P. C., Fox, J. G., & Samson, L. D. (2008). DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, *118*(7), 2516–25.
- Micucci, J. a., Sperry, E. D., & Martin, D. M. (2015). Chromodomain Helicase DNA-Binding Proteins in Stem Cells and Human Developmental Diseases. *Stem Cells and Development*, *24*(8), 917–926.
- Mottis, A., Mouchiroud, L., & Auwerx, J. (2013). Emerging roles of the corepressors NCoR1 and SMRT in homeostasis. *Genes and Development*.
- Mundade, R., Imperiale, T. F., Prabhu, L., Loehrer, P. J., & Lu, T. (2014). Genetic pathways, prevention, and treatment of sporadic colorectal cancer. *Oncoscience*, *1*(6), 400–6.

- Nagy-Szakal, D., Mir, S. A. V., Harris, R. A., Dowd, S. E., Yamada, T., Lacorazza, H. D., Tatevian, N., Smith, C. W., De Zoeten, E. F., Klein, J., & Kellermayer, R. (2015). Loss of n-6 fatty acid induced pediatric obesity protects against acute murine colitis. *FASEB Journal*, *29*(8), 3151–3159.
- Nishisho, I., Nakamura, Y., Miyoshi, Y., Miki, Y., Ando, H., Horii, A., Koyama, K., Utsunomiya, J., Baba, S., Hedge, P., Markham, A., Krush, A. J., Petersen, G., Hamilton, S. R., Nilbert, M. C., Levy, D. B., Bryan, T. M., Preisinger, A. C., Smith, K. J., et al. (1991). Mutations of Chromosome-5q21 Genes in Fap and Colorectal-Cancer Patients. *Science*, *253*(5020), 665–669.
- Nishiyama, M., Nakayama, K. K. I., Tsukiyama, T., Kikuchi, A., & Tsunematsu, R. (2004). Early Embryonic Death in Mice Lacking the  $\beta$ -Catenin-Binding Protein Duplin. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(19), 8386–8394.
- Nishiyama, M., Oshikawa, K., Tsukada, Y., Nakagawa, T., Iemura, S., Natsume, T., Fan, Y., Kikuchi, A., Skoultchi, A. I., & Nakayama, K. I. (2009). CHD8 suppresses p53-mediated apoptosis through histone H1 recruitment during early embryogenesis. *Nature Cell Biology*, *11*(2), 172–82.
- Nishiyama, M., Skoultchi, A. I., & Nakayama, K. I. (2012). Histone H1 recruitment by CHD8 is essential for suppression of the Wnt- $\beta$ -catenin signaling pathway. *Molecular and Cellular Biology*, *32*(2), 501–12.
- Oberoi, J., Fairall, L., Watson, P. J., Yang, J.-C., Czimmerer, Z., Kampmann, T., Goult, B. T., Greenwood, J. A., Gooch, J. T., Kallenberger, B. C., Nagy, L., Neuhaus, D., & Schwabe, J. W. R. (2011). Structural basis for the assembly of the SMRT/NCoR core transcriptional repression machinery. *Nature Structural & Molecular Biology*, *18*(2), 177–184.
- Ogawa, S., Lozach, J., Jepsen, K., Sawka-Verhelle, D., Perissi, V., Sasik, R., Rose, D. W., Johnson, R. S., Rosenfeld, M. G., & Glass, C. K. (2004). A nuclear receptor corepressor transcriptional checkpoint controlling activator protein 1-dependent gene networks required for macrophage activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(40), 14461–14466.
- Pennington, K. L., & DeAngelis, M. M. (2015). Epigenetic Mechanisms of the Aging Human Retina. *Journal of Experimental Neuroscience*, *9*(Suppl 2), 51–79.
- Perissi, V., Scafoglio, C., Zhang, J., Ohgi, K. A., Rose, D. W., Glass, C. K., & Rosenfeld, M. G. (2008). TBL1 and TBLR1 Phosphorylation on Regulated Gene Promoters Overcomes Dual CtBP and NCoR/SMRT Transcriptional Repression Checkpoints. *Molecular Cell*, *29*(6), 755–766.
- Peters, J. M., Hollingshead, H. E., & Gonzalez, F. J. (2009). Role of peroxisome-proliferator-activated receptor  $\beta/\delta$  (PPAR $\beta/\delta$ ) in gastrointestinal tract function and disease Jeffrey. *Clinical Science*, *115*(4), 107–127.
- Peters, J. M., Morales, J. L., & Gonzalez, F. J. (2011). Modulation of gastrointestinal inflammation and colorectal tumorigenesis by peroxisome proliferator-activated receptor- $\beta/\delta$  (PPAR $\beta/\delta$ ). *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*.
- Pino, M. S., & Chung, D. C. (2010). The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer. *Gastroenterology*, *138*(6), 2059–2072.
- Piscaglia, A. C. (2014). Intestinal stem cells and celiac disease. *World Journal of Stem Cells*, *6*(2), 213–29.

