

Université de Montréal

**Analyses intracellulaires des interactions et de la
signalisation de la polycystine-1**

par Jennifer Lake

Département de Biochimie, Université de Montréal
Faculté de Médecine

Mémoire présenté
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise (M.Sc.)
En biochimie
option génétique moléculaire

19 décembre, 2017

© Jennifer Lake, 2017

Résumé

La polykystose rénale autosomique dominante (PKD) affecte 1/500 personne, cause des kystes rénaux et mène à l'insuffisance rénale. Elle dépend d'un mécanisme de dosage d'un des gènes *PKD1* ou *PKD2* encodant respectivement la polycystine-1 et la polycystine-2 (Pc1, Pc2). Les polycystines forment un complexe via leurs motifs *coiled-coil*. Un BAC-*Pkd1* murin a été modifié par recombinaison homologue pour produire un transcrit pleine longueur (BAC-*Pkd1*_{TAG}). La surexpression de *Pkd1* chez les souris *Pkd1*_{TAG} induit la PKD. Pour définir le rôle intracellulaire du domaine *coiled-coil* de Pc1, le domaine a été supprimé de *Pkd1* par recombinaison et a servi à générer quatre lignées de souris *Pkd1*_{Δcoiled-coil} (1-10 copies). Ces souris ne développent pas de PKD. Le motif *coiled-coil* est donc requis pour induire la maladie. Chez la souris, l'inactivation de *Pkd1* (*Pkd1*^{-/-}) cause une PKD et une mortalité périnatale. Nous avons donc produit des souris *Pkd1*^{-/-}; *Pkd1*_{TAG} et *Pkd1*^{-/-}; *Pkd1*_{Δcoiled-coil}. Celles-ci sont protégées d'une mortalité périnatale et de PKD, mais les lignées à 1-3 copies agissent comme des hypomorphes fonctionnels. Les cellules rénales *Pkd1*_{Δcoiled-coil} montrent que Pc1 suit une maturation et un transport intracellulaire suffisamment efficace, que l'interaction est conservée entre Pc1-Pc2 et que l'expression de Pc2 est inchangée sauf chez les hypomorphes où Pc2 est surexprimé. Le motif *coiled-coil* de Pc1 et ses interactions semblent induire une polykystose rénale et jouer un rôle dans l'homéostasie rénale.

Mots-clés : PKD, coiled-coil, polycystines, souris, transport, interactions, maturation

Abstract

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) affects 1/500 person, causes renal cysts and leads to kidney failure. It depends on a dosage effect mechanism of one of the *PKD1* or *PKD2* genes encoding polycystin-1 and polycystin-2 (Pc1, Pc2), respectively. The polycystins form a complex via their *coiled-coil* domains. A murine *Pkd1*-BAC was modified by homologous recombination to produce a full-length transcript (*Pkd1*_{TAG}-BAC). Overexpression of *Pkd1* in *Pkd1*_{TAG} mice induces polycystic kidney disease (PKD). To define the intracellular role of the *coiled-coil* motif of Pc1, the motif was deleted from *Pkd1* by recombination and used to generate four *Pkd1*_{Δcoiled-coil} mouse lines (1-10 copies). These mice do not develop PKD. The *coiled-coil* motif is therefore required to induce the disease. In mice, the *knock-out* of *Pkd1* causes PKD and perinatal mortality. We therefore produced *Pkd1*^{-/-}; *Pkd1*_{TAG} and *Pkd1*^{-/-}; *Pkd1*_{Δcoiled-coil} mice. These are protected from perinatal mortality and PKD, but 1-3 copy lines act as functional hypomorphs. *Pkd1*_{Δcoiled-coil} kidney cells show that Pc1 is sufficiently efficient in maturation and intracellular trafficking, that the interaction is conserved between Pc1-Pc2 and that Pc2 expression is unchanged except in hypomorphs where Pc2 is overexpressed. The *coiled-coil* motif of Pc1 and its interactions appear to induce polycystic kidney disease and play a role in renal homeostasis.

Keywords: PKD, coiled-coil, polycystins, mouse, trafficking, interactions, maturation

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures	vii
Liste des abréviations.....	viii
Remerciements.....	xi
Avant-propos.....	xii
1. Revue de la littérature	1
1.1 Le rein chez les mammifères	1
1.1.1 Le développement du rein.....	1
1.1.2 La structure et l’anatomie du rein	4
1.2 La fonction rénale et ses processus.....	5
1.2.1 Les fonctions du rein.....	6
1.2.2 Mécanismes biologiques de la fonction rénale	7
1.2.3 Régulation de la fonction rénale	10
1.3 Les maladies rénales	11
1.3.1 Les maladies polykystiques rénales et les maladies fibrokystiques hépatorénales.....	12
1.4 La polykystose rénale autosomique dominante	13
1.4.1 Épidémiologie	14
1.4.2 Manifestations rénales	14
1.4.3 Manifestations extrarénales	16
1.4.4 Mécanismes cellulaires et voies de signalisation.....	17
1.4.5 Thérapies.....	18
1.5 La génétique moléculaire de la polykystose rénale autosomique dominante	19
1.5.1 Le gène <i>PKDI</i>	19
1.5.2 Le gène <i>PKD2</i>	20

1.5.3	Variations génétiques et mutations de <i>PKD1</i> et <i>PKD2</i>	21
1.6	Les polycystines.....	23
1.6.1	Les domaines et fonctions de la polycystine-1	23
1.6.2	Le motif <i>coiled-coil</i> de la polycystine-1	26
1.6.3	La polycystine-2.....	28
1.6.3	Le complexe des polycystines	31
1.6.4	Le transport et la maturation des polycystines.....	32
1.7	La pathogénèse de PKD.....	34
1.7.1	Mécanisme du <i>Two hit</i>	35
1.7.2	Effet de dosage.....	37
1.7.3	Mécanisme du <i>Third hit</i>	39
2.	Projet de recherche.....	41
2.1	Mise en contexte et objectifs.....	41
2.2	Résultats préliminaires.....	41
2.3	Hypothèses du projet.....	44
2.4	Approche expérimentale	44
3.	Matériels et Méthodes.....	46
3.1	Modèle de souris	46
3.1.1	Lignées de souris transgéniques.....	46
3.1.2	Les lignées de souris <i>contrôles</i>	47
3.2	Extraction d'ADN et géotypage.....	47
3.2.1	Extraction d'ADN génomique	47
3.2.2	Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et Tqman.....	48
3.3	Extraction et quantification protéique.....	48
3.3.1	Extraits protéiques totaux	48
3.3.2	Extraits protéiques nucléaires	48
3.3.3	Quantification des protéines	49
3.4	Immunobuvardage de type Western blot et Co-immunoprécipitation.....	49
3.5	Déglycosylation de Pc1.....	51
3.6	Isolation des exosomes de l'urine	51

3.7	Analyses de données	52
4.	Résultats	53
4.1	Expression de la polycystine-1 chez les souris Pkd1 ^{-/-} ; Pkd1 Δ coiled-coil.....	53
4.1.1	Analyse de l'expression de Pc1 Δ coiled-coil	53
4.2	Transport intracellulaire de Pc1 chez les souris Pkd1 ^{-/-} ; Pkd1 Δ coiled-coil.....	56
4.2.1	Clivage autoprotéolytique au site GPS de Pc1	56
4.2.2	Glycosylation de Pc1 et son transport jusqu'au trans-golgi.....	59
4.2.3	Excrétion de Pc1 dans les exosomes urinaires.....	63
4.3	Interactions de Pc1 avec des partenaires chez les souris Pkd1 ^{-/-} ; Pkd1 Δ coiled-coil	65
4.3.1	Analyse de l'expression de la polycystine-2.....	65
4.3.2	Interactions PC1-PC2 chez les souris Pkd1 ^{-/-} ; Pkd1 Δ coiled-coil	68
4.4	Signalisation des protéines mal repliées chez les souris Pkd1 ^{-/-} ; Pkd1 Δ Coiled-coil.	70
4.4.1	Effet de l'ablation du motif <i>coiled-coil</i> et de la surexpression de Pc1 sur la voie IRE1 α -Xbp1	70
5.	Discussion	73
6.	Conclusion	85
	Bibliographie.....	xiii
	Annexe I.....	xxx

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Caractéristiques principales des maladies polykystiques rénales et des maladies fibrokystiques hépatorénales les plus communes.	13
Tableau 1.2. Variants des gènes <i>PKD1</i> et <i>PKD2</i> selon le type de mutation et la signification clinique.....	22
Tableau 1.3. Les partenaires protéiques interagissant avec le domaine <i>coiled-coil</i> de la polycystine-1 et la fonction du complexe.	28

Liste des figures

Figure 1.1 Structures anatomiques du rein.	5
Figure 1.2 Mécanismes impliqués dans la fonction rénale.....	8
Figure 1.3 Régulation coordonnée de la fonction rénale.	11
Figure 1.4 Reins polykystiques en phase terminale de la maladie.	15
Figure 1.5 Le gène <i>PKD1</i> et son transcrit.....	20
Figure 1.6 Le gène <i>PKD2</i> et son transcrit.....	21
Figure 1.7 Structures et domaines protéiques de la polycystine-1 et de la polycystine-2.	24
Figure 1.8 Clivage de la polycystine-1 au site protéolytique du récepteur couplé aux protéines G (motif GPS).	25
Figure 1.9 Motif <i>coiled-coil</i> de la polycystine-1.	27
Figure 1.10 Structure et modèle de dimérisation de la polycystine-2.....	30
Figure 1.11 La maturation et le transport intracellulaire du complexe des polycystines	33
Figure 1.12 Mécanismes potentiels menant à la formation des kystes dans PKD.....	35
Figure 2.1. Analyses préliminaires des lignées de souris transgéniques et binaires <i>Pkd1</i> Δ <i>coiled-coil</i> et <i>Pkd1</i> _{Tag}	43
Figure 3.1 Constructions d'ADN BAC- <i>Pkd1</i> _{TAG} et BAC- <i>Pkd1</i> Δ <i>coiled-coil</i> par recombinaison homologue.....	46
Figure 4.1 Analyse de l'expression de <i>Pc1</i> chez les souris <i>Pkd1</i> ^{-/-} ; <i>Pkd1</i> Δ <i>coiled-coil</i>	55
Figure 4.2 Le clivage GPS est conservé chez les souris <i>Pkd1</i> ^{-/-} ; <i>Pkd1</i> Δ <i>coiled-coil</i>	59
Figure 4.3 <i>Pc1</i> atteint le trans-Golgi en absence du domaine <i>coiled-coil</i> chez les souris <i>Pkd1</i> ^{-/-} ; <i>Pkd1</i> Δ <i>coiled-coil</i>	62
Figure 4.4 <i>Pc1</i> est excrété dans les exosomes urinaires chez les souris <i>Pkd1</i> ^{-/-} ; <i>Pkd1</i> Δ <i>coiled-coil</i>	64
Figure 4.5 Analyse de l'expression de <i>Pc2</i> chez les souris <i>Pkd1</i> ^{-/-} ; <i>Pkd1</i> Δ <i>coiled-coil</i>	67
Figure 4.6 L'interaction entre <i>Pc1</i> et <i>Pc2</i> est conservée chez les souris <i>Pkd1</i> ^{-/-} ; <i>Pkd1</i> Δ <i>coiled-coil</i>	69
Figure 4.7 Niveaux d'expression de <i>Xbp1s</i> et sa cible <i>BiP</i> chez les souris <i>Pkd1</i> ^{-/-} ; <i>Pkd1</i> Δ <i>coiled-coil</i>	72
Figure 5.1. La signalisation et les interactions intracellulaires de <i>Pc1</i> chez les souris <i>Pkd1</i> ^{-/-} ; <i>Pkd1</i> Δ <i>coiled-coil</i>	84

Liste des abréviations

µg : microgramme

µl : microlitre

ADH : hormone antidiurétique

AI : anévrisme intracrânien

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

BAC : chromosome artificiel bactérien

BSA : albumine de sérum bovin

BU : bourgeon urétérique

cm : centimètre

CoIp : co-immunoprécipitation

CTS : séquence ciblant le cil

DFG : débit de filtration glomérulaire

ELV : vésicules ressemblant aux exosomes ou *exosome-like vesicles*

GPS : site protéolytique du récepteur couplé aux protéines G

IB : immunobuvardage

IP : immunoprécipitation

IRA : insuffisance rénale aiguë

IRT : insuffisance rénale terminale

Jpc : jours post coïtum

L : litre

LDL : lipoprotéines de basse densité

LRR : répétitions riches en leucine/ *leucine-rich repeats*

min : minute

mL : millilitres

MM : mésenchyme métanéphrique

mm : millimètre

MRC : maladie rénale chronique

MVB : corps multi-vésiculaires ou *multivesicular body*

Nb : nombre

P : post-natal
PAC : chromosome artificiel dérivé du Phage 1
PC1 : polycystine-1 (humain)
Pc1 : polycystine-1 (souris)
PC2 : polycystine-2 (humain)
Pc2 : polycystine-2 (souris)
PKD1 : polycystic kidney disease 1 (humain)
Pkd1 : polycystic kidney disease 1 (souris)
PKD2 : polycystic kidney disease 2 (humain)
Pkd2 : polycystic kidney disease 2 (souris)
PCR : réaction de polymérisation en chaîne
PD : domaine pore
PKD : polykystose rénale autosomique dominante/ *polycystic kidney disease*
PKR : polykystose rénale récessive
RE : réticulum endoplasmique
REJ : récepteur pour *egg jelly*
SDS : dodécylsulfate de sodium
TMHS : hélices transmembranaires
TRP : potentiel de récepteur transitoire
UPR : unfolded protein response (réponses aux protéines mal repliées)
V : Volt
VSLD : *voltage-sensor-like domain*
WSC : *wall integrity and stress response*,

*À défaut de pouvoir lire cet ouvrage dont tu serais si fier, je te le dédie et je te dis
merci pour les souvenirs qui sont une source inépuisable de réconfort et de force.*

À la mémoire de mon papa, Stéphane Lake 1963-2011.

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier ma directrice de recherche, Dre Marie Trudel, pour l'opportunité, pour sa pédagogie, son enseignement, son appui et pour toute l'expérience que j'ai pu acquérir dans son laboratoire. J'aimerais aussi remercier ma collègue Josepha « Jojo », nous avons accompli nos maîtrises respectives ensemble et ce parcours aurait été beaucoup plus difficile sans ce support et cet entraide continu. Merci à tous mes collègues de l'IRCM qui ont croisé ma route et à mes amis avec qui j'ai eu des conversations enrichissantes scientifiquement ou humainement, un merci particulier à Monica, Camila, Noushine, Almira, Aïsha, Delphine, Lina, Guan, Claude, Marjorie et Valérie. Je n'aurais pu réussir ce projet sans le support sans précédent de quatre femmes merveilleuses et accomplies qui ont toujours cru en moi, même quand moi je n'y croyais pas : Mé, Alexe, Marie et Cyn. Vos accomplissements respectifs sont pour moi une source continue de motivation et votre amitié est une source inépuisable d'énergie. Merci à mon amoureux Fred qui a su gérer mes absences et mon perfectionnisme parfois exagéré. Tu as été un pilier déterminant. Je tiens aussi à dire un gros merci à Linda, ma maman, sans qui je ne serais pas en train d'écrire ces lignes. Je voudrais finalement dire merci à toutes les femmes en sciences qui ont travaillé fort pour rendre le milieu plus accessible aux femmes. Merci de me donner la chance de poursuivre ma passion, vos efforts ne seront pas en vain.

Avant-propos

La polykystose rénale autosomique dominante (PKD) est la maladie génétique héréditaire dominante la plus commune et touche la population mondiale. Cette maladie est caractérisée par le développement de multiples kystes rénaux qui sont détectés dès l'enfance, progressent avec l'âge en nombre et en taille et conduisent à la destruction des reins. La PKD est multisystémique, d'autres organes peuvent être touchés par cette maladie comme le foie, le cerveau et le cœur. Présentement, la progression de la maladie ne peut être arrêtée, les reins deviennent non-fonctionnels vers 50 ans d'âge et seule la dialyse ou une transplantation permet la survie des patients. L'impact sur notre système de santé est important, car la PKD représente environ 10% des cas d'insuffisance rénale. Le projet de recherche de ce mémoire vise une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires qui régissent la PKD. L'objectif de ces recherches est qu'il soit un jour possible de ralentir ou d'arrêter la destruction des reins en minimisant la formation de kystes, d'entraîner une meilleure qualité de vie et de prolonger significativement l'espérance de vie.

1. Revue de la littérature

Ce chapitre a pour but la bonne compréhension du présent projet de recherche : le rein, les maladies rénales, la polykystose rénale autosomique dominante, les gènes impliqués, les protéines et la pathogénèse de la maladie.

1.1 Le rein chez les mammifères

Les reins sont une paire d'organes rétropéritonéaux situés de part et d'autre de la colonne vertébrale. Chez l'humain, le pôle supérieur du rein est vis-à-vis la douzième vertèbre thoracique et le pôle inférieur fait face à la troisième vertèbre lombaire (Taal, Chertow et al. 2012). Le rein droit est à une position plus caudale que le rein gauche. Les reins pèsent de 125 à 179 grammes chez l'homme ou entre 115 et 155 grammes chez la femme avec une longueur d'environ 11 à 12 cm, une largeur de 5 à 7,5 cm et une épaisseur de 2,5 à 3 cm pour les deux sexes (Taal, Chertow et al. 2012).

1.1.1 Le développement du rein

Chez les mammifères, les reins dérivent du mésoderme, la couche intermédiaire de l'embryon formé durant la gastrulation (Jennette, Olson et al. 2007). Les reins se développent plus précisément du mésoderme intermédiaire de la crête urogénitale. Cette dernière est une structure qui se trouve le long du mur postérieur de l'abdomen chez le fœtus (Taal, Chertow et al. 2012). Le développement du rein se produit en trois étapes successives avec la formation de trois systèmes excrétoires : *pronephros*, *mesonephros* et *metanephros*. Les reins définitifs proviennent du *metanephros*, mais le *pronephros* et le *mesonephros* ont des rôles importants dans le développement (Jennette, Olson et al. 2007, Taal, Chertow et al. 2012).

Tout d'abord, le *pronephros* est formé à 22 jours de gestation chez l'humain ou 8 jours post coïtum (jpc) chez la souris (Taal, Chertow et al. 2012). Ce système se développe de la

région la plus rostrale de la crête urogénitale et comprend les tubules pronéphriques et le tube pronéphrique. Le deuxième système, le *mesonephros*, se développe caudalement aux tubules pronéphriques dans la région médiale de la crête urogénitale (Taal, Chertow et al. 2012). Le *mesonephros* est remodelé avant la naissance, mais les différentes cellules endothéliales, myoïdes pérیتubulaires et stéroïdogéniques du *mesonephros* migrent jusqu'au primordium adrénogonadal d'où émergeront les glandes et gonades. Ensuite, le *metanephros* résulte des interactions au niveau caudal de la crête urogénitale entre le mésenchyme métanéphrique (MM) et le bourgeon urétérique (BU) épithélial (Taal, Chertow et al. 2012). À 11,5 jpc chez la souris ou cinq semaines de gestation chez l'humain, des inductions réciproques se produisent entre le bourgeon urétérique et le mésenchyme métanéphrique, puis les signaux du MM provoquent la ramification du bourgeon urétérique en tubule-t. Le tubule-t subit une ramification dichotomique permettant la formation du système collecteur urinaire et des conduits collecteurs (Taal, Chertow et al. 2012). Le BU envoie aussi des signaux vers le MM pour induire la condensation de ce dernier le long de la surface du bourgeon urétérique. Une partie du MM s'agrège aux pointes inférieures et adjacentes du bourgeon ramifié. Ces agrégats pérیتubulaires subissent une conversion mésenchymo-épithéliale et deviennent la vésicule rénale. (Taal, Chertow et al. 2012)

Ensuite, les segments de la vésicule rénale subissent des modifications morphologiques et un remodelage de proximal à distal précis en plusieurs étapes jusqu'à former le glomérule et les composantes du néphron tubulaire (Taal, Chertow et al. 2012). Les différentes étapes sont successivement la forme de virgule, la forme de S, la boucle capillaire et le stade mature. Les néphrons naissent séquentiellement, ce processus de remodelage se répète donc de 600 000 à 1 million de fois dans chaque rein chez le fœtus humain (Taal, Chertow et al. 2012). Les premières cellules du glomérule, les podocytes, sont observées au stade de forme S et forment une couche épithéliale en colonne. Une fente vasculaire sépare les podocytes des cellules distales qui formeront le tubule proximal. Les cellules épithéliales pariétales se différencient et s'aplatissent pour devenir la capsule de Bowman, une structure qui entoure l'espace urinaire en continue avec l'épithélium proximal tubulaire (Taal, Chertow et al. 2012). Les cellules endothéliales migrent dans la fente vasculaire et produisent la membrane basale glomérulaire avec les cellules épithéliales glomérulaires viscérales. La membrane basale glomérulaire est une composante

importante de la barrière mature de filtration. La croissance des cellules mésangiales est ensuite nécessaire au développement et au modelage des boucles capillaires des glomérules. À ce stade de la boucle, les cellules endothéliales glomérulaires développent des *fenestraes*, c'est-à-dire des pores transmembranaires qui se retrouveront dans les lits capillaires semiperméables (Taal, Chertow et al. 2012). Puis, au stade mature, la barrière de filtration est formée de la membrane glomérulaire, des podocytes et des cellules endothéliales fenestrées. Cette barrière de filtration sépare l'espace urinaire de l'espace du sang (Taal, Chertow et al. 2012). Finalement, la portion tubulaire du néphron se segmente dans un ordre proximal-distal : tubule contourné proximal, boucles de Henle et tubule contourné distal qui connecte les tubes collecteurs. La filtration débute avant la naissance, tous les segments du néphron sont donc présents à la naissance, mais la maturation des tubules se poursuit aussi après la naissance. (Taal, Chertow et al. 2012)

Une fois que le bourgeon urétérique se ramifie et que les néphrons sont induits, le rein commence sa division en une région extérieure corticale et une région médullaire intérieure (Taal, Chertow et al. 2012). Les néphrons sont induits dans la région corticale tandis que le système collecteur se forme dans la région médullaire. Dans les régions périphériques des reins, la zone néphrogénique, les néphrons sont induits en groupes successifs. Ainsi, les néphrons les plus matures sont dans la couche interne du cortex tandis que les néphrons immatures sont dans la région périphérique. La zone néphrogénique renferme des cellules du mésenchyme adjacentes et inférieures aux bouts des bourgeons urétériques qui ont un rôle de progéniteur épithélial. (Taal, Chertow et al. 2012)

En ce qui concerne le développement du système collecteur, les tubes collecteurs dérivent du bourgeon urétérique et sont le résultat de la morphogénèse. Le système collecteur est effectivement composé de centaines de tubules (Taal, Chertow et al. 2012). Ces tubules reconduisent le filtrat produit par les néphrons à l'extérieur du rein jusqu'à l'uretère pour terminer dans la vessie. Un remodelage important est impliqué dans la formation des tubes collecteurs. Les premières séries de ramifications sont symétriques, les suivantes sont asymétriques et donnent lieu à une structure en forme d'entonnoir (Taal, Chertow et al. 2012). Au sein de cette structure se trouve un groupement de tubes qui forment la papille en forme de cône reposant dans un calice s'écoulant dans l'uretère. Les reins de souris n'ont qu'une seule

papille tandis que l'humain en a de 8 à 10, chacune s'écoule dans un calice mineur et plusieurs calices mineurs s'écoulent dans un plus petit nombre de calices majeurs. (Taal, Chertow et al. 2012)

Pour terminer, les cellules stromales dérivent du mésenchyme métanéphrique, mais elles ne sont pas induites à condenser par le bourgeon urétérique (Taal, Chertow et al. 2012). Elles se divisent en deux sous-populations : les cellules stromales corticales et les cellules stromales médullaires. Les cellules corticales forment une mince couche sous la capsule rénale et les cellules médullaires peuplent l'espace interstitiel entre les tubes collecteurs et les tubules. Les cellules stromales corticales, autour des condensats, transmettent les signaux nécessaires aux branchements du bourgeon urétérique et au remodelage du rein (Taal, Chertow et al. 2012). Les cellules stromales se différencient pendant la néphrogenèse en cellules interstitielles périlitubulaires et en péricytes qui sont importantes pour le remodelage vasculaire, pour la production de la matrice extracellulaire et pour la formation néphrique. Elles migrent de leur position autour des condensats vers les zones entre les néphrons en développement dans la médulla. (Taal, Chertow et al. 2012)

1.1.2 La structure et l'anatomie du rein

Le rein possède une fente, le hile, qui est située sur la surface médiale ou concave de chaque rein. C'est à travers cette fente que le pelvis rénal, l'artère, la veine rénale, les vaisseaux lymphatique et le plexus nerveux passent dans le sinus du rein (Taal, Chertow et al. 2012). La surface d'un rein divisé en deux permet d'observer distinctement le cortex et la médulla. Le cortex est la région externe plus pâle et la médulla est la région intérieure plus foncée. La médulla de l'humain est séparée en 8 à 18 masses striées et coniques : ce sont les pyramides rénales (Taal, Chertow et al. 2012). Chez la souris, il n'y a qu'une seule pyramide rénale. Toujours chez l'humain, entre 2 et 3 cavités s'étendent vers l'extérieur du rein à partir de la partie supérieure du bassin rénal, ce sont les calices majeurs. Ces calices majeurs se divisent en de nombreux calices mineurs qui s'étendent vers les papilles des pyramides et vont filtrer l'urine qui se forme dans les unités des pyramides (Taal, Chertow et al. 2012). Chez la souris, l'unique

papille est plutôt directement entourée par le pelvis rénal. Les uretères proviennent de la partie inférieure du pelvis rénal, plus précisément à la jonction pyélo-urétérale et descendent d'environ 30 cm, chez l'humain, pour déboucher dans la vessie. Plusieurs sections du rein possèdent des muscles lisses dont la papille, les parois des calices, du pelvis et les uretères. Ces muscles sont capables de se contracter pour faire avancer l'urine vers la vessie. (Taal, Chertow et al. 2012). La figure 1.1 présente les principales structures de l'anatomie du rein :

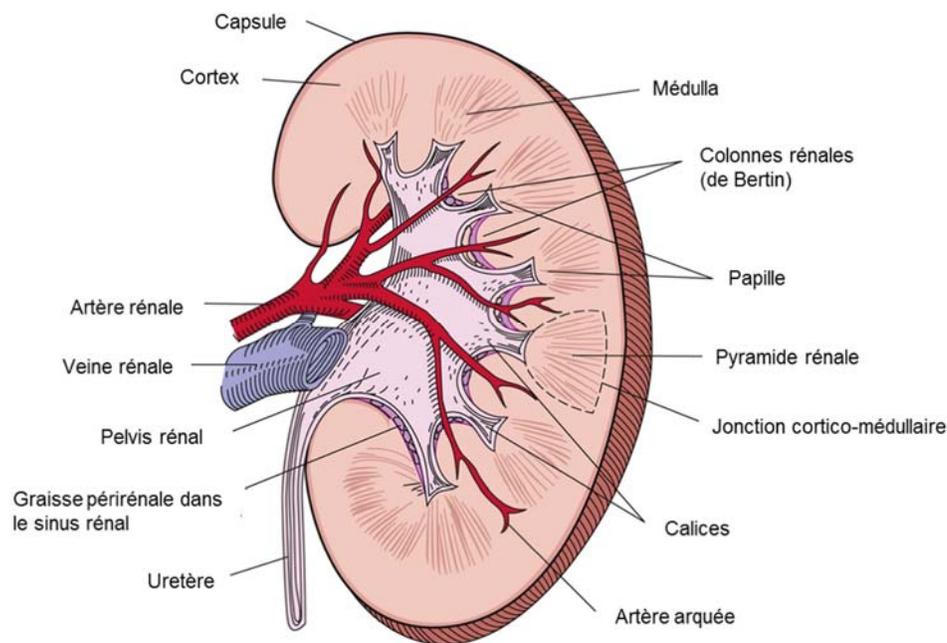


Figure 1.1 Structures anatomiques du rein.

Schéma de la section coupée d'un rein représentant les structures anatomiques importantes. Figure adaptée et traduite de *Brenner and Rector's The Kidney, chapter 2 Anatomy of the kidney* (Taal, Chertow et al. 2012). Permission obtenue sous conditions (Annexe I).

1.2 La fonction rénale et ses processus

L'une des fonctions principales des reins est de filtrer les produits toxiques, métaboliques et les déchets azotés (Eaton and Pooler 2013). Toutefois, ces organes sont aussi des joueurs importants au niveau de plusieurs autres fonctions qui sont tout autant essentielles pour la santé des mammifères. Pour accomplir leurs nombreuses fonctions, les reins travaillent de manière interactive avec d'autres systèmes d'organes (Eaton and Pooler 2013). La section qui suit

présente brièvement les diverses fonctions rénales ainsi que les processus et mécanismes biologiques qu'impliquent ces fonctions.

1.2.1 Les fonctions du rein

L'excrétion des déchets par les reins est primordiale. Le corps humain forme des produits finaux qui découlent de processus métaboliques et souvent, ces produits finaux ne sont pas utiles et peuvent s'avérer toxiques si présents en trop grandes quantités (Eaton and Pooler 2013). Ainsi, ces produits doivent être excrétés par les reins à la même vitesse qu'ils sont produits pour éviter la toxicité. Ces produits sont par exemple : l'urée, l'acide urique, la créatinine, l'urobiline, etc. De plus, les reins se chargent d'excréter des substances étrangères comme plusieurs drogues. Les reins coopèrent avec le foie qui métabolise les molécules organiques sous forme soluble dans l'eau pour que le rein puisse aisément s'en débarrasser par la suite. (Eaton and Pooler 2013)

Les reins se chargent aussi d'excréter l'eau et les électrolytes du corps. Toutefois, cette excrétion doit respecter un niveau adéquat. En d'autres mots, les reins s'occupent de l'équilibre entre l'eau et les électrolytes (Eaton and Pooler 2013). Ces derniers entrent dans le corps en des quantités variables. Les concentrations trouvées dans le corps sont donc perturbées, d'où le besoin de maintenir un équilibre par un processus hautement régulé. La fonction d'équilibre des reins est de maintenir une quantité constante de chacun des électrolytes et de l'eau dans le corps (Eaton and Pooler 2013). Les reins répondent à une augmentation d'eau ou d'électrolytes, mais aussi aux déficits. Par exemple, l'augmentation d'apport en eau se traduira en une augmentation d'excrétion par les reins, donc en une augmentation d'urine. Au contraire, une diminution d'apport en eau se traduira en une diminution au maximum de l'excrétion d'eau par les reins pour préserver les réserves du corps (Eaton and Pooler 2013). Chacune des substances est régulée par les reins de manière indépendante, le rein peut à la fois réguler la concentration de sodium et celle de potassium en limitant l'excrétion d'un et favorisant l'excrétion de l'autre. Les reins agissent aussi comme des régulateurs du volume des fluides extracellulaires, dont le plasma sanguin en partenariat avec le système cardiovasculaire (Eaton and Pooler 2013). Cette régulation assure que l'espace vasculaire est suffisamment rempli pour que le sang puisse

circuler normalement. Cette régulation est possible par le maintien d'un équilibre entre l'eau et les sels. D'ailleurs, cet équilibre est important pour l'osmolalité du plasma. Dans le même ordre d'idées, les reins maintiennent un équilibre acido-basique en régulant la concentration des ions hydrogènes (pH) en combinant élimination et synthèse (Eaton and Pooler 2013).

Les reins entrent aussi en fonction au niveau de la régulation de la production des globules rouges (Eaton and Pooler 2013). La moelle osseuse produit les globules rouges et cette production est stimulée par une hormone : l'érythropoïétine. Au stade embryonnaire, elle est largement produite par le foie, mais à l'âge adulte, cette hormone provient surtout des reins et est sécrétée par les cellules interstitielles dans l'interstitium cortical. Une réduction dans la pression partielle d'oxygène au niveau de l'environnement de ces cellules mène à la sécrétion de l'érythropoïétine (Eaton and Pooler 2013).

Ensuite, une des fonctions rénales est la production de substances dites vasoactives; c'est le système rénine-angiotensine-aldostérone qui est important pour le contrôle des muscles vasculaires lisses (Eaton and Pooler 2013). Cette régulation a un effet sur la résistance vasculaire périphérique et donc sur la pression sanguine artérielle. Les pathologies touchant ce système mènent à l'hypertension (Eaton and Pooler 2013). La synthèse de la vitamine D est aussi régulée par les reins. Les reins sont impliqués dans sa dernière transformation biochimique. La forme active de la vitamine D, calcitriol, est produite dans les reins et son taux de production est régulé par des hormones qui contrôlent l'équilibre de calcium, de phosphate et l'intégrité des os. Finalement, les reins contrôlent aussi une fraction de la gluconéogenèse qui consiste à synthétiser le nouveau glucose à partir de sources non carbohydrates lorsque l'apport en carbohydrates est arrêté pour une trop grande durée de temps (Eaton and Pooler 2013).

1.2.2 Mécanismes biologiques de la fonction rénale

La fonction rénale implique différents processus biologiques dont la filtration, la sécrétion, la réabsorption et l'excrétion. Il est tout d'abord important de faire la différence entre ces quatre différents processus. Lors de la filtration, l'eau et les solutés du sang doivent quitter

le système vasculaire par la barrière de filtration pour entrer dans l'espace de Bowman et donc se retrouver à l'extérieur (Eaton and Pooler 2013). La sécrétion est quant à elle un processus de transport des substances jusqu'au lumen tubulaire à partir du cytosol des cellules épithéliales du néphron. La réabsorption est le déplacement d'une substance du lumen à travers la couche épithéliale jusqu'à l'interstitium, la substance peut ensuite être acheminée aux vaisseaux sanguins et se retrouver à nouveau en circulation (Eaton and Pooler 2013). Finalement, l'excrétion est un mécanisme d'élimination: les substances quittent le corps. Par exemple, les produits qui se retrouvent dans l'urine finale sont des produits excrétés (Eaton and Pooler 2013). La figure 1.2 résume les quatre procédés rénaux décrits ci-dessus.

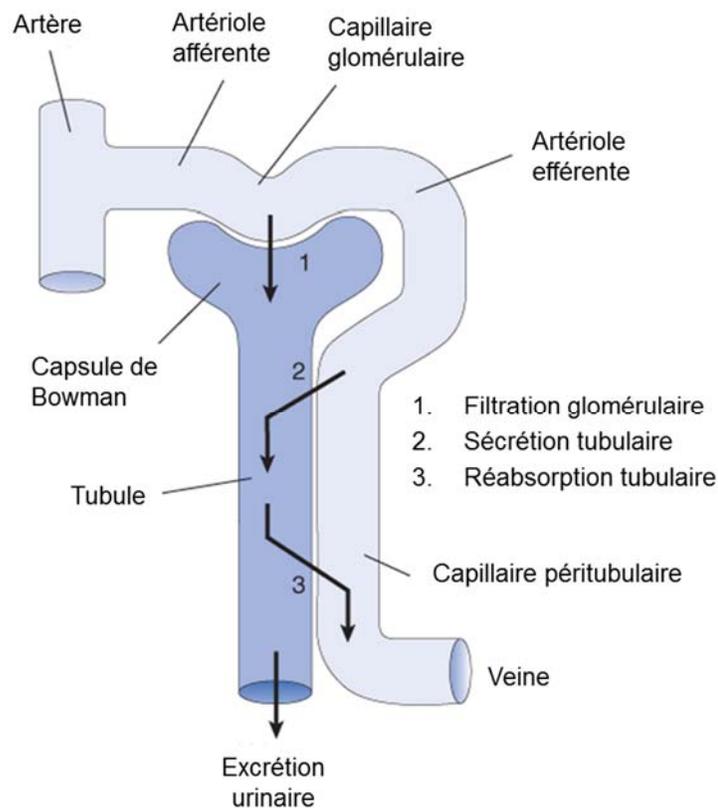


Figure 1.2 Mécanismes impliqués dans la fonction rénale

Schéma des quatre mécanismes biologiques fondamentaux de la fonction rénale dans le rein : filtration glomérulaire, sécrétion tubulaire, réabsorption tubulaire et excrétion urinaire. Figure adaptée et traduite de *Vander's Renal Physiology, chapter 1 Renal Functions, Basic Processes, and Anatomy McGraw-Hill Education*. (Eaton and Pooler 2013). Permission obtenue sous conditions (Annexe I)

La filtration glomérulaire est donc le premier processus pour la formation de l'urine. Le flux de liquide qui provient des capillaires glomérulaires entre dans la capsule de Bowman en passant par une barrière de filtration (Eaton and Pooler 2013). Le filtrat glomérulaire contient les ions inorganiques, les solutés organiques de faibles masses et certaines petites protéines comme les hormones peptidiques, tandis que les grosses protéines du plasma comme l'albumine sont exclues par la barrière de filtration (Eaton and Pooler 2013). Les substances du filtrat qui sont dans la même concentration que celle du plasma sanguin sont filtrées librement. Par exemple, les ions sodium, potassium et chlore sont filtrés librement tout comme le glucose, l'urée et l'insuline (Eaton and Pooler 2013). Le débit de filtration glomérulaire (DFG) est le volume de filtrat formé par unité de temps. Chez un jeune homme en santé, le DFG est de 180 L/jour ce qui correspond à 125 mL/min. Le volume total de plasma chez l'humain est en moyenne 3 L, ce dernier est donc filtré environ 60 fois par jour par les reins ce qui implique que le DFG est d'une importance capitale (Eaton and Pooler 2013). Le DFG permet aux reins d'excréter une grosse quantité de déchets et de réguler de manière précise les composantes de l'environnement interne. Le vieillissement et plusieurs maladies affectant les reins ont comme conséquence la réduction du débit de filtration glomérulaire (Eaton and Pooler 2013).