- Powell, S. M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T. M., Hamilton, S. R., Thibodeau, S. N., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1992). APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*, *359*(6392), 235–237.
- Rezza, A., Sennett, R., & Rendl, M. (2014). Adult Stem Cell Niches. Cellular and Molecular Components. *Current Topics in Developmental Biology*, *107*, 333–372.
- Rodríguez-Paredes, M., Ceballos-Chávez, M., Esteller, M., García-Domínguez, M., & Reyes, J. C. (2009). The chromatin remodeling factor CHD8 interacts with elongating RNA polymerase II and controls expression of the cyclin E2 gene. *Nucleic Acids Research*, *37*(8), 2449–2460.
- Roessner, A., Kuester, D., Malfertheiner, P., & Schneider-Stock, R. (2008). Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. *Pathology Research and Practice*, *204*(7), 511–524.
- Rothenberg, M. E., Nusse, Y., Kalisky, T., Lee, J. J., Dalerba, P., Scheeren, F., Lobo, N., Kulkarni, S., Sim, S., Qian, D., Beachy, P. A., Pasricha, P. J., Quake, S. R., & Clarke, M. F. (2012). Identification of a cKit + colonic crypt base secretory cell that supports Lgr5 + stem cells in mice. *Gastroenterology*, *142*(5).
- Rustgi, A. K. (2007). The genetics of hereditary colon cancer. *Genes and Development*.
- Sakamoto, I., Kishida, S., Fukui, A., Kishida, M., Yamamoto, H., Hino, S., Michiue, T., Takada, S., Asashima, M., & Kikuchi, A. (2000). A novel beta-catenin-binding protein inhibits beta-catenin-dependent Tcf activation and axis formation. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(42), 32871–32878.
- Salovaara, R., Roth, S., Loukola, A., Launonen, V., Sistonen, P., Avizienyte, E., Kristo, P., Järvinen, H., Souchelnytskyi, S., Sarlomo-Rikala, M., & Aaltonen, L. A. (2002). Frequent loss of SMAD4/DPC4 protein in colorectal cancers. *Gut*, *51*(1), 56–59.
- Sato, T., van Es, J. H., Snippert, H. J., Stange, D. E., Vries, R. G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N. F., van de Wetering, M., & Clevers, H. (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature*, *469*(7330), 415–418.
- Schnetz, M. P., Bartels, C. F., Shastri, K., Balasubramanian, D., Zentner, G. E., Balaji, R., Zhang, X., Song, L., Wang, Z., Laframboise, T., Crawford, G. E., & Scacheri, P. C. (2009). Genomic distribution of CHD7 on chromatin tracks H3K4 methylation patterns. *Genome Research*, *19*(4), 590–601.
- Shen, L., Toyota, M., Kondo, Y., Lin, E., Zhang, L., Guo, Y., Hernandez, N. S., Chen, X., Ahmed, S., Konishi, K., Hamilton, S. R., & Issa, J.-P. J. (2007). Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(47), 18654–9.
- Singleton, M. R., Dillingham, M. S., & Wigley, D. B. (2007). Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Annual Review of Biochemistry*, *76*, 23–50.
- Souza, D. G., Vieira, A. T., Pinho, V., Sousa, L. P., Andrade, A. A., Bonjardim, C. A., McMillan, M., Kahn, M., & Teixeira, M. M. (2005). NF-kappaB plays a major role during the systemic and local acute inflammatory response following intestinal reperfusion injury. *Br J Pharmacol*, *145*(2), 246–254.
- Stephens, P. J., Tarpey, P. S., Davies, H., Van Loo, P., Greenman, C., Wedge, D. C.,

- Nik-Zainal, S., Martin, S., Varela, I., Bignell, G. R., Yates, L. R., Papaemmanuil, E., Beare, D., Butler, A., Cheverton, A., Gamble, J., Hinton, J., Jia, M., Jayakumar, A., et al. (2012). The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature*, *486*(7403), 400–4.
- Stevenson, C. S., Marshall, L. A., & Morgan, D. W. (2006). *In vivo models of inflammation* (Vol. 2). Springer Science & Business Media.
- Sturm, A., & Dignass, A. U. (2008). Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, *14*(3), 348–353.
- Subtil-Rodríguez, A., Vázquez-Chávez, E., Ceballos-Chávez, M., Rodríguez-Paredes, M., Martín-Subero, J. I., Esteller, M., & Reyes, J. C. (2014). The chromatin remodeller CHD8 is required for E2F-dependent transcription activation of S-phase genes. *Nucleic Acids Research*, *42*(4), 2185–2196.
- Sun, G., & Shi, Y.-B. (2012). Thyroid hormone regulation of adult intestinal stem cell development: mechanisms and evolutionary conservations. *International Journal of Biological Sciences*, *8*(8), 1217–1224.
- Tahara, T., Yamamoto, E., Madireddi, P., Suzuki, H., Maruyama, R., Chung, W., Garriga, J., Jelinek, J., Yamano, H. O., Sugai, T., Kondo, Y., Toyota, M., Issa, J. P. J., & Estécio, M. R. H. (2014). Colorectal carcinomas with CpG island methylator phenotype 1 frequently contain mutations in chromatin regulators. *Gastroenterology*, *146*(2).
- Universalis, E., & Articles, L. G. (2015). *Appareil digestif (Les Grands Articles d'Universalis)*. Encyclopaedia Universalis.
- Walther, A., Johnstone, E., Swanton, C., Midgley, R., Tomlinson, I., & Kerr, D. (2009). Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nature Reviews. Cancer*, *9*(7), 489–99.
- Wang, S., Liu, Z., Wang, L., & Zhang, X. (2009). NF-kappaB signaling pathway, inflammation and colorectal cancer. *Cellular & Molecular Immunology*, *6*(5), 327–34.
- Watson, P. J., Fairall, L., & Schwabe, J. W. R. (2012). Nuclear hormone receptor co-repressors: Structure and function. *Molecular and Cellular Endocrinology*.
- Webb, P., Anderson, C. M., Valentine, C., Nguyen, P., Marimuthu, a, West, B. L., Baxter, J. D., & Kushner, P. J. (2000). The nuclear receptor corepressor (N-CoR) contains three isoleucine motifs (I/LXXII) that serve as receptor interaction domains (IDs). *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *14*(12), 1976–1985.
- Xu, H. E., Stanley, T. B., Montana, V. G., Lambert, M. H., Shearer, B. G., Cobb, J. E., McKee, D. D., Galardi, C. M., Plunket, K. D., Nolte, R. T., Parks, D. J., Moore, J. T., Kliewer, S. A., Willson, T. M., & Stimmel, J. B. (2002). Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPARalpha. *Nature*, *415*(6873), 813–7.
- Yamagishi, H., Kuroda, H., Imai, Y., & Hiraishi, H. (2016). Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers. *Chinese Journal of Cancer*.
- Yamamoto, H., Sawai, H., & Perucho, M. (1997). Frameshift somatic mutations in gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cancer Research*, *57*(19), 4420–4426.
- Yamamoto, H., Williams, E. G., Mouchiroud, L., Cantó, C., Fan, W., Downes, M.,

- Héligon, C., Barish, G. D., Desvergne, B., Evans, R. M., Schoonjans, K., & Auwerx, J. (2011). NCoR1 is a conserved physiological modulator of muscle mass and oxidative function. *Cell*, *147*(4), 827–839.
- Yamashina, K., Yamamoto, H., Chayama, K., Nakajima, K., & Kikuchi, A. (2006). Suppression of STAT3 activity by Duplin, which is a negative regulator of the Wnt signal. *Journal of Biochemistry*, *139*(2), 305–314.
- Yan, Y., Kolachala, V., Dalmasso, G., Nguyen, H., Laroui, H., Sitaraman, S. V., & Merlin, D. (2009). Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. *PLoS ONE*, *4*(6).
- Yoon, H. G., Chan, D. W., Huang, Z. Q., Li, J., Fondell, J. D., Qin, J., & Wong, J. (2003). Purification and functional characterization of the human N-CoR complex: The roles of HDAC3, TBL1 and TBLR1. *EMBO Journal*, *22*(6), 1336–1346.
- Yu, J., Li, Y., Ishizuka, T., Guenther, M. G., & Lazar, M. A. (2003). A SANT motif in the SMRT corepressor interprets the histone code and promotes histone deacetylation. *EMBO Journal*, *22*(13), 3403–3410.
- Zhang, J., Kalkum, M., Chait, B. T., & Roeder, R. G. (2002). The N-CoR-HDAC3 nuclear receptor corepressor complex inhibits the JNK pathway through the integral subunit GPS2. *Molecular Cell*, *9*(3), 611–623.

## Annexes

### Liste des séquences utilisées pour la construction des protéines recombinantes associées à chacun des domaines de la protéine NCOR1 :

NCOR1\_RD1\_V5:

Structure: pcDNA3-**ECORV**-**kosak**-**atg**-**V5**-RD1-**TGA**-**NotI**-pcDNA3

5'-**GATATCACCATGGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACG**  
TCAAGTTCAGGTTATCCTCCCAACCAAGGAGCATTACAGCACAGAACAAAGTCGTTATCCTCC  
TCACTCTGTCCAGTATACATTTCCCAACACCCGCCACCAGCAGGAGTTTCGCAGTCCCTGATT  
ATCGTTCCCTCTCATCTTGAAGTGAGTCAGGCATCACAGCTTTTGCAGCAACAGCAGCAGCAA  
CAGCTTCGAAGGCGACCTTCCTTGCTTTTCAAGATTTTACCCAGGTTCTGACAGGCCTCAAGA  
AAGGAGAAGTAGTTATGAACCGTTTCATCCAGGCCATCCCCAGTGGATCATGATTCACTGG  
AATCGAAGCGACCACGTCTGGAACAGGTTTCTGATTCTCATTTTTCAGCGTGTGAGTGTGCG  
GTTTTGCCTTTAGTGCACCCGCTGCCAGAAGGGCTGAGGGCTTCTGCAGATGCTAAGAAGGA  
TCCAGCATTTCGGAGGCAAACATGAAGCTCCATCCTCTCCAATTTTCGGGGCAACCATGTGGAG  
ATGATCAAAATGCTTCACCTTCAAAACTCTCAAAGGAAGAGTTAATACAGAGTATGGATCG  
TGTAGATCGAGAAATTGCAAAAGTAGAACAGCAGATCCTTAAACTGAAAAAGAAACAACA  
ACAGCTTGAAGAAGAGGCAGCTAAACCTCCTGAGCCTGAGAAGCCCGTGTCCCCTCCTCCT  
GTGGAGCAGAAACACCGCAGTATTGTCCAAATTATTTATGATGAGAATCGGAAAAAAGCAG  
AAGAAGCTCATAAAATTTTTGAAGGTCTTGGCCAAAAAGTTGAACTGCCACTGTATAACCAG  
CCATCAGATACCAAGGTGTACCATGAGAACATCAAGACAAACCAGGTGATGAGGAAAAAA  
CTCATTTTATTTTTTAAAAGAAGAAATCATGCAAGAAAACAAAGGGAACAAAAAATCTGCC  
AGCGTTATGATCAGCTCATGGAGGCATGGGAGAAAAAAGTGGACAGAATAGAAAATAATC  
CTCGGAGGAAAGCTAAAGAAAGCAAAACAAGGGAATACTATGAAAAGCAGTTTCCAGAAA  
TTCGAAAACAAAGAGAACAGCAAGAAAGATTTTCAGCGAGTTGGGCAGAGGGGAGCTGGTC  
TTTCAGCCACCATTGCTAGGAGTGAGCATGAGATTTCTGAAATTATTGATGGGCTCTCTGAG  
CAGGAGAATAATGAGAAACAAT**TGAGCGGCCGC**-3'

NCOR1\_SANT\_V5

Structure: pcDNA3-**ECORV**-**kosak**-**atg**-**V5**-SANT-**TGA**-**NotI**-pcDNA3

5'-**GATATCACCATGGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACG**  
CGGCAGCTCTCTGTGATTCCACCTATGATGTTTGTATGCAGAACAAAGACGAGTCAAGTTCAT  
TAACATGAATGGGCTTATGGAGGACCCTATGAAAGTGTATAAAGATAGGCAGTTTATGAAT  
GTTTGGACTGACCATGAAAAGGAGATCTTTAAGGACAAGTTTATCCAGCATCCAAAAAACT  
TTGGACTAATTGCATCATACTTGGAGAGGAAGAGTGTTCCTGATTGTGTTTTGTATTACTATT  
TAACCAAGAAAAATGAGAATTATAAAGCCCTCGTCAGAAGGAATTATGGGAAACGCAGAG  
GCAGAAACCAGCAAATGCTCGACCCTCGCAAGAAGAAAAAGTAGAAGAAAAAGAAAGAGG  
ATAAAGCAGAAAAACAGAAAAAAGAAGAAGAAAAAGAAAGATGAAGAGGAAAAAGAT  
GAAAAAGAAGACTCCAAAGAAAATACCAAGGAAAAGGACAAGATAGATGGTACAGCAGAA  
GAAACTGAGGAAAGAGAGCAAGCCACACCCCGGGGCGAAAGACTGCCAACAGTCCAGGGC  
CGCCGTAAGGGCCGGATCACCAGGTCCATGACAACGAAGCTGCAGTGCAGTGCAGTGTGCGC  
CCGAGCGGCTACTGAAGAGCCCCACCACCTCTGCCACCGCCACCAGAACCCATTTCTACA  
GAGCCTGTGGAGACCTCTCGATGGACAGAAGAAGAAATGGAAGTTGCTAAAAAAGGTCTAG  
TAGAACATGGTTCGTAACCTGGGCAGCAATTGCTAAAATGGTGGGAACGAAAAGTGAAGCTCA  
ATGTA AAAACTTCTATTTTAACTATAAAAAGGCGACACAATCTTGACAACCTCTTACAGCAGC  
ATAAACAGAAAACCTTACGAAAACCTCGTGAAGAGCGAGATGTGTCTCAATGTGAAAGTGT  
CGCTTCCACTGTTTCTGCTCAGGAG**TGAGCGGCCGC**-3'

## NCOR1\_RD2-3\_V5:

Structure: pcDNA3-**ECORV**-**kosak**-**atg**-**V5**-RD2/3-**TGA**-**NotI**-pcDNA3