Avec un débit de filtration de 180 L par jour, il est évident qu'une majorité de ce volume doit être réabsorbé, c'est le processus de réabsorption tubulaire. Cette réabsorption signifie aussi que l'urine finale est différente du filtrat glomérulaire au niveau de la composition (Eaton and Pooler 2013). Le filtrat s'écoule de la capsule de Bowman dans les différentes parties du tubule et ce faisant, certaines composantes sont réabsorbées par les tubules tandis que d'autres composantes sont ajoutées au filtrat, c'est la sécrétion tubulaire (Eaton and Pooler 2013). Puisque les tubules sont associés au système vasculaire, les transferts se font rapidement entre les capillaires du plasma et le lumen du tubule par l'espace interstitiel. Le transport tubulaire est généralement caractérisé par une plus grande partie de réabsorption que de sécrétion (Eaton and Pooler 2013). Pour chacune des substances du plasma, il y a une combinaison spécifique de filtration, de réabsorption et de sécrétion. Par exemple, le glucose est complètement réabsorbé, puis l'eau et les électrolytes le sont pratiquement aussi, de sorte que les quantités filtrées étant excrétées dans l'urine sont petites. Au contraire, la quantité réabsorbée des déchets est partielle, la majorité de la quantité filtrée étant excrétée dans l'urine (Eaton and Pooler 2013). Ces

processus sont sujets à un contrôle physiologique. Si une substance est en concentration anormalement basse ou haute, ces mécanismes réguleront l'excrétion en conséquence pour que le corps maintienne un niveau physiologique (Eaton and Pooler 2013).

1.2.3 Régulation de la fonction rénale

La régulation de la fonction rénale est complexe. En effet, plusieurs entités sont impliquées dans la régulation des divers processus rénaux. La régulation rénale est possible grâce à des contrôles redondants. Ainsi, l'excrétion des substances majeures n'est pas seulement régulée par un processus, mais par plusieurs, de sortes que l'échec d'un mécanisme peut être compensé par l'opération d'un autre point de contrôle ou processus (Eaton and Pooler 2013). Ces systèmes de contrôles vont donc s'adapter aux conditions dans le temps et modifier leur efficacité au besoin. Pour répondre aux besoins du corps humain, les processus rénaux impliquent la combinaison de signaux hormonaux, de signaux neuronaux et de messagers chimiques (Eaton and Pooler 2013). Les signaux hormonaux proviennent de la glande surrénale, de l'hypophyse, des glandes parathyroïdes et du cœur. L'aldostérone et le cortisol sont sécrétés par le cortex surrénal, puis l'épinéphrine et la norépinéphrine sont sécrétées par la médulla surrénale (Eaton and Pooler 2013). Toutes ces hormones, majoritairement l'aldostérone, sont des régulateurs de l'excrétion du sodium et du potassium par les reins. Une autre hormone importante dans la régulation de la fonction rénale est la vasopressine ou hormone antidiurétique (ADH) qui régule l'excrétion de l'urée, de l'eau et partiellement du sodium (Eaton and Pooler 2013). Finalement, le cœur sécrète les peptides natriurétiques qui permettent l'augmentation de l'excrétion du sodium par les reins. En ce qui concerne les signaux neuronaux, ils proviennent du plexus cœliaque sympathique et jouent un rôle important dans le contrôle du flux sanguin et dans la filtration glomérulaire. Ces signaux permettent aussi la libération de substances vasoactives qui affectent les reins et le système vasculaire périphérique (Eaton and Pooler 2013). Les messagers chimiques intrarénaux sont quant à eux des signaux qui proviennent d'une partie du rein et qui agissent dans une autre partie du rein. Plusieurs substances peuvent jouer le rôle de messenger chimique et avoir un effet sur les processus rénaux comme l'oxyde nitrique, les agonistes purinergiques, les superoxydes, les éicosanoïdes, etc. (Eaton and Pooler 2013).

Pour conclure, les reins sont des organes complexes et vitaux. Leur régulation est d'une importance capitale. Le bon fonctionnement des reins implique d'autres systèmes d'organes, de l'autorégulation et des signaux provenant de plusieurs sources différentes. Ci-dessous, la figure 1.3 résume les liens entre chaque palier, des systèmes d'organes jusqu'aux cellules :

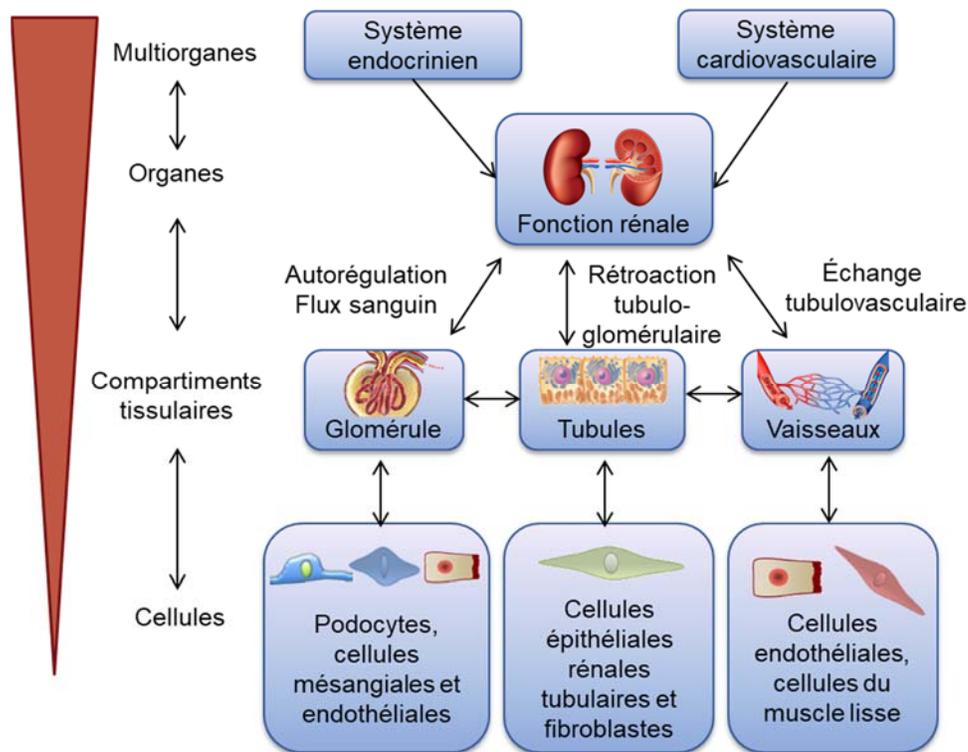


Figure 1.3 Régulation coordonnée de la fonction rénale.

La fonction rénale nécessite une régulation coordonnée des systèmes neuroendocrinien et cardiovasculaire, des compartiments tissulaires (glomérules, tubules, vaisseaux) et des diverses cellules rénales (podocytes, cellules mésangiales, cellules endothéliales, cellules épithéliales, fibroblastes, cellules du muscle lisse). Les mécanismes d'autorégulation du flux sanguin, de rétroaction tubuloglomérulaire et l'échange tubulovasculaire participent aussi à la régulation de la fonction rénale. Figure adaptée de l'article *Systems biology of kidney diseases*, *Kidney International* (He, Chuang et al. 2012).

1.3 Les maladies rénales

Les reins étant des organes hautement régulés, leur dérèglement et leurs anomalies mènent à différentes affections rénales. Les maladies rénales sont diversifiées et dépendent de plusieurs facteurs environnementaux et génétiques. Les trois problèmes néphrologiques cliniques les plus répandus chez l'humain sont l'insuffisance rénale terminale (IRT), la maladie

rénale chronique (MRC) et l'insuffisance rénale aiguë (IRA) (Taal, Chertow et al. 2012). L'IRT est la condition la plus grave et elle est définie de manière médicale par le besoin de recevoir une dialyse continue ou une transplantation rénale quelle que soit la raison en découlant, elle réunit toutes les affections rénales menant à l'insuffisance rénale (Taal, Chertow et al. 2012). Le taux d'incidence de l'insuffisance rénale terminale au Canada, en 2012, était de 156 par million d'habitants et de 359 pour les États-Unis (United States Renal Data System, 2014). Le taux d'incidence est d'ailleurs plus élevé chez les gens âgés de plus de 75 ans, soit de 638 par millions d'habitants pour le Canada et de 1415 pour les États-Unis (United States Renal Data System, 2014). Ainsi, les affections rénales sont non-négligeables. La composante génétique est très importante au niveau des néphropathies puisque jusqu'à maintenant, plus de 200 gènes sont associés aux maladies rénales héréditaires (Arts and Knoers 2016). Ces maladies incluent les désordres récessifs et dominants de toutes sortes. Certains désordres débutent au stade embryonnaire et d'autres à l'âge adulte (Arts and Knoers 2016). Les maladies polykystiques rénales et fibrokystiques hépatorénales sont un sous-groupe important des maladies génétiques rénales et seront discutées dans la prochaine section.

1.3.1 Les maladies polykystiques rénales et les maladies fibrokystiques hépatorénales

Les maladies polykystiques rénales et fibrokystiques hépatorénales sont un sous-ensemble des ciliopathies. Celles-ci sont définies comme étant des désordres monogéniques qui impliquent une anomalie ciliaire et les phénotypes varient selon le désordre (O'Connor and Guay-Woodford 2016). Les phénotypes des maladies polykystiques rénales et fibrokystiques hépatorénales sont distincts, mais il existe des chevauchements non-négligeables entre les gènes causant ces maladies affectant les reins et/ou le foie (O'Connor and Guay-Woodford 2016). Les troubles de cette catégorie avec les prévalences les plus élevées, sont la polykystose rénale autosomique dominante, la polykystose rénale récessive, la néphronophthisis, puis les syndromes de Joubert, de Bardet-Biedel et de Meckel-Gruber (O'Connor and Guay-Woodford 2016).

Ci-dessous, le tableau 1.1 présente ces désordres génétiques majeurs ainsi que leurs phénotypes, composantes systémiques et prévalences.

Tableau 1.1. Caractéristiques principales des maladies polykystiques rénales et des maladies fibrokystiques hépatorénales les plus communes.

Maladie	Gène(s)	Phénotype Rénal	Phénotype hépatique	Composantes systémique	Prévalence
PKD	<i>PKD1</i> , <i>PKD2</i>	Kystes le long du néphron entier	Kystes biliaires, FHC (rare)	Oui - adultes	~ 1/1000
PKR	<i>PKHD1</i>	Dilatation des tubes collecteurs	FHC, Syndrome Caroli	Non	~ 1/20 000
Néphronophthisis	<i>NPHP1-18</i>	Kystes aux jonctions cortico-médullaires	FHC	Parfois	~ 1/100 000
Syndrome de Joubert	<i>JBTS1-22</i>	Dysplasie kystique, NPHP	FHC, Syndrome Caroli	Oui	~ 1/100 000
Syndrome Bardet-Biedel	<i>BBS1-19</i>	Dysplasie kystique, NPHP	FHC	Oui	~ 1/140 000
Syndrome Meckel-Gruber	<i>MKS1-11</i>	Dysplasie kystique	FHC	Oui	~ 1/250 000

PKD: polykystose rénale autosomique dominante; PKR: polykystose rénale récessive; FHC: fibrose hépatique congénitale; NPHP: Néphronophthisis.
(O'Connor and Guay-Woodford 2016)

Ainsi, la maladie rénale génétiquement héréditaire la plus commune est la polykystose rénale autosomique dominante et sera discutée dans la prochaine section (Little 2016, O'Connor and Guay-Woodford 2016).

1.4 La polykystose rénale autosomique dominante

La polykystose rénale autosomique dominante (PKD) est la maladie génétique héréditaire la plus commune et touche la population mondiale. Cette maladie est caractérisée

par le développement de multiples kystes rénaux qui progressent avec l'âge et conduisent à la destruction des reins.

1.4.1 Épidémiologie

La prévalence de la polykystose rénale autosomique dominante est estimée à 1 :400-1 :1000 faisant de cette maladie le désordre monogénique le plus répandu (Dalgaard 1957, Iglesias, Torres et al. 1983, Torres and Harris 2009). En 2016, la population Canadienne était de 36,29 millions (Statistique Canada, 2016). Ainsi, selon les prévalences estimées (1 :1000), il serait attendu qu'environ 66 000 canadiens souffrent de la PKD. Globalement, cette maladie affecterait entre 4 et 7 millions d'individus et serait responsable de 7%-15% des patients qui nécessitent une transplantation rénale (Akoh 2015). Cette maladie est la quatrième cause mondiale de l'insuffisance rénale (Chebib and Torres 2016). Entre 45% et 70% des patients souffrant de la polykystose rénale autosomique dominante atteindront le stade d'insuffisance rénale terminale d'ici leurs 65 ans (Lentine et al., 2010).

1.4.2 Manifestations rénales

Le phénotype principal de PKD est la formation de kystes rénaux. La figure 1.4 ci-dessous montre le phénotype de reins polykystiques en phase terminale de la maladie. Plusieurs manifestations rénales sont liées au développement et à l'élargissement des kystes. L'expansion des kystes se produit à un taux constant chez un individu, mais ces taux sont hétérogènes dans la population atteinte de PKD (Harris, Bae et al. 2006). Les kystes plus larges sont généralement associés avec une progression plus rapide de la maladie et leur nombre augmente avec l'âge (Harris, Bae et al. 2006). Certaines caractéristiques des kystes varient selon le gène muté, *PKD1* ou *PKD2*. Les reins *PKD1* ont généralement un plus grand nombre de kystes et ces derniers sont aussi plus larges (Harris, Bae et al. 2006). Le taux de croissance kystique n'est toutefois pas différent entre les reins *PKD1* ou *PKD2* et se situe entre 5 et 6% par année (Harris, Bae et al. 2006). Les mutations dans *PKD1* causent donc un phénotype plus sévère, les kystes se développent plus tôt, impliquant le gène dans l'initiation des kystes, mais pas dans leur élargissement (Harris, Bae et al. 2006).

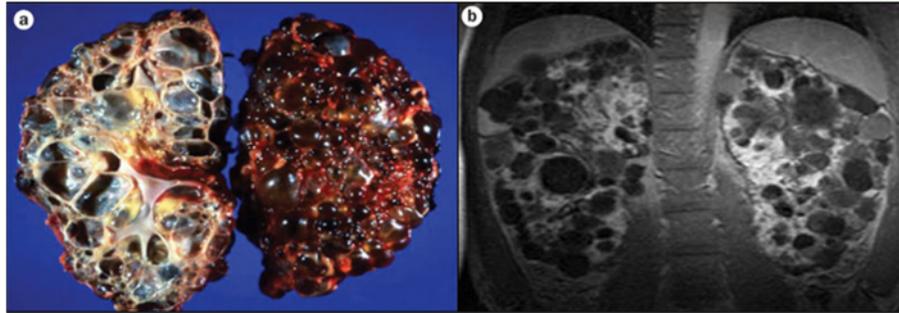


Figure 1.4 Reins polykystiques en phase terminale de la maladie.

A) section coupée à gauche et caractéristique de la surface kystique à droite. Les kystes sont séparés par des bandes fibrotiques. (T. I. Steinman, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, MA, USA). B) Reins polykystiques examinés par IRM T1 à contraste au gadolinium. Le gadolinium est filtré et concentré dans les tubules et permet de voir les résidus de parenchyme en blanc. Les régions rehaussées par le gadolinium permettent l'identification des tissus qui ont encore leurs fonctions. Figure tirée de l'article *Why kidneys fail in autosomal dominant polycystic kidney disease*, *Nature Reviews Nephrology* (Grantham, Mulamalla et al. 2011). Permission obtenue sous conditions (Annexe I).

La douleur atteint près de 60% des patients à un stade ou un autre de la maladie, elle constitue une manifestation rénale importante (Bajwa, Sial et al. 2004). Les kystes infectés, la rupture des kystes causant l'hématurie, les pierres aux reins ou la néphrolithiase sont tous des manifestations qui peuvent causer la douleur aigue chez les patients (Bajwa, Sial et al. 2004). Certaines douleurs chroniques se manifestent aussi, par exemple, par des maux de dos ou par la formation des kystes (Bajwa, Sial et al. 2004). Finalement, le développement de l'insuffisance rénale dans la polykystose rénale autosomique dominante est variable. Plusieurs patients n'atteignent jamais la phase terminale de l'insuffisance rénale alors que certains l'atteignent très tôt ou seulement très tard dans la vie (Gabow, Johnson et al. 1992). En phase terminale, les kystes envahissent la majeure partie des reins (Grantham, Mulamalla et al. 2011). Plusieurs facteurs contribuent à la progression de la maladie vers l'insuffisance rénale autre que le gène atteint, *PKD1* ou *PKD2* (Gabow, Johnson et al. 1992). En 1992, différentes variables ont été associées de manière indépendante à la fonction rénale. Il a été démontré que l'âge précoce lors du diagnostic, le sexe masculin, une augmentation de la masse du ventricule gauche, les kystes hépatiques chez la femme, trois grossesses ou plus et la taille des reins sont tous associés à l'insuffisance rénale (Gabow, Johnson et al. 1992).

1.4.3 Manifestations extrarénales

L'hypertension est une manifestation extrarénale importante, environ 60% des patients atteints de PKD en souffrent avant l'insuffisance rénale (Eccder and Schrier 2001). La phase d'insuffisance rénale terminale progresse beaucoup plus rapidement en présence d'hypertension qu'en son absence dans les cas de PKD (Eccder and Schrier 2001). Le système rénine-angiotensine-aldostérone a été démontré expérimentalement et cliniquement comme étant un facteur du développement de l'hypertension dans la polykystose rénale. Les traitements de l'hypertension peuvent réduire la morbidité et la mortalité des patients PKD (Eccder and Schrier 2001). La majorité des autres manifestations extrarénales se traduit par la présence de kystes dans d'autres organes, comme le foie (94%), les vésicules séminales (40%), le pancréas (9%), la membrane arachnoïde (8%) ou les méninges de la moelle épinière (2%) (Pirson 2010). Les anomalies des tissus connectifs représentent d'autres manifestations extrarénales communes dans la maladie. Ces anomalies peuvent prendre la forme d'un prolapsus de la valve mitrale, d'anévrismes intracrâniens et d'hernies abdominales (Pirson 2010). Le foie est l'organe le plus touché au niveau des manifestations extrarénales avec la présence de kystes hépatiques. La fréquence de ces kystes hépatiques chez les patients atteints de la polykystose rénale est très variable (Thomsen and Thaysen 1988). L'occurrence et la sévérité des kystes hépatiques ont été reliées au nombre de grossesses chez une femme. Ainsi, le sexe, les facteurs hormonaux et extrarénaux interagissent pour réguler la kystogenèse hépatique (Gabow, Johnson et al. 1990). Les patients ont aussi une incidence plus élevée d'anévrismes intracrâniens (AI) comparativement au reste de la population, le pourcentage de risque se situant entre 6 et 12% (Vlak, Algra et al. 2011, Caranci, Briganti et al. 2013). De plus, les patients avec un historique familial ont entre 16-20% de risques de développer un AI (Xu, Yu et al. 2011, Caranci, Briganti et al. 2013). Ces anévrismes subissent une rupture précoce et sont associés à un haut taux de mortalité et morbidité chez les patients atteints de la polykystose rénale. (Schrier, Belz et al. 2004)

1.4.4 Mécanismes cellulaires et voies de signalisation

Plusieurs mécanismes cellulaires sont impliqués dans la polykystose rénale autosomique dominante. Par exemple, la prolifération cellulaire et la sécrétion de fluides sont deux mécanismes dérégulés dans la maladie (Lee 2016). Les cellules épithéliales tubulaires des reins prolifèrent anormalement suite à l'inactivation des gènes *PKD1* ou *PKD2*. Cette inactivation implique une perte d'équilibre homéostatique (Lee 2016). La voie de calcium intracellulaire est notamment dérégulée, tout comme la voie de l'AMP cyclique (AMPC) (Lee 2016). Cette perte d'équilibre, dont l'accumulation d'AMP cyclique, cause une hausse dans la signalisation des voies qui régulent la prolifération : B-Raf/MEK/ERK, mTOR et la voie du récepteur EGF (Yamaguchi, Nagao et al. 2003, Yamaguchi, Wallace et al. 2004). Ces stimulations aberrantes causent la prolifération cellulaire et mènent au développement de kystes remplis de fluides (Lee 2016). En plus d'une prolifération cellulaire anormale, l'apoptose est aussi dérégulée dans les tubules. Des études chez des modèles de souris et de rat développant la polykystose rénale ont montré une hausse dans l'activité des caspases, une augmentation de la libération du cytochrome c de la mitochondrie au cytoplasme et une dérégulation de c-Myc (Lanoix, D'Agati et al. 1996, Tao, Kim et al. 2005). De plus, chez les patients, l'augmentation d'apoptose est détectée dans les tubules rénaux qui ne sont pas kystiques suggérant que l'apoptose serait impliquée dans la perte de néphrons normaux participant à la destruction des reins plutôt que dans la kystogenèse (Woo 1995). L'inflammation et la fibrose sont aussi des marqueurs de la polykystose rénale autosomique dominante chez l'humain (Mun and Park 2016). Lorsque les niveaux du gène *PKD1* diminuent, les chimio attractants augmentent, la migration des macrophages est stimulée et promeut la sécrétion de cytokines pro-inflammatoire comme TNF- α , IL-1 β , et IL-2 (Gregory, Morand et al. 2006, Karihaloo, Koraihy et al. 2011). Les niveaux de ces cytokines sont d'ailleurs élevés dans les kystes de reins polykystiques (Gardner, Burnside et al. 1991). La dérégulation de la voie JAK-STAT cause aussi l'inflammation dans des modèles de souris et dans des cellules humaines de reins PKD (Bhunja, Piontek et al. 2002, Talbot, Shillingford et al. 2011). Finalement, la fibrose est augmentée dans PKD. Ce phénomène est caractérisé par une trop grande production et accumulation de collagène ainsi que par la décomposition des tissus connectifs (Birbrair, Zhang et al. 2014). Les facteurs pro-fibrotiques augmentent tandis que les facteurs anti-fibrotiques sont diminués dans PKD. Les facteurs pro-fibrotiques sont

TGF- β 1, le facteur de croissance des tissus connectifs, le facteur de croissance des fibroblastes 2, le facteur de croissance dérivé des plaquettes et l'ostéopontine tandis que les facteurs anti-fibrotiques sont le facteur de croissance des hépatocytes et *bone morphogenic protein-7* (Bmp7) (Grantham 1997, Lan 2011, Norman 2011). Il a été montré que TGF- β est augmenté dans les cellules kystiques causant la fibrose et diminuant la transition épithélio-mésenchymateuse régulé par la β -caténine (Kim, Lu et al. 2002, Chea and Lee 2009). La voie de signalisation Wnt est donc dérégulée dans PKD, on note une augmentation de l'activation de cette voie dans les kystes des patients (Lal, Song et al. 2008).

1.4.5 Thérapies

Jusqu'à récemment, il n'existait aucune thérapie pour les patients souffrant de PKD autre que des soins drastiques tels que la dialyse et la transplantation rénale. Entre 2014 et 2016, un inhibiteur de la vasopressine, le Tolvaptan a été approuvé au Japon, en Corée, au Canada, en Suisse, en Angleterre, en Écosse et par *la European Medicines Agency* en Europe, mais pas par la FDA aux États-Unis (National Institute for Health and Care Excellence, 2015, Horie 2015, Scottish Medicines Consortium, 2016, Gansevoort, Arici et al. 2016). Cet inhibiteur permet de réduire la croissance des reins kystiques et de réduire le taux de filtration glomérulaire chez les patients atteints de PKD (Horie 2015). Toutefois, son utilisation est controversée puisque qu'elle est associée avec la polyurie et la possible élévation d'enzymes du foie (Torres, Chapman et al. 2012, Horie 2015). Malgré cette avancée thérapeutique, il n'existe toujours aucune cure ou thérapie complètement effective de la maladie et le Tolvaptan ne fait pas exception : il ne guérit pas les patients (Horie 2015). Une meilleure compréhension des mécanismes de la pathogénèse de la maladie permettra de meilleures avenues thérapeutiques.

1.5 La génétique moléculaire de la polykystose rénale autosomique dominante

1.5.1 Le gène *PKDI*

Le locus APCKD humain est localisé pour la première fois en 1985, il est étroitement lié au locus de l'alpha-globine sur le bras court du chromosome 16 (Reeders, Breuning et al. 1985). Étant le locus principal impliqué dans la polykystose rénale autosomique dominante, il prendra plus tard le nom de *polycystic kidney disease 1* ou *PKDI*. La position exacte du locus de *PKDI* est identifiée comme étant 16p13.3 et plusieurs marqueurs sont isolés de cette région entre 1987 et 1991 (Breuning, Reeders et al. 1987, Reeders, Keith et al. 1988, Breuning, Snijdwint et al. 1990, Germino, Barton et al. 1990, Hyland, Suthers et al. 1990, Himmelbauer, Germino et al. 1991). L'identification de *PKDI* dans cette région a été laborieuse, puisque la région est riche en gènes avec au moins 20 candidats (Germino, Weinstat-Saslow et al. 1992). De plus, les exons 1 à 33 de *PKDI* sont localisés dans une région dupliquée six fois, donnant lieu à six pseudogènes (Harris and Rossetti 2010). Ces pseudogènes sont situés à environ 13-16 mégabases de *PKDI* sur le chromosome 16 (Harris and Rossetti 2010). Cette région de *PKDI* et les pseudogènes partagent une homologie de séquence de 97-99% (The International Polycystic Kidney Disease Consortium, 1995). Ces pseudogènes ont donc compliqué considérablement la détermination de la séquence de *PKDI* ainsi que les tests génétiques pour PKD (The International Polycystic Kidney Disease Consortium, 1995). L'ordre des marqueurs isolés et la position du locus *PKDI* sont déterminés par des études de liaisons chez des individus sains ou atteints de PKD et grâce à des cellules somatiques hybrides (Reeders, Keith et al. 1988, Breuning, Snijdwint et al. 1990, Germino, Barton et al. 1990). Cette découverte a d'ailleurs aidé l'identification du gène *TSC2* responsable de la sclérose tubéreuse positionné proche de *PKDI* par la caractérisation de délétions détectées dans l'intervalle censé contenir le gène *PKDI* (European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis 1993). Peu après, le *European Polycystic Kidney Disease Consortium* a identifié des phénotypes distincts, PKD ou TSC, dans différents membres d'une même famille (European Polycystic Kidney Disease Consortium, 1994). Les deux membres atteints de PKD sont porteurs d'une translocation chromosomique balancée avec un point de cassure dans les limites de la position 16p13.3. Le gène perturbé par ce réarrangement est *PKDI* et la découverte

de mutations supplémentaires dans ce gène chez d'autres patients confirment l'identification de *PKD1* à la position 16p13.3 (European Polycystic Kidney Disease Consortium, 1994). Peu de temps suivant la localisation exacte du gène *PKD1*, la séquence génomique complète du locus est générée (G. Germino 1995). Le modèle final du gène comporte 46 exons dans une région de 52kb et le transcrit détecté est de 14kb et une protéine prédite de 4 303 acides aminés pour un total de 460 kDa (The American PKD1 Consortium, 1995, The International Polycystic Kidney Disease Consortium, 1995, Hughes, Ward et al. 1995, Grantham 1996). La figure 1.5 présente le gène *PKD1* et son transcrit.

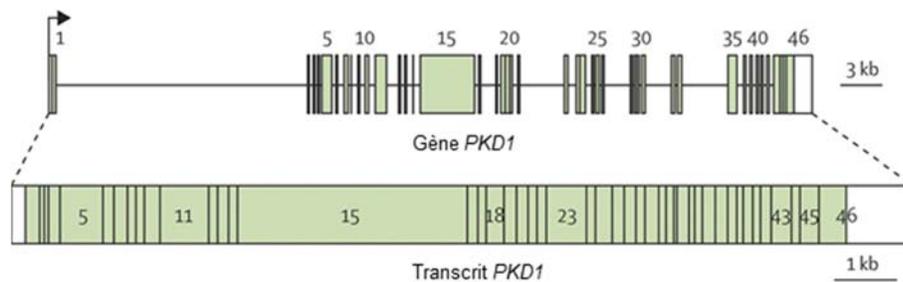


Figure 1.5 Le gène *PKD1* et son transcrit.

Le gène *PKD1* et son transcrit sont illustrés. Le nombre d'exons ainsi que leurs positions sont montrés et numérotés. *PKD1* possède 46 exons. Les régions codantes sont colorées en vert. Figure adaptée et traduite de l'article *Autosomal dominant polycystic kidney disease*, *The Lancet* (permission obtenue, Annexe I) (Torres, Harris et al. 2007).

1.5.2 Le gène *PKD2*

Le gène *PKD2* est localisé sur le long bras (q) du chromosome 4 à la position 22.1 (MIM:173910). C'est en 1993 que ce deuxième locus PKD (*PKD2*) est assigné au chromosome 4 entre les régions 4q22-q23 (Kimberling, Kumar et al. 1993, Peters, Spruit et al. 1993). Puis, en 1996, *PKD2* est identifié par clonage positionnel, la séquence prédite est de 968 acides aminés (Mochizuki, Wu et al. 1996). Peu après, sa structure d'exon est caractérisée, *PKD2* possède 15 exons (Hayashi, Mochizuki et al. 1997). Une méthode d'antisera polyclonaux spécifique pour le NH₂ intracellulaire et le COOH terminal a été utilisée pour identifier que *PKD2* encode une glycoprotéine membranaire intégrale, la polycystine-2, d'environ 110 kDa

(Hayashi, Mochizuki et al. 1997, Cai, Maeda et al. 1999). La figure 1.6 présente le gène *PKD2* et son transcrit.

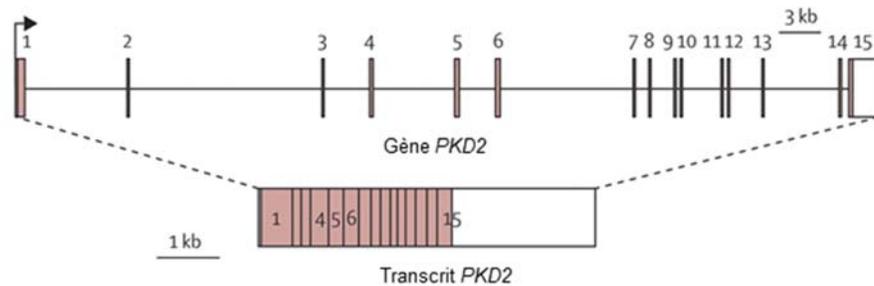


Figure 1.6 Le gène *PKD2* et son transcrit.

Le gène *PKD2* et son transcrit sont illustrés. Le nombre d'exons ainsi que leurs positions sont montrés et numérotés. *PKD2* possède 15 exons. Les régions codantes sont colorées en rose. Figure adaptée et traduite de l'article *Autosomal dominant polycystic kidney disease, The Lancet* (permission obtenue, Annexe I) (Torres, Harris et al. 2007).

1.5.3 Variations génétiques et mutations de *PKD1* et *PKD2*

Selon les études cliniques, 85% des cas de polykystose rénale autosomique dominante sont causés par les mutations du gène *PKD1* et les 15% restant seraient causés par les mutations dans le gène *PKD2* (Peters and Sandkuijl 1992). Toutefois, selon des études communautaires, les mutations de *PKD2* seraient plutôt responsables de 29 à 36% des cas de PKD (Dicks, Ravani et al. 2006, Rossetti, Adeva et al. 2007). Cette différence entre les pourcentages peut s'expliquer par le développement plus tardif des kystes rénaux et par la détection retardée chez les patients qui présentent un phénotype plus modéré associé à *PKD2* (Tan, Blumenfeld et al. 2011).

Il y a une haute hétérogénéité allélique pour *PKD1* et *PKD2*, c'est-à-dire qu'il n'existe pas de point de mutation favorisé. Les mutations ont des variantes de séquences, sont uniques à chaque famille en plus d'être présentes dans tout le gène (Tan, Blumenfeld et al. 2011). La base de données *ADPKD Mutations* classifie les variations génétiques en douze catégories : non-sens, changement de cadre de lecture, mutation au site d'épissage, insertion, délétion, large délétion, large duplication, substitution, *intervening sequence* silencieux ou inconnu, 3'UTR silencieux et mutations synonymes. De plus, ces variants sont catégorisés selon leur signification clinique, c'est-à-dire selon leur degré de pathogénicité : définitivement pathogénique, probablement hautement pathogénique, probablement pathogénique,

hypomorphique, indéterminé et probablement neutre (Tan, Blumenfeld et al. 2011). Le tableau 1.2 présente ces distributions de variants pour *PKD1* et *PKD2*.

Tableau 1.2. Variants des gènes *PKD1* et *PKD2* selon le type de mutation et la signification clinique.

	Signification clinique Type de mutations	Définitivement pathogénique	Probablement hautement pathogénique	Probablement pathogénique	Hypomorphique	Indéterminée	Probablement neutre	Total
PKD1	Non-sens	110	0	0	0	0	0	110
	Changement cadre de lecture	134	0	0	0	0	0	134
	Épissage	32	12	1	0	1	0	4
	Insertion	3	1	1	0	0	0	5
	Délétion	11	15	5	0	0	1	32
	Large délétion	15	0	0	0	0	0	15
	Large duplication	1	0	0	0	0	0	1
	Substitution	2	70	23	4	64	96	259
	IVS silencieux	0	0	0	0	0	96	96
	IVS inconnu	0	0	0	0	2	0	2
	3'UTR silencieux	0	0	0	0	0	6	6
	Sous-total	308	98	30	4	67	357	864
PKD2	Non-sens	30	0	0	0	0	0	30
	Changement cadre de lecture	50	0	0	0	0	0	50
	Épissage	14	2	1	0	0	0	17
	Insertion	1	0	1	0	0	0	2
	Délétion	1	0	3	0	0	0	4
	Large délétion	1	0	0	0	0	0	1
	Substitution	0	7	4	0	3	9	23
	IVS silencieux	0	0	0	0	0	5	5
	IVS inconnu	0	0	0	0	1	0	1
	Synonyme	0	0	0	0	0	6	6
	Sous-total	97	9	9	0	4	20	139
Total		405	107	39	4	71	377	1003

IVS, *intervening sequence*; UTR, région non-transcrite. Données tirées de la banque de données *the ADPKD Mutation* (<http://www.pkdb.mayo.edu/>), 2011, adaptées et traduites de l'article *Autosomal dominant polycystic kidney disease: Genetics, mutations and microRNAs*, *Biochim Biophys Acta*. (Tan, Blumenfeld et al. 2011). (Permission obtenue, Annexe I).

1.6 Les polycystines

Les produits des gènes *PKD1* et *PKD2* sont respectivement la polycystine-1 et la polycystine-2 (PC1 et PC2). Les polycystines sont exprimées dans les tubules distaux et proximaux des reins durant le développement, l'expression est plus prononcée dans les tubules distaux chez l'adulte (Ong, Ward et al. 1999). PC1 et PC2 sont aussi exprimées dans le développement des structures épithéliales du pancréas, du foie, des poumons, du cerveau, des organes reproductifs, du placenta et du thymus (Ong, Ward et al. 1999). Certaines cellules non-épithéliales expriment PC1 et PC2 comme dans le muscle vasculaire lisse, les muscles squelettiques, le myocarde et les neurones (Ong, Ward et al. 1999). PC1 et PC2 sont aussi localisées dans le cil primaire du rein. D'ailleurs, des défauts dans les cils rénaux des patients PKD sont connus faisant de cette maladie une ciliopathie (Pazour et al., 2002, Yoder et al., 2002, Badano et al., 2006).

1.6.1 Les domaines et fonctions de la polycystine-1

PC1 est une glycoprotéine de 460 kDa dans sa forme non-glycosylée et possède 11 domaines transmembranaires (The International Polycystic Kidney Disease Consortium, 1995, Hughes, Ward et al. 1995). Cette protéine possède une panoplie de domaines différents et sa fonction complète reste à définir. Ses domaines sont présentés à la figure 1.7 ci-dessous. Chez la souris, la protéine prédite est à 79% identique à la polycystine-1 chez l'humain. Tous les domaines fonctionnels décrits chez l'humain sont trouvés chez la souris, la plupart des acides aminés consensus sont aussi conservés (Lohning, Nowicka et al. 1997).