5'-**GATATCACCATGGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACG**  
 GATGAAGATATTGAAGCCTCCAATGAAGAAGAAAATCCAGAAGACAGCGAAGTTGAAGCT  
 GTCAAGCCCAGCGAGGACAGTCCTGAAAATGCTACTTCTCGAGGAAACACAGAACCTGCGG  
 TTGAGCTTGAGCCCACCACGAAACTGCACCCAGTACATCTCCCTCCTTAGCAGTTCCAAGT  
 ACAAACCAGCTGAAGATGAAAGTGTGGAGACCCAGGTGAATGACAGCATCAGTGCTGAG  
 ACAGCAGAGCAGATGGATGTAGATCAGCAGGAGCACAGTGCTGAAGAGGGTTCTGTTTGTG  
 ATCCCCACCCGCTACCAAAGCTGACTCTGTGGACGTTGAAGTGAGGGTGCCAGAAAACCA  
 TGCATCTAAAGTTGAAGGTGATAATACCAAAGAAAGAGACTTGGATAGAGCCAGTGAGAAG  
 GTGGAACCTAGAGATGAAGATTTGGTGGTAGCTCAGCAAATAAATGCCCAAAGGCCCGAGC  
 CCCAGTCAGACAATGATTCCAGTGCCACGTGCAGCGCTGATGAGGATGTGGATGGAGAGCC  
 AGAGAGGCAGAGAATGTTTCCTATGGACTCAAAGCCTTCACTGTAAACCCCACTGGATCTA  
 TACTCGTCTCATCTCCGTTAAACCAAATCCACTGGATCTGCCACAGCTTCAGCATCGAGCT  
 GCTGTTATCCCACCAATGGTATCCTGCACCCCATGTAACATACCAATTGGAACCCCACTGAG  
 CGGCTATGCTCTCTACCAGCGACACATTAAGCAATGCATGAGTCAGCACTCCTGGAGGAG  
 CAGCGGCAGAGACAAGAACAGATAGATTTGGAATGTAGAAGTTCTACAAGTCCATGTGGCA  
 CATCCAAGAGTCCAAACAGAGAGTGGGAAGTCTTCAGCCTGCTCCACATCAAGTGATAAC  
 TAATCTCCCTGAAGGCGTTCGGCTTCCGACAACTCGACCAACCAGGCCACCGCCCCCTCTCA  
 TCCCGTCATCCAAAACACAGTGGCTTCAGAAAAACCATCTTTTATAATGGGAGGCTCCATC  
 TCACAGGGAACACCAGGCACTTATTTGACTTCTCATAATCAGGCTTCTCACTCAAGAAAC  
 ACCCAAGCCGTCAGTGGGATCTATCTCTCTTGGACTGCCACGGCAACAGGAATCTGCCAAAT  
 CAGCTACTTTGCCCTACATCAAGCAGGAAGAATTTTCTCCCCGAAGCCAAAACCTCACAACCT  
 GAGGGTCTGTTGGTCAGGGCCCAACATGAAGGTGTAGTCAGAGGTACCGCAGGAGCCATAC  
 AAGAAGGAAGTATAACTCGGGGAACTCCAACCAGCAAAAATTCAGTGGAGAGCATTCCATC  
 CCTACGGGGCTCTACTCAGGGCACCCCGGCTCTGCCCCAGACTGGCATAACCAACAGAG  
 GCTTTGGTGAAGGGTCCATTTGAGAATGCCATTGAAGACAGCAGTCCCTGAGAAAGGCA  
 GAGAGGAAGCTGCATCCAAAGGCCATGTTATTTATGAAGGCAAAAAGTGGACATATCTTGTC  
 ATATGATAATATTAAGAATGCCCGAGAAGGGACTAGGAGTCCAAGAACAGCTCATGAAATC  
 AGTTTAAAGAGAT**TGAGCGGCCGC**-3'

## NCOR1\_middle\_V5:

Structure: pcDNA3-**ECORV**-**kosak**-**atg**-**V5**-Middle-**TGA**-**NotI**-pcDNA3

5'-**GATATCACCATGGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACG**  
 AGCTATGAATCAGTGGAAAGGAAATATAAAGCAAGGGATGTCAATGAGGGAGTCTCCTGTAT  
 CAGCACCGTTAGAGGGGCTGATATGCCGAGCATTACCCAGGGGGAGTCTCATTCTGACCTC  
 AAAGAAAGGACTGTATTGTCTGGCTCCATAATGCAGGGGACACCAAGAGCAACAACCTGAAA  
 GCTTTGAAGATGGCCTTAAATATCCCAAACAAATTAAGGGAAAGTCTCCCATACGAGC  
 ATTTGAAGGTGCCATTACCAAAGGAAAACCATATGATGGCATCACCACCATCAAAGAAATG  
 GGGCGTTCCATTCATGAGATTCCAAGGCAAGATATTTTAACTCAGGAAAGTCGGAAAACCTC  
 CAGAAGTGGTCCAGAGCACACGGCCGATAATTGAGGGTTCATTTCCAGGGCACACCAAT  
 AAAGTTTGACAACAACCTCAGGTCAATCTGCCATCAAACACAATGTCAAATCCTTAATCACGG  
 GGCTAGCAAACCTATCCCGTGAATGCCTCCGCTGGAATTTGTGCCAGAGAACATAAAAAGT  
 GGTAGAACGGGGAAAATATGAGGATGTGAAAGCAGGCGAGACCGTGCGTTCCCGGCACAC  
 GTCAGTGGTAAGCTCTGGCCCCTCCGTTCTTAGGTCCCACTGCATGAAGCTCCCAAAGCAC  
 AACTGAGCCCTGGGATTTATGATGACACCAGTGCACGGAGGACCCCTGTGAGTTATCAAAA  
 CACCATGTCCAGAGGCTCACCCATGATGAACAGAACTTCTGATGTTACAATTTCTTCTAACA