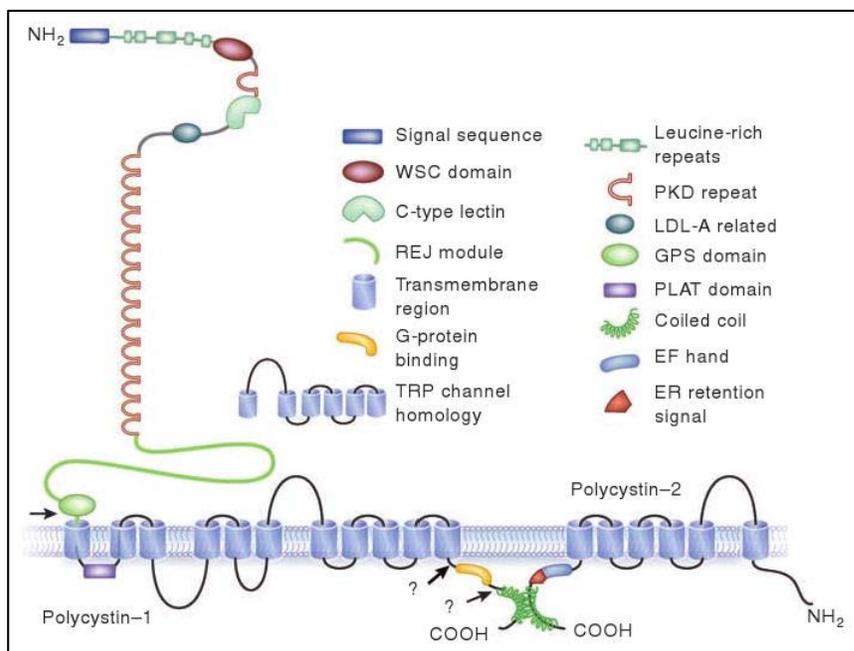


Figure 1.7 Structures et domaines protéiques de la polycystine-1 et de la polycystine-2.

Les domaines et motifs connus de la polycystine-1 (PC1) et de la polycystine-2 (PC2) sont représentés sous forme de schéma et énumérés. La possible interaction entre le motif *coiled-coil* de PC1 et un motif *coiled-coil* de PC2 est illustrée. Les flèches indiquent les sites de clivage dans la région du domaine GPS et dans la queue C-terminale de PC1. Figure tirée de l'article *Autosomal dominant polycystic kidney disease: the last 3 years*, *Kidney Int.* (Permission obtenue, Annexe I) (Torres and Harris 2009)

Tout d'abord, en N-terminal, PC1 possède une séquence de signal (*signal sequence*), puis des répétitions riches en leucine (LRR, *leucine-rich repeats*). Ces répétitions permettent à PC1 d'interagir avec la matrice extracellulaire et servent à l'adhésion cellulaire (Ferreira, Watanabe et al. 2015). Le domaine WSC, *wall integrity and stress response*, interagirait avec les carbohydrates tandis que le domaine lectine de type-C (*C-type lectin*) est important dans la signalisation cellulaire et l'exocytose (Ferreira, Watanabe et al. 2015). Le domaine qui suit est le domaine LDL-A, il a été suggéré que ce domaine permet des interactions entre PC1 et des molécules LDL : Les lipoprotéines de basse densité (Ferreira, Watanabe et al. 2015). Ensuite, vient le domaine extracellulaire *PKD* de la polycystine-1 qui couvre environ 30% de sa structure et est décrit comme 16 copies d'un nouveau module protéique ressemblant aux plis β -sandwich des immunoglobulines (Bycroft, Bateman et al. 1999). Ce domaine faciliterait l'assemblage des jonctions en recrutant l'E-cadhérine par des interactions homophiliques (Streets et al., 2009). Ce domaine est suivi par un module récepteur pour *egg jelly* (REJ) qui partage une grande identité de séquence avec une glycoprotéine membranaire, le récepteur pour *egg jelly* de l'oursin

de mer (Moy, Mendoza et al. 1996). Cette protéine possède un rôle de régulation du transport d'ions dans la réaction acrosomique. La découverte du module REJ chez PC1 suggère que PC1 joue un rôle dans la régulation ionique (Moy, Mendoza et al. 1996).

Tout juste avant la première hélice transmembranaire, PC1 a un domaine régulateur, un récepteur couplé aux protéines G (GPS) induisant l'autoprotéolyse. PC1 est clivée de manière autoprotéolytique dans ce domaine (Yu, Hackmann et al. 2007). Cette autoprotéolyse génère un fragment N-terminal d'environ 325 kDa (NTF) et un fragment C-terminal d'environ 150 kDa (CTF) (Qian, Boletta et al. 2002). PC1 activerait la transcription par ce clivage et la translocation du CTF au noyau (Torres and Harris 2006). Des mutations dans le domaine GPS perturbent le clivage et prévient l'induction de la tubulogénèse (Qian, Boletta et al. 2002). Le clivage de PC1 résulte en deux classes de PC1, la moins abondante (uFL-PC1) et la plus abondante (PC1 clivé). La forme uFL serait critique dans le développement embryonnaire et la forme clivée de PC1 serait critique dans le développement post-natal des reins dans les segments distaux des néphrons (Yu, Hackmann et al. 2007). Le schéma du clivage est présenté en figure 1.8.

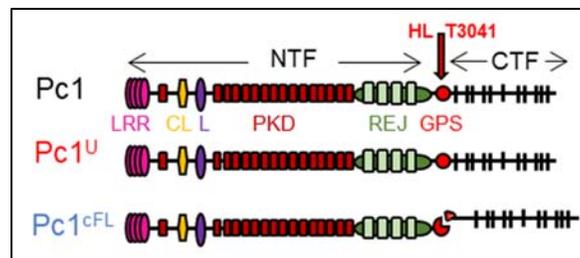


Figure 1.8 Clivage de la polycystine-1 au site protéolytique du récepteur couplé aux protéines G (motif GPS). Schéma de la structure de la polycystine-1 avec les différents motifs. Le clivage se produit au tripeptide HL*T3049 PC1 dans le motif GPS à la base de l'ectodomaine résultant en un fragment PC1_{NTF} et un PC1_{CTF}. Les produits générés par le clivage GPS : PC1^U, forme longue non-clivée de PC1; PC1^{cFL}, forme longue clivée dans laquelle PC1_{NTF} and PC1_{CTF} demeurent liées de manière non-covalente. LRR, répétition riche en leucine; PKD, répétitions PKD; CL, lectine de type C; REJ, récepteur pour le module *egg jelly*; GPS, site protéolytique du récepteur couplé aux protéines G; TM, domaine transmembranaire. Adapté de *Novel Functional Complexity of Polycystin-1 by GPS Cleavage In Vivo: Role in Polycystic Kidney Disease, Mol Cell Biol* (Kurbegovic, Kim et al. 2014)

PC1 possède aussi un domaine PLAT qui signifie polycystine-1, lipoxigénase et alpha toxine et est composé d'un β -sandwich en 2 feuillets de 4 brins chacun (Bateman and Sandford 1999). La conservation de lysine ou arginine chargées à la surface du cinquième brin bêta de tous les domaines PLAT eucaryotiques pourrait indiquer un site conservé pour la liaison de

ligand dans ce domaine (Bateman and Sandford 1999). Le domaine PLAT de PC1 serait important pour la médiation d'interactions avec des protéines membranaires (Bateman and Sandford 1999). Suite au domaine GPS, PC1 a 11 domaines transmembranaires qui se terminent avec un domaine liant les protéines G (Ferreira, Watanabe et al. 2015). Malgré son large domaine extracellulaire, la partie terminale intracellulaire de PC1 semble la partie la plus importante. Sur la quarantaine de partenaires de PC1 connus, nombreux interagissent avec la partie C-terminal, par exemple, les protéines G hétérotrimérique, RGS7, Na⁺/K⁺ ATPase, β -caténine et Arf4 (Kim, Arnould et al. 1999, Parnell, Magenheimer et al. 2002, Zatti, Chauvet et al. 2005, Lal, Song et al. 2008, Torres and Harris 2009, Ward, Brown-Glaberman et al. 2011). La partie de C-terminale semble donc importante dans la signalisation intracellulaire. Le domaine *coiled-coil* dans cette partie terminale permettrait les interactions de PC1 avec PC2 (Qian, Germino et al. 1997).

1.6.2 Le motif *coiled-coil* de la polycystine-1

Entre 1950 et 1953 Pauling et Crick ont découvert le motif *coiled-coil* (Pauling et al., 1951, Crick 1952, Pauling et al., 1953). Ces motifs jouent des rôles mécaniques et structurels, servent d'échafaud, régulent la dimérisation et le réarrangement de facteur par hétérodimérisation et certains lient l'ADN (Lupas 1996). PC1 possède un domaine *coiled-coil* en C-terminal identifié dès 1997 entre les positions 4214-4248 (Qian, Germino et al. 1997). Ce domaine est une répétition de 5 heptades avec un domaine riche en prolines comme illustré à la figure 1.9 ci-dessous (Qian, Germino et al. 1997). Les cinq heptades sont représentatives d'un patron α -hélicoïdal retrouvés dans les motifs *coiled-coil*. La séquence N-terminale du motif inclue une séquence riche en sérines qui pourraient être phosphorylées par une variété de kinases (Su et al., 2015).

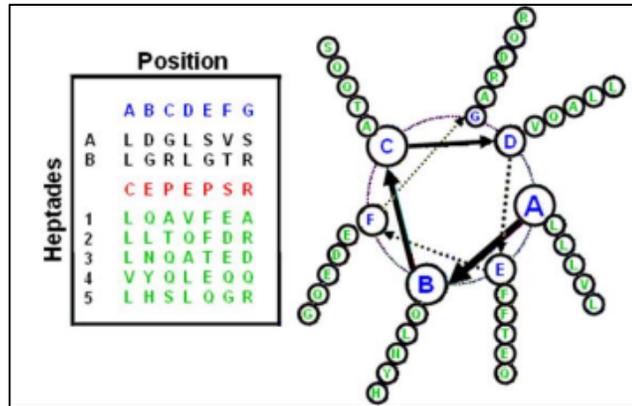


Figure 1.9 Motif *coiled-coil* de la polycystine-1.

L'encadré de gauche montre les positions des acides aminés de la polycystine-1 (PC1) des positions A à G (bleu) dans une heptade. De haut en bas, deux heptades potentielles (A et B) et 5 heptades principales (vert) sont montrées. Un groupe d'acides aminés riche en proline est aussi montré (rouge). (Côté 2009)

Le motif *coiled-coil* de PC1 semble important dans sa signalisation, puisque lorsque ses acides aminés critiques sont tronqués ou mutés par mutagenèse dirigée, l'activité avec certains de ses partenaires est perdue (Xiao et al., Xu, Rossetti et al. 2007, 2008). Ce motif permettrait aussi les interactions entre PC1 et PC2 en se liant à la partie terminale de PC2 (Qian, Germino et al. 1997). Plusieurs études démontrent que le motif *coiled-coil* de PC1 interagit avec certains partenaires outre PC2 (Qian, Germino et al. 1997). Comme mentionné plus haut, plusieurs partenaires de PC1 interagissent via sa partie C-terminale, certains directement via le motif *coiled-coil*. Les partenaires connus pour interagir directement via le motif *coiled-coil* de PC1 sont présentés au tableau 1.3. Le motif *coiled-coil* de PC1 serait impliqué dans l'augmentation de l'activité de la polycystine-2 (Xu, Gonzalez-Perrett et al. 2003). De plus, les mutations de PC1 dans son domaine *coiled-coil* causent la perte de la stimulation sur l'activité de canal de PC2 lorsque PC2 n'est pas muté (Xu, Gonzalez-Perrett et al. 2003). Une des mutations documentées comme causant PKD est la mutation Q4224P. Elle est localisée dans le domaine *coiled-coil* et abolit un site de restriction BsrI (Badenas, Torra et al. 1999, Casuscelli, Schmidt et al. 2009). Il a été proposé que cette mutation empêcherait la formation d'un site intact de liaisons pour PC2 en raison d'un point de brisure de l'hélice par le résidu proline. Pour confirmer l'hypothèse, une mutation équivalente a été créée chez la souris (Q4215P). Chez ce mutant, PC2 n'interagit effectivement pas avec PC1 (Casuscelli, Schmidt et al. 2009). Il semblerait donc que l'un des effets majeurs de la mutation PKD Q4224P est d'interférer au niveau de l'association entre PC1 et PC2.

Tableau 1.3. Les partenaires protéiques interagissant avec le domaine *coiled-coil* de la polycystine-1 et la fonction du complexe.

Partenaire via le domaine <i>coiled-coil</i> de PC1	Fonction du complexe	Référence
Polycystine-2	Canal, signalisation	(Qian, Germino et al. 1997, Tsiokas, Kim et al. 1997)
Vimentine	Filaments intermédiaires	(Xu, Sikaneta et al. 2001)
Cytokeratins K8/K18	Filaments intermédiaires	(Xu, Sikaneta et al. 2001)
Desmine	Filaments intermédiaires	(Xu, Sikaneta et al. 2001)
Jade1	Coactivateur de la transcription	(Foy, Chitalia et al. 2012)
Pascine-2	Organisation cytosquelette et migration cellulaire	(Yao, Su et al. 2014)
Rabep1	Transport intracellulaire Golgi-Cil	(Kim, Xu et al. 2014)
Siah-1	Régulation par la voie du protéasome dépendant de l'ubiquitine	(Kim, Jeong et al. 2004)

1.6.3 La polycystine-2

PC2 est une protéine d'environ 110 kDa avec 6 domaines transmembranaires et sa fonction est beaucoup mieux définie que PC1 (Cai, Maeda et al. 1999). Plusieurs résultats ont été obtenus à travers les années quant à sa fonction. En 2000, un résultat a montré que cette protéine, membre de la sous-famille de la super famille des canaux à potentiel de récepteur transitoire (TRP), pourrait être un canal à cation non-sélectif transportant des ions calcium (Hanaoka, Qian et al. 2000, Koulen, Cai et al. 2002). En 2004, un résultat suggérait que PC2 pouvait aussi être inhibé par le calcium (Cai, Anyatonwu et al. 2004). En 2016, une étude a suggéré que le canal PC2 serait activé par des ligands de la voie Wnt et que cette activation dépendrait de *PKDI/PC1* (Kim, Nie et al. 2016). Toujours en 2016, un groupe montre que PC2

serait en fait un canal conducteur Na^+/K^+ et un plus petit canal unique avec une conductance et une perméabilité plus faible au Ca^{2+} (Shen, Yang et al. 2016). En 2017, l'établissement et l'étude des structures de deux états conformationnels de PC2 permettent de proposer un mécanisme qui provoquerait l'inactivation de PC2 aux concentrations élevées de Ca^{2+} (Wilkes, Madej et al. 2017). PC2 est notamment exprimé abondamment aux membranes du réticulum endoplasmique (RE) (Koulen, Cai et al. 2002). PC2 a aussi un rôle au niveau de l'établissement de l'asymétrie gauche-droite durant l'embryogénèse en réponse au flux de fluides vers la gauche dans les cils (Bataille, Demoulin et al. 2011). PC2 est aussi retrouvé au niveau de la membrane plasmique et des jonctions latérales cellulaires où il joue un rôle dans les contacts cellule-cellule, dans la polarité cellulaire, dans la division cellulaire et l'apoptose (Grieben, Pike et al. 2017). Ce canal serait régulé par les cations divalents (Koulen, Cai et al. 2002), les événements de phosphorylation (Torres and Harris 2009), puis par le pH et le voltage (Gonzalez-Perrett, Batelli et al. 2002).

En 2017, une structure par cryo-microscopie électronique d'une construction tronquée terminale de PC2, en combinaison avec des données de cristallographie aux rayons X permet une meilleure compréhension de la structure de PC2 (Grieben, Pike et al. 2017). Leurs résultats concordent d'ailleurs avec une structure obtenue par des nanodisques de lipides l'année d'avant (Shen, Yang et al. 2016). Selon ces résultats, la polycystine-2 possède un repliement typique des canaux TRP avec un domaine spécifique aux polycystines enfermé dans le lumen du RE ou à la surface extracellulaire du canal (Grieben, Pike et al. 2017). Les quatre premières hélices transmembranaires (TMHs) de PC2 (S1-4) forment un domaine VSLD *voltage-sensor-like* et sont suivies par un domaine pore avec les deux autres TMHs (S5-6) séparées par deux pores en hélice (PH1, PH2) (Grieben, Pike et al. 2017). PC2 possède aussi un domaine TOP comprenant la boucle 1 entre le S1 et S2 du VSLD et qui contient un feuillet bêta central de 5 brins antiparallèles et trois hélice alpha (α 1-3) qui forment la surface supérieure du domaine (Grieben, Pike et al. 2017). La surface inférieure du feuillet bêta fait face à la surface du domaine pore et comprend les boucles S3 et S4 du VSLD ainsi qu'une épingle à cheveux bêta (Grieben, Pike et al. 2017). La structure de PC2 est présentée à la figure 1.10a. Peu de temps après cette publication, l'établissement de deux structures de deux états conformationnels de PC2 humain

pleine longueur vient confirmer les précédents résultats de Grieben et al et apporte des informations supplémentaires (Wilkes, Madej et al. 2017). Les structures permettent de révéler que le domaine TOP montre différents états de glycosylation selon la conformation. De plus, Selon l'état conformationnel, un cation ou plusieurs cations peuvent se lier montrant que PC2 peut être en mode ion unique ou multi-ions (Wilkes, Madej et al. 2017). En bref, cela reflète la diversité de fonction et de localisation de PC2 (Wilkes, Madej et al. 2017). Plusieurs résultats suggèrent qu'un domaine *coiled-coil* (CC2) dans le C-terminal de PC2 (Ser835-Ala873) serait important pour la formation du complexe PC1-PC2 (Kobori et al., 2009, Yu, Ulbrich et al. 2009, Giamarchi, Feng et al. 2010, Ong et al., 2011). Certains résultats suggèrent que ce domaine formerait un homotrimère pour se lier au domaine *coiled-coil* de PC1 tandis que plusieurs autres résultats suggèrent qu'il formerait plutôt un homotétramère (figure 1.10b) (Kobori, Smith et al. 2009, Yu, Ulbrich et al. 2009, Shen, Yang et al. 2016). Le domaine *coiled-coil* de PC2 permettrait la dimérisation du C-terminal de PC2 et la reconnaissance de PC1 (Giamarchi, Feng et al. 2010).

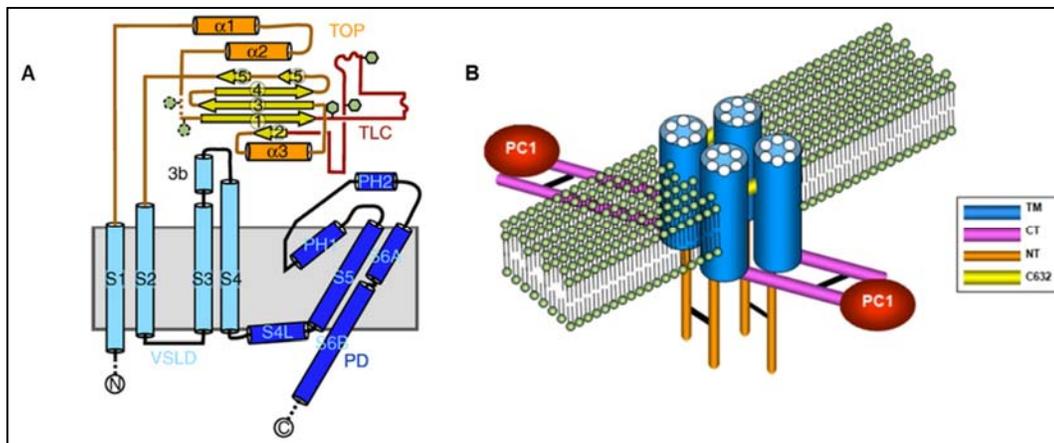


Figure 1.10 Structure et modèle de dimérisation de la polycystine-2

A) Structure secondaire de la polycystine-2 montrant le domaine VSLD, les hélices S1-S4, le domaine TOP (orange et jaune), les domaines pores (PD) S5, PH1, PH2 et S6 (bleu). Les cylindres, flèches et hexagones représentent respectivement les hélices, brins bêta et les sites de glycosylation. B) PC2 et ses domaines de dimérisation. PC2 forme un homotétramère avec la membrane transmembranaire (TM). L'homodimérisation du C-terminal (CT) par le *coiled-coil* de PC2 (CC2) et la dimérisation du N-terminal (NT) par le domaine NT sont illustrés par des traits noirs. Les ponts disulfures entre les monomères de PC2 sont médiés par Cys632 (jaune). Figures tirées respectivement de *Structure of the polycystic kidney disease TRP channel Polycystin-2 (PC2)*. *Nat Struct Mol Biol*. (Permission obtenue, Annexe I) et *A single amino acid residue constitutes the third dimerization domain essential for the assembly and function of the tetrameric polycystin-2 (TRPP2) channel*. *J Biol Chem*. (Sous licence CC BY-NC 3.0) (Ong et al., 2011, Grieben, Pike et al. 2017)

1.6.3 Le complexe des polycystines

L'existence d'un complexe entre PC1 et PC2 a été suggéré. Les deux protéines co-assembleraient à la membrane pour produire un canal et réguler la morphologie et la fonction des tubules rénaux à la manière d'un complexe mécanosensitif en détectant les changements dans les flux (Hanaoka, Qian et al. 2000, Newby, Streets et al. 2002, Nauli, Alenghat et al. 2003). Plusieurs mécanismes sont proposés dans lesquels le complexe PC1-PC2 détecterait des signaux extracellulaires qui seraient ensuite transmis au noyau, mais ils nécessitent d'être investigués (Torres and Harris 2006). La formation du complexe entre PC1 et PC2 pourrait aussi faciliter leur maturation et sortie du RE ou du golgi (Cai, Maeda et al. 1999, Gainullin et al., 2015, Su, Wu et al. 2015). Comme mentionné plus haut, le motif *coiled-coil* de PC1 est connu pour médier l'interaction entre PC1 et PC2 (Qian, Germino et al. 1997, Tsiokas, Kim et al. 1997, Casuscelli, Schmidt et al. 2009, Giamarchi, Feng et al. 2010, Gainullin, Hopp et al. 2015). Lorsque le motif *coiled-coil* est délété (mutant tronqué YFP-PC1 Δ CC), PC2 localise au cil beaucoup moins efficacement, à 37% comparativement à la construction sauvage dans des cellules IMCD-3 (Su, Wu et al. 2015). D'autres mutations dans la région du motif *coiled-coil* ont aussi été testées dans ce modèle cellulaire, la première est la mutation Q4215P qui correspond à la mutation *PKDI* chez l'humain (Q4224P) et la deuxième est un double point mutation L4229A/L4233A qui abolit la formation de la structure *coiled-coil* prédite. Ces deux mutants tronqués sont fonctionnellement atteints au même niveau que le premier mutant YFP-PC1 Δ CC (Su, Wu et al. 2015). Toutefois, même les mutants de PC1 qui n'ont pas le motif *coiled-coil* pour interagir avec PC2 ou PC2 avec sa séquence ciblant le cil (CTS) mutée parviennent à promouvoir le transport d'un et l'autre jusqu'au cil. Qui plus est, PC2, toujours en lignées cellulaires, est co-immunoprécipité avec plusieurs des mutants de PC1 qui n'ont pas le motif *coiled-coil* (Su, Wu et al. 2015). Ainsi, il est possible que PC1 et PC2 interagissent par un autre domaine que le *coiled-coil*. L'une des hypothèses est que le transport au cil primaire est plus efficace lorsque PC1 et PC2 forment un complexe, mais semble possible sans le complexe. L'autre hypothèse soutenue est la nécessité du motif *coiled-coil* pour les interactions entre PC1 et PC2.

1.6.4 Le transport et la maturation des polycystines

Les polycystines sont localisées dans divers et parfois différents compartiments cellulaires : le cil, la membrane plasmique, le réticulum endoplasmique et les exosomes urinaires ou vésicules ressemblant aux exosomes (EVLs). Les exosomes urinaires sont des petites vésicules, environ 50-100nm, on les retrouve dans l'urine dite normale (Pisitkun, Shen et al. 2004, Hogan, Manganelli et al. 2009). Ces exosomes sont les produits finaux de la voie des corps multivésiculaire (MVB). PC1/PC2 sont empaquetés dans les vésicules intraluminales à l'intérieur des MVB et ces vésicules sont sécrétées comme exosomes lorsqu'elles fusionnent avec la membrane plasmique (Hogan, Manganelli et al. 2009). Le clivage de PC1, la maturation et le transport intracellulaire jusqu'à la présence dans les exosomes des polycystines pourraient être co-dépendant ou indépendant de ces dernières (Ong and Harris 2015). La figure 1.11 ci-dessous résume les présentes hypothèses concernant la maturation et le transport des polycystines :

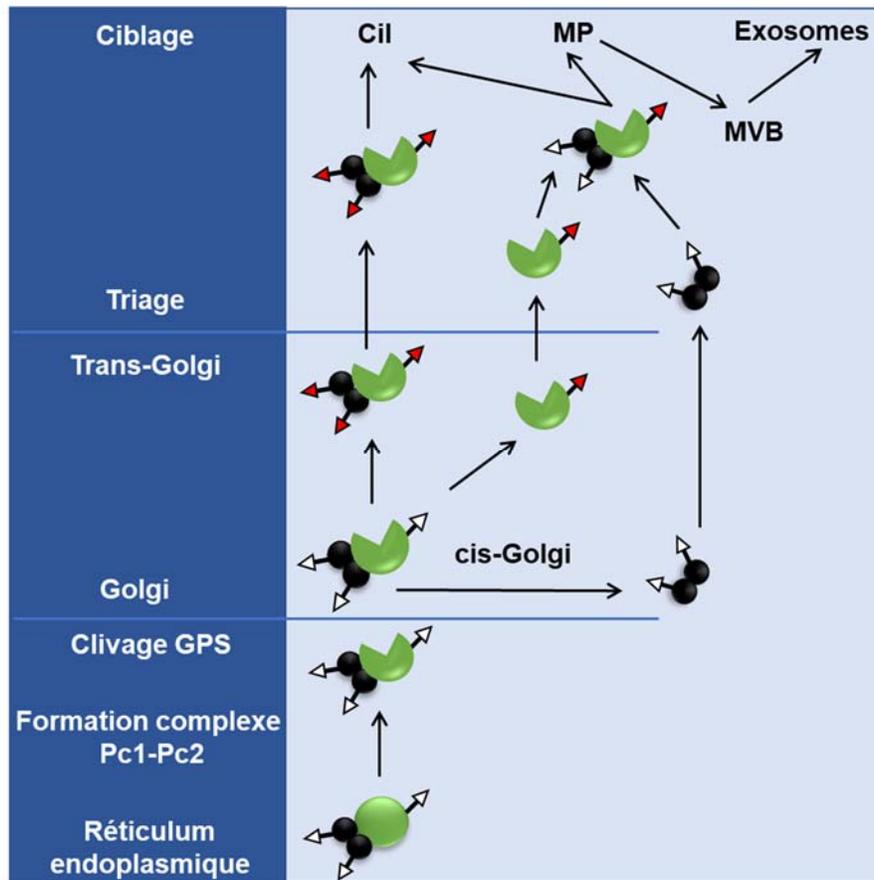


Figure 1.11 La maturation et le transport intracellulaire du complexe des polycystines

Pc1 (vert) lie le dimère Pc2 (noir) dans le réticulum endoplasmique avant le clivage au site GPS. Les protéines sont exprimées sous leur forme immature (triangle blanc). Suite au clivage, le complexe transite jusqu'au Golgi, acquiert sa forme glycosylée mature par l'ajout de N-acétylglucosamine (Vagin, Kraut et al. 2009) en passant par le trans-Golgi (triangle rouge). Puis, Pc1 est trié et ciblé. Un modèle alternatif propose que Pc2 peut sortir de manière indépendante de Pc1 qui lui suit la maturation au trans-Golgi. Le complexe serait reformé post-Golgi, trié et ciblé. Les différentes cibles de Pc1-Pc2 sont indiquées : cil, MP (membrane plasmique), MVB (corps multi-vésiculaires), exosomes. Adapté de *A polycystin-centric view of cyst formation and disease: the polycystins revisited*, *Kidney International*. (Ong and Harris 2015)

PC2 étant abondant au niveau du réticulum endoplasmique, il doit être retenu au niveau de la voie sécrétoire précoce (*early secretory pathway*). La rétention de PC2 au niveau du réticulum endoplasmique implique donc un signal de rétention dans son C-terminal (Cai, Maeda et al. 1999). Le transport de PC2 serait contrôlé par des séquences spécifiques au niveau de son N-terminal et de son C-terminal et dépendrait aussi de la disponibilité de ses partenaires, par exemple : RyR2, IP3R ou TRPV4 (Li, Wright et al. 2005, Anyatonwu, Estrada et al. 2007, Kottgen, Buchholz et al. 2008). Plusieurs partenaires sont impliqués dans le transport des

polycystines. PC1 interagit avec un complexe de GTPases (Arf4, Rab6, Rab11), ArfGAP, et ASAP1 dans le Golgi pour faciliter son bourgeonnement du Golgi et son exocytose (Ward, Brown-Glaberman et al. 2011). Il a été montré qu'un motif R₆VXP dans le N-terminal de PC2 est important pour sa localisation au niveau du cil et que ce transport serait indépendant de PC1 (Geng, Okuhara et al. 2006). La séquence ciblant le cil de PC2 (R₆VXP) lie aussi Arf4 (Ward, Brown-Glaberman et al. 2011). Une séquence importante pour le ciblage au cil a aussi été identifiée chez PC1 dans son C-terminal (KVHPSST) (Ward, Brown-Glaberman et al. 2011). Tout comme pour PC1, La N-glycosylation de PC2 est aussi importante pour le transport de PC2 jusqu'au Golgi et pour son ciblage (Hofherr, Wagner et al. 2014). Les sites de N-glycosylation de PC2 sont au niveau du domaine exoplasmique de sa boucle 1 (Hofherr, Wagner et al. 2014). Une étude a montré que le complexe PC1/PC2 serait aussi couplé à Rabep1, les domaines *coiled-coil* de PC1 et Rabep1 interagissant ensemble. Rabep1 couplerait le complexe de polycystines à GGA1/Arl3 dans le trans-Golgi, un module de transport jusqu'au cil (Kim, Xu et al. 2014).

Les défauts dans le clivage, la maturation et la glycosylation de la polycystine-1 sont tous associés à la polykystose rénale autosomique dominante (Chapin, Rajendran et al. 2010, Inoue, Sohara et al. 2014, Kim, Xu et al. 2014, Gainullin, Hopp et al. 2015, Porath, Gainullin et al. 2016). La diminution de PC1 dans les exosomes est aussi associée à PKD (Hogan, Manganelli et al. 2009, Hogan, Bakeberg et al. 2015)

1.7 La pathogénèse de PKD

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la maladie sont au cœur des recherches sur la polykystose rénale depuis plus de 20 ans. Plusieurs hypothèses pour expliquer ces mécanismes ont été émises dont le *two-hit*, l'effet de dosage et le *third-hit*. L'hypothèse du *two-hit* suggère la perte complète de l'allèle normale, l'effet de dosage suggère que les kystes se développent seulement lorsque les niveaux de la protéine fonctionnelle sont en-dessous ou au-dessus d'un certain seuil et l'hypothèse du *third-hit* suggère qu'une modification supplémentaire

est nécessaire en plus des deux autres hypothèses pour expliquer la pathogénèse. Les trois hypothèses sont présentées à la figure 1.12 chez l'humain et la souris.

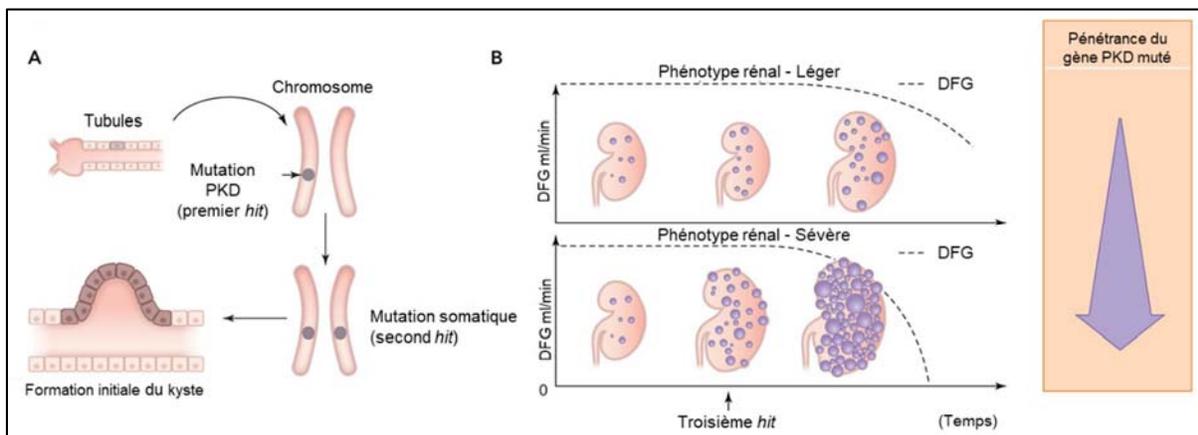


Figure 1.12 Mécanismes potentiels menant à la formation des kystes dans PKD

A) Les kystes dérivent d'une cellule monoclonale qui subit une première mutation germinale (premier hit) inactivant un allèle *PKD1* ou *PKD2* et qui développe une mutation somatique (second hit) sur l'autre allèle. B) Le graphique montre un exemple de DFG et de progression des kystes pour un phénotype PKD léger (haut) versus sévère (bas). Le troisième *hit* et la pénétrance incomplète du gène muté PKD peut expliquer la sévérité et le taux de croissance des kystes (flèche mauve). Figure tirée et traduite de *Molecular pathways and therapies in autosomal-dominant polycystic kidney disease. Physiology (Bethesda)* (Saigusa and Bell 2015). Permission sans licence.

1.7.1 Mécanisme du *Two hit*

Les reins de l'humain sont constitués d'environ 10^6 néphrons desquels moins de 5% sont kystiques chez les patients atteints de PKD (Gabow 1993). Cette caractéristique justifie un possible mécanisme de seconde mutation ou *two-hit*. Selon ce mécanisme, une première mutation germinale a lieu, inactivant un allèle *PKD1* ou *PKD2*, puis les kystes dérivent d'une cellule unique dite monoclonale qui développe un second « hit », une mutation somatique inactivant l'autre allèle de *PKD1/PKD2* (Saigusa and Bell 2015). Certains résultats supportent cette hypothèse, par exemple, l'épithélium de reins kystiques en provenance de kystes simples de patients PKD a pu être isolé pour montrer que les kystes individuels sont en fait monoclonaux (Qian et al., 1996). Qian et al. ont montré qu'un sous-ensemble de kystes (5-10%) avait une perte d'hétérozygotie pour deux marqueurs polymorphes KG8 et EJ1 étroitement liés situés dans *PKD1* et l'haplotype normal était perdu (Qian, Watnick et al. 1996). Supportant un modèle de seconde mutation (*two-hit*) ou d'anomalies accumulées, Watnick et al ont montré qu'une

seconde manifestation PKD est associée avec l'inactivation somatique de l'allèle normale de *PKD1* (Watnick, Torres et al. 1998). Chez les 14 kystes analysés, l'allèle normale de *PKD1* est perdu ou muté. La plupart des kystes sont susceptibles d'être composés d'une combinaison unique de mutations germinales et somatiques (Watnick, Torres et al. 1998). Pareillement, au niveau du gène *PKD2*, 11 des 12 kystes analysés montrent une mutation somatique non-aléatoire dans la copie de *PKD2* hérité du parent sain (Pei, Watnick et al. 1999). Selon ces résultats, la kystogenèse dans PKD nécessiterait l'inactivation des deux copies de *PKD1* (Watnick, Torres et al. 1998, Pei, Watnick et al. 1999). Toutefois, la perte d'hétérozygotie des kystes humains monoclonaux expliquent seulement entre 5.8% et 24% des kystes (Qian, Watnick et al. 1996, Brasier and Henske 1997, Koptides, Constantinides et al. 1998, Badenas, Torra et al. 2000). Ainsi, le mécanisme de seconde mutation ne semble pas pouvoir expliquer toute la pathogenèse de PKD.

Chez la souris, l'une des premières bases moléculaires à être établie pour le phénotype de polykystose rénale est le mécanisme de perte de fonction (Lu, Peissel et al. 1997, Wu, Markowitz et al. 2000). En 1997, Lu et al introduisent une mutation tronquant *Pkd1* qui mime une mutation de la maladie où les souris hétérozygotes ne montrent pas de phénotype de la maladie (Lu, Peissel et al. 1997). Les homozygotes (*Pkd1*^{-/-}) meurent pendant la période périnatale et les kystes débutent leur formation dès le jour embryonnaire 15,5. Quelques années plus tard, Wu et al démontrent que les souris *Pkd2*^{-/-} meurent in utero dès le jour embryonnaire 13,5 (Wu, Markowitz et al. 2000). De par ces modèles « null » pour *Pkd1* et *Pkd2*, les kystes sont associés à une perte de fonction. Les bases moléculaires de la formation des kystes rénaux sont toutefois plus complexes à élucider. L'hypothèse du *two-hit* énoncé chez l'humain a été étudiée chez la souris. Des souris avec l'allèle hypermutable *Pkd2* (WS25) permettent de montrer que les pertes somatiques de *Pkd1* et *Pkd2* sont suffisantes pour la formation de kystes rénaux. Le mécanisme moléculaire serait récessif (Watnick, Torres et al. 1998, Wu, D'Agati et al. 1998). Ces modèles ne reproduisent toutefois pas toutes les manifestations extrarénales de la maladie. De plus, chez l'humain les kystes se développent surtout après la maturation des reins comparativement à ces modèles de souris *Pkd1*^{-/-} où les kystes se développent pendant le développement (Lu, Peissel et al. 1997, Wu, Markowitz et al. 2000, Lentine, Xiao et al. 2010).

Ces modèles sont d'un intérêt considérable pour l'étude de la maladie, mais ne permettent pas d'étudier tous les aspects de la polykystose rénale autosomique dominante.

1.7.2 Effet de dosage

Le second modèle expliquant la kystogenèse est celui de l'effet de dosage. La surexpression de la polycystine-1 a été observée à plusieurs reprises dans les reins de patients PKD suggérant l'implication d'un mécanisme d'effet de dosage pour *PKD1* (Geng, Segal et al. 1996, Ward, Turley et al. 1996). L'expression de la polycystine-2 a aussi été observée dans les kystes de patients (Ong, Ward et al. 1999). Ces observations sont pertinentes puisqu'elles suggèrent que la polykystose rénale ne peut être expliquée seulement par un mécanisme de perte de fonction. Toutefois, l'expression de polycystines dans l'épithélium des kystes semble variable. L'expression est augmentée dans certains kystes comparativement à l'expression dans les reins normaux, mais certains kystes ne montrent aucune expression des polycystines (Ibraghimov-Beskrovnaya, Dackowski et al. 1997). Ces observations suggèrent que dans certains kystes, il n'y aurait pas d'expression des polycystines alors que dans d'autres l'allèle normal serait surexprimé (Ibraghimov-Beskrovnaya, Dackowski et al. 1997). Plusieurs mutations de *PKD1* seraient associées à différents niveaux de sévérité de la maladie. Depuis 2009, les évidences pour un modèle de dosage se succèdent les unes après les autres, n'excluant toutefois pas l'importance des mutations somatiques dans *PKD1* et *PKD2*. Deux familles consanguines dépistées pour les mutations dans *PKD1* et *PKD2* ont permis de trouver des variants génétiques mis-sens de *PKD1* (Rossetti, Kubly et al. 2009). Ces cas montraient des sévérités différentes de la maladie due aux variants au sein d'une même famille ce qui suggère la présence d'allèle *PKD1* avec pénétrance incomplète (Rossetti, Kubly et al. 2009).

Grâce aux études chez la souris, il est vite devenu évident que le modèle des *two-hit* n'était pas le seul mécanisme pouvant expliquer la kystogenèse. En 2004, Peters et son équipe publient un résultat démontrant qu'une diminution de l'expression de *Pkd1* est suffisante pour causer un phénotype de polykystose rénale dans la souris. Ils génèrent un modèle de souris avec un allèle hypomorphique *Pkd1^{nl}* hébergeant un marqueur de sélection intronique pour la

néomycine (Lantinga-van Leeuwen, Dauwerse et al. 2004). Cette cassette cause un épissage anormal de l'intron 1, il en résulte en un épissage normal de seulement 13-30% dans les transcrits de *Pkd1*. Les souris homozygotes sont viables avec des kystes bilatéraux contrairement au homozygotes *Pkd1*^{-/-} (Lantinga-van Leeuwen, Dauwerse et al. 2004). La réduction du dosage de *Pkd1* semble suffisante pour l'initiation de la kystogénèse et les niveaux diminués de *Pkd1* peuvent dépasser la létalité embryonnaire de *Pkd1*^{-/-}. Les modèles d'animaux avec des allèles hypomorphiques développent des kystes, mais sont viables comme homozygotes. En 2006, une mutation conditionnelle dans *Pkd1* est générée en introduisant un site loxP et une cassette mc1-neo loxP flanquée entre dans les introns 30 et 34 (Jiang, Chiou et al. 2006). Ainsi, l'expression de *Pkd1* murin est partiellement inhibée (Jiang, Chiou et al. 2006). Les souris apparaissent normales à la naissance, mais développent progressivement des kystes rénaux ressemblant davantage au phénotype humain et suggérant une fois de plus qu'un abaissement du niveau d'expression de *Pkd1* est suffisant pour causer la kystogénèse (Jiang, Chiou et al. 2006).

Ainsi, l'avènement de modèles conditionnels pour *Pkd1* est une ressource non-négligeable. En 2007, un modèle de souris avec une délétion de *Pkd1* murin spécifique au rein inductible au tamoxifène est produit (Lantinga-van Leeuwen, Leonhard et al. 2007). Suite à l'injection de tamoxifène, les exons 2 à 11 sont délétés dans les reins. Cette délétion cause la formation de kystes (Lantinga-van Leeuwen, Leonhard et al. 2007). Dépendamment de l'âge de l'induction, le phénotype est différent. Lorsque traité entre 3 et 6 mois, les souris développent un phénotype kystique moins sévère alors qu'à quatre jours d'âge, le phénotype est sévère avec le développement de kystes massifs (Lantinga-van Leeuwen, Leonhard et al. 2007). Une autre étude montre que chez des souris *Pkd1*^{cond/cond} au stade P13 et plus jeunes développent un phénotype kystique sévère en trois semaines tandis que les souris induites entre P14 et P21 ont des reins qui semblent normaux, même trois mois suivant l'induction (Piontek, Menezes et al. 2007). L'apparition de la maladie kystique est plus tardive (5 mois) pour les souris induites après P13 (Piontek, Menezes et al. 2007). L'inactivation de *Pkd1* lors du développement des reins chez la souris semble donc particulièrement néfaste. Le développement des kystes chez l'humain étant plus tardif, les modèles conditionnels sont importants pour la recherche.

Afin de déterminer si la surexpression de *Pkd1* est un mécanisme pathogénique dans la kystogénèse, plusieurs modèles ont été produits dont les modèles de souris TPK, SBPkd1_{TAG} et Pkd1_{TAG} (Pritchard, Sloane-Stanley et al. 2000, Thivierge, Kurbegovic et al. 2006, Kurbegovic, Cote et al. 2010). Deux lignées de souris TPK (TPK1 et TPK3) avec ~30 copies d'un transgène correspondant au fragment de 108kb du gène *PKDI* humain, plus le gène *TSC2* ont été produites (Pritchard, Sloane-Stanley et al. 2000). Les lignées de souris produisent l'ARNm de *Pkd1* et une protéine Pcl similaires au patron endogène. Ces lignées de souris TPK développent un phénotype de kystogénèse caractérisé par des micro-kystes souvent d'origine glomérulaire (Pritchard, Sloane-Stanley et al. 2000). Ce modèle est le premier à montrer qu'une surexpression de *PKDI* peut mener à un phénotype de polykystose rénale. Les souris SBPkd1_{TAG} et Pkd1_{TAG} ont été établies en modifiant par recombinaisons homologues un chromosome artificiel bactérien de Pkd1 (Pkd1-BAC) (Thivierge, Kurbegovic et al. 2006, Kurbegovic, Cote et al. 2010). Ces modifications ont permis de cibler un profil d'expression de *Pkd1* limitée aux reins adultes (SBPkd1_{TAG}) ou un profil d'expression systémique dans les tissus natifs en plus des reins (Pkd1_{TAG}). Les lignées transgéniques générées surexpriment de 2 à 15 fois le transgène *Pkd1* comparativement aux niveaux endogènes (Thivierge, Kurbegovic et al. 2006, Kurbegovic, Cote et al. 2010). Les souris développent des kystes et une insuffisance rénale. Ces modèles montrent que la surexpression de *Pkd1* est suffisante pour causer la kystogénèse rénale. Plusieurs souris Pkd1_{TAG} développent des anomalies cardiaques ou ont des lésions cérébrales occasionnelles avec des anévrismes cérébraux rompus ou non. Ces modèles de dosage démontrent que la surexpression de *Pkd1* peut déclencher les phénotypes rénaux et extrarénaux ressemblant aux humains atteints de PKD : kystes aux reins, kystes au foie, anomalies cardiaques et anévrismes cérébraux (Thivierge, Kurbegovic et al. 2006, Kurbegovic, Cote et al. 2010).

1.7.3 Mécanisme du *Third hit*

La troisième hypothèse pour expliquer la pathogénèse de la polykystose autosomique dominante est celle d'un troisième « hit » ou *third-hit* requis pour le développement rapide des kystes, c'est-à-dire une troisième modification (Takakura et al., 2008). En effet, la sévérité du phénotype de polykystose rénale est hautement variable, même au sein de la même famille. Le

phénotype peut varier : cas in utero, cas avec de kystes rénaux massifs très élargis, cas avec un IRT vers les 60 ans et cas de patients très âgés qui ont une fonction rénale suffisante (Rossetti et al., 2007). Il a donc été suggéré que des facteurs environnementaux ou des gènes modificateurs pourraient influencer la pathogénèse (Rossetti et al., 2007).

Ces hypothèses de mécanismes pathogéniques ont été étudiés chez la souris. Tatakura et al. ont utilisé un modèle de souris transgénique Mx1Cre pour induire l'inactivation somatique de *Pkd1* à des points spécifiques dans le temps. L'induction d'une mutation somatique aux souris âgées d'une semaine cause un phénotype sévère de polykystose rénale un à deux mois plus tard tandis que l'inactivation chez les reins matures à 5 semaines résulte en la formation focale de kystes un à deux mois plus tard, avec une progression focalisée (Takakura, Contrino et al. 2008). Ces résultats suggèrent un troisième « hit » qui déclencherait la réactivation du programme développemental ou la prolifération cellulaire chez l'adulte requis pour le développement rapide des kystes dans les reins adultes (Takakura, Contrino et al. 2008).

2. Projet de recherche

La polykystose rénale autosomique dominante (PKD) est la maladie génétique héréditaire dominante la plus commune. Elle est majoritairement causée par les mutations du gène *PKD1* qui encode pour la polycystine-1. Mon intérêt vise plus particulièrement le domaine intracellulaire *coiled-coil* de la polycystine-1. Mon projet de recherche porte donc sur les analyses intracellulaires des interactions et de la signalisation de la polycystine-1 et de son motif *coiled-coil* dans des lignées de souris transgéniques. Le but de mon projet de recherche est d'approfondir notre compréhension des mécanismes moléculaires qui régissent la polykystose rénale.

2.1 Mise en contexte et objectifs

Parmi les motifs de la polycystine-1 (PC1), le motif *coiled-coil* dans le domaine intracellulaire interagit avec plusieurs protéines impliquées dans différentes voies de signalisation, interactions cellules-cellules, cellules-matrice extracellulaire et est critique pour le clivage de PC1 (Kurbegovic, Kim et al. 2014, Trudel, Yao et al. 2016). Les polycystines 1 et 2 interagiraient via ce domaine *coiled-coil* de PC1 pour former des complexes importants dans la signalisation. L'importance du domaine *coiled-coil* est démontrée par des mutations de PC1 dans ce motif chez des patients PKD (Peral, San Millan et al. 1996). Ce motif *coiled-coil* semble avoir une importance capitale dans la PKD. Mon projet de maîtrise vise à élucider le rôle du motif *coiled-coil* intracellulaire de la polycystine-1. L'implication du motif *coiled-coil* de Pc1 sera caractérisée dans la maladie PKD chez la souris afin de déterminer son rôle moléculaire et cellulaire dans la signalisation, dans les interactions protéiques et dans la kystogenèse.

2.2 Résultats préliminaires

Le laboratoire a généré plusieurs souris modifiées génétiquement. Deux séries de lignées de souris *Pkd1* transgéniques ont été produites. Un chromosome artificiel bactérien (BAC) *Pkd1*

murin a d'abord été modifié avec l'introduction d'une mutation silencieuse par recombinaison homologue pour produire un transcrit pleine longueur (BAC-Pkd1_{TAG}). La première série de souris est composée de trois lignées Pkd1_{TAG} 6, 18, 26 transgéniques surexprimant *Pkd1* entre 2-10 copies. La caractérisation de ces lignées de souris Pkd1_{TAG} au niveau rénal et extrarénal montre le développement d'une polykystose rénale et systémique (Kurbegovic, Cote et al. 2010). De plus, l'expression d'ARN et de la protéine sont à des niveaux stables (Kurbegovic, Cote et al. 2010). Une deuxième série de quatre lignées transgéniques Pkd1_{Δcoiled-coil} ont été générées par recombinaison homologue à partir du BAC-Pkd1_{TAG} où les 25 acides aminés du motif *coiled-coil* de Pcd ont été délétés. Ces souris Pkd1_{Δcoiled-coil} 30,32,42,49 expriment entre 1 et 10 copies du transgène. Les résultats préliminaires sur ces lignées exprimant Pkd1_{Δcoiled-coil} montrent que les souris ne développent pas la polykystose rénale même au-delà d'un an d'âge (fig2.1A). Ces résultats indiquent un rôle déterminant du motif *coiled-coil* dans la formation de kystes rénaux et au niveau systémique. Au niveau moléculaire, des analyses de *Pkd1* chez les souris Pkd1_{Δcoiled-coil} montrent que l'expression d'ARN et de la protéine sont à des niveaux stables et que l'expression augmente en fonction du nombre de copies du transgène (fig2.1B, C, D). Ensuite, le laboratoire a produit des souris nulles pour le gène *Pkd1* (Pkd1^{-/-}). Ces souris développent une polykystose rénale et des kystes au pancréas dès la naissance et meurent avant le jour post-natal 1. Finalement, des croisements binaires entre les souris Pkd1_{TAG26} (~10 copies) ou Pkd1_{Δcoiled-coil} 30, 32, 42, 49 et les souris Pkd1^{-/-} ont été effectués. Les souris Pkd1^{-/-}; Pkd1_{TAG26} montrent une complémentation du phénotype, de la naissance à plusieurs mois d'âge (fig.2.1E). Les souris Pkd1^{-/-}; Pkd1_{Δcoiled-coil} 30, 32 et 49 montrent une complémentation temporaire du phénotype, mais développent progressivement la polykystose rénale et meurent avant P20 (fig.2.1E). La lignée Pkd1^{-/-}; Pkd1_{Δcoiled-coil} 42 complémente le phénotype léthal Pkd1^{-/-} et les souris survivent sans développer de polykystose rénale à plus d'un an d'âge (fig2.1E). L'effet de dosage de la polycystine-1 ainsi que le motif *coiled-coil* semblent donc avoir un impact important dans la kystogenèse.

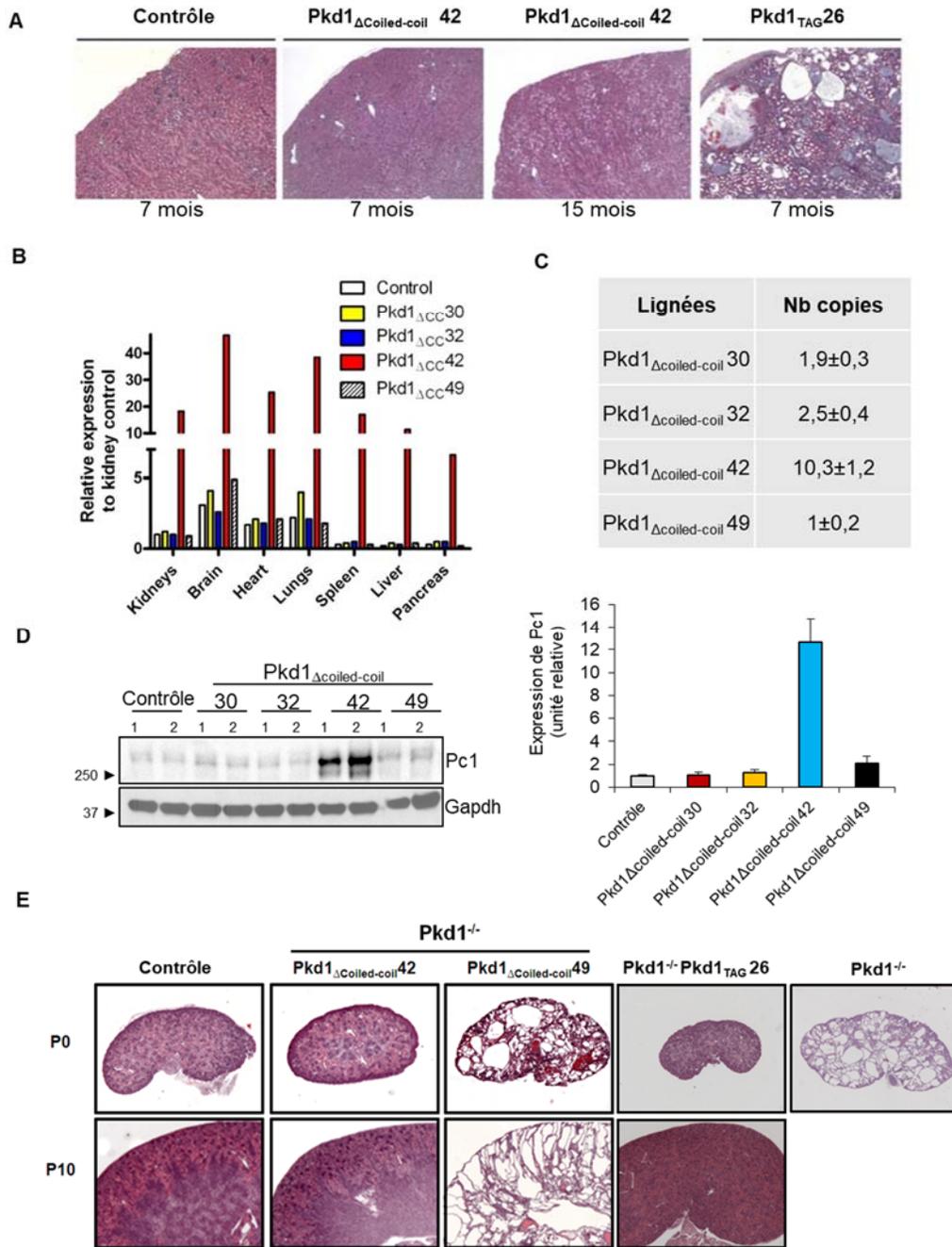


Figure 2.1. Analyses préliminaires des lignées de souris transgéniques et binaires Pkd1 Δ coiled-coil et Pkd1 Δ Tag.
 A) Sections corticales de reins adultes de contrôle (Pkd1 $^{+/+}$), Pkd1 Δ coiled-coil 42 et Pkd1 Δ Tag26 colorées à l'hématoxyline et éosine. B) Expression du transgène Pkd1 Δ coiled-coil (gauche) aux reins contrôles et évaluée par PCR quantitatif dans les reins (kidneys), cerveau (brain), cœur (heart), poumons (lungs), rate (spleen), foie (liver), pancréas (pancreas). C) Nombre (Nb) de copies du transgène Pkd1 Δ coiled-coil chez chaque lignée. D) Analyse de Pc1 sur des extraits protéiques rénaux totaux des souris Pkd1 Δ coiled-coil 30, 32, 42, 49 et contrôle Pkd1 $^{+/+}$ à P10 et histogramme des niveaux relatif de Pc1. E) Sections de reins à P0 et P10 de contrôle (Pkd1 $^{+/+}$), Pkd1 $^{-/-}$; Pkd1 Δ coiled-coil 42, 49, Pkd1 $^{-/-}$; Pkd1 Δ Tag26 et Pkd1 $^{-/-}$ colorées à l'hématoxyline et éosine. *Note : A, B, C et E sont des résultats préliminaires antérieurs au présent projet, obtenus par le laboratoire de Dre Trudel. D, est un résultat préliminaire obtenu par ma personne.

2.3 Hypothèses du projet

Les résultats préliminaires ci-haut suggèrent que l'effet de dosage de la polycystine-1 ainsi que le motif *coiled-coil* ont un impact important dans la kystogénèse de PKD. À partir de ces résultats préliminaires, l'hypothèse principale de ce projet est que le motif *coiled-coil* de la polycystine-1 (Pc1) n'est pas primordial à la fonction de la polycystine-1. Plus précisément, nous suggérons que la polycystine-1 supprimée de son motif *coiled-coil* pourrait suivre sa maturation normale et être transportée jusqu'à certaines de ses cibles hors du réseau trans-golgien. Nous supposons aussi que selon le niveau de la polycystine-1 tronquée de ce motif, la réussite de la maturation et du transport de la polycystine-1 sera différente. Finalement nous supposons que certaines interactions médiées par le motif *coiled-coil* de la polycystine-1, plus précisément celles entre Pc1 et Pc2, ne sont pas fonctionnellement nécessaires à la signalisation ou bien qu'elles seraient possibles sans le motif *coiled-coil*.

2.4 Approche expérimentale

Le modèle de souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ s'avère un atout afin de comprendre la signalisation de la polycystine-1 et le rôle du motif *coiled-coil*. Les analyses de ces souris fourniront des informations pour une meilleure compréhension de la polykystose rénale.

Des croisements de souris binaires $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$; $Pkd1^{-/-}$ ont été effectués afin de déterminer :

- 1) Si les souris transgéniques $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ peuvent compléter le phénotype précoce de souris $Pkd1^{-/-}$ (résultats préliminaires).
- 2) Le rôle du motif *coiled-coil* de Pc1 dans la maturation et le transport intracellulaire.
- 3) Le rôle du motif *coiled-coil* de Pc1 dans les interactions et la signalisation avec ses partenaires.

Ces croisements binaires sont comparés aux souris $Pkd1_{TAG}$; $Pkd1^{-/-}$. J'ai effectué des analyses au niveau rénal et urinaire chez les souris binaires par des approches d'expression

biochimiques et protéiques. J'ai caractérisé le rôle du motif *coiled-coil* en évaluant son niveau d'expression, son implication dans le transport intracellulaire et ses modifications post-traductionnelles. De plus, les interactions entre Pc1 et Pc2 ont été analysées afin de déterminer si l'ablation du domaine *coiled-coil* empêche les interactions entre ces partenaires. Des analyses préliminaires sur la voie de réponse aux protéines mal repliées ont aussi été effectuées afin de détecter si Pc1 $_{\Delta coiled-coil}$ cause un stress au niveau du réticulum endoplasmique. Pour ces études, plusieurs approches biochimiques sont combinées : immunobuvardage de type *Western blot*, déglycosylation de Pc1, co-immunoprécipitation et isolation d'exosomes de l'urine.

3. Matériels et Méthodes

3.1 Modèle de souris

Les lignées transgéniques et les lignées contrôles utilisées durant les différentes manipulations sont les suivantes : C57BL/6, $Pkd1^{+/+}$, $Pkd1^{-/-}$, $Pkd1^{+/-}$, $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{TAG26}$ et $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 30, 32, 42, 49.

3.1.1 Lignées de souris transgéniques

Préalablement à ce projet, le laboratoire a isolé un BAC- $Pkd1$ qui contenait la séquence murine complète de $Pkd1$ (Thivierge, Kurbegovic et al. 2006). À partir de ce BAC- $Pkd1$ sauvage le laboratoire a généré par recombinaison homologue, un $Pkd1$ sauvage ($Pkd1_{TAG}$). Une mutation par substitution d'un nucléotide G par A a été introduite, sans modifier la séquence d'acides aminés, pour créer un nouveau site de restriction dans l'exon 10 de $Pkd1$ pour permettre de distinguer le transgène du transcrit endogène. Une deuxième construction ($Pkd1_{\Delta coiled-coil}$) a été produite à partir du $Pkd1_{TAG}$ par recombinaison homologue dans un vecteur BAC (PLD53.SC-AB) soit la délétion des 75 nucléotides de l'exon 46 de $Pkd1$ qui correspond au motif *coiled-coil* (acides aminés 4212-4236).

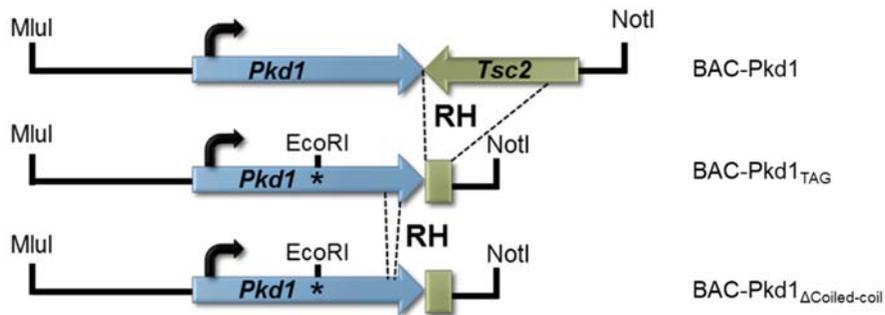


Figure 3.1 Constructions d'ADN BAC- $Pkd1_{TAG}$ et BAC- $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ par recombinaison homologue.

À partir du BAC- $Pkd1$ sauvage (haut) deux constructions par recombinaison homologue (RH) sont générées : $Pkd1$ sauvage BAC- $Pkd1_{TAG}$ (milieu) et BAC- $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ (bas). Les BACs sont digérés avec les enzymes de restriction $MluI$ and $NotI$ et les fragments $MluI$ - $NotI$ sont isolés. Le BAC- $Pkd1$ (haut) contient les gènes m $Pkd1$ (bleu) et m $Tsc2$ (vert) en orientation queue à queue. Le gène m $Tsc2$ est délété par RH et une mutation silencieuse (*) $EcoRI$ est incorporée (milieu et bas). Les 75 nucléotides de l'exon 46 sont délétés par recombinaison homologue pour générer le Bac- $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ (bas).

Pour obtenir les souris transgéniques Pkd1_{TAG26} et Pkd1_{Δcoiled-coil} 30, 32, 42, 49 exprimant entre 2-10 copies du transgène, les fragments Pkd1_{Δcoiled-coil} et Pkd1_{TAG} ont premièrement été isolés. Ces fragments ont ensuite été purifiés et microinjectés dans le pronucléus d'ovules de souris fertilisées (C57BL/6J X CBA/J) F2 puis l'intégrité du transgène des souris a été analysée, le tout selon la méthode préalablement décrite (Thivierge, Kurbegovic et al. 2006, Kurbegovic, Cote et al. 2010). Les souris Pkd1_{TAG26} et Pkd1_{Δcoiled-coil} ont ensuite été croisées avec des souris hétérozygotes Pkd1^{+/-} et rétrocroisées pour obtenir les lignées Pkd1^{-/-}; Pkd1_{TAG26} et Pkd1^{-/-}; Pkd1_{Δcoiled-coil} 30, 32, 42, 49.

3.1.2 Les lignées de souris *contrôles*

Les lignées de souris indiquées comme « contrôle » dans la partie résultats sont des souris de type sauvage ayant les deux copies de Pkd1 (Pkd1^{+/+}). Ces souris ont le fond génétique C57BL/6 et proviennent soit directement d'un croisement C57BL/6 x C57BL/6 ou découlent d'une reproduction Pkd1^{+/-}; Pkd1_{Δcoiled-coil} x Pkd1^{+/-} où le transgène n'est pas incorporé et où les deux copies de Pkd1 endogène sont présentes. Leur provenance n'est pas discriminée. Les souris *contrôles* Pkd1^{-/-} et Pkd1^{+/-} proviennent de reproduction Pkd1^{+/-} x Pkd1^{+/-} ou Pkd1^{+/-} x C57BL/6.

3.2 Extraction d'ADN et géotypage

3.2.1 Extraction d'ADN génomique

Pour l'extraction d'ADN de souris, 1-2 mm des queues de souris sont coupées et digérées dans un tampon avec la pronase (11459643001, *Roche*) (50 mM Tris pH8; 100 mM EDTA; 0,5% SDS; 0,6mg/ml pronase) toute la nuit à 55°C sous agitation. Les échantillons sont centrifugés (5min; 13000 RPM), le surnageant est récolté et l'ADN est précipité par l'ajout d'un volume d'éthanol 100% et 1/10 de volume de NaOAc (3M). Les tubes sont agités et centrifugés (5min; 13000 RPM), le surnageant est éliminé et le culot d'ADN est lavé à l'éthanol 70% puis centrifugé (5min; 13000 RPM). Les culots sont séchés et resuspendus dans du tampon TE (10 mM Tris pH8; 1 mM EDTA pH8).

3.2.2 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et Tqman

La réaction de polymérisation en chaîne et l'essai *Tqman* pour l'allèle *Pkd1* sont effectuées sur l'ADN génomique des souris. Les séquences du couple d'amorces permettant de détecter l'introduction du gène de résistance à la néomycine, néomycine phosphotransférase (Neo^r) par PCR sont : anti-sens 5'CAGGGTCTCCGGCCAG3' et sens 5'AGCGCATCGCCTTCTATCGC3' dans l'exon 1 de *Pkd1*. Les séquences du couple d'amorces permettant de détecter le transgène *Pkd1* par PCR sont: anti-sens 5'GTTTTGCCTGGATCCGCTGTTG3' dans l'exon 11 de *Pkd1* et sens 5'TGGTACCTGATTGGGCATGAT3' dans l'intron 9 de *Pkd1*. Le nombre de copies de *Pkd1* endogène (0, 1, 2) est déterminé par essai *Tqman* avec un couple d'amorces qui reconnaît le gène Neo^r dont les séquences sont : anti-sens 5'CCGGCTTCCATCCGAGTAC3' et sens 5'TCGACCACCAAGCGAAACA3. Le gène de référence pour la *Tqman* est le gène *Dolt* et les séquences pour le couple d'amorces est : anti-sens 5'GCCCCAGCACCATT3' et sens 5'TAGTTGGCATCCTTATGCTTCATC3'.

3.3 Extraction et quantification protéique

3.3.1 Extraits protéiques totaux

Entre le quart et l'organe entier (reins ou poumons) de souris au jour post-natal 10 (P10) est homogénéisé dans le tampon de lyse (Tris pH 20 mM; EDTA 2mM; NaCl 150 mM; triton 0,5%) et inhibiteurs de protéases (*protease inhibitor cocktail* Sigma-Aldrich P8340 1:100; PMSF 1mM). Les extraits homogénéisés sont laissés sur glace 45min, centrifugés (15min, 15000 RPM; 4°C) et le surnageant est récolté.

3.3.2 Extraits protéiques nucléaires

Entre le quart et le rein entier de souris à P10 est homogénéisé dans le tampon de lyse (Hepes 10 mM; KCl 10 mM; EDTA 0,1 mM; EGTA 0,1 mM), DTT 2 mM et inhibiteurs de

protéases (*protease inhibitor cocktail* Sigma-Aldrich P8340 1:100; PMSF 1mM). Les extraits sont laissés sur glace 15min, centrifugés (15min, 2500 RPM; 4°C). Le surnageant est récolté au besoin comme extrait cytoplasmique ou jeté. Le tampon de lyse nucléaire est ajouté (1,5 volume du culot) (Hepes 20 mM; KCl 400 mM; EDTA 1 mM; EGTA 1 Mm), DTT 2 mM et inhibiteurs de protéases (*protease inhibitor cocktail* Sigma-Aldrich P8340 1:100; PMSF 1mM). Les extraits sont agités à 4°C pendant 30min, centrifugés (15min, 15000 RPM, 4°C) et le surnageant est récolté.

3.3.3 Quantification des protéines

Les concentrations des surnageants recueillis sont quantifiées par la méthode acide bicinchoninique (BCA)(Smith, Krohn et al. 1985) avec la trousse Pierce™ BCA protein Assay de thermofisher et une courbe standard d'albumine de sérum bovin (BSA 20 mg/ml, molecular biology grade B9000S, New England Biolabs).

3.4 Immunobuvardage de type Western blot et Co-immunoprécipitation

Les anticorps primaires : souris anti-AIP1 1:1000 (622620, *BD Biosciences*), souris anti-GAPDH 1:10000 (ab8245, *Abcam*), lapin anti-mCC mPkd1 c-terminal 1:1400 (5183, gracieuseté de PKD Core Center, département de néphrologie, Université du Maryland, Baltimore), poulet anti-mCC igY mPkd1 c-terminal (5828, gracieuseté de PKD Core Center, département de néphrologie, Université du Maryland, Baltimore), rat anti-PC2, IB 1:500; IP 3,3-5µg/mg (γCC2, gracieuseté de S. Somlo, Renal Division, Department of Internal Medicine, Yale School of Medicine, New Haven, CT et généré contre une protéine de fusion correspondant aux acides aminés 687-962 de la poycystine-2 humaine), mouse anti-PC1 1:1000 (7e12, gracieuseté de C.J. Ward, département de néphrologie et hypertension, Mayo Clinic, Rochester, généré contre la région LRR, acides aminés 24-180), lapin anti-Xbp1s 1 :500 (poly6195, *Biologend*) et souris anti-BiP 1 :1000 (sc-376768, *Santa Cruz Biotechnology*), souris anti-Lamine A/C 1 : 1500 (4777S, *Cell Signaling*). *Les anticorps secondaires* : chèvre anti-Mouse

IgG peroxydase 1:2000-1:15000 (a4416, *Sigma-Aldrich*), chèvre anti-Rabbit IgG peroxydase 1:2000-1:5000 (a6154, *Sigma-Aldrich*), lapin anti-Rat IgG peroxydase 1:3000 (612-4304, *Rockland antibodies & assays*).

Les gels de polyacrylamide : IB PC2, BiP, Xbp1s : gel de résolution 8% ou 10% bis-acrylamide et gel de concentration 4% bis-acrylamide, tampon de migration (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0,1% SDS). IB PC1 : gels NuPAGE™ 3-8% Tris-Acetate, tampon de migration NuPAGE™ Tris-Acetate SDS ou NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris, tampon de migration NuPAGE™ MES SDS Running Buffer (ThermoFisher Scientific).

Co-immunoprécipitation : entre 800 et 1200µg de protéines sont incubées avec les anticorps (PC2 ou mCC) pendant au moins 5 heures sous agitation. Les billes sont ajoutées et agitées jusqu'au lendemain. Pour les études de clivage, les billes *goat anti-Chicken IgY-agarose* sont utilisées (P1010, *Aves lab*) et pour les IP de PC2 les billes *a/g plus* sont utilisées (sc-2003, *Santa Cruz*). Les échantillons sont lavés 5x dans du tampon de lavage (Tris pH 20 mM; EDTA 2mM; NaCl 150 mM; triton 0,5%) et inhibiteurs de protéases (*protease inhibitor cocktail* Sigma-Aldrich P8340 1:100; PMSF 1mM) et centrifugés entre chaque lavage (3min, 2500rpm, 4°C). Le surnageant est retiré, les billes sont resuspendues dans le tampon Laemmli 1X (3X : Tris-HCl 0,1875M pH 6,8; SDS 6%; glycérol 30%; bleu de bromophénol 0,006%; β-mercaptoéthanol 10%), bouillies 10min, 100°C et chargées sur le gel correspondant selon la méthode d'immunobuvardage.

Immunobuvardage : entre 20-50µg de protéines sont bouillies 10min, 100°C ou incubées 10min à 65°C pour PC1 dans le tampon de lyse (Tris pH 20 mM; EDTA 2mM; NaCl 150 mM; triton 0,5%) et tampon Laemmli 1X (3X : Tris-HCl 0,1875M pH 6,8; SDS 6%; glycérol 30%; bleu de bromophénol 0,006%; β-mercaptoéthanol 10%) ou le tampon de chargement Invitrogen 1X LDS NP0007 Invitrogen dans le ratio 300:100:100 (4X Invitrogen : SDS : β-mercaptoéthanol) pour PC1. Les échantillons sont chargés sur gel et migrés (80-150V, 1h-3h) à température pièce ou 4°C. Les protéines sont transférées par électrophorèse à 4°C (10-20V) sur membrane de PVDF (Immobilon-P Millipore-Sigma) toute la nuit dans le tampon de transfert (Tris 25 mM, glycine 192 mM, MeOH 20% v/v). Les membranes sont bloquées au moins 4h

dans du Lait TBST 5% (Tris 100mM pH 7,5; NaCl 150 mM; Tween-20 0,1%; lait 5% m/v) et ensuite incubées avec les anticorps primaires puis secondaires (lait TBST 5%) selon les dilutions mentionnées plus haut. La détection des protéines se fait par chimiluminescence avec les solutions de détection Amersham™ ECL™ Prime ou ECL™ (RPN2236/RPN2106 GE healthcare Life Sciences), soit la solution A (luminol) et la solution B (peroxyde) dans un ratio 1:1. Les films d'autoradiographie sont de la marque HyBlot CL.