AGTCTACCAATCATGAAAGGAAATCGACACTGACCCCTACCCAGAGGGAAAGTATCCCAGC  
 GAAGTCTCCAGTGCCTGGGGTGGACCCTGTCGTGAGCCACAGTCCGTTTGATCCCCATCACA  
 GAGGCAGCACTGCAGGCGAGGTTTATCGGAGCCACCTGCCACGCACCTTGGATCCAGCCAT  
 GCCTTTTCACAGGGCTTTGGATCCTGCAGCGGCTGCTTACCTGTTTCAGAGACAGCTTTACCC  
 AACTCCAGGTTACCCAAGTCAGTATCAGCTTTACGCAATGGAGAACACAAGACAGACAATC  
 TTAAATGATTACATTACCTCACAACAGATGCAAGTGAAGTGGCGTCCAGATGTGGCCAGAG  
 GACTCTCCCAAGAGAGCAGCCACTGGGTCTCCCATACCCAGCAACGAGAGGAATCATTGA  
 CCTGACCAATATGCCTCCAACAATTTAGTGCCTCATCCAGGGGGAACAAGCACTCCTCCCA  
 TGGACAGAATCACTTATATTCCTGGTACACAGATTACTTTCCCTCCAGGCCGTACAACCTCT  
 GCTTCCATGTCTCCAGGACACCCAACACACCTTGCAGCTGCTGCAAGTGTGAGAGGGAAAC  
 GGGAACGGGAGCGGGAGAAGGAGCGGGAGCGGGAACGGATTGCTGCAGCTTCTCCGACC  
 TCTACCTGCGGCCAGGCTCAGAACAGCCTGGCCGACCTGGCAGTCATGGATATGTTTCGCTCC  
 CCTTCCCCTCAGTAAGAAGTCAAGGAGACCATGTTGCAACAGAGACCCAGTGTTCCTCAAGG  
 AACCAATGGAACCAGTGTAATCACACCTTTGGATCCAACCTGCTCAGCTACGAATCATGCCAC  
 GCCTGCTGGGGGCCCTTCAATAAGCCAAGGCCTGCCATGAGCGGCCGC-3'

NCOR1\_RID1-2-3\_V5:

Structure: pcDNA3-**ECORV**-**kosak**-**atg**-**V5**-RID1/2/3-**TGA**-**NotI**-pcDNA3

5'-**GATATCACCATGGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACG**  
 GCCTCCCGTTACAACACTGCTGCGGATGCCCTGGCTGCTCTTGTGGATGCTGCAGCTTCTGC  
 ACCCCAGATGGATGTGTCCAAAACAAAAGAGAGTAAGCATGAAGCTGCCAGGTTAGAAGA  
 AAATTTGAGAAGCAGGTCAGCAGCAGTTAGTGAACAGCAGCAGCTAGAGCAGAAAACCCT  
 GGAGGTGGAGAAGAGATCTGTTCAAGTGTATACACTTCTTCAGCCTTTCCAAGTGGCAAGC  
 CCCAGCCTCATTCTCAGTAGTTTATTCTGAGGCTGGGAAAGATAAAGGGCCTCCTCCAAAA  
 TCCAGATATGAGGAAGAGCTAAGGACCAGAGGGAAAGACTACCATTACTGCAGCTAACTTCA  
 TAGACGTGATCATCACCCGGCAAATGCTCAGGACAAGGATGCGAGGGAAACGTGGCTCTCA  
 AAGTTCAGACTCTTCTAGTAGCTTATCTTCTCACAGGTATGAAACACCTAGCGATGCTATTG  
 AGGTGATAAGTCCAGCTCACCTGCGCCACCCAGGAGAACTGCAGACCTATCAGCC  
 AGAGGTTGTTAAGGCAAATCAAGCGGAAAATGATCCTACCAGACAATATGAAGGACCATTA  
 CATCACTATCGACCACAGCAGGAATCACCATCTCCCAACAACAGCTGCCCCCTTCTTACA  
 GGCAGAGGGAAATGGGGCAAGTGCCAGGACCCATCGGCTGATCACACTTGTGATCACATC  
 TGTCAAATTATCACACAAGATTTTGCTAGAAAATCAAGTTTCTCGCAGACTCCCCAGCAGCC  
 TCCTACTTCTACATTCCAGAAGTCACTTCTGCTTTGGTATCTACACCTGTGAGGACTAAAAC  
 ATCAAACCGTTACAGCCCAGAATCCCAGGCTCAGTCTGTCCATCATCAAAGACCAGGTTCAA  
 GGGTCTCTCCAGAAAATCTTGTGGACAAATCCAGGGGAAGTAGGCCTGGAAAATCCCAGA  
 GAGGAGTCAGTCTCTTCGGAGCCCTACGAGCCATCTCCCACCCAGGTTCCGGTTGTGC  
 ATGAGAAACAGGACAGCTTGTGCTCTTGTCTCAGAGGGGCGCAGAGCCTGCAGAGCAGAG  
 GAATGATGCCCGCTCACCAGGGAGTATAAGTACTTGCCTTCATTCTTACCAAGCTTGAAA  
 ATACATCACCCATGGTTAAATCAAAGAAGCAGGAGATTTTCGTAAGTTGAACTCCTCTGGT  
 GGAGGTGACTCTGATATGGCAGCTGCTCAGCCAGGAACTGAGATCTTTAATCTGCCAGCAGT  
 TACTACGTCAGGCTCAGTTAGCTCTAGAGGCCATCTTTTGCTGATCCTGCCAGTAATCTTGG  
 GCTGGAAGACATTATCAGGAAGGCTCTCATGGGAAGCTTTGATGACAAAGTTGAGGATCAT  
 GGAGTTGTCATGTCCCAGCCTATGGGAGTAGTGCCTGGTACTGCCAACACCTCAGTTGTGAC  
 CAGTGGTGAGACACGAAGAGAGGAAGGGGACCCATCACCTCATTGAGGAGGTTTGCAA  
 ACCAAAGCTGATCAGCAAGTCAAACAGCAGGAAATCTAAGTCTCCTATACCTGGGCAAGGC  
 TACTTAGGAACGGAACGGCCCTTTCAGTCTCCTCTGTACATTGAGAAGGGGATTACCATAG  
 GCAGACGCCAGGTTGGGCCTGGGAAGACAGGCCCTTCAACAGGCTCAACTCAGTTTCTT  
 TATAACCCTCTGACTATGCGGATGCTCAGCAGTACTCCACCAACACCGATTGCATGTGCTCC