3.5 Déglycosylation de Pc1

Entre 6,7-13,3µg de protéines sont dénaturées à 100°C pendant 10min avec le tampon de dénaturation (ratio 1 :10) (B1704S 10x, New England BioLabs). Les protéines sont soit non-digérées, soit déglycosylées en utilisant le peptide N-glycosidase F (PNGase F, P0704S New England BioLabs) ou déglycosylées en utilisant l'endoglycosidase H (endo-H, P0702S New England BioLabs) selon les instructions et l'ensemble de tampons du manufacturier (New England BioLabs) pendant 1h00 à 37°C, puis 10min 4°C. Un immunobuvardage pour Pc1 (anti-7e12) est ensuite effectué selon le protocole décrit plus haut avec comme contrôle de chargement Gapdh.

3.6 Isolation des exosomes de l'urine

L'urine est récoltée chez les souris au jour post-natal 10 lors du sacrifice de l'animal et est supplémentée d'inhibiteurs de protéines (*protease inhibitor cocktail* Sigma-Aldrich P8340 1:100; PMSF 1mM) puis congelée à -80°C jusqu'à son utilisation. L'urine est centrifugée (3000g, 15min) puis le surnageant est récupéré. Les exosomes sont isolés à l'aide du kit exoquick-TC (EXOTC10A-1, System Biosciences). La solution du kit est ajoutée dans un ratio 5 urine : 1 Exoquick-TC et incubée sans agitation à 4°C pour 48h. Les échantillons sont centrifugés (1500g, 30min). Le surnageant et le culot sont séparés, puis le culot est resuspendu dans le tampon de resuspension (Tris pH 20 Mm; EDTA 2mM; NaCl 150 mM; triton 0,5%). Les exosomes et les fractions libres d'exosomes recueillis sont quantifiés par la méthode Bradford (Bradford 1976) et une courbe standard d'albumine de sérum bovin (BSA 20 mg/ml,

molecular biology grade B9000S, New England Biolabs). Le volume total des échantillons d'exosomes et 5µg du surnageant sont utilisés pour un immunobuvardage pour Pc1 (anti-7e12) selon le protocole décrit plus haut avec comme contrôle de chargement Alix/AIP1 (anti-AIP1, 622620, *BD Biosciences*).

3.7 Analyses de données

Les intensités des bandes en pixels des immunobuvardages de type Western blot sont quantifiées avec les logiciels ImageLab (BioRad) ou ImageJ. Le logiciel Excel est utilisé pour calculer les expressions relatives, les écarts-type et les autres tests statistiques lorsque $n \geq 3$. Préalable au test-T, un test F est effectué pour déterminer si la variance est égale ou inégale et ensuite le test-T bilatéral de type 2 (variance égale) ou 3 (variance inégale) est effectué selon le cas. Pour les analyses statistiques, l'intervalle de confiance à 95% est adopté.

4. Résultats

4.1 Expression de la polycystine-1 chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$

Les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 30, 32, 42 et 49 sont protégées d'une mortalité périnatale et de la polykystose rénale à différents niveaux. Selon les résultats préliminaires, l'efficacité de cette protection dépend du nombre de copies de transgène $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$. Les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 30, 32, 49 à 1-2,5 copies agiraient comme des hypomorphes, tandis que les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 42 à 10 copies complèteraient totalement le phénotype léthal des souris $Pkd1^{-/-}$. Ainsi, la première partie de ce projet consiste à analyser l'expression de $Pc1_{\Delta coiled-coil}$ chez les quatre lignées de souris afin de mieux comprendre le mécanisme de protection et de vérifier si l'expression de $Pc1$ corrèle avec le nombre de copies du transgène.

4.1.1 Analyse de l'expression de $Pc1_{\Delta coiled-coil}$

Afin d'analyser l'expression de $Pc1_{\Delta coiled-coil}$ chez les quatre lignées $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$, des immunobuvardages de type Western blot ont été effectués. Pour cette détection, un anticorps monoclonal 7e12 qui reconnaît le domaine extracellulaire LRR de la polycystine-1 et un anticorps qui reconnaît *Gapdh* comme contrôle de chargement sont utilisés (fig.4.1AB; panneaux de gauche). À la figure 4.1A, panneau gauche, $Pc1$ est détecté dans les extraits protéiques totaux de reins de souris sauvages contrôles ($Pkd1^{+/+}$, n=2), $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 42 (n=5), 49 (n=2) et $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{TAG26}$ (n=1). Par rapport au contrôle, les échantillons $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 42 ont des bandes d'intensité plus forte, suggérant des niveaux de $Pc1$ plus élevés. Les échantillons $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 49 ont des niveaux de $Pc1$ similaires au contrôle et l'échantillon $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{TAG26}$ est plus intense que les contrôles mais moins élevé que $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 42. De plus, pour chaque lignée, un doublet de $Pc1$ est détecté selon des intensités qui diffèrent et qui selon des études antérieures correspondrait aux fragments N-terminal de $Pc1$ glycosylé (~450 kDa) et non-glycosylé (~370 kDa). Afin d'évaluer les niveaux probables de glycosylation différents par rapport au contrôle, les ratios de l'expression de la polycystine-1

glycosylée/non-glycosylée ont été calculés et sont présentés sur l'histogramme en fig. 4.1A, panneau de droite. Les ratios de Pc1 sont plus bas par rapport au contrôle ($1,03 \pm 0,09$) chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ 42 ($0,3 \pm 0,1$) ou 49 ($0,46 \pm 0,09$) et similaire au contrôle pour les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\text{TAG26}}$ (1,13). À la figure 4.1B, panneau de gauche, l'immunobuvardage montre la détection de Pc1 dans les extraits contrôles ($Pkd1^{+/+}$), dans les extraits $Pkd1^{+/-}$ et les extraits $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ 30, 32 et 49 ($n=2$). Les lignées 30, 32 et 49 ont des bandes correspondant à Pc1 d'intensités similaires aux contrôles et légèrement plus élevés que les hétérozygotes $Pkd1^{+/-}$. Toutefois, on peut noter que la bande non-glycosylée est plus intense que la bande glycosylée comparativement au contrôle. Le panneau de droite (fig. 4.1B) présente l'histogramme des ratios de l'expression de Pc1 glycosylée/non-glycosylée pour chacune des lignées par rapport au contrôle ($1,1 \pm 0,1$). Les niveaux glycosylés sont similaires aux contrôles pour les souris hétérozygotes $Pkd1^{+/-}$ n'ayant pas de transgène ($1,144 \pm 0,009$) et diminués pour les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ 30 ($0,57 \pm 0,03$), 32 ($0,4 \pm 0,1$) et 49 ($0,41 \pm 0,04$).

La figure 4.1C présente un histogramme des niveaux relatifs de l'expression de Pc1 total en prenant en compte la bande glycosylée (~450 kDa) et la bande non-glycosylée (~370 kDa) chez les différentes lignées : contrôles ($n=4$), $Pkd1^{+/-}$ ($n=2$), $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ 30, 32, 49 ($n=2$), $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ 42 ($n=5$) et $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\text{TAG26}}$ ($n=1$). Les résultats suggèrent une réduction de l'expression de Pc1 de presque 50% pour les hétérozygotes $Pkd1^{+/-}$ ayant une seule copie de *Pkd1* comparativement au contrôle ($0,4 \pm 0,2$). Les hypomorphes $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{Coiled-coil}}$ 30, 32 et 49 ont des niveaux d'expression qui se situent entre ceux des hétérozygotes et des contrôles, respectivement $0,9 \pm 0,2$; $0,8 \pm 0,2$ et $0,83 \pm 0,09$. Les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{Coiled-coil}}$ 42 ont une expression 8,5 fois plus élevée de Pc1 par rapport au contrôle et les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\text{TAG26}}$ ont une expression 3,2 fois plus élevée par rapport au contrôle. Le nombre approximatif de copies du transgène $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ chez chaque lignée est présenté en D. Les hypomorphes $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ 30, 32 et 49 ont un nombre de copie qui se situent entre 1 et 2,5 ce qui corrèle avec leur expression se situant entre les hétérozygotes (1 copie de Pc1 endogène) et les contrôles (2 copies de Pc1 endogène). Les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ 42 ont une expression $8,5 \pm 1,8$ fois plus élevée et environ $10,3 \pm 1,2$ copies du transgène. L'expression de Pc1 chez la lignée 42 corrèle avec le nombre de copies et le niveau d'expression est statistiquement différente des contrôles ($p=0,0002$).

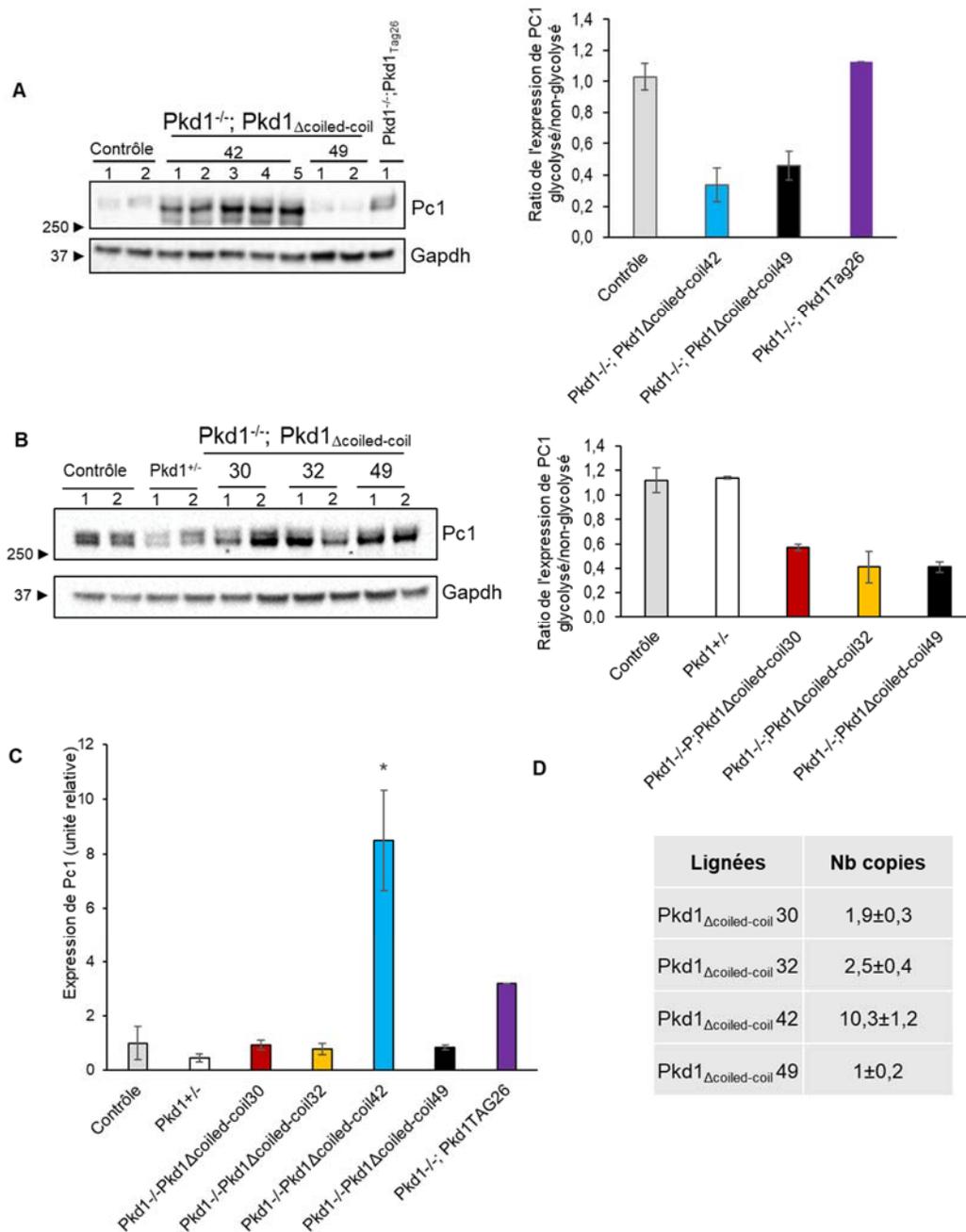


Figure 4.1 Analyse de l'expression de Pc1 chez les souris *Pkd1*^{-/-}; *Pkd1*_{Δcoiled-coil}.

A et B. Analyse par immunobuvardage des niveaux de Pc1 sur 20µg d'extraits protéiques rénaux totaux des souris *Pkd1*^{-/-}; *Pkd1*_{Δcoiled-coil}, *Pkd1*^{-/-}; *Pkd1*_{TAG26}, *Pkd1*^{+/-} et contrôle *Pkd1*^{+/-} à P10. Les échantillons sont migrés sur gel à gradient 4-12% et Pc1 est détecté avec l'anticorps anti-LRR. Gapdh, le contrôle de chargement est détecté avec un anti-Gapdh. Les panneaux de gauche montrent les immunobuvardages de Pc1 et Gapdh. Pour Pc1, deux bandes sont visualisées, la bande du haut présente Pc1 glycosylée (~450 kDa) et la bande du bas Pc1 non-glycosylée (~370 kDa). Les panneaux de droite montrent les histogrammes des ratios des niveaux de Pc1 glycosylé sur Pc1 non-glycosylée pour chaque lignée C. Expression relative des niveaux de Pc1 chez les contrôles (n=4), *Pkd1*^{+/-} (n=2), *Pkd1*^{-/-}; *Pkd1*_{Δcoiled-coil} 30, 32, 49 (n=2), *Pkd1*^{-/-}; *Pkd1*_{Δcoiled-coil} 42 (n=5) et *Pkd1*^{-/-}; *Pkd1*_{TAG26} (n=1). *Pkd1*^{-/-}; *Pkd1*_{Δcoiled-coil} 42 est significativement différent du contrôle. * p = 0,0002. D. Nombre (Nb) de copies du transgène *Pkd1*_{Δcoiled-coil} chez chaque lignée (D est un résultat préliminaire du laboratoire).

En bref, le profil d'expression de Pc1 corrèle avec le nombre de copies de transgène chez les quatre lignées de souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$. De plus, les résultats suggèrent que les lignées à 1-2,5 copies n'agissent pas comme des hypomorphes d'expression, dirigeant vers l'hypothèse qu'ils seraient plutôt des hypomorphes fonctionnels. Ensuite, pour les quatre différentes lignées $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$, le niveau de glycosylation de Pc1 est réduit de 40 à 70% comparativement aux contrôles de type sauvage tandis que pour les contrôles hétérozygotes ou le contrôle de surexpression $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{TAG26}$, le niveau n'est pas diminué. Ce dernier résultat suggère une altération au niveau d'une modification post-traductionnelle, la glycosylation, de $Pc1_{\Delta coiled-coil}$.

4.2 Transport intracellulaire de Pc1 chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$

Puisque le patron d'expression de Pc1 chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ suggère un niveau de glycosylation plus bas que les contrôles, nous nous sommes intéressés aux modifications post-traductionnelles de $Pc1_{\Delta coiled-coil}$ et à son transport intracellulaire. Ainsi, la prochaine partie de ce projet consiste à analyser le clivage GPS de la polycystine-1 qui se produit normalement au niveau du réticulum endoplasmique et produit deux fragments Pc1 N-terminal et C-terminal. Ensuite, l'analyse en détails du patron de déglycosylation de Pc1 a été réalisée afin de déterminer si $Pc1_{\Delta coiled-coil}$ parvenait à atteindre le réseau trans-Golgi. Finalement, l'analyse de la présence de Pc1 dans les exosomes urinaires afin de déterminer si ce ciblage était conservé a été effectué.

4.2.1 Clivage autoprotéolytique au site GPS de Pc1

Puisque le clivage autoprotéolytique au site GPS de la polycystine-1 est une étape du transport intracellulaire au niveau du réticulum endoplasmique, nous avons vérifié son intégrité chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$. Tout d'abord, les différents domaines de la protéine Pc1 sont schématisés dans la figure 4.2A. Le clivage autoprotéolytique de Pc1 s'effectue dans le domaine GPS, plus particulièrement au site HL↓T3041. Les produits en résultant sont identifiés, soit deux fragments N-terminal (NTF) et C-terminal (CTF) qui forment la polycystine-1 clivée

pleine longueur (Pc1^{cFl}, en bleu fig.4.2A). Pc1 non clivée (Pc1^U) est aussi identifié en rouge (fig.4.2A).

Afin de déterminer si le clivage au site GPS est conservé, les extraits protéiques de reins ou poumons à P10 des souris contrôles (Pkd1^{+/+}, Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil 42 ou 49 et Pkd1^{-/-}; Pkd1_{TAG26}) sont immunoprécipités avec un anti-cCC qui reconnaît la partie carboxy-terminale de Pc1. Les différents fragments de Pc1 sont ensuite visualisés par immunobuvardage avec 7e12, l'anti-LRR qui reconnaît le domaine LRR, ou un anti-rCC qui reconnaît la queue carboxy-terminale de Pc1 (fig.4.2B,C). Les panneaux de droite à la figure 4.2B,C permettent l'identification des différents produits Pc1. En 4.2A, les fragments N-terminal de Pc1 sont détectés dans tous les échantillons (~450 et ~370 kDa), mais plus faiblement pour le contrôle dans le poumon et pour Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil 49 dans le rein et le poumon, les flèches noires pointent le doublet pour ces faibles détections (fig.4.2B, longue exposition LRR). Pc1 non-clivé (Pc1^U) à environ 520 kDa est peu exprimé après la naissance chez la souris et est donc détecté faiblement dans quelques-uns des échantillons : Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil 42 et Pkd1^{-/-}; Pkd1_{Tag 26} dans le poumon puis contrôle et Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil 42 pour le rein (trois premiers panneaux). Le fragment Pc1 CTF est quant à lui visualisé en B, les deux panneaux du bas vers 150 kDa. Le fragment CTF est bien visualisé au niveau des quatre échantillons pour le poumon. Au niveau du rein, la bande est faible pour le contrôle et les échantillons Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil 42 et Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil 49. L'expression de Pc1 au niveau du rein est plus faible que dans le poumon, ce qui peut expliquer la différence de détection. De plus, la co-immunoprécipitation ne garantit pas la même efficacité de précipitation pour chacun des échantillons ce qui peut aussi expliquer le différentiel de détection pour chacun des fragments. Plus particulièrement, il semble y avoir une limite de détection concernant Pc1 chez les souris Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil 49 d'où la difficulté d'obtenir une exposition acceptable pour chacun des échantillons.

À la figure 4.2C, la même expérience est répétée dans les extraits protéiques rénaux, sans l'échantillon Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil 49. Il est possible d'observer le doublet de Pc1 N-terminal dans les échantillons Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil 42 et Pkd1^{-/-}; Pkd1_{Tag 26}. Le fragment Pc1 CTF est aussi visualisé dans les trois échantillons où l'intensité semble similaire entre le contrôle et Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil 42 tandis que chez Pkd1^{-/-}; Pkd1_{Tag 26}, l'intensité de la bande est plus forte. Ces

résultats suggèrent que le clivage au site GPS est conservé, en partie, chez les deux lignées de souris $Pkd1^{-/-}$: $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ puisque le fragment CTF est détecté vers 150 kDa.

Ce résultat suggère que certaines modifications post-traductionnelles sont conservées chez les souris ayant le transgène, soit $Pc1_{\Delta\text{coiled-coil}}$. Selon ce résultat, une certaine portion de $Pc1$ est clivée normalement et pourrait donc poursuivre son transit intracellulaire au-delà du réticulum endoplasmique. Toutefois, ce résultat n'explique pas les niveaux de glycosylation diminués chez ses quatre lignées. Ainsi, il serait important de comprendre davantage les modifications de $Pc1$ et les étapes de son transport intracellulaire chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$. Il semble pertinent de vérifier si l'ajout de N-glycanes complexes est conservé et si la protéine est transportée jusqu'au réseau trans-golgi ou bien si elle est maintenue au niveau du réticulum endoplasmique.

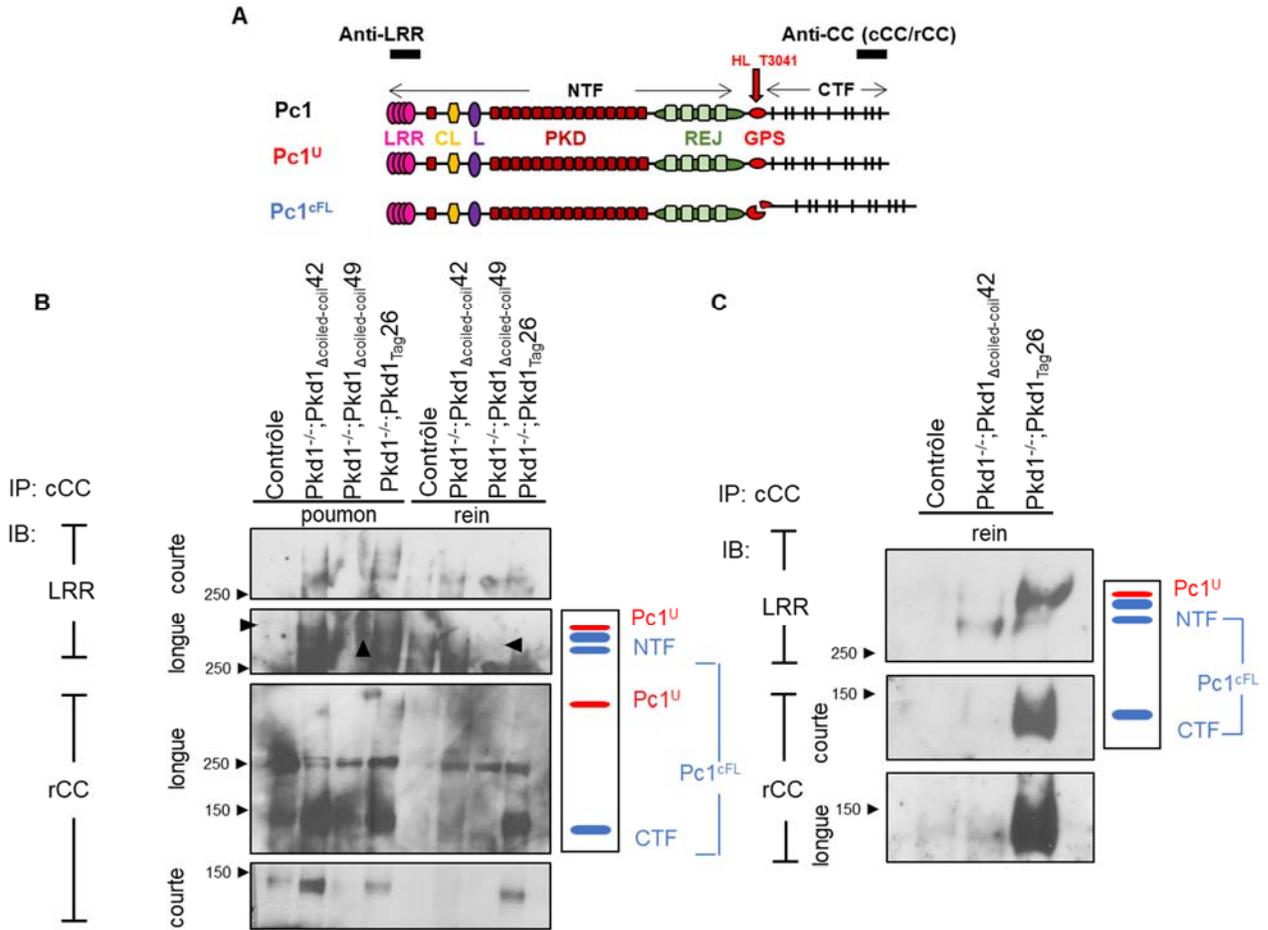


Figure 4.2 Le clivage GPS est conservé chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$.

A. Schéma de la structure de Pc1 murin (Pc1, noir). Le clivage se produit au site $HL\downarrow T^{3041}$ dans le domaine GPS produisant deux fragments N-terminal (NTF) et C-terminal (CTF). Les positions des épitopes des anticorps anti-LRR et anti-CC (poulet/*chicken*, cCC; lapin/*rabbit*, rCC) sont illustrés par des boîtes noires. Les formes pleine longueur non-clivée ($Pc1^U$, rouge) et pleine longueur clivée ($Pc1^{cFL}$, bleu) sont montrées. LRR, répétitions riches en leucine; CL, lectine de type-C; L, LDL-A; PKD; répétitions PKD; REJ, récepteur pour egg jelly; GPS, site protéolytique du récepteur couplé aux protéines G. Le code de couleur est maintenu en B. B et C. Les produits Pc1 ont été analysés dans les reins et poumons à P10 de souris sauvages $Pkd1^{+/+}$ (contrôle), $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 42, 49 et $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{TAG26}$. 800 μ g d'extraits protéiques totaux des différents échantillons sont immunoprécipités (IP) avec un anti-cCC et détectés par immunobuvardage (IB) avec un anti-LRR ou un anti-rCC selon des expositions courtes et longues. Les panneaux situés à droite servent de guide pour identifier les différents produits Pc1. Les flèches noires pointent les fragments Pc1 faiblement détectés pour le contrôle (poumon) et $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 49 (rein, poumon).

4.2.2 Glycosylation de Pc1 et son transport jusqu'au trans-golgi

Puisque les niveaux de la forme de Pc1 glycosylée semblaient plus bas chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ (figure 4.1 AB), l'objectif en découlant était d'analyser le profil de glycosylation de Pc1 plus en détails afin de comprendre cette différence. Cette analyse a pour

but d'évaluer la glycosylation de Pc1, mais aussi si la protéine parvient à atteindre le trans-Golgi où les N-glycanes complexes sont normalement ajoutés.

Un immunobuvardage de la N-glycosylation de Pc1 a été effectué sur des extraits de protéines du rein de contrôle (Pkd1^{+/+}), de souris Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil 42 et 49 et Pkd1^{-/-}; Pkd1_{TAG26} (fig.4.3). Afin de détecter Pc1 chez chacune des lignées autant celles qui expriment fortement que faiblement Pc1, des quantités différentes de protéines totales ont été utilisées. Pour les échantillons des lignées contrôles et Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil 49 qui expriment plus faiblement Pc1, 13,3 μ g sont utilisés. Pour les échantillons des lignées Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil 42 et Pkd1^{-/-}; Pkd1_{TAG26}, 6,7 μ g sont utilisés. Le contrôle de chargement, Gapdh, à la figure 4.3A permet de visualiser cette différence, on note que les puits des lignées contrôles et Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil 49 montrent une quantité plus élevée de Gapdh comparativement aux deux autres lignées ce qui correspond aux quantités respectives chargées sur le gel. En A, une première série d'échantillons ne sont pas digérés (ND). Une deuxième série de protéines est traitée à la PNGase F (P) et une troisième série est traitée à endo-H (E). Les échantillons non-digérés permettent de voir l'expression de Pc1 détectée avec l'anti-LRR en conditions dénaturantes normales. Ainsi dans chacun des puits ND, la présence de Pc1 N-terminal clivée ou non-clivée (Pc1^C, Pc1^U) est détectée. Ensuite, au niveau des puits P, une diminution marquée de l'épaisseur de la bande et une modification de la position de migration après traitement par la PNGase F sont considérées comme sensible (S) à l'enzyme et à une preuve de N-glycosylation. Chez les échantillons traités à la PNGase F pour les lignées Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil 42, Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil 49 et Pkd1^{-/-}; Pkd1_{TAG26}, Pc1^U et Pc1^C sont détectés. L'épaisseur et la hauteur de la bande Pc1 sont diminuées comparativement à leurs échantillons non-digérés respectifs. Pc1 est sensible à l'enzyme (Pc1^U-S, Pc1^C-S) suggérant la présence de N-glycosylation chez la protéine. EndoH clive les N-glycanes à haute teneur en mannose ajoutés dans le réticulum endoplasmique, mais pas les N-glycanes complexes modifiés dans le Golgi. La résistance à EndoH indique que les glycoprotéines ont atteint le trans-Golgi. Toujours à la figure 4.3A, pour les échantillons traités à EndoH (E), il est possible de visualiser pour chacun une portion de Pc1 résistante (R) et une portion de Pc1 sensible (S) à EndoH. En 4.3B, l'histogramme (Pc1 clivée résistante)/(Gapdh) montre le niveau d'expression relatif de Pc1 clivée résistante chez les quatre échantillons analysés en A (fig.4.3A, B). Ainsi, le niveau de Pc1 clivée-R est 3,2 fois plus élevé chez

l'échantillon Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil 42 et 5,3 fois plus élevé pour l'échantillon Pkd1^{-/-}; Pkd1_{TAG} 26 comparativement au contrôle sauvage. Le niveau de Pc1 clivée résistante pour la lignée Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil 49 est quant à lui plus faible, soit de 0,58 comparativement à 1, donc diminué d'environ 40% par rapport au contrôle sauvage.

À la figure 4.3C, la différence entre les proportions de Pc1 résistante/sensible entre chaque lignée est illustrée par un histogramme des ratios relatifs de Pc1^C-R sur Pc1^C-S (n=3). Il est à noter que la bande de Pc1-clivée résistante comprend aussi une petite portion de Pc1 non-clivée sensible à EndoH, mais le ratio permet d'évaluer globalement la résistance à EndoH pour chaque échantillon. Le ratio Pc1 résistant/sensible pour la lignée Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil 42 est 9,3 fois plus faible comparativement au contrôle (1,7±0,3 versus 0,183±0,009). Pour la lignée Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil 49, le ratio est 2,1 fois plus faible (0,8±0,1) et pour la lignée Pkd1^{-/-}; Pkd1_{TAG} 26, le ratio est 3,4 fois plus faible (0,5±0,2) comparativement au contrôle. Ainsi, les ratios pour Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil 42, 49 et Pkd1^{-/-}; Pkd1_{TAG}26 sont significativement différents du contrôle (p=0,009; p=0,002; p=0,002). Ce qui suggère qu'il y a une différence significative dans la quantité de Pc1 résistante à EndoH entre le contrôle sauvage et les lignées Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil 42, 49 et Pkd1^{-/-}; Pkd1_{TAG}26. De plus, Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil 42 est significativement différent de Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil 49 (p=0,01), soit 4,4 fois plus faible.

Ces résultats suggèrent qu'une certaine quantité de Pc1 Δ coiled-coil parvient à atteindre le réseau trans-golgi puisqu'une proportion de Pc1 est résistante à EndoH. Cette étape du transport intracellulaire de Pc1 semble partiellement conservée, mais l'efficacité est probablement affectée puisque les ratios de Pc1 résistante/sensible sont plus faibles chez les lignées transgéniques. Ces résultats suggèrent aussi que le motif *coiled-coil* n'est pas nécessaire pour que Pc1 soit transportée du réticulum endoplasmique au trans-Golgi, mais peut-être important pour l'efficacité de ce transport.

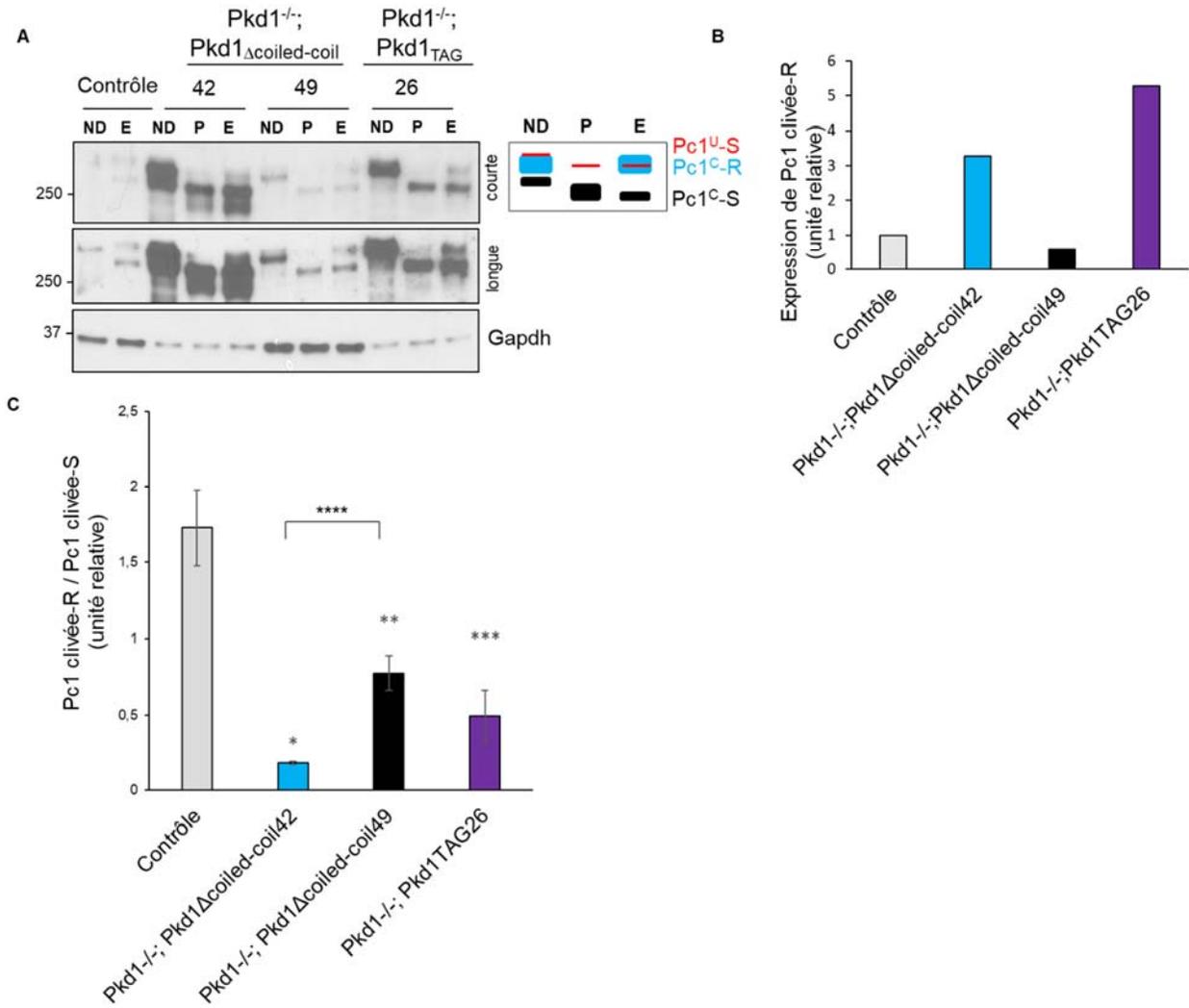


Figure 4.3 Pc1 atteint le trans-Golgi en absence du domaine *coiled-coil* chez les souris Pkd1^{-/-}; Pkd1_{Δcoiled-coil}.
 A) Analyse par immunobuvardage de la N-glycosylation de Pc1 sur des extraits protéiques rénaux totaux des souris Pkd1^{-/-}; Pkd1_{Δcoiled-coil} 42 (6,7μg) 49 (13,3μg), Pkd1^{-/-}; Pkd1_{TAG}26 (6,7μg) et contrôle Pkd1^{+/+} (13,3μg). Les échantillons sont soit non-digérés (ND), traités à la PNGase F (P) ou traités à endo-H (E) puis migrés sur gel à gradient 4-12% et Pc1 est détecté avec l'anticorps anti-LRR et anti-Gapdh pour le contrôle de chargement. Le schéma à droite décrit les différentes formes de Pc1 : Pc1 non-clivée (Pc1^U, rouge) ou Pc1 clivée (Pc1^C) et sensible à endo-H (S, noir) ou résistante à endo-H (R, bleu). B) Histogramme de l'expression relative de Pc1 clivée résistante normalisée avec Gapdh chez les quatre échantillons en A. C) Histogramme du ratio relatif de (Pc1 clivée résistante) / (Pc1 clivée sensible), n=3 pour chaque lignée. Pkd1^{-/-}; Pkd1_{Δcoiled-coil} 42, 49 et Pkd1^{-/-}; Pkd1_{TAG}26 sont significativement différents du contrôle. Pkd1^{-/-}; Pkd1_{Δcoiled-coil} 42 est significativement différent de Pkd1^{-/-}; Pkd1_{Δcoiled-coil} 49. * p = 0,009; ** p = 0.002; *** p = 0,002; **** p = 0,01.

4.2.3 Excrétion de Pc1 dans les exosomes urinaires

Puisque les résultats suggèrent que la polycystine-1 est transportée jusqu'au trans-Golgi chez les souris Pkd1; Pkd1^{-/-}_{Δcoiled-coil}, l'objectif suivant était de déterminer si la protéine parvient à atteindre la dernière étape de son transport, c'est-à-dire le ciblage de Pc1. L'une des dernières cibles de Pc1 est son excrétion dans l'urine via les exosomes.

Ainsi, le but était de déterminer si Pc1 sans le motif *coiled-coil* est excrété dans les exosomes urinaires. Pour se faire, l'urine est récoltée chez les souris à P10 lors du sacrifice, l'urine de 2 (Pkd1^{-/-}; Pkd1_{Δcoiled-coil} 42, Pkd1^{-/-}; Pkd1_{TAG26}) ou 3 (contrôle, Pkd1^{-/-}; Pkd1_{Δcoiled-coil} 30, Pkd1^{-/-}; Pkd1_{Δcoiled-coil} 49) souris de chacune des lignées est mise en commun. Les exosomes sont précipités et isolés puis mis sur gel et Pc1 est détecté par immunobuvardage avec l'anti-LRR (7e12). Une exposition courte et une exposition longue montrent la détection de Pc1 vers 450 kDa à la figure 4.4. Le contrôle de chargement, Alix est aussi visualisé à la figure 4.4 et consiste en un marqueur des exosomes, afin de déterminer si les exosomes ont été isolés. La présence d'Alix dans les 5 puits permet d'affirmer que les exosomes ont effectivement été isolés. On observe que l'intensité de la bande pour Pkd1^{-/-}; Pkd1_{Δcoiled-coil} 42 et Pkd1^{-/-}; Pkd1_{TAG26} est plus élevée comparativement au contrôle et comparativement aux Pkd1^{-/-}; Pkd1_{Δcoiled-coil} 30 et 49. De plus, le contrôle Alix est plus faible chez les échantillons Pkd1^{-/-}; Pkd1_{Δcoiled-coil} 42 et Pkd1^{-/-}; Pkd1_{TAG26}, ce qui signifie qu'une moins grande quantité de protéines a été isolées. Une plus grande quantité de Pc1 est détectée dans ces deux échantillons comparativement aux contrôles et aux hypomorphes ayant une plus grande quantité de protéines totales, mais une détection de Pc1 plus faible. Chez les souris Pkd1^{-/-}; Pkd1_{Δcoiled-coil} 42, l'efficacité de l'excrétion de Pc1 dans les exosomes semble similaire à celle des Pkd1^{-/-}; Pkd1_{TAG26}, car la détection de Pc1 chez ces deux lignées sont semblables. Ce résultat suggère que chez les lignées à grand nombre de copies de transgène, Pc1 parvient à être transportée dans les exosomes avec ou sans la présence du motif *coiled-coil*. Ensuite, chez les hypomorphes, il semble que l'excrétion dans les exosomes est plus faible, les bandes correspondant à la détection de Pc1 sont d'intensité moindre que la bande de la lignée contrôle (fig4.4). La présence de Pc1 dans les exosomes semble plus faible chez les lignées à faible copie que les lignées transgéniques à haute copie, ce

qui correspond aux niveaux d'expression de Pc1 chez ces lignées. Ces résultats suggèrent que Pc1, sans le motif *coiled-coil*, parvient à être ciblée au moins partiellement jusqu'à son excrétion puisqu'elle est présente dans les exosomes urinaires.

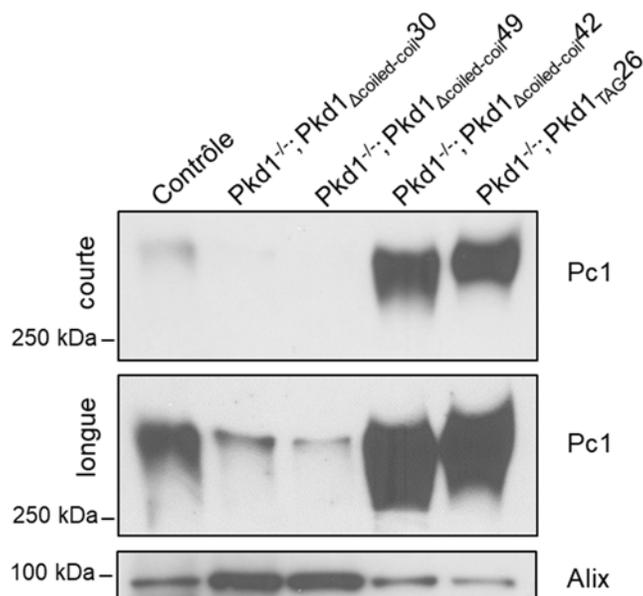


Figure 4.4 Pc1 est excrétée dans les exosomes urinaires chez les souris Pkd1^{-/-} ; Pkd1^{Δcoiled-coil}.

Immunobuvardage de protéines des exosomes urinaires chez les souris Pkd1^{-/-} ; Pkd1^{Δcoiled-coil} 30, 42, 49, Pkd1^{-/-} ; Pkd1^{TAG26} et contrôle Pkd1^{+/+} à P10. Les exosomes sont isolés avec le kit exoquick-TC, les protéines sont faiblement détectées par quantification Bradford (<1-3μg), l'entièreté de chaque extrait (11μl) est donc utilisée pour l'immunobuvardage. Pc1 a été analysée sur un gel à gradient 3-8% et détecté avec l'anticorps anti-LRR pour deux expositions courte et longue. Un marqueur des exosomes, Alix, est aussi analysé. Pc1 est détectée dans les exosomes urinaires de tous les extraits protéiques des souris.

La portion d'urine libre des exosomes a aussi été migrée sur gel afin de déterminer si Pc1 était détecté librement dans l'urine et si l'isolation d'exosomes avait été efficace. La faible concentration des protéines dans les fractions libres d'exosomes permettait de migrer un maximum de 5μg de protéines totales sur gel. Cette quantité n'a pas été suffisante pour détecter Pc1 dans l'urine libre d'exosomes chez chacune des lignées (résultat non-monté). Le marqueur des exosomes, Alix, n'a pas non plus été détecté, possiblement parce que l'isolation des exosomes a été efficace, mais une plus grande quantité de protéines totales seraient nécessaires pour le confirmer. Les résultats suggèrent que Pc1^{Δcoiled-coil} est excrétée dans les exosomes chez les hypomorphes Pkd1^{-/-}; Pkd1^{Δcoiled-coil} 30, 49 et chez les souris surexprimant Pc1, Pkd1^{-/-} Pkd1^{Δcoiled-coil} 42. La sécrétion de Pc1 n'a pas pu être évaluée avec certitude, les fractions libres d'exosomes nécessiteraient d'être isolées par ultracentrifugation afin d'améliorer la détection.

Pour conclure cette partie des résultats, le motif *coiled-coil* ne semble pas indispensable à son transport, mais semble jouer un rôle dans l'efficacité de ce transport. En effet, les résultats suggèrent que Pc1 Δ Coiled-coil est clivée à son site GPS dans le réticulum endoplasmique, puisque le fragment C-terminal est détecté chez les souris Pkd1 $^{-/-}$; Pkd1 Δ Coiled-coil. Puis, les résultats suggèrent aussi qu'une portion de Pc1 est transportée jusqu'au réseau trans-golgi, puisqu'une portion de Pc1 est résistante à l'enzyme endoH. Finalement, Pc1 est excrétée dans les exosomes urinaire suggérant que Pc1 Δ Coiled-coil parvient à être ciblée à sa sortie du Golgi. Maintenant, il serait intéressant de déterminer si sans le motif *coiled-coil*, Pc1 parvient à interagir avec certains de ses partenaires connus, Pc2 étant le plus connu.

4.3 Interactions de Pc1 avec des partenaires chez les souris Pkd1 $^{-/-}$; Pkd1 Δ coiled-coil

La partie suivante du projet porte sur l'analyse de la signalisation et les interactions entre Pc1 et la polycystine-2. Une hypothèse répandue est le rôle de modulateur que la polycystine-1 et 2 ont l'une sur l'autre. Ces deux partenaires interagiraient d'ailleurs via le motif *coiled-coil* de Pc1. Ainsi, l'objectif de cette section est de déterminer si l'ablation du domaine *coiled-coil* a un effet sur la modulation de la polycystine-2 (Pc2) et si cette ablation élimine les interactions entre Pc1 et Pc2. Pour atteindre cet objectif, l'expression de la polycystine-2 est d'abord évaluée chez les souris Pkd1 $^{-/-}$; Pkd1 Δ coiled-coil. Puis, les interactions de ces deux partenaires sont analysées par co-immunoprécipitation chez les souris Pkd1 $^{-/-}$; Pkd1 Δ coiled-coil.

4.3.1 Analyse de l'expression de la polycystine-2

Afin de déterminer si la polycystine-2 (Pc2) est affectée par l'ablation du motif *coiled-coil* de la polycystine-1 (Pc1) chez les souris Pkd1 $^{-/-}$; Pkd1 Δ coiled-coil, l'analyse de son expression est tout d'abord effectuée. À la figure 4.5A, un immunobuvardage de type Western blot est effectué sur les extraits de protéines rénales chez les contrôles (C57, Pkd1 $^{+/+}$), Pkd1 $^{-/-}$; Pkd1 Δ coiled-coil, Pkd1 $^{-/-}$; Pkd1 $_{TAG26}$ à P10. Un deuxième type de contrôle est utilisé, les protéines rénales de souris Pkd1 $^{-/-}$ à P0 afin de comparer les hypomorphes avec ces derniers. Pc2 est détecté avec un anti-Pc2 (γ cc2) vers 110 kDa dans tous les échantillons (fig.4.5A). Le contrôle

de chargement est le Gapdh et détecté avec un anti Gapdh vers 37 kDa dans tous les échantillons (fig.4.5A). Les bandes correspondant à Pc2 chez Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil 30, 32, 49 apparaissent particulièrement plus intenses comparativement aux contrôles sauvages et plus intenses que les contrôles Pkd1^{-/-}. Les bandes Pc2 pour les échantillons Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil 42 sont similaires aux contrôles sauvages tandis que les bandes chez les échantillons Pkd1^{-/-}; Pkd1_{TAG26} sont moins intenses, mais leur Gapdh correspondant semble aussi un peu plus faible que pour les autres échantillons (fig4.5A).

Afin d'analyser statistiquement les niveaux de Pc2, l'expérience est répétée plusieurs fois (n=9) et au moins n \geq 3 pour chacune des lignées analysées est obtenu. L'histogramme des ratios Pc2/Gapdh de ces données est visualisé à la figure 4.5B. Les ratios des bandes détectées Pc2/Gapdh suggèrent des niveaux de Pc2 plus élevés pour les souris hypomorphes Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil, 30, 32, 49 respectivement de 2,8 \pm 0,5; 2,8 \pm 0,4 et 3,4 \pm 0,5 comparativement au contrôle sauvage (1 \pm 0,2) ou au contrôle Pkd1^{-/-} (1,8 \pm 0,5). En ce qui concerne les souris qui ne développent pas la polykystose rénale, Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil, 42, le ratio des niveaux de Pc2 (0,8 \pm 0,2) est comparable au contrôle sauvage (1 \pm 0,2) et aux souris Pkd1^{-/-}; Pkd1_{TAG26} (1,1 \pm 0,6).

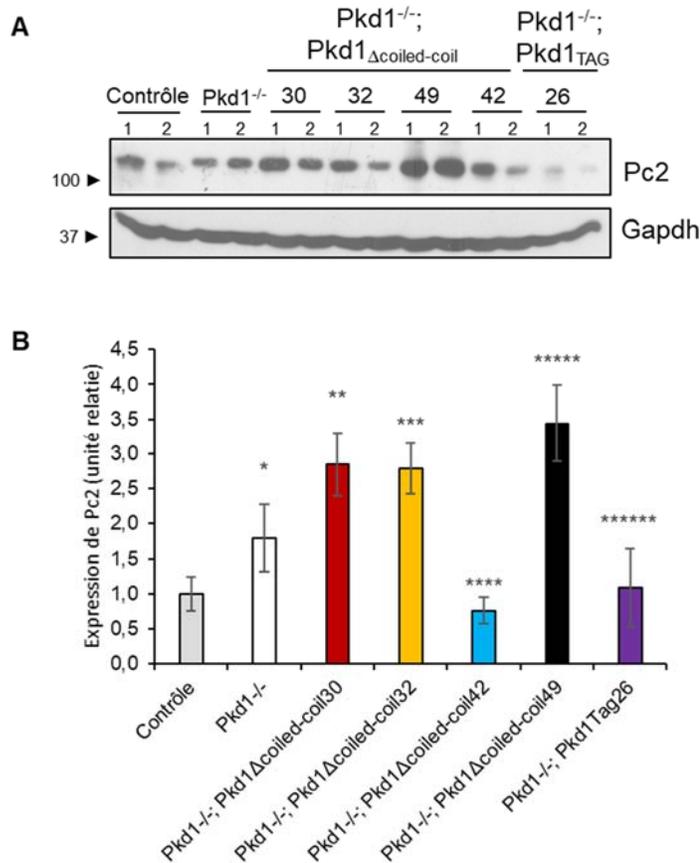


Figure 4.5 Analyse de l'expression de Pc2 chez les souris Pkd1^{-/-}; Pkd1_{Δcoiled-coil}.

A) Analyse par immunobuvardage des niveaux de Pc2 sur 20µg d'extraits protéiques rénaux totaux des souris Pkd1^{-/-}; Pkd1_{Δcoiled-coil} 30, 32, 42, 49 (n=2); Pkd1_{TAG}26 (n=2), contrôle Pkd1^{+/+} (n=2) à P10 et Pkd1^{-/-} (n=2) à P0. Les échantillons sont migrés sur gel 8% et Pc2 est détecté avec l'anticorps anti-Pc2 (γcc2) et Gapdh, le contrôle de chargement, est détecté avec un anti-Gapdh. Une bande est visualisée vers ~110 kDa pour Pc2 (haut) et 37 kDa pour Gapdh (bas). B) Expression relative des niveaux de Pc2 chez les contrôles (n=6), Pkd1^{-/-} (n=3), Pkd1^{-/-}; Pkd1_{Δcoiled-coil} 30, 32, 42, 49 (respectivement n=4, n=3, n=6, n=5), et Pkd1^{-/-}; Pkd1_{TAG}26 (n=3). Pkd1^{-/-} et Pkd1^{-/-}; Pkd1_{Δcoiled-coil} 30, 32, 49 sont significativement différents du contrôle. *p=0,01; **p=0,00003; ***p=0,00004; ****p=0,08; *****p=0,000004; *****p=0,7.

Finalement, les résultats suggèrent que les niveaux d'expression de la polycystine-2 sont inchangés ou similaires aux souris sauvages chez les souris surexprimant 10X le transgène, Pkd1^{-/-}; Pkd1_{Δcoiled-coil} 42. Puis, de manière surprenante, les hypomorphes Pkd1^{-/-}; Pkd1_{ΔCoiled-coil} 30, 32 et 49 montrent une expression de Pc2 de près de trois fois plus élevée que les contrôles. Il semblerait donc que chez les hypomorphes développant la polykystose rénale, il y ait présence d'une modulation ou compensation au niveau de l'expression de la polycystine-2.

4.3.2 Interactions PC1-PC2 chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$

Les interactions entre Pc1 et Pc2 ont ensuite été analysées puisqu'elles sont importantes dans la signalisation. Le prochain objectif est de déterminer si Pc1 et Pc2 parviennent à interagir ensemble *in vivo* sans la présence du motif *coiled-coil* de la polycystine-1. Pour ce faire, une analyse par co-immunoprécipitation a été effectuée (fig.4.6A,B). Entre 800 (fig.4.6B) et 1200 μ g (fig.4.6A) d'extraits rénaux à P10 des lignées de souris contrôles de type sauvage, $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 42, 49 et $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{TAG26}$ ont été mis en présence (+) ou non (-) d'un anticorps reconnaissant Pc2 ($\gamma cc2$), de billes et précipités (fig.4.6A). Une fois immunoprécipitées, les protéines sont détectées par immunobuvardage avec l'anti-Pc2 (fig.4.6A premier panneau) ou avec un l'anticorps 7e12 reconnaissant le domaine LRR de Pc1 (fig.4.6A panneau du milieu, panneau du bas; fig.4.6B, premier panneau). Un extrait protéique non-immunoprécipité (input) de 1% est analysé par immunobuvardage avec l'anti-LRR et anti-Gapdh pour détecter Pc1 et Gapdh respectivement (fig.4.6A,B, panneaux de droite). Comparativement aux reins de souris de type sauvage, un signal similaire pour Pc2 est détecté chez la souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 42 dans l'immunoprécipité de Pc2 (+) (fig.4.6A) tandis que pour Pc1, le signal semble un peu plus élevé (fig.4.6B) ou similaire (fig.4.6A) pour $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 42. Puis, comparativement à la souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{TAG26}$ qui surexprime aussi Pc1 (10X), la souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 42 a un signal plus intense pour Pc2, mais plus faible pour Pc1. En effet, un signal plus intense pour Pc1 et plus faible pour Pc2 est détecté chez la souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{TAG26}$ comparativement au contrôle et à $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 42. Un très faible doublet de Pc1 est détecté chez $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 49 pour un niveau de Pc2 similaire au contrôle (fig.4.6A). En ce qui concerne les *inputs* de 1%, Pc1 est détecté faiblement dans le contrôle, plus fortement chez $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 42 et $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{TAG26}$ et à un niveau intermédiaire pour $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 49 (fig.4.6A,B).

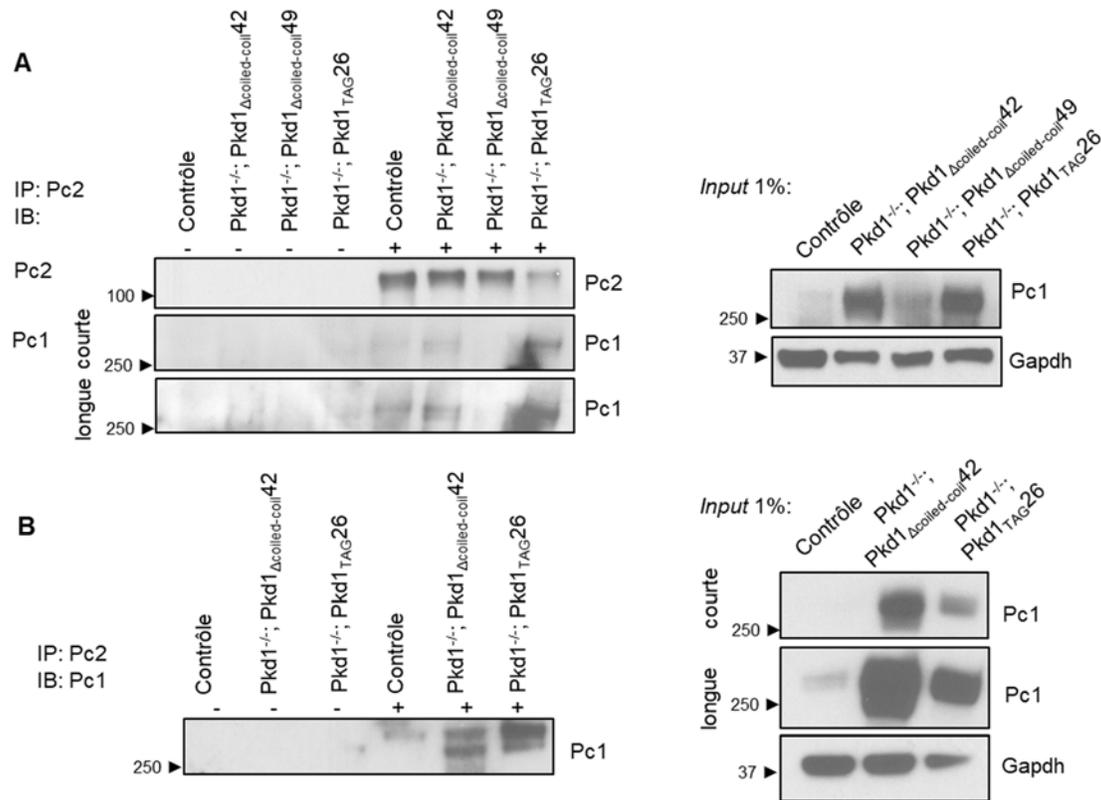


Figure 4.6 L'interaction entre Pc1 et Pc2 est conservée chez les souris Pkd1^{-/-}; Pkd1^{Δcoiled-coil}

L'interaction entre Pc1 et Pc2 a été analysée dans les reins à P10 de souris sauvages Pkd1^{+/+} (contrôle), Pkd1^{-/-}; Pkd1^{Δcoiled-coil} 42, 49 et Pkd1^{-/-}; Pkd1^{TAG26}. A, B. Entre 800 et 1200μg d'extraits protéiques totaux des différents échantillons sont immunoprécipités (IP) avec les billes A/G plus (santa cruz) et un anti-Pc2 γcc2 (+) ou sans (-) et détectés par immunobuvardage (IB) avec un anti-Pc2 (γcc2) et/ou un anti-LRR selon des expositions courtes et longues. 1% des protéines non-immunoprécipitées sont détectés par immunobuvardage avec un anti-LRR avec comme contrôle de chargement Gapdh (panneau de droite, A,B).

Ces résultats suggèrent qu'une interaction entre Pc1-Pc2 est conservée chez les souris Pkd1^{-/-}; Pkd1^{Δcoiled-coil} 42 à un niveau au moins égal au contrôle sauvage. L'interaction semble très faiblement conservée chez l'hypomorphe 49, mais à un niveau plus faible comparativement au contrôle. L'analyse suggère que l'interaction est moins abondante que lorsque Pc1 conserve son motif *coiled-coil* en situation de surexpression ou à un niveau endogène.

Pour conclure cette partie, les résultats suggèrent que la polycystine-2 est surexprimée chez les hypomorphes kystiques à P10, mais pas chez les souris saines Pkd1^{-/-}; Pkd1^{Δcoiled-coil} 42. De plus, l'interaction entre Pc1-Pc2 est partiellement conservée sans le motif *coiled-coil* suggérant qu'ils pourraient être partenaires dans la signalisation sans interagir directement via le motif *coiled-coil* de Pc1.

4.4 Signalisation des protéines mal repliées chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$.

Le motif *coiled-coil* a été supprimé de la polycystine-1 chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ et cette suppression ne semble pas empêcher le transport de Pc1 ni son interaction avec la polycystine-2. Toutefois, les résultats présentés ci-haut suggèrent une diminution dans cette efficacité de transport et au niveau de l'interaction entre Pc1 et Pc2 autant chez les hypomorphes 30, 32, 49 que chez la lignée 42 surexprimant ~10X le transgène. Il est intéressant de se questionner sur le repliement de la polycystine-1 sans ce motif, parfois dans un contexte de surexpression (1-10X) et de se demander si une quantité anormale de Pc1 non-glycosylée ne se retrouve pas au niveau du réticulum endoplasmique (RE). L'objectif est de déterminer si $Pc1_{\Delta coiled-coil}$ cause un stress au niveau du RE ce qui augmenterait significativement la réponse aux protéines mal repliées ou the *unfolded protein response* (UPR). Dans le cadre de ce projet, l'analyse de la voie IRE α -Xbp1s est débutée.

4.4.1 Effet de l'ablation du motif *coiled-coil* et de la surexpression de Pc1 sur la voie IRE1 α -Xbp1

L'objectif est de déterminer si la voie IRE1 α -Xbp1 est suractivée chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$. Afin d'atteindre cet objectif, deux protéines sont analysées. La première est Xbp1s, un variant épissé non-conventionnel promu par l'activation de la voie IRE1 α . Ce facteur de transcription active la transcription de gènes cibles dans la réponse UPR, dont BiP, une chaperonne du réticulum endoplasmique. La deuxième protéine analysée est donc BiP. Afin de déterminer si ces deux cibles sont augmentées, deux immunobuvardages sont effectués sur des extraits rénaux nucléaires (Xbp1s) ou totaux (BiP) des souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 30, 32, 42, 49 en les comparant aux contrôles sauvages C57 ($Pkd1^{+/+}$) (fig4.7).

Tout d'abord les niveaux nucléaires de Xbp1s sont détectés par un anti-Xbp1s et visualisés à la figure 4.7A avec la lamine A/C comme marqueur nucléaire. On note une faible bande vers 54 kDa pour les deux échantillons $Pkd1^{-/-}\Delta CC30$. Xbp1s semble faiblement exprimé

chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 30 et indétectable pour les autres lignées et le contrôle (fig4.7A). Cette faible détection de Xbp1s ne suggère pas une situation de stress au niveau du RE. Il serait intéressant de confirmer ce résultat avec un anticorps spécifique à Xbp1s différent, optimal chez la souris, afin de vérifier si nous voyons des niveaux similaires entre les contrôles et $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$, particulièrement chez la lignée $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 30. Les niveaux d'expression de la chaperonne BiP (Grp78) sont visualisés à la figure 4.7B. On note une bande vers 78kDa qui correspond à BiP pour tous les échantillons. L'intensité des bandes en prenant en considération l'intensité du contrôle de chargement, Gapdh, sont comparables entre les contrôles et les lignées $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 30, 32, 42, 49. Ce résultat ne suggère pas l'augmentation de BiP ou d'une réponse UPR. En C, les ratios de BiP/Gapdh permettent de confirmer que les niveaux d'expression sont similaires entre les contrôles et les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$.

En résumé, les résultats suggèrent que la voie IRE1 α n'est pas suractivée puisque Xbp1s ne semble pas significativement activé et l'une de ses cibles, BiP, ne présente pas une expression plus élevée comparé aux contrôles. Une étude plus approfondie de cette voie serait toutefois nécessaire afin de confirmer les présents résultats préliminaires.

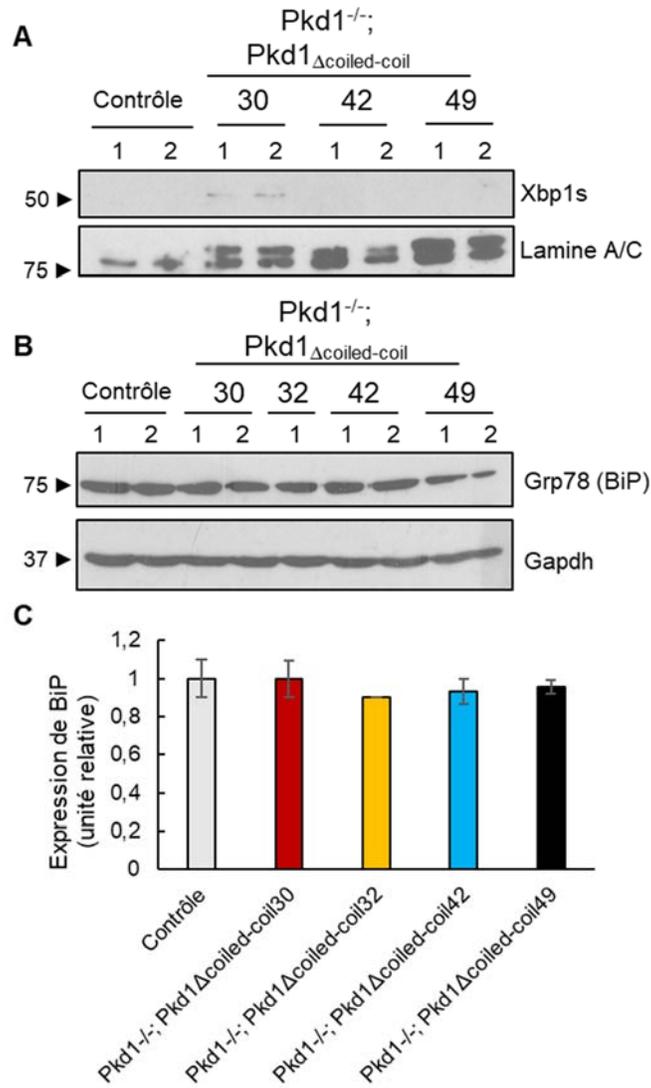


Figure 4.7 Niveaux d'expression de Xbp1s et sa cible BiP chez les souris Pkd1^{-/-}; Pkd1^{Δcoiled-coil}.

A) Analyse par immunobuvardage des niveaux de Xbp1s sur 50µg d'extraits nucléaires rénaux des souris Pkd1^{-/-}; Pkd1^{Δcoiled-coil}, 30, 42, 49 (n=2) et contrôle Pkd1^{+/+} (n=2) à P10. Les échantillons sont migrés sur gel 10% et Xbp1s est détecté avec un anti-Xbp1s et la Lamine A/C, le contrôle de chargement, est détecté avec un anti-Lamine. Une bande est visualisée vers ~54 kDa pour Xbp1s et vers 60-70 kDa pour le doublet de Lamine A/C. B) Analyse par immunobuvardage des niveaux de BiP sur 50µg d'extraits rénaux totaux des souris Pkd1^{-/-}; Pkd1^{Δcoiled-coil}, 30, 42, 49 (n=2), 32 (n=1) et contrôle Pkd1^{+/+} (n=2) à P10. Les échantillons sont migrés sur gel 8% et BiP est détecté avec un anti-BiP et Gapdh, le contrôle de chargement, est détecté avec un anti-Gapdh. Une bande est visualisée vers ~78 kDa pour BiP et 37 kDa pour Gapdh. C) Expression relative des niveaux de BiP des échantillons en B.

5. Discussion

Cette étude analyse un modèle PKD de souris, $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$, où le motif *coiled-coil* est supprimé dans un contexte *Pkd1* endogène *knock-out*. Ce modèle permet l'étude du rôle pathogénique du motif *coiled-coil* puisque le gène *Pkd1* murin a été tronqué, dans un chromosome artificiel bactérien, pour supprimer spécifiquement les 25 acides aminés correspondant au motif *coiled-coil*. Quatre lignées de souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$ avec une augmentation de 1 à 10 fois du transgène et de la protéine ont été produites. Le niveau d'expression de $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ corrèle avec le nombre de copie du transgène suggérant la présence de tous les éléments régulateurs nécessaires à l'expression tissu-spécifique du transgène. Trois de ces lignées (1-2,5x), $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$ 30, 32, 49, ont entraîné de manière reproductible des altérations morphologiques rénales et extrarénales caractéristiques de la polykystose rénale et meurent autour de 3 semaines d'âge. Une des quatre lignée, $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$ 42 (10x) ne présente pas de phénotype relié à la polykystose rénale et les souris vivent sans anomalie à plus d'un an d'âge. L'intérêt de ce modèle est qu'il permet d'étudier la fonction du domaine *coiled-coil* de *Pc1* et son implication dans la maladie. De plus, la différence de phénotype entre les quatre lignées selon l'expression du transgène fournit un justificatif et permet de décortiquer l'un des mécanismes pathogéniques proposé dans la littérature, soit celui de l'effet de dosage.

L'expression de la polycystine-1 chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$ corrèle avec le nombre de copies du transgène (fig4.1). Il semble qu'une expression de $Pc1_{\Delta coiled-coil}$ ~8 fois supérieure au niveau endogène permet la complémentation totale du phénotype léthal $Pkd1^{-/-}$, tandis que l'expression se situant près du niveau endogène permet une complémentation partielle du phénotype léthal $Pkd1^{-/-}$. Il a été montré chez la souris que toute dérégulation, augmentation ou diminution, de *Pkd1* peut mener à la formation de kystes. En effet, des modèles de surexpression, d'allèle hypomorphique et de perte de fonction ont été reportés comme pouvant mener à la kystogenèse (Lu, Peissel et al. 1997, Pritchard, Sloane-Stanley et al. 2000, Wu, Markowitz et al. 2000, Lantinga-van Leeuwen, Dauwerse et al. 2004, Thivierge,

Kurbegovic et al. 2006, Kurbegovic, Cote et al. 2010). Selon le modèle $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$, et $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\text{TAG}}$, il semblerait que la perte de fonction ($Pkd1^{-/-}$) puisse être complétée par une réexpression ou surexpression de $Pkd1_{\text{TAG}}/Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$. Toutefois, lors de la surexpression de $Pkd1_{\text{TAG}}$, des kystes se développent de manière tardive tandis que lors de la surexpression de $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$, on n'observe pas de kystes, même tardivement. Le phénomène de complémentation lors d'une réexpression/surexpression avait d'ailleurs été observé par Harris et son équipe avec les modèles de surexpression TPK1/3 exprimant ~30 copies d'un PAC-PKD1 humain (chromosome artificiel dérivé du Phage 1) et des gènes avoisinants. Lorsque ces lignées étaient croisées avec des souris $Pkd1(\text{del}34)$ *KO*, le transgène parvenait à compléter le phénotype léthal et démontrait que PC1 humain peut compenser la perte de *Pc1* endogène chez la souris (Pritchard, Sloane-Stanley et al. 2000).

Il est intéressant de s'attarder à la différence de complémentation entre les lignées de souris à faible copies du transgène $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{Coiled-coil}}$ 30, 32, 49 et la lignée $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{Coiled-coil}}$ 42. Les souris hétérozygotes $Pkd1^{+/-}$ à une seule copie sont viables et ne développent pas de kystes à long terme. L'expression de $Pc1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{Coiled-coil}}$ 30, 32, 49 n'est pas inférieure au niveau des hétérozygotes et est même similaire à l'expression des souris contrôles, $Pkd1^{+/+}$ (fig4.1B, C). Pourtant, les lignées 30, 32, 49 développent un phénotype de polykystose rénale malgré l'expression de la polycystine-1. Ces trois lignées agissent comme des hypomorphes avec une partie de la fonction sauvage de *Pc1* qui semble conservée, mais pas suffisamment pour compléter totalement le phénotype $Pkd1^{-/-}$. Elles ne semblent pas agir comme des hypomorphes d'expression puisque les niveaux d'expression de $Pc1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ ne sont pas différents de *Pc1* endogène. Ce résultat suggère que ces trois lignées de souris agissent comme des hypomorphes de fonction. Toutefois, rappelons que *Pc1* est exprimé dans les tubules distaux et proximaux des reins durant le développement et davantage dans les tubules distaux chez l'adulte (Ong, Ward et al. 1999). Ainsi, outre les niveaux d'expression de $Pc1_{\Delta\text{coiled-coil}}$, il serait intéressant de vérifier par immunohistochimie si $Pc1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ est distribuée de manière similaire au contrôle sauvage à P10 dans les tubules rénaux. La distribution de $Pc1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ pourrait avoir un effet sur sa fonction rénale. L'expression de $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ a été montré comme tissu-spécifique, il serait important de vérifier s'il en est de même au niveau de la distribution de $Pc1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ dans les tubules rénaux.

Pour conclure, l'absence du domaine *coiled-coil* semble mener à un produit Pc1 moins actif, mais la lignée $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$ 42, par sa surexpression, parviendrait à surmonter ce manque par la présence d'une beaucoup plus grande quantité de $Pc1_{\Delta coiled-coil}$. Il est donc intéressant de s'attarder à l'analyse de la fonction du motif *coiled-coil*.

La seconde observation au niveau de l'expression de Pc1 chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$ est, en se fiant à des études antérieures de notre laboratoire, la réduction de la forme glycosylée de Pc1 (~450 kDa) et une augmentation de la forme de Pc1 non-glycosylée (~370 kDa) à la figure 4.1A, B. Le réticulum endoplasmique est impliqué dans la N-glycosylation de plusieurs protéines membranaires (Janssen, Waanders et al. 2010). Ce résultat suggère une altération aux niveaux des modifications post-traductionnelles, soit la glycosylation de $Pc1_{\Delta coiled-coil}$. Le niveau inférieur de glycosylation suggère qu'une plus grande portion de Pc1 demeure au niveau du réticulum endoplasmique, les N-glycanes n'étant pas ajoutés. Il y aurait une possible altération au niveau du transport intracellulaire de $Pc1_{\Delta coiled-coil}$. Il a été montré par plusieurs études sur des modèles de souris, lignées cellulaires, et mutants tronqués qu'une glycosylation aberrante est associée avec la kystogenèse et la polykystose rénale, confirmant l'importance de la maturation de Pc1 (Inoue, Sohara et al. 2014, Gainullin, Hopp et al. 2015, Porath, Gainullin et al. 2016). La question découlant de ce constat est donc de savoir si la maturation de $Pc1_{\Delta coiled-coil}$ est adéquate et si la protéine parvient à transiter.