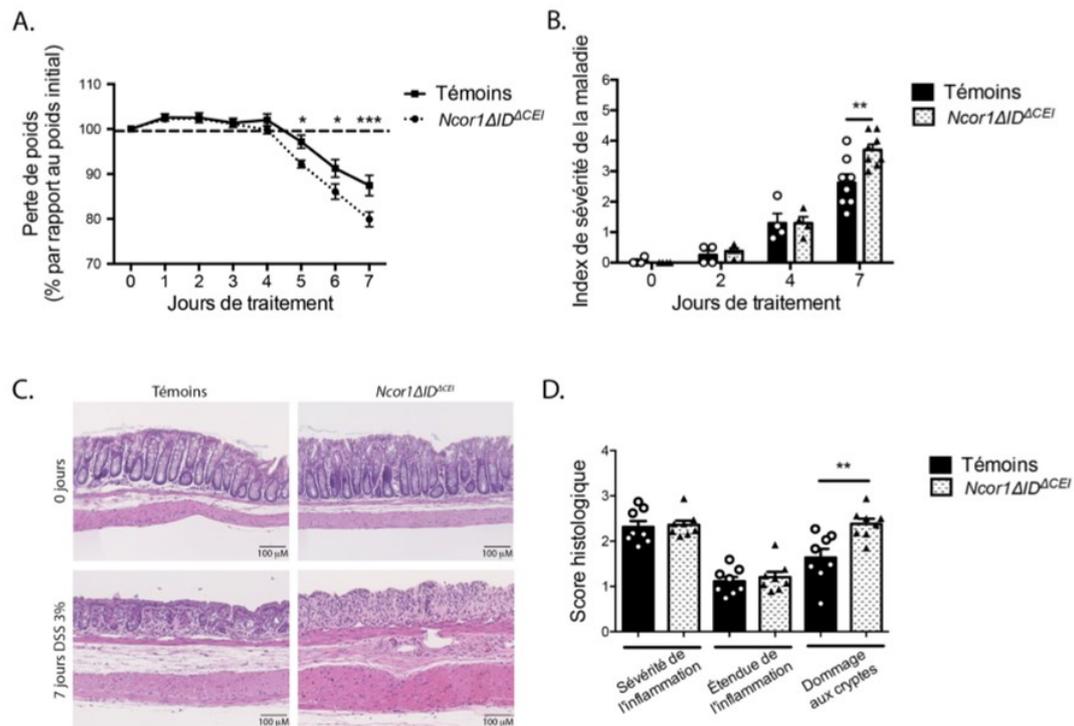
CTCTGCGGTGAACCAAGCAGCTCCTCACCAACAGAACAGGATCTGGGAGCGAGAGCCTGCC  
CCTGCTCTCAGCACAGTACGAGACCCTGTCGGATAGTGATGACTGAGCGGCCGC-3'