La première modification post-traductionnelle analysée chez $Pc1_{\Delta Coiled-coil}$ est le clivage au site protéolytique GPCR (GPS) du domaine GAIN à la juxta membrane qui est une des étapes clés de la maturation de Pc1 (Yu, Hackmann et al. 2007). Le clivage GPS joue un rôle important dans la régulation du transport de Pc1 jusqu'au cil ou jusqu'à la membrane et aurait lieu au début de la voie de sécrétion (Wei, Hackmann et al. 2007, Chapin, Rajendran et al. 2010, Kim, Xu et al. 2014). Des évidences suggèrent que le clivage de Pc1 est nécessaire pour permettre le transport de PC1/2 jusqu'au Golgi et qu'un clivage entravé cause la séquestration de Pc1 au niveau du réticulum endoplasmique, l'empêchant d'atteindre la membrane plasmique (Chapin, Rajendran et al. 2010, Kim, Xu et al. 2014). L'analyse du clivage chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$ a permis de confirmer la présence de la forme clivée pleine longueur de Pc1 ($Pc1^{cFL}$) par la détection des fragments $Pc1^{NTF}$ (~ 450, ~370 kDa) et du fragment $Pc1^{CTF}$ (~150

kDa) (fig4.2B,C). En effet, les fragments sont visualisés au niveau du poumon et au niveau du rein des souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$ 42, 49 (fig4.2B,C). Toutefois, au niveau du rein où l'expression de Pc1 est normalement à des niveaux plus faibles que dans le poumon, le clivage semble moins efficace. Cette diminution d'efficacité est particulièrement visible à la figure 4.2C où $Pc1^{CTF}$ chez $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$ 42 est plus faible comparativement à l'échantillon $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{TAG26}$ et plutôt similaire au contrôle. Il faudrait confirmer cette diminution d'efficacité en répétant l'expérience sur des échantillons de reins et poumons au jour post-natal 0 (P0) pour éliminer la composante de limite de détection, puisque les niveaux d'expression de Pc1 sont plus élevés à P0. L'ablation du motif *coiled-coil* ne semble pas empêcher le clivage au site GPS, l'efficacité semble diminuée, mais cette étape de maturation ne serait pas limitante pour le transport de Pc1 jusqu'au Golgi, puis jusqu'au cil ou à la membrane plasmique. Ce résultat concorde avec une étude effectuée sur des mutants de PC1 tronqués et exprimés dans des cellules épithéliales LLC-PK1 dont le mutant $PC1^{R4204X}$ (Cai, Fedeles et al. 2014). Ce mutant est tronqué avant le motif *coiled-coil*, mais montre un clivage conservé au niveau du GPS.

Le clivage GPS n'étant pas limitant à la maturation de Pc1 chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$ 42, 49, nous pouvons maintenant nous attarder à son transport du réticulum endoplasmique au réseau trans-Golgi. L'analyse du patron de N-glycosylation de $Pc1_{\Delta coiled-coil}$ permet de différencier les glycanes ajoutés au niveau du RE, sensible à EndoH, aux N-glycanes complexes ajoutés au niveau du Golgi et résistant à la digestion par EndoH. La résistance à EndoH est obtenue dans le réseau trans-Golgi où les oligosaccharides à forte teneur en mannose sont modifiés en saccharides complexes par l'ajout de N-acétylglucosamine (Vagin, Kraut et al. 2009). Ces ajouts permettent de former la protéine mature. Ainsi, le patron de déglycosylation de Pc1 à la figure 4.3 chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$ 42, 49 nous indique que dans le cas des hypomorphes et de la lignée 42, une portion de Pc1 est résistante et se retrouve au niveau du réseau trans-Golgi (fig4.3A). Ce résultat signifie qu'une partie de Pc1 parvient à quitter le RE et sa maturation se poursuit puisqu'il atteint le Golgi où les N-glycanes complexes sont ajoutés. Il y a significativement moins de Pc1 clivée résistante chez les lignées $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$ 42, 49 et la lignée $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{TAG26}$ comparativement au contrôle sauvage (fig4.3C). La réduction de Pc1 résistante à EndoH est respectivement de 89%, 53% et 71% comparativement au contrôle. Cette réduction peut suggérer un défaut au niveau de la maturation

entre le réticulum endoplasmique et le trans-Golgi, que Pc1 se replie plus difficilement sans le motif *coiled-coil* ou que l'interaction entre Pc1 et Pc2 qui facilite généralement le transit n'est pas efficace ou inexistante (Hopp, Ward et al. 2012, Kim, Xu et al. 2014). D'autres mutants Pc1 ont montré cette réduction de Pc1 résistante, par exemple, le modèle de souris développant progressivement des kystes $Pkd1^{RC/RC}$ correspondant à l'allèle humaine *PKDI* p.R3277C montre une réduction de 60% de Pc1 résistante causée par un défaut de maturation et de repliement de la protéine (Hopp, Ward et al. 2012). Cela suggère que la maturation inadéquate de Pc1 est impliquée dans PKD. La différence de réduction entre $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$ 42 et 49 est significative, la lignée 49 ayant une réduction moins drastique (fig4.3C). Ce résultat est surprenant sachant que les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$ 49 développent des kystes, une défaillance plus prononcée dans la maturation aurait été attendue. Toutefois, lorsqu'on s'attarde à l'expression relative de Pc1 clivée-R (fig4.3B) chez $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$ 49, ce niveau est diminué de près de 40% par rapport au contrôle sauvage et est 5,5 fois plus faible que la lignée $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$ 42. Cette réduction dépeint un défaut de maturation plus prononcé pour les hypomorphes. La réduction du ratio Pc1 résistante/sensible est aussi élevée chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{TAG26}$ (71%) similairement au 89% de réduction chez $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$ 42. Il est possible que la surexpression de Pc1 soit la cause de cette diminution de Pc1 résistante, la trop grande population pourrait empêcher un taux de transport efficace, par exemple. Une étude où Pc2 est cotransfectée dans des cellules MDCK avec une construction Pc1 contenant une mutation non-sens avant le domaine *coiled-coil* (p.E4211X) présente des résultats contraires à ceux présentés ici (Gainullin, Hopp et al. 2015). En effet, aucun PC1 N-terminal résistante n'est détecté lorsque le motif *coiled-coil* est tronqué, suggérant que la perte de ce domaine régule la maturation de Pc1 (Gainullin, Hopp et al. 2015). L'analyse *in vivo* présentée ici suggère aussi que le motif *coiled-coil* régule la maturation, mais qu'il n'est pas essentiel. Le patron de glycosylation suggère qu'une petite proportion de $Pc1_{\Delta coiled-coil}$ parvient à atteindre le réseau trans-Golgi, une proportion suffisante dans le cas de la lignée $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$ 42. En effet, la lignée $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$ 42 exprime un niveau total de Pc1 8,5 fois plus élevé que les contrôles sauvages (Fig4.1C). Même si le ratio Pc1 résistante/sensible pour cette lignée est 9,3 fois plus faible que chez les contrôles (Fig4.3C), la quantité de Pc1 résistante demeure tout de même plus élevée que la quantité présente chez les contrôles, soit ~3,2 fois plus élevée (fig4.3B). Ainsi, une quantité de Pc1 résistante au moins équivalente à celle du contrôle sauvage

parviendrait à transiter chez la lignée $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$ 42, même si une bonne proportion de Pc1 demeure sensible à EndoH. Cela pourrait expliquer l'absence de phénotype PKD chez cette lignée. Ces résultats sous-entendent que le motif *coiled-coil* est impliquée pour une maturation efficace de Pc1.

Puisqu'un certain niveau de $Pc1_{\Delta coiled-coil}$ se rend jusqu'au Golgi et que les N-acétylglucosamines nécessaires à la maturation de Pc1 sont ajoutées, il semble que cette fraction de la protéine puisse être ciblée et être fonctionnelle. Afin de déterminer si les étapes suivantes du transport de Pc1 sont conservées, l'analyse des exosomes est effectuée. Les vésicules ressemblant aux exosomes urinaires (ELV) sont les produits finaux de la voie de triage des corps multi-vésiculaires ou *multivesicular body* (MVB) (Hogan, Manganelli et al. 2009). Pc1 est normalement entreposé dans les vésicules intraluminales des MVB et certaines de ces vésicules sont excrétées dans l'urine lorsque les MVB fusionnent avec la membrane plasmique, ce sont les exosomes (Hogan, Manganelli et al. 2009). À la figure 4.4, les exosomes sont isolés chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$ 30, 42 et 49 et Pc1 est détecté chez les trois lignées. La présence de $Pc1_{\Delta coiled-coil}$ dans les ELVs signifie que la maturation de Pc1, son ciblage et son triage sont conservés jusqu'à son excrétion. Seule une bande pour Pc1 est détecté chez les lignées $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$ et chez les contrôles sauvages et $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{TAG26}$. Cette bande correspond à Pc1 N-terminal clivée et glycosylée. Ce résultat corrèle avec le fait que Pc1 mature transite normalement jusqu'aux exosomes. De plus, cette présence dans les exosomes urinaires de Pc1 clivée glycosylée est consistante avec les observations chez l'humain (Pisitkun, Shen et al. 2004, Hogan, Manganelli et al. 2009).

On observe aussi que pour les lignées qui ont ~10 copies du transgène $Pkd1_{TAG26}$ ou $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$ 42, une plus grande quantité de Pc1 est détectée dans les exosomes comparativement au contrôle, ce qui corrèle avec le patron d'expression de Pc1 chez ces souris (fig4.4). De manière intéressante, chez les hypomorphes $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$ 30 et 49, l'intensité de la bande correspondant à Pc1 est plus faible comparativement au contrôle, ce qui ne correspond pas au patron d'expression vu à la figure 4.1. Ce résultat est intéressant puisque ces souris développent la polykystose rénale. Dans une étude conduite sur 13 patients PKD ayant des mutations *PKDI*, PC1 montrait une diminution de 54% dans les ELV. Une hypothèse

proposée pour les mutations de type troncation chez l'humain dans la région transmembranaire est que PC1 serait incapable de former un complexe stable avec son partenaire PC2, interagissant normalement par leurs C-terminaux, et qu'ils seraient dégradés (Hogan, Bakeberg et al. 2015). Seul PC1 de l'allèle sauvage se rendrait aux exosomes causant une diminution d'environ 50% (Hogan, Bakeberg et al. 2015). Un complexe Pc1-Pc2 inadéquat chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ expliquerait la diminution de Pc1 dans les exosomes pour les hypomorphes. Cette diminution de Pc1 dans les ELVs est aussi observée dans le modèle de souris hypomorphique $Pkd1$ R3277C, la mutation mène à un défaut de repliement de Pc1 qui résulte en une diminution de Pc1 dans les exosomes (Hopp, Ward et al. 2012). De plus, nous avons vu qu'une quantité non-négligeable de $Pc1_{\Delta coiled-coil}$ est sensible à EndoH et reste probablement séquestrée au niveau du RE ou ne parvient pas à transiter jusqu'au trans-Golgi. Ainsi, chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 30, 32 et 49 qui ne surexpriment pas beaucoup Pc1, cette diminution dans la maturation et le transport peut se refléter au niveau du ciblage dans les exosomes. En d'autres mots, cela peut aussi expliquer la quantité plus faible de Pc1 détecté dans les exosomes pour ces trois lignées comparativement au contrôle sauvage. La diminution de Pc1 dans les exosomes semble un marqueur chez les patients et chez la souris PKD. Il semble qu'une diminution de $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ dans les exosomes des souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 30, 32 et 49 soit un marqueur de la polykystose rénale. Il est tout de même important de conclure en soulignant le fait que l'absence du motif *coiled-coil* n'empêche pas le transport de Pc1 jusqu'aux exosomes.

Ainsi, $Pc1_{\Delta coiled-coil}$ semble suivre la voie de sécrétion normale puisque la protéine est clivée au site GPS, N-glycosylée, elle atteint le trans-Golgi et est sécrétée dans les exosomes. Puisque Pc1 et Pc2 sont partenaires dans le transport et dans la signalisation, l'effet de l'ablation du motif *coiled-coil* sur l'expression de Pc2 et sur leurs interactions en tant que complexe sont analysées chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$. L'expression de Pc2 au niveau des reins n'est pas différente pour les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 42 et $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{TAG}$ 26 comparativement aux souris contrôles (fig4.5). Pourtant, chez les souris à P0 $Pkd1^{-/-}$ qui développent des kystes *in utero* et meurent avant P1, le niveau de Pc2 double, suggérant une dérégulation de Pc2. Ainsi, le nombre élevé de copies du transgène de $Pkd1_{TAG}$ et $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ semble conserver l'expression de Pc2 à un niveau endogène qui ne suggère pas de dérégulation au niveau de Pc2, concordant avec la complémentation du phénotype de polykystose rénale chez ses souris.

Chez les souris hypomorphes, les lignées $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 30, 32, 49, Pc2 est surexprimée ~ 3 fois plus que chez les contrôles $Pkd1^{+/+}$, ressemblant à ce qui est observé chez les souris $Pkd1^{-/-}$ à P0. Ainsi, chez les hypomorphes de fonction qui développent la polykystose rénale, il y a une augmentation de la polycystine-2. La surexpression de Pc2 est notamment associée à une diminution de la prolifération cellulaire (Grimm, Karihaloo et al. 2006). La prolifération cellulaire étant impliquée dans la kystogénèse de la polykystose rénale (Lee 2016), l'augmentation de Pc2 chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 30, 32, 49 pourrait être un effet stabilisateur. L'augmentation de Pc2 pourrait servir à diminuer la prolifération cellulaire. Ce mécanisme de compensation ne serait pas nécessaire chez les lignées qui surexpriment $Pc1_{\Delta Coiled-coil}$ puisque la surexpression de Pc1 semble empêcher la kystogénèse. Il a aussi été démontré que la maturation de Pc1 est influencée par le dosage de Pc2 (Gainullin, Hopp et al. 2015). Les niveaux de $Pc1^{CTF}$ diminuent en absence de Pc2, la surexpression de Pc2 sauvage augmente l'état d'équilibre de $Pc1^{CTF}$ et une interaction intacte entre Pc1-Pc2 est nécessaire pour cet état d'équilibre (Cai, Fedeles et al. 2014). Ainsi, un autre mécanisme de compensation possible chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 30, 32, 49 est l'augmentation de Pc2 pour faciliter l'interaction plus difficile en absence du motif *coiled-coil* et permettre la maturation d'une portion de Pc1. Chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 42, un tel mécanisme ne serait pas nécessaire puisque le système est en présence d'un excès de Pc1, ne nécessitant pas cette modulation de Pc2. Dans un ordre d'idées, globalement, l'expression endogène de la polycystine-2 est plus étendue durant le développement et elle plus élevée que Pc1 dans les reins matures chez l'humain et chez la souris (Foggensteiner, Bevan et al. 2000). Ainsi, il y aurait déjà davantage de Pc2 que de Pc1 dans les cellules rénales, la nécessité d'en produire encore plus dans un contexte où les niveaux de Pc1 ne sont pas beaucoup plus élevés peut sembler superflue. Outre que pour pallier son rôle de chaperonne ou de modulateur, il est possible qu'une autre composante mène à la surexpression de la polycystine-2 chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 30, 32, 49.

Puisque la littérature suggère que le motif *coiled-coil* de la polycystine-1 médie les interactions avec la polycystine-2, nous avons vérifié l'interaction entre Pc1 et Pc2 chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$ (Qian, Germino et al. 1997, Tsiokas, Kim et al. 1997, Casascelli, Schmidt et al. 2009, Giamarchi, Feng et al. 2010). Une interaction entre Pc1 et Pc2 est conservée

chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$ 42 et 49 (fig.4.6A,B). En prenant en compte les niveaux de Pc2 détectés lors de la co-immunoprécipitation et le niveau de $Pc1_{\Delta coiled-coil}$, on note que l'interaction Pc1-Pc2 est plus faible pour la lignée $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$ 42 comparativement à la lignée $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{TAG}$ 26 (fig.6A,B). Ce résultat suggère que le domaine *coiled-coil* facilite l'interaction entre les deux protéines. De même, l'interaction Pc1-Pc2 chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$ 49 est plus faible comparativement au contrôle ce qui corrèle avec le résultat obtenu chez la lignée 42 et suggère que l'ablation du motif *coiled-coil* n'empêche pas l'interaction entre les partenaires, mais l'efficacité est diminuée. Ces résultats suggèrent qu'un autre domaine de Pc1 peut médier les interactions entre Pc1-Pc2, qu'une interaction indirecte est possible ou que l'ablation du motif *coiled-coil* rend accessible un domaine différent de Pc1 pour une nouvelle interaction. En 2010, un résultat similaire avait été observé en cellules de reins embryonnaires humain 293 (HEK293) (Chapin, Rajendran et al. 2010). En effet, un PC1-CTD tronqué de ses 179 acides aminés suivant le dernier domaine transmembranaire avait conservé son interaction avec la polycystine-2 malgré l'absence du motif *coiled-coil*. Ce mutant n'avait pas non plus d'effet sur son clivage GPS ou sa localisation (Chapin, Rajendran et al. 2010). L'analyse tirée de notre modèle de souris combinée à cette étude implique qu'il pourrait y avoir un domaine ailleurs que dans la partie C-terminale qui contribuerait aux interactions entre le complexe Pc1-Pc2 (Chapin, Rajendran et al. 2010). Pc2 pourrait conserver son rôle de chaperonne essentielle pour la maturation de Pc1 et sa localisation. Ce rôle ne serait pas dépendant de la présence du domaine *coiled-coil* de Pc1 contrastant avec de précédents résultats qui défendent la nécessité de la présence du motif *coiled-coil* de Pc1 (Gainullin, Hopp et al. 2015). Puisque Pc1 et Pc2 semblent interagir chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$ 42 et 49, il est possible que plusieurs partenaires de Pc1 puissent aussi conserver leurs interactions, notamment Rabep1, un partenaire du transport intracellulaire important pour le transit jusqu'au réseau trans-Golgi et nécessitera d'être investigué (Kim, Xu et al. 2014).

Puisqu'une portion importante de $Pc1_{\Delta coiled-coil}$ semble séquestrée au niveau du RE, il est important de se demander si la réponse aux protéines mal repliées (UPR) est augmentée. L'analyse préliminaire de la voie IRE α -Xbp1s chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$, notamment l'évaluation des niveaux protéiques de Xbp1s et sa cible BiP, ne suggèrent pas un stress ni l'activation de cette voie au niveau du RE (fig.4.7). Il serait toutefois intéressant

d'analyser les niveaux phosphorylés du récepteur IRE α et d'analyser les deux autres voies de la réponse aux protéines mal repliées soit PERK et ATF6 α ainsi que les membres de leur voie respective (Hetz and Glimcher 2009). De récentes études ont mis en lumière l'implication de la voie UPR dans la polykystose hépatique autosomique dominante (Fedele, So et al. 2015, Besse, Dong et al. 2017). Un mécanisme commun entre la polykystose rénale autosomique dominante et la polykystose hépatique fournit de nouvelles informations sur la formation des kystes dans la maladie. La polykystose hépatique est caractérisée par de multiples kystes au foie et est causée par des mutations dans les gènes PRKCSH ou SEC63 qui encodent pour la glucosidase II β et SEC63p respectivement (Besse, Dong et al. 2017). Ces protéines sont exprimées au niveau du RE et participent à la maturation de Pc1 et Pc2. Des modèles de souris dans lesquels Sec63p ou GII β sont inactivées conditionnellement développent des kystes au foie et aux reins de manière dose-dépendante de Pc1 (Fedele, Tian et al. 2011). La glucosidase II β et SEC63p sont impliquées dans la voie de réponse aux protéines mal repliées et pourraient interférer au niveau de la progression des kystes (Fedele, So et al. 2015, Besse, Dong et al. 2017). La déficience en SEC63p active la voie IRE1 α -Xbp1 et résulte en l'augmentation de la transcription de chaperonnes qui permettent d'outrepasser le fardeau des protéines mal repliées (Fedele, So et al. 2015). L'inactivation de Xbp1 accentue le phénotype de polykystose rénale chez les souris Sec63KO et dépend du dosage de Pc1 (Fedele, So et al. 2015). L'activation de Xbp1 aurait donc un rôle protecteur dans le cadre des maladies polykystiques. L'activation et l'augmentation des chaperonnes de la voie UPR IRE1 α pourraient s'avérer une option clinique intéressante dans un cas où Pc1 a une fonction réduite. Dans le contexte des souris hypomorphes Pkd1 $^{-/-}$; Pkd1 Δ coiled-coil où Pc1 a une fonction réduite causant un phénotype, il pourrait être intéressant de voir l'impact de l'activation contrôlée de Xbp1s.

La figure 5.1 résume l'analyse du transport et des interactions intracellulaires de Pc1 Δ coiled-coil. Chez les souris Pkd1 $^{-/-}$; Pkd1 Δ coiled-coil, Pc1 Δ coiled-coil est exprimé en fonction du nombre de copies du transgène dans le RE en présence de Pc2. L'expression de Pc2 est inchangée chez la lignée Pkd1 $^{-/-}$; Pkd1 Δ coiled-coil 42, mais augmentée chez les trois lignées Pkd1 $^{-/-}$; Pkd1 Δ coiled-coil 30, 32, 49. Grâce à la présence en excès de Pc1 Δ coiled-coil ou Pc2, les polycystines parviendraient à former un complexe au RE et le clivage au GPS nécessaire à la maturation serait effectué (Kim, Xu et al. 2014, Gainullin, Hopp et al. 2015). La maturation et la localisation

de Pc1 semble dépendre de Pc2 de manière dosage-dépendant comme déjà proposé (Kim, Xu et al. 2014, Gainullin, Hopp et al. 2015). La liaison de Pc1 à Pc2 ne serait toutefois pas absolument dépendante du motif *coiled-coil* de Pc1. Une portion de Pc1 Δ *coiled-coil* parvient à transiter jusqu'au Golgi et l'ajout de N-acétylglucosamines serait effectué au niveau du trans-Golgi en complexe avec Pc2 ou seul. Pc1 et Pc2 seraient présents au cis-Golgi. Il a été suggéré qu'ils pouvaient être séparés et suivre un transport indépendant pour être à nouveau complexé dans un compartiment post-Golgi ou être transporté ensemble sous forme de complexe jusqu'au cil (fig5.1) (Hoffmeister, Babinger et al. 2011, Kim, Xu et al. 2014). La proportion de Pc1 Δ *coiled-coil* clivée qui demeure au niveau RE ne semble pas activer la voie IRE1 α -Xbp1s, mais plus d'analyses seront nécessaires pour le confirmer. Finalement, Pc1 Δ *coiled-coil* clivée résistante suivrait un triage et un ciblage fonctionnel puisqu'il est présent dans les exosomes suggérant qu'il pourrait être présent au niveau de la membrane plasmique et du cil, puis exporté via la voie des corps multi-vésiculaires comme déjà reporté (fig5.1)(Hogan, Manganelli et al. 2009, Hopp, Ward et al. 2012, Kim, Xu et al. 2014, Kurbegovic, Kim et al. 2014, Gainullin, Hopp et al. 2015).

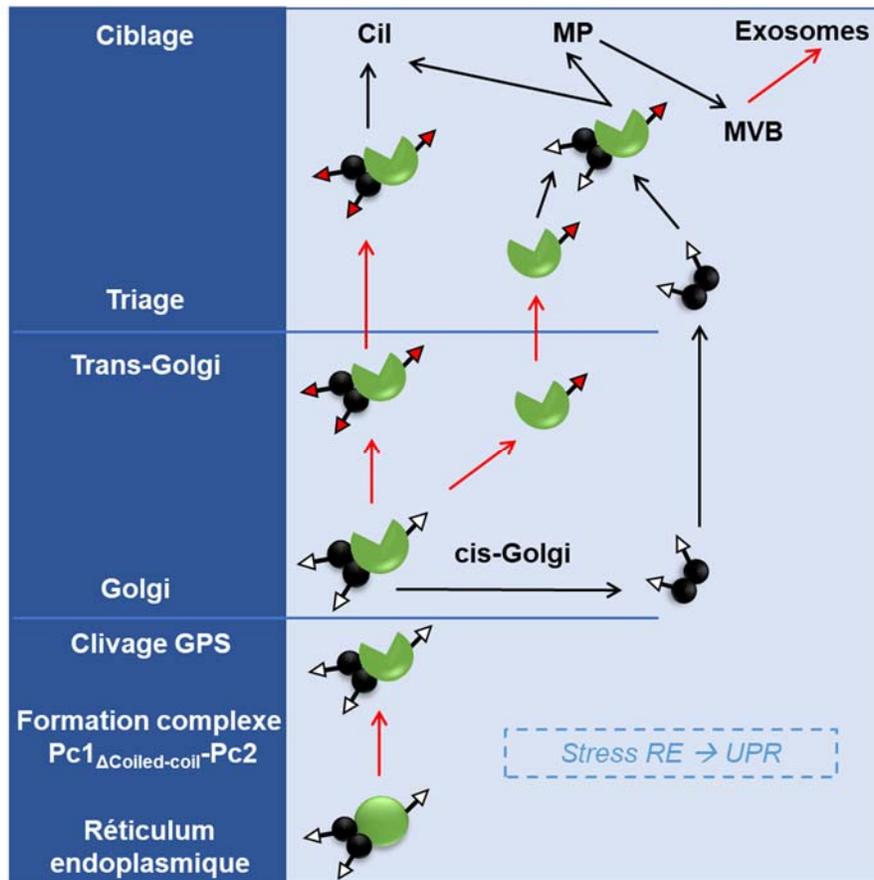


Figure 5.1. La signalisation et les interactions intracellulaires de Pc1 chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1^{\Delta coiled-coil}$. $Pc1^{\Delta coiled-coil}$ (vert) lie le dimère $Pc2$ (noir) plus difficilement dans le réticulum endoplasmique avant le clivage au site GPS. Les protéines sont exprimées sous leur forme sensible à EndoH (triangle blanc). L'accumulation de $Pc1^{\Delta Coiled-coil}$ pourrait ou non causer un stress au RE (boîte pointillée). Suite au clivage, une petite portion du complexe transite jusqu'au Golgi, acquiert la résistance à EndoH en passant par le trans-Golgi (triangle rouge) et serait trié et ciblé. Un modèle alternatif propose que $Pc2$ peut sortir du cis-Golgi sans acquérir de résistance et être transporté de manière indépendante de $Pc1^{\Delta Coiled-coil}$ qui lui suit la maturation et acquiert la résistance à EndoH. Le complexe serait reformé post-Golgi, trié et ciblé. Les différentes cibles de $Pc1$ - $Pc2$ sont indiquées : cil, MP (membrane plasmique), MVB (corps multi-vésiculaires), exosomes. Les flèches rouges indiquent les parties de la voie de transport et de signalisation analysées dans le présent projet. Adapté de *A polycystin-centric view of cyst formation and disease: the polycystins revisited*, *Kidney International*. (Ong and Harris 2015)

Ainsi, le transport et les interactions de $Pc1$ sans le motif *coiled-coil* sont moins efficaces, mais suffisantes dans un contexte où $Pc1^{\Delta coiled-coil}$ est surexprimé de manière à échapper au développement de la polykystose rénale. La surexpression de $Pc1^{\Delta coiled-coil}$ semble compenser pour la fonction biochimique du motif *coiled-coil*. Le motif *coiled-coil* aurait un rôle dans le transport intracellulaire de $Pc1$ et dans la kystogénèse de la polykystose rénale.

6. Conclusion

En conclusion, l'analyse du modèle murin $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ a permis une meilleure compréhension du domaine *coiled-coil* de la polycystine-1. En plus de son implication dans la kystogénèse, nous avons déterminé que le motif *coiled-coil* de la polycystine-1 est important pour l'efficacité de sa maturation, de son transport, de ses interactions avec la polycystine-2 et de sa signalisation intracellulaire. Nous avons aussi montré l'importance de l'effet de dosage et de la fonction de Pc1 chez ce même modèle murin. L'ablation du motif *coiled-coil* sur un fond génétique $Pkd1^{-/-}$ retarde à court terme le phénotype de polykystose rénale dans un contexte d'expression comparable au niveau endogène, mais les souris n'atteignent pas un mois d'âge suggérant un rôle fonctionnel pour le motif *coiled-coil*. Toutefois, dans un contexte de surexpression élevée, le phénotype est totalement complété. Ainsi, le dosage de la polycystine-1 joue un rôle primordial en l'absence de la fonction reliée au motif *coiled-coil* et un niveau suffisant permet d'outrepasser le phénotype de polykystose rénale. En résumé, nous avons montré que l'absence du motif *coiled-coil* réduisait l'efficacité de sa maturation, de son transport et de ses interactions, mais que, dépendant du niveau d'expression de la polycystine-1, sa présence n'était pas absolument nécessaire. Nos résultats suggèrent aussi que la polycystine-1 peut interagir avec la polycystine-2 sans le domaine *coiled-coil*. À la lumière de ces résultats, il semblerait possible d'inhiber les interactions et la fonction du motif *coiled-coil* sans empêcher la maturation, le transport et l'interaction avec la polycystine-2.

En effet, puisque le motif *coiled-coil* semble impliqué dans la kystogénèse et PKD, il semble être une cible thérapeutique adéquate. Une meilleure décortication des interactions médiées par le motif *coiled-coil* de la polycystine-1 sera nécessaire afin de mieux comprendre son implication dans la maladie et de bien cibler son application thérapeutique. Les résultats présentés dans cette étude suggèrent que l'inhibition de certaines des interactions médiées par ce motif pourrait avoir un effet bénéfique sur la progression de la maladie, c'est-à-dire en diminuant sa vitesse. Par exemple, l'élaboration d'une inhibition qui vise spécifiquement le motif *coiled-coil* pourrait être envisagée. Le développement d'un inhibiteur du motif *coiled-coil* de la polycystine-1 pourrait sembler laborieux puisque de nombreuses protéines possèdent un

motif *coiled-coil*. Toutefois, l'inhibition de partenaires protéiques spécifiques interagissant avec le motif pourrait être envisagée suite à une compréhension complète de la signalisation du motif *coiled-coil* de la polycystine-1. L'inhibition spécifique du motif *coiled-coil* de la polycystine-1 pourrait être accomplie avec des peptides. Une approche qui semble prendre en popularité et intérêt est celle des inhibiteurs des interactions protéines-protéines à base peptidiques (Wojcik et Berlicki, 2016). Cette approche permet l'élaboration et la découverte de molécules peptidiques qui interagissent spécifiquement avec la surface des protéines et permet l'inhibition d'interactions protéines-protéines spécifiques (Wojcik et Berlicki, 2016). Ainsi, à plus long terme, le motif *coiled-coil* pourrait s'avérer une cible intéressante dans la maladie chez l'humain pour ralentir la destruction des reins, minimiser la formation de kystes et même prolonger l'espérance de vie.

Bibliographie

Akoh, J. A. (2015). "Current management of autosomal dominant polycystic kidney disease." World J Nephrol **4**(4): 468-479.

Anyatonwu, G. I., M. Estrada, X. Tian, S. Somlo and B. E. Ehrlich (2007). "Regulation of ryanodine receptor-dependent calcium signaling by polycystin-2." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(15): 6454-6459.

Arts, H. H. and N. V. A. M. Knoers (2016). Chapter 22 - Inherited Kidney Disorders in the Age of Genomics A2 - Little, Melissa H. Kidney Development, Disease, Repair and Regeneration. San Diego, Academic Press: 275-291.

Badano, J. L., N. Mitsuma, P. L. Beales and N. Katsanis (2006). "The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders." Annu Rev Genomics Hum Genet **7**: 125-148.

Badenas, C., R. Torra, L. Perez-Oller, J. Mallolas, R. Talbot-Wright, V. Torregrosa and A. Darnell (2000). "Loss of heterozygosity in renal and hepatic epithelial cystic cells from ADPKD1 patients." Eur J Hum Genet **8**(7): 487-492.

Badenas, C., R. Torra, J. L. San Millan, L. Lucero, M. Mila, X. Estivill and A. Darnell (1999). "Mutational analysis within the 3' region of the PKD1 gene." Kidney Int **55**(4): 1225-1233.

Bajwa, Z. H., K. A. Sial, A. B. Malik and T. I. Steinman (2004). "Pain patterns in patients with polycystic kidney disease." Kidney Int **66**(4): 1561-1569.

Bataille, S., N. Demoulin, O. Devuyst, M. P. Audrezet, K. Dahan, M. Godin, M. Fontes, Y. Pirson and S. Burtey (2011). "Association of PKD2 (polycystin 2) mutations with left-right laterality defects." Am J Kidney Dis **58**(3): 456-460.

Bateman, A. and R. Sandford (1999). "The PLAT domain: a new piece in the PKD1 puzzle." Curr Biol **9**(16): R588-590.

Besse, W., K. Dong, J. Choi, S. Punia, S. V. Fedeles, M. Choi, A. R. Gallagher, E. B. Huang, A. Gulati, J. Knight, S. Mane, E. Tahvanainen, P. Tahvanainen, S. Sanna-Cherchi, R. P. Lifton, T. Watnick, Y. P. Pei, V. E. Torres and S. Somlo (2017). "Isolated polycystic liver disease genes define effectors of polycystin-1 function." J Clin Invest **127**(9): 3558.

Bhunja, A. K., K. Piontek, A. Boletta, L. Liu, F. Qian, P. N. Xu, F. J. Germino and G. G. Germino (2002). "PKD1 induces p21(waf1) and regulation of the cell cycle via direct activation of the JAK-STAT signaling pathway in a process requiring PKD2." Cell **109**(2): 157-168.

Birbrair, A., T. Zhang, D. C. Files, S. Mannava, T. Smith, Z. M. Wang, M. L. Messi, A. Mintz and O. Delbono (2014). "Type-1 pericytes accumulate after tissue injury and produce collagen in an organ-dependent manner." Stem Cell Res Ther **5**(6): 122.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.

Brasier, J. L. and E. P. Henske (1997). "Loss of the polycystic kidney disease (PKD1) region of chromosome 16p13 in renal cyst cells supports a loss-of-function model for cyst pathogenesis." J Clin Invest **99**(2): 194-199.

Breuning, M. H., S. T. Reeders, H. Brunner, J. W. Ijdo, J. J. Saris, A. Verwest, G. J. van Ommen and P. L. Pearson (1987). "Improved early diagnosis of adult polycystic kidney disease with flanking DNA markers." Lancet **2**(8572): 1359-1361.

Breuning, M. H., F. G. Snijdwint, H. Brunner, A. Verwest, J. W. Ijdo, J. J. Saris, J. G. Dauwerse, L. Blonden, T. Keith, D. F. Callen and et al. (1990). "Map of 16 polymorphic loci on the short arm of chromosome 16 close to the polycystic kidney disease gene (PKD1)." J Med Genet **27**(10): 603-613.

Burn, T. C., T. D. Connors, W. R. Dackowski, L. R. Petry, T. J. Van Raay, J. M. Millholland, M. Venet, G. Miller, R. M. Hakim, G. M. Landes and et al. (1995). "Analysis of the genomic sequence for the autosomal dominant polycystic kidney disease (PKD1) gene predicts the presence of a leucine-rich repeat. The American PKD1 Consortium (APKD1 Consortium)." Hum Mol Genet **4**(4): 575-582.

Bycroft, M., A. Bateman, J. Clarke, S. J. Hamill, R. Sandford, R. L. Thomas and C. Chothia (1999). "The structure of a PKD domain from polycystin-1: implications for polycystic kidney disease." Embo j **18**(2): 297-305.

Cai, Y., G. Anyatonwu, D. Okuhara, K. B. Lee, Z. Yu, T. Onoe, C. L. Mei, Q. Qian, L. Geng, R. Witzgall, B. E. Ehrlich and S. Somlo (2004). "Calcium dependence of polycystin-2 channel activity is modulated by phosphorylation at Ser812." J Biol Chem **279**(19): 19987-19995.

Cai, Y., S. V. Fedeles, K. Dong, G. Anyatonwu, T. Onoe, M. Mitobe, J. D. Gao, D. Okuhara, X. Tian, A. R. Gallagher, Z. Tang, X. Xie, M. D. Lalioti, A. H. Lee, B. E. Ehrlich and S. Somlo (2014). "Altered trafficking and stability of polycystins underlie polycystic kidney disease." J Clin Invest **124**(12): 5129-5144.

Cai, Y., Y. Maeda, A. Cedzich, V. E. Torres, G. Wu, T. Hayashi, T. Mochizuki, J. H. Park, R. Witzgall and S. Somlo (1999). "Identification and characterization of polycystin-2, the PKD2 gene product." J Biol Chem **274**(40): 28557-28565.

Canada, S. (2016). Tableau 051-0001 - Estimations de la population, selon le groupe d'âge et le sexe au 1er juillet, Canada, provinces et territoires.

Caranci, F., F. Briganti, L. Cirillo, M. Leonardi and M. Muto (2013). "Epidemiology and genetics of intracranial aneurysms." Eur J Radiol **82**(10): 1598-1605.

Casascelli, J., S. Schmidt, B. DeGray, E. T. Petri, A. Celic, E. Folta-Stogniew, B. E. Ehrlich and T. J. Boggon (2009). "Analysis of the cytoplasmic interaction between polycystin-1 and polycystin-2." Am J Physiol Renal Physiol **297**(5): F1310-1315.

Chapin, H. C., V. Rajendran and M. J. Caplan (2010). "Polycystin-1 surface localization is stimulated by polycystin-2 and cleavage at the G protein-coupled receptor proteolytic site." Mol Biol Cell **21**(24): 4338-4348.

Chea, S. W. and K. B. Lee (2009). "TGF-beta mediated epithelial-mesenchymal transition in autosomal dominant polycystic kidney disease." Yonsei Med J **50**(1): 105-111.

Chebib, F. T. and V. E. Torres (2016). "Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: Core Curriculum 2016." Am J Kidney Dis **67**(5): 792-810.

Consortium, S. M. (2016). tolvaptan 15mg, 30mg, 45mg, 60mg and 90mg tablets (Jinarc®) The Scottish Medicines Consortium

Consortium, T. E. P. K. D. (1994). "The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. ." Cell **77**(6): 881-894.