### Tableau supplémentaire:

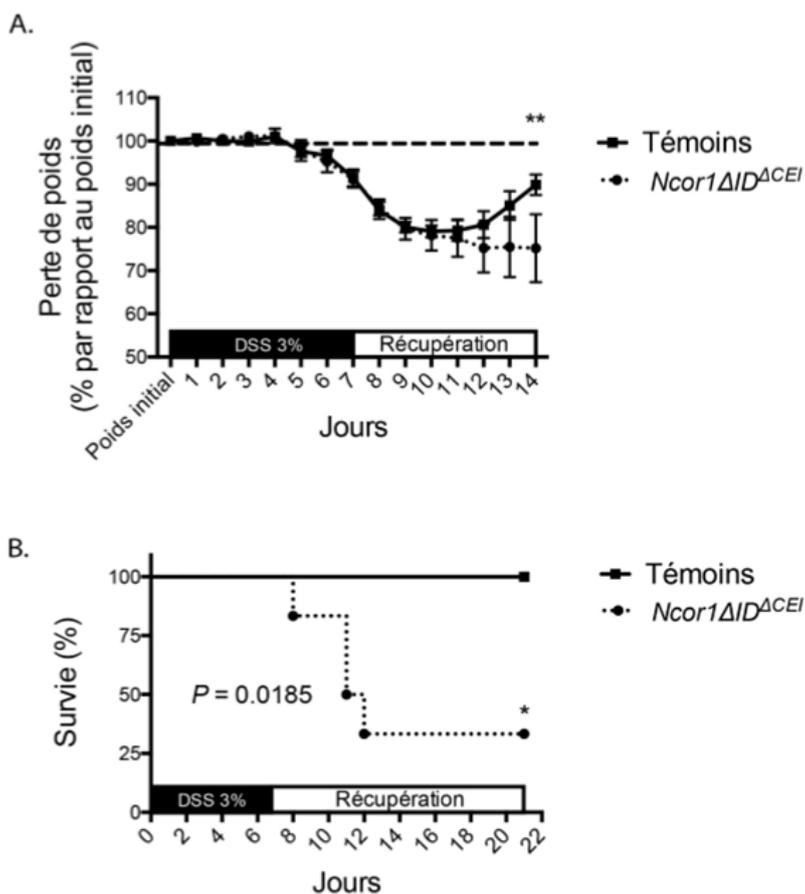
**Tableau 9:** Gènes identifiés lors de l'analyse d'un séquençage d'ARN modulé avec un ratio plus grand que 2 lors de la perte d'expression de CHD8 et NCOR1 dans des HT-19 et des Caco-2/15.

Gènes modulés	Caco 215 shNCOR1-655	Caco 2/15 shCHD8-8	HT-29 shNCOR1-655	HT-29 shCHD8-8
<b>BDNF</b> (Brain-derived neurotrophic factor)	23.04	4.90	16.82	6.33
<b>CA12</b> (Carbonic anhydrase 12)	-7.85	-4.31	-4.23	-2.35
<b>CLDN2</b> (Claudin 2)	-2.14	-6.11	-10.54	-40.96
<b>DAPK2</b> (Death associated protein kinase)	-2.63	-3.77	-2.85	-2.93
<b>ITGA5</b> (integrin alpha 5)	3.87	2.09	2.05	3.40
<b>PCHD7</b> (protocadherin 7)	7.14	3.57	4.20	4.83
<b>SERPINA6</b> (antitrypsin)	-2.93	-2.89	-37.66	-24.07

## Figures supplémentaires:



**Figure 14: Évidences cliniques que les animaux *Ncor1* $\Delta$ ID<sup>ACEI</sup> âgés de 4 à 5 mois sont plus susceptibles à un traitement DSS 3% que les témoins.** (A) Courbe représentant la perte de poids des animaux témoins et mutants lors d'un traitement DSS 3% pendant 7 jours (n=8 animaux par groupe; moyennes  $\pm$  les SEM). Un test ANOVA à deux facteurs et un test de comparaison multiple par la méthode de Bonferroni ont été utilisés pour mesurer la significativité des résultats (\*; P < 0,05, \*\*\*; P < 0,001). (B) Index de sévérité de la maladie mesuré au moment du sacrifice d'animaux traités au DSS 3% pour 0, 2, 4 et 7 jours (n = 8 animaux par groupe; moyennes  $\pm$  les SEM). (C) Photos représentatives des coupes histologiques de côlons distaux avec coloration H & E obtenues suite au sacrifice des animaux avant et après un traitement au DSS 3% de 7 jours (grossissement 20X). (D) Scores histologiques calculés après un traitement au DSS 3% de 7 jours à partir des coupes histologiques de côlons entiers (n = 8 animaux par groupe; 11 -20 champs par coupe; moyennes  $\pm$  les SEM). Des tests T student ont été utilisés pour mesurer la significativité des résultats (\*\* p < 0.01). (Tiré de St-Jean *et al.*, non-publié)



**Figure 15: Traitement DSS 3% sur des animaux *Ncor1* $\Delta$ ID $\Delta$ CEI âgés de 2 mois.** (A) Courbe représentant la perte de poids des animaux témoins et mutants lors d'un traitement DSS 3 % pendant 7 jours suivi d'une période de récupération de 7 jours ( $n = 5$  par groupe; moyennes  $\pm$  les SEM). Un test ANOVA à deux facteurs et un test de comparaison multiple par la méthode de Bonferroni ont été utilisés pour mesurer la significativité des résultats (\*\*;  $P < 0,01$ ). (B) Courbe de survie Kaplan-Meier réalisée à partir d'animaux traités au DSS 3 % pendant 7 jours et dont la survie a été évaluée sur une période de récupération de 14 jours ( $n = 6$  par groupe). Les animaux ont été sacrifiés lorsque leur perte de poids atteignait la limite fixée à 30 % tel qu'exigé par les règles d'éthique sur la manipulation des animaux. Un test de Log-rank (Mantel-Cox) a été utilisé afin de déterminer la significativité des résultats ( $P = 0,0185$ ) (\*;  $P < 0.05$ ). (Tiré de St-Jean *et al.*, non-publié)