Côté, O. (2009). Analyse fonctionnelle de la polycystine-1 et de son domaine intracellulaire dans le développement de la polykystose rénale autosomique dominante M. Sc. Mémoire, Université de Montréal.

Crick, F. H. (1952). "Is alpha-keratin a coiled coil?" Nature **170**(4334): 882-883.

Dalgaard, O. Z. (1957). "Bilateral polycystic disease of the kidneys; a follow-up of two hundred and eighty-four patients and their families." Acta Med Scand Suppl **328**: 1-255.

Dicks, E., P. Ravani, D. Langman, W. S. Davidson, Y. Pei and P. S. Parfrey (2006). "Incident renal events and risk factors in autosomal dominant polycystic kidney disease: a population and family-based cohort followed for 22 years." Clin J Am Soc Nephrol **1**(4): 710-717.

Disease, T. I. P. K. and Consortium (1995). "Polycystic kidney disease: the complete structure of the PKD1 gene and its protein. The International Polycystic Kidney Disease Consortium." Cell **81**(2): 289-298.

Eaton, D. C. and J. P. Pooler (2013). Vander's Renal Physiology. Vander's Renal Physiology. LANGE. États-Unis, McGraw-Hill Education.

Eceder, T. and R. W. Schrier (2001). "Hypertension in autosomal-dominant polycystic kidney disease: early occurrence and unique aspects." J Am Soc Nephrol **12**(1): 194-200.

European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis, C. (1993). "Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16." Cell **75**(7): 1305-1315.

Excellence, N. I. f. H. a. C. (2015). Tolvaptan for treating autosomal dominant polycystic kidney disease, National Institute for Health and Care Excellence (NICE).

Fedele, S. V., J. S. So, A. Shrikhande, S. H. Lee, A. R. Gallagher, C. E. Barkauskas, S. Somlo and A. H. Lee (2015). "Sec63 and Xbp1 regulate IRE1alpha activity and polycystic disease severity." J Clin Invest **125**(5): 1955-1967.

Fedele, S. V., X. Tian, A. R. Gallagher, M. Mitobe, S. Nishio, S. H. Lee, Y. Cai, L. Geng, C. M. Crews and S. Somlo (2011). "A genetic interaction network of five genes for human polycystic kidney and liver diseases defines polycystin-1 as the central determinant of cyst formation." Nat Genet **43**(7): 639-647.

Feng, S., L. Rodat-Despoix, P. Delmas and A. C. Ong (2011). "A single amino acid residue constitutes the third dimerization domain essential for the assembly and function of the tetrameric polycystin-2 (TRPP2) channel." J Biol Chem **286**(21): 18994-19000.

Ferreira, F. M., E. H. Watanabe and L. F. Onuchic (2015). Polycystins and Molecular Basis of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. Polycystic Kidney Disease. X. Li. Brisbane (AU).

Foggensteiner, L., A. P. Bevan, R. Thomas, N. Coleman, C. Boulter, J. Bradley, O. Ibraghimov-Beskrovnya, K. Klinger and R. Sandford (2000). "Cellular and subcellular distribution of polycystin-2, the protein product of the PKD2 gene." J Am Soc Nephrol **11**(5): 814-827.

Foy, R. L., V. C. Chitalia, M. V. Panchenko, L. Zeng, D. Lopez, J. W. Lee, S. V. Rana, A. Boletta, F. Qian, L. Tsiokas, K. B. Piontek, G. G. Germino, M. I. Zhou and H. T. Cohen (2012). "Polycystin-1 regulates the stability and ubiquitination of transcription factor Jade-1." Hum Mol Genet **21**(26): 5456-5471.

Gabow, P. A. (1993). "Autosomal dominant polycystic kidney disease." N Engl J Med **329**(5): 332-342.

Gabow, P. A., A. M. Johnson, W. D. Kaehny, W. J. Kimberling, D. C. Lezotte, I. T. Duley and R. H. Jones (1992). "Factors affecting the progression of renal disease in autosomal-dominant polycystic kidney disease." Kidney Int **41**(5): 1311-1319.

Gabow, P. A., A. M. Johnson, W. D. Kaehny, M. L. Manco-Johnson, I. T. Duley and G. T. Everson (1990). "Risk factors for the development of hepatic cysts in autosomal dominant polycystic kidney disease." Hepatology **11**(6): 1033-1037.

Gainullin, V. G., K. Hopp, C. J. Ward, C. J. Hommerding and P. C. Harris (2015). "Polycystin-1 maturation requires polycystin-2 in a dose-dependent manner." J Clin Invest **125**(2): 607-620.

Gansevoort, R. T., M. Arici, T. Benzing, H. Birn, G. Capasso, A. Covic, O. Devuyst, C. Drechsler, K. U. Eckardt, F. Emma, B. Knebelmann, Y. Le Meur, Z. A. Massy, A. C. Ong, A. Ortiz, F. Schaefer, R. Torra, R. Vanholder, A. Wiecek, C. Zoccali and W. Van Biesen (2016). "Recommendations for the use of tolvaptan in autosomal dominant polycystic kidney disease: a position statement on behalf of the ERA-EDTA Working Groups on Inherited Kidney Disorders and European Renal Best Practice." Nephrol Dial Transplant **31**(3): 337-348.

Gardner, K. D., Jr., J. S. Burnside, L. W. Elzinga and R. M. Locksley (1991). "Cytokines in fluids from polycystic kidneys." Kidney Int **39**(4): 718-724.

Geng, L., D. Okuhara, Z. Yu, X. Tian, Y. Cai, S. Shibasaki and S. Somlo (2006). "Polycystin-2 traffics to cilia independently of polycystin-1 by using an N-terminal RVxP motif." J Cell Sci **119**(Pt 7): 1383-1395.

Geng, L., Y. Segal, B. Peissel, N. Deng, Y. Pei, F. Carone, H. G. Rennke, A. M. Glucksmann-Kuis, M. C. Schneider, M. Ericsson, S. T. Reeders and J. Zhou (1996). "Identification and localization of polycystin, the PKD1 gene product." J Clin Invest **98**(12): 2674-2682.

Germino, G. G., N. J. Barton, J. Lamb, D. R. Higgs, P. Harris, G. H. Xiao, G. Scherer, Y. Nakamura and S. T. Reeders (1990). "Identification of a locus which shows no genetic recombination with the autosomal dominant polycystic kidney disease gene on chromosome 16." Am J Hum Genet **46**(5): 925-933.

Germino, G. G., D. Weinstat-Saslow, H. Himmelbauer, G. A. Gillespie, S. Somlo, B. Wirth, N. Barton, K. L. Harris, A. M. Frischauf and S. T. Reeders (1992). "The gene for autosomal dominant polycystic kidney disease lies in a 750-kb CpG-rich region." Genomics **13**(1): 144-151.

Giamarchi, A., S. Feng, L. Rodat-Despoix, Y. Xu, E. Bubenshchikova, L. J. Newby, J. Hao, C. Gaudio, M. Crest, A. N. Lupas, E. Honore, M. P. Williamson, T. Obara, A. C. Ong and P. Delmas (2010). "A polycystin-2 (TRPP2) dimerization domain essential for the function of heteromeric polycystin complexes." Embo j **29**(7): 1176-1191.

Gonzalez-Perrett, S., M. Batelli, K. Kim, M. Essafi, G. Timpanaro, N. Moltabetti, I. L. Reisin, M. A. Arnaout and H. F. Cantiello (2002). "Voltage dependence and pH regulation of human polycystin-2-mediated cation channel activity." J Biol Chem **277**(28): 24959-24966.

Grantham, J. J. (1996). "The etiology, pathogenesis, and treatment of autosomal dominant polycystic kidney disease: recent advances." Am J Kidney Dis **28**(6): 788-803.

Grantham, J. J. (1997). "Mechanisms of progression in autosomal dominant polycystic kidney disease." Kidney Int Suppl **63**: S93-97.

Grantham, J. J., S. Mulamalla and K. I. Swenson-Fields (2011). "Why kidneys fail in autosomal dominant polycystic kidney disease." Nat Rev Nephrol **7**(10): 556-566.

Gregory, J. L., E. F. Morand, S. J. McKeown, J. A. Ralph, P. Hall, Y. H. Yang, S. R. McColl and M. J. Hickey (2006). "Macrophage migration inhibitory factor induces macrophage recruitment via CC chemokine ligand 2." J Immunol **177**(11): 8072-8079.

Grieben, M., A. C. Pike, C. A. Shintre, E. Venturi, S. El-Ajouz, A. Tessitore, L. Shrestha, S. Mukhopadhyay, P. Mahajan, R. Chalk, N. A. Burgess-Brown, R. Sitsapesan, J. T. Huiskonen and E. P. Carpenter (2017). "Structure of the polycystic kidney disease TRP channel Polycystin-2 (PC2)." Nat Struct Mol Biol **24**(2): 114-122.

Grimm, D. H., A. Karihaloo, Y. Cai, S. Somlo, L. G. Cantley and M. J. Caplan (2006). "Polycystin-2 regulates proliferation and branching morphogenesis in kidney epithelial cells." J Biol Chem **281**(1): 137-144.

Hanaoka, K., F. Qian, A. Boletta, A. K. Bhunia, K. Piontek, L. Tsiokas, V. P. Sukhatme, W. B. Guggino and G. G. Germino (2000). "Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents." Nature **408**(6815): 990-994.

Harris, P. C., K. T. Bae, S. Rossetti, V. E. Torres, J. J. Grantham, A. B. Chapman, L. M. Guay-Woodford, B. F. King, L. H. Wetzel, D. A. Baumgarten, P. J. Kenney, M. Consugar, S. Klahr, W. M. Bennett, C. M. Meyers, Q. J. Zhang, P. A. Thompson, F. Zhu and J. P. Miller (2006). "Cyst number but not the rate of cystic growth is associated with the mutated gene in autosomal dominant polycystic kidney disease." J Am Soc Nephrol **17**(11): 3013-3019.

Harris, P. C. and S. Rossetti (2010). "Molecular diagnostics for autosomal dominant polycystic kidney disease." Nat Rev Nephrol **6**(4): 197-206.

Hayashi, T., T. Mochizuki, D. M. Reynolds, G. Wu, Y. Cai and S. Somlo (1997). "Characterization of the exon structure of the polycystic kidney disease 2 gene (PKD2)." Genomics **44**(1): 131-136.

He, J. C., P. Y. Chuang, A. Ma'ayan and R. Iyengar (2012). "Systems biology of kidney diseases." Kidney Int **81**(1): 22-39.

Hetz, C. and L. H. Glimcher (2009). "Fine-tuning of the unfolded protein response: Assembling the IRE1alpha interactome." Mol Cell **35**(5): 551-561.

Himmelbauer, H., G. G. Germino, I. Ceccherini, G. Romeo, S. T. Reenders and A. M. Frischauf (1991). "Saturating the region of the polycystic kidney disease gene with NotI linking clones." Am J Hum Genet **48**(2): 325-334.

Hoffmeister, H., K. Babinger, S. Gurster, A. Cedzich, C. Meese, K. Schadendorf, L. Osten, U. de Vries, A. Rascole and R. Witzgall (2011). "Polycystin-2 takes different routes to the somatic and ciliary plasma membrane." J Cell Biol **192**(4): 631-645.

Hofherr, A., C. Wagner, S. Fedeles, S. Somlo and M. Kottgen (2014). "N-glycosylation determines the abundance of the transient receptor potential channel TRPP2." J Biol Chem **289**(21): 14854-14867.

Hogan, M. C., J. L. Bakeberg, V. G. Gainullin, M. V. Irazabal, A. J. Harmon, J. C. Lieske, M. C. Charlesworth, K. L. Johnson, B. J. Madden, R. M. Zenka, D. J. McCormick, J. L. Sundsbak, C. M. Heyer, V. E. Torres, P. C. Harris and C. J. Ward (2015). "Identification of Biomarkers for PKD1 Using Urinary Exosomes." J Am Soc Nephrol **26**(7): 1661-1670.

Hogan, M. C., L. Manganelli, J. R. Woollard, A. I. Masyuk, T. V. Masyuk, R. Tammachote, B. Q. Huang, A. A. Leontovich, T. G. Beito, B. J. Madden, M. C. Charlesworth, V. E. Torres, N. F. LaRusso, P. C. Harris and C. J. Ward (2009). "Characterization of PKD Protein-Positive Exosome-Like Vesicles." J Am Soc Nephrol **20**(2): 278-288.

Hopp, K., C. J. Ward, C. J. Hommerding, S. H. Nasr, H. F. Tuan, V. G. Gainullin, S. Rossetti, V. E. Torres and P. C. Harris (2012). "Functional polycystin-1 dosage governs autosomal dominant polycystic kidney disease severity." J Clin Invest **122**(11): 4257-4273.

Horie, S. (2015). "Will introduction of tolvaptan change clinical practice in autosomal dominant polycystic kidney disease?" Kidney Int **88**(1): 14-16.

Hughes, J., C. J. Ward, B. Peral, R. Aspinwall, K. Clark, J. L. San Millan, V. Gamble and P. C. Harris (1995). "The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains." Nat Genet **10**(2): 151-160.

Hyland, V. J., G. K. Suthers, K. Friend, R. N. MacKinnon, D. F. Callen, M. H. Breuning, T. Keith, V. A. Brown, P. Phipps and G. R. Sutherland (1990). "Probe, VK5B, is located in the same interval as the autosomal dominant adult polycystic kidney disease locus, PKD1." Hum Genet **84**(3): 286-288.

Ibraghimov-Beskrovnaya, O., W. R. Dackowski, L. Foggensteiner, N. Coleman, S. Thiru, L. R. Petry, T. C. Burn, T. D. Connors, T. Van Raay, J. Bradley, F. Qian, L. F. Onuchic, T. J. Watnick, K. Piontek, R. M. Hakim, G. M. Landes, G. G. Germino, R. Sandford and K. W. Klinger (1997). "Polycystin: in vitro synthesis, in vivo tissue expression, and subcellular localization identifies a large membrane-associated protein." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(12): 6397-6402.

Iglesias, C. G., V. E. Torres, K. P. Offord, K. E. Holley, C. M. Beard and L. T. Kurland (1983). "Epidemiology of adult polycystic kidney disease, Olmsted County, Minnesota: 1935-1980." Am J Kidney Dis **2**(6): 630-639.

Inoue, Y., E. Sohara, K. Kobayashi, M. Chiga, T. Rai, K. Ishibashi, S. Horie, X. Su, J. Zhou, S. Sasaki and S. Uchida (2014). "Aberrant Glycosylation and Localization of Polycystin-1 Cause Polycystic Kidney in an AQP11 Knockout Model." J Am Soc Nephrol **25**(12): 2789-2799.

Janssen, M. J., E. Waanders, J. Woudenberg, D. J. Lefeber and J. P. Drenth (2010). "Congenital disorders of glycosylation in hepatology: the example of polycystic liver disease." J Hepatol **52**(3): 432-440.

Jennette, J. C., J. L. Olson, M. M. Schwartz and F. G. Silva (2007). Heptinstall's Pathology of the Kidney. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.

Jiang, S. T., Y. Y. Chiou, E. Wang, H. K. Lin, Y. T. Lin, Y. C. Chi, C. K. Wang, M. J. Tang and H. Li (2006). "Defining a link with autosomal-dominant polycystic kidney disease in mice with congenitally low expression of Pkd1." Am J Pathol **168**(1): 205-220.

Karihaloo, A., F. Korashy, S. C. Huen, Y. Lee, D. Merrick, M. J. Caplan, S. Somlo and L. G. Cantley (2011). "Macrophages promote cyst growth in polycystic kidney disease." J Am Soc Nephrol **22**(10): 1809-1814.

Kim, E., T. Arnould, L. Sellin, T. Benzing, N. Comella, O. Kocher, L. Tsiokas, V. P. Sukhatme and G. Walz (1999). "Interaction between RGS7 and polycystin." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(11): 6371-6376.

Kim, H., W. Jeong, K. Ahn, C. Ahn and S. Kang (2004). "Siah-1 interacts with the intracellular region of polycystin-1 and affects its stability via the ubiquitin-proteasome pathway." J Am Soc Nephrol **15**(8): 2042-2049.

Kim, H., H. Xu, Q. Yao, W. Li, Q. Huang, P. Outeda, V. Cebotaru, M. Chiaravalli, A. Boletta, K. Piontek, G. G. Germino, E. J. Weinman, T. Watnick and F. Qian (2014). "Ciliary membrane proteins traffic through the Golgi via a Rabep1/GGA1/Arl3-dependent mechanism." Nat Commun **5**: 5482.

Kim, K., Z. Lu and E. D. Hay (2002). "Direct evidence for a role of beta-catenin/LEF-1 signaling pathway in induction of EMT." Cell Biol Int **26**(5): 463-476.

Kim, S., H. Nie, V. Nesin, U. Tran, P. Outeda, C. X. Bai, J. Keeling, D. Maskey, T. Watnick, O. Wessely and L. Tsiokas (2016). "The polycystin complex mediates Wnt/Ca(2+) signalling." Nat Cell Biol **18**(7): 752-764.

Kimberling, W. J., S. Kumar, P. A. Gabow, J. B. Kenyon, C. J. Connolly and S. Somlo (1993). "Autosomal dominant polycystic kidney disease: localization of the second gene to chromosome 4q13-q23." Genomics **18**(3): 467-472.

Kobori, T., G. D. Smith, R. Sandford and J. M. Edwardson (2009). "The transient receptor potential channels TRPP2 and TRPC1 form a heterotetramer with a 2:2 stoichiometry and an alternating subunit arrangement." J Biol Chem **284**(51): 35507-35513.

Koptides, M., R. Constantinides, G. Kyriakides, M. Hadjigavriel, P. C. Patsalis, A. Pierides and C. C. Deltas (1998). "Loss of heterozygosity in polycystic kidney disease with a missense mutation in the repeated region of PKD1." Hum Genet **103**(6): 709-717.

Kottgen, M., B. Buchholz, M. A. Garcia-Gonzalez, F. Kotsis, X. Fu, M. Doerken, C. Boehlke, D. Steffl, R. Tauber, T. Wegierski, R. Nitschke, M. Suzuki, A. Kramer-Zucker, G. G. Germino, T. Watnick, J. Prene, B. Nilius, E. W. Kuehn and G. Walz (2008). "TRPP2 and TRPV4 form a polymodal sensory channel complex." J Cell Biol **182**(3): 437-447.

Koulen, P., Y. Cai, L. Geng, Y. Maeda, S. Nishimura, R. Witzgall, B. E. Ehrlich and S. Somlo (2002). "Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel." Nat Cell Biol **4**(3): 191-197.

Kurbegovic, A., O. Cote, M. Couillard, C. J. Ward, P. C. Harris and M. Trudel (2010). "Pkd1 transgenic mice: adult model of polycystic kidney disease with extrarenal and renal phenotypes." Hum Mol Genet **19**(7): 1174-1189.

Kurbegovic, A., H. Kim, H. Xu, S. Yu, J. Cruanes, R. L. Maser, A. Boletta, M. Trudel and F. Qian (2014). "Novel functional complexity of polycystin-1 by GPS cleavage in vivo: role in polycystic kidney disease." Mol Cell Biol **34**(17): 3341-3353.

Lal, M., X. Song, J. L. Pluznick, V. Di Giovanni, D. M. Merrick, N. D. Rosenblum, V. Chauvet, C. J. Gottardi, Y. Pei and M. J. Caplan (2008). "Polycystin-1 C-terminal tail associates with beta-catenin and inhibits canonical Wnt signaling." Hum Mol Genet **17**(20): 3105-3117.

Lan, H. Y. (2011). "Diverse roles of TGF-beta/Smads in renal fibrosis and inflammation." Int J Biol Sci **7**(7): 1056-1067.

Lanoix, J., V. D'Agati, M. Szabolcs and M. Trudel (1996). "Dysregulation of cellular proliferation and apoptosis mediates human autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD)." Oncogene **13**(6): 1153-1160.

Lantinga-van Leeuwen, I. S., J. G. Dauwerse, H. J. Baelde, W. N. Leonhard, A. van de Wal, C. J. Ward, S. Verbeek, M. C. Deruiter, M. H. Breuning, E. de Heer and D. J. Peters (2004). "Lowering of Pkd1 expression is sufficient to cause polycystic kidney disease." Hum Mol Genet **13**(24): 3069-3077.

Lantinga-van Leeuwen, I. S., W. N. Leonhard, A. van der Wal, M. H. Breuning, E. de Heer and D. J. Peters (2007). "Kidney-specific inactivation of the Pkd1 gene induces rapid cyst formation in developing kidneys and a slow onset of disease in adult mice." Hum Mol Genet **16**(24): 3188-3196.

Lee, E. J. (2016). "Cell Proliferation and Apoptosis in ADPKD." Adv Exp Med Biol **933**: 25-34.

Lentine, K. L., H. Xiao, G. Machnicki, A. Gheorghian and M. A. Schnitzler (2010). "Renal function and healthcare costs in patients with polycystic kidney disease." Clin J Am Soc Nephrol **5**(8): 1471-1479.

Li, Y., J. M. Wright, F. Qian, G. G. Germino and W. B. Guggino (2005). "Polycystin 2 interacts with type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptor to modulate intracellular Ca²⁺ signaling." J Biol Chem **280**(50): 41298-41306.

Little, M. H. (2016). Introduction A2 - Little, Melissa H. Kidney Development, Disease, Repair and Regeneration. San Diego, Academic Press: 164-165.

Lohning, C., U. Nowicka and A. M. Frischauf (1997). "The mouse homolog of PKD1: sequence analysis and alternative splicing." Mamm Genome **8**(5): 307-311.

Lu, W., B. Peissel, H. Babakhanlou, A. Pavlova, L. Geng, X. Fan, C. Larson, G. Brent and J. Zhou (1997). "Perinatal lethality with kidney and pancreas defects in mice with a targeted Pkd1 mutation." Nat Genet **17**(2): 179-181.

Lupas, A. (1996). "Coiled coils: new structures and new functions." Trends Biochem Sci **21**(10): 375-382.

Mochizuki, T., G. Wu, T. Hayashi, S. L. Xenophontos, B. Veldhuisen, J. J. Saris, D. M. Reynolds, Y. Cai, P. A. Gabow, A. Pierides, W. J. Kimberling, M. H. Breuning, C. C. Deltas, D. J. Peters and S. Somlo (1996). "PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein." Science **272**(5266): 1339-1342.

Moy, G. W., L. M. Mendoza, J. R. Schulz, W. J. Swanson, C. G. Glabe and V. D. Vacquier (1996). "The sea urchin sperm receptor for egg jelly is a modular protein with extensive homology to the human polycystic kidney disease protein, PKD1." J Cell Biol **133**(4): 809-817.

Mun, H. and J. H. Park (2016). "Inflammation and Fibrosis in ADPKD." Adv Exp Med Biol **933**: 35-44.

Nauli, S. M., F. J. Alenghat, Y. Luo, E. Williams, P. Vassilev, X. Li, A. E. Elia, W. Lu, E. M. Brown, S. J. Quinn, D. E. Ingber and J. Zhou (2003). "Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells." Nat Genet **33**(2): 129-137.

Newby, L. J., A. J. Streets, Y. Zhao, P. C. Harris, C. J. Ward and A. C. Ong (2002). "Identification, characterization, and localization of a novel kidney polycystin-1-polycystin-2 complex." J Biol Chem **277**(23): 20763-20773.

Norman, J. (2011). "Fibrosis and progression of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD)." Biochim Biophys Acta **10**(36): 1.

O'Connor, A. K. and L. M. Guay-Woodford (2016). Chapter 20 - Polycystic Kidney Diseases and Other Hepatorenal Fibrocystic Diseases: Clinical Phenotypes, Molecular Pathobiology, and Variation between Mouse and Man A2 - Little, Melissa H. Kidney Development, Disease, Repair and Regeneration. San Diego, Academic Press: 241-264.

Ong, A. C. and P. C. Harris (2015). "A polycystin-centric view of cyst formation and disease: the polycystins revisited." Kidney Int **88**(4): 699-710.

Ong, A. C., C. J. Ward, R. J. Butler, S. Biddolph, C. Bowker, R. Torra, Y. Pei and P. C. Harris (1999). "Coordinate expression of the autosomal dominant polycystic kidney disease proteins, polycystin-2 and polycystin-1, in normal and cystic tissue." Am J Pathol **154**(6): 1721-1729.

Parnell, S. C., B. S. Magenheimer, R. L. Maser, C. A. Zien, A. M. Frischauf and J. P. Calvet (2002). "Polycystin-1 activation of c-Jun N-terminal kinase and AP-1 is mediated by heterotrimeric G proteins." J Biol Chem **277**(22): 19566-19572.

Pauling, L. and R. B. Corey (1953). "Compound helical configurations of polypeptide chains: structure of proteins of the alpha-keratin type." Nature **171**(4341): 59-61.

Pauling, L., R. B. Corey and H. R. Branson (1951). "The structure of proteins; two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain." Proc Natl Acad Sci U S A **37**(4): 205-211.

Pazour, G. J., J. T. San Agustin, J. A. Follit, J. L. Rosenbaum and G. B. Witman (2002). "Polycystin-2 localizes to kidney cilia and the ciliary level is elevated in orpk mice with polycystic kidney disease." Curr Biol **12**(11): R378-380.

Pei, Y., T. Watnick, N. He, K. Wang, Y. Liang, P. Parfrey, G. Germino and P. St George-Hyslop (1999). "Somatic PKD2 mutations in individual kidney and liver cysts support a "two-hit" model of cystogenesis in type 2 autosomal dominant polycystic kidney disease." J Am Soc Nephrol **10**(7): 1524-1529.

Peral, B., J. L. San Millan, A. C. Ong, V. Gamble, C. J. Ward, C. Strong and P. C. Harris (1996). "Screening the 3' region of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene reveals six novel mutations." Am J Hum Genet **58**(1): 86-96.

Peters, D. J. and L. A. Sandkuijl (1992). "Genetic heterogeneity of polycystic kidney disease in Europe." Contrib Nephrol **97**: 128-139.

Peters, D. J., L. Spruit, J. J. Saris, D. Ravine, L. A. Sandkuijl, R. Fossdal, J. Boersma, R. van Eijk, S. Norby, C. D. Constantinou-Deltas and et al. (1993). "Chromosome 4 localization of a second gene for autosomal dominant polycystic kidney disease." Nat Genet **5**(4): 359-362.

Piontek, K., L. F. Menezes, M. A. Garcia-Gonzalez, D. L. Huso and G. G. Germino (2007). "A critical developmental switch defines the kinetics of kidney cyst formation after loss of Pkd1." Nat Med **13**(12): 1490-1495.

Pirson, Y. (2010). "Extrarenal manifestations of autosomal dominant polycystic kidney disease." Adv Chronic Kidney Dis **17**(2): 173-180.

Pisitkun, T., R. F. Shen and M. A. Knepper (2004). "Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(36): 13368-13373.

Porath, B., V. G. Gainullin, E. Cornec-Le Gall, E. K. Dillinger, C. M. Heyer, K. Hopp, M. E. Edwards, C. D. Madsen, S. R. Mauritz, C. J. Banks, S. Baheti, B. Reddy, J. I. Herrero, J. M. Banales, M. C. Hogan, V. Tasic, T. J. Watnick, A. B. Chapman, C. Vigneau, F. Lavainne, M. P. Audrezet, C. Ferec, Y. Le Meur, V. E. Torres, H. P. o. P. K. D. G. Genkyst Study Group, D. Consortium for Radiologic Imaging Studies of Polycystic Kidney and P. C. Harris (2016). "Mutations in GANAB, Encoding the Glucosidase IIalpha Subunit, Cause Autosomal-Dominant Polycystic Kidney and Liver Disease." Am J Hum Genet **98**(6): 1193-1207.

Pritchard, L., J. A. Sloane-Stanley, J. A. Sharpe, R. Aspinwall, W. Lu, V. Buckle, L. Strmecki, D. Walker, C. J. Ward, C. E. Alpers, J. Zhou, W. G. Wood and P. C. Harris (2000). "A human PKD1 transgene generates functional polycystin-1 in mice and is associated with a cystic phenotype." Hum Mol Genet **9**(18): 2617-2627.

Qian, F., A. Boletta, A. K. Bhunia, H. Xu, L. Liu, A. K. Ahrabi, T. J. Watnick, F. Zhou and G. G. Germino (2002). "Cleavage of polycystin-1 requires the receptor for egg jelly domain and is disrupted by human autosomal-dominant polycystic kidney disease 1-associated mutations." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(26): 16981-16986.

Qian, F., F. J. Germino, Y. Cai, X. Zhang, S. Somlo and G. G. Germino (1997). "PKD1 interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain." Nat Genet **16**(2): 179-183.

Qian, F., T. J. Watnick, L. F. Onuchic and G. G. Germino (1996). "The molecular basis of focal cyst formation in human autosomal dominant polycystic kidney disease type I." Cell **87**(6): 979-987.

Reeders, S. T., M. H. Breuning, K. E. Davies, R. D. Nicholls, A. P. Jarman, D. R. Higgs, P. L. Pearson and D. J. Weatherall (1985). "A highly polymorphic DNA marker linked to adult polycystic kidney disease on chromosome 16." Nature **317**(6037): 542-544.

Reeders, S. T., T. Keith, P. Green, G. G. Germino, N. J. Barton, O. J. Lehmann, V. A. Brown, P. Phipps, J. Morgan, J. C. Bear and et al. (1988). "Regional localization of the autosomal dominant polycystic kidney disease locus." Genomics **3**(2): 150-155.

Rossetti, S., M. Adeva, V. Kubly, M. B. Consugar, V. E. Torres and P. C. Harris (2007). "An Olmsted County population-based study indicates that PKD2 is more common than previously described." J Am Soc Nephrol **18**: 365A.

Rossetti, S., M. B. Consugar, A. B. Chapman, V. E. Torres, L. M. Guay-Woodford, J. J. Grantham, W. M. Bennett, C. M. Meyers, D. L. Walker, K. Bae, Q. J. Zhang, P. A. Thompson, J. P. Miller and P. C. Harris (2007). "Comprehensive molecular diagnostics in autosomal dominant polycystic kidney disease." J Am Soc Nephrol **18**(7): 2143-2160.

Rossetti, S., V. J. Kubly, M. B. Consugar, K. Hopp, S. Roy, S. W. Horsley, D. Chauveau, L. Rees, T. M. Barratt, W. G. van't Hoff, P. Niaudet, V. E. Torres and P. C. Harris (2009). "Incompletely penetrant PKD1 alleles suggest a role for gene dosage in cyst initiation in polycystic kidney disease." Kidney Int **75**(8): 848-855.

Saigusa, T. and P. D. Bell (2015). "Molecular pathways and therapies in autosomal-dominant polycystic kidney disease." Physiology (Bethesda) **30**(3): 195-207.

Schrier, R. W., M. M. Belz, A. M. Johnson, W. D. Kaehny, R. L. Hughes, D. Rubinstein and P. A. Gabow (2004). "Repeat imaging for intracranial aneurysms in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease with initially negative studies: a prospective ten-year follow-up." J Am Soc Nephrol **15**(4): 1023-1028.

Shen, P. S., X. Yang, P. G. DeCaen, X. Liu, D. Bulkley, D. E. Clapham and E. Cao (2016). "The Structure of the Polycystic Kidney Disease Channel PKD2 in Lipid Nanodiscs." Cell **167**(3): 763-773 e711.

Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson and D. C. Klenk (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Anal Biochem **150**(1): 76-85.

Streets, A. J., B. E. Wagner, P. C. Harris, C. J. Ward and A. C. Ong (2009). "Homophilic and heterophilic polycystin 1 interactions regulate E-cadherin recruitment and junction assembly in MDCK cells." J Cell Sci **122**(Pt 9): 1410-1417.

Su, X., M. Wu, G. Yao, W. El-Jouni, C. Luo, A. Tabari and J. Zhou (2015). "Regulation of polycystin-1 ciliary trafficking by motifs at its C-terminus and polycystin-2 but not by cleavage at the GPS site." J Cell Sci **128**(22): 4063-4073.

System, U. S. R. D. (2014). 2014 USRDS annual data report: Epidemiology of kidney disease in the United States. Bethesda, Maryland, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases.

Taal, M. W., G. M. Chertow, P. A. Marsden, K. Skorecki, A. S. L. Yu and B. M. Brenner (2012). Brenner & Rector's the Kidney. Philadelphia, Elsevier/Saunders.

Takakura, A., L. Contrino, A. W. Beck and J. Zhou (2008). "Pkd1 inactivation induced in adulthood produces focal cystic disease." J Am Soc Nephrol **19**(12): 2351-2363.

Talbot, J. J., J. M. Shillingford, S. Vasanth, N. Doerr, S. Mukherjee, M. T. Kinter, T. Watnick and T. Weimbs (2011). "Polycystin-1 regulates STAT activity by a dual mechanism." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(19): 7985-7990.

Tan, Y. C., J. Blumenfeld and H. Rennert (2011). "Autosomal dominant polycystic kidney disease: genetics, mutations and microRNAs." Biochim Biophys Acta **1812**(10): 1202-1212.

Tao, Y., J. Kim, M. Stanley, Z. He, S. Faubel, R. W. Schrier and C. L. Edelstein (2005). "Pathways of caspase-mediated apoptosis in autosomal-dominant polycystic kidney disease (ADPKD)." Kidney Int **67**(3): 909-919.

Thivierge, C., A. Kurbegovic, M. Couillard, R. Guillaume, O. Cote and M. Trudel (2006). "Overexpression of PKD1 causes polycystic kidney disease." Mol Cell Biol **26**(4): 1538-1548.

Thomsen, H. S. and J. H. Thaysen (1988). "Frequency of hepatic cysts in adult polycystic kidney disease." Acta Med Scand **224**(4): 381-384.

Torres, V. E., A. B. Chapman, O. Devuyst, R. T. Gansevoort, J. J. Grantham, E. Higashihara, R. D. Perrone, H. B. Krasa, J. Ouyang and F. S. Czerwiec (2012). "Tolvaptan in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease." N Engl J Med **367**(25): 2407-2418.

Torres, V. E. and P. C. Harris (2006). "Mechanisms of Disease: autosomal dominant and recessive polycystic kidney diseases." Nat Clin Pract Nephrol **2**(1): 40-55; .

Torres, V. E. and P. C. Harris (2009). "Autosomal dominant polycystic kidney disease: the last 3 years." Kidney Int **76**(2): 149-168.

Torres, V. E., P. C. Harris and Y. Pirson (2007). "Autosomal dominant polycystic kidney disease." Lancet **369**(9569): 1287-1301.

Trudel, M., Q. Yao and F. Qian (2016). "The Role of G-Protein-Coupled Receptor Proteolysis Site Cleavage of Polycystin-1 in Renal Physiology and Polycystic Kidney Disease." Cells **5**(1).

Tsiokas, L., E. Kim, T. Arnould, V. P. Sukhatme and G. Walz (1997). "Homo- and heterodimeric interactions between the gene products of PKD1 and PKD2." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(13): 6965-6970.

Vagin, O., J. A. Kraut and G. Sachs (2009). "Role of N-glycosylation in trafficking of apical membrane proteins in epithelia." Am J Physiol Renal Physiol **296**(3): F459-469.

Vlak, M. H., A. Algra, R. Brandenburg and G. J. Rinkel (2011). "Prevalence of unruptured intracranial aneurysms, with emphasis on sex, age, comorbidity, country, and time period: a systematic review and meta-analysis." Lancet Neurol **10**(7): 626-636.

Ward, C. J., H. Turley, A. C. Ong, M. Comley, S. Biddolph, R. Chetty, P. J. Ratcliffe, K. Gattner and P. C. Harris (1996). "Polycystin, the polycystic kidney disease 1 protein, is expressed by epithelial cells in fetal, adult, and polycystic kidney." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(4): 1524-1528.

Ward, H. H., U. Brown-Glaberman, J. Wang, Y. Morita, S. L. Alper, E. J. Bedrick, V. H. Gattone, 2nd, D. Deretic and A. Wandinger-Ness (2011). "A conserved signal and GTPase complex are required for the ciliary transport of polycystin-1." Mol Biol Cell **22**(18): 3289-3305.

Watnick, T. J., V. E. Torres, M. A. Gandolph, F. Qian, L. F. Onuchic, K. W. Klinger, G. Landes and G. G. Germino (1998). "Somatic mutation in individual liver cysts supports a two-hit model of cystogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease." Mol Cell **2**(2): 247-251.

Wei, W., K. Hackmann, H. Xu, G. Germino and F. Qian (2007). "Characterization of cis-autoproteolysis of polycystin-1, the product of human polycystic kidney disease 1 gene." J Biol Chem **282**(30): 21729-21737.

Wilkes, M., M. G. Madej, L. Kreuter, D. Rhinow, V. Heinz, S. De Sanctis, S. Ruppel, R. M. Richter, F. Joos, M. Grieben, A. C. Pike, J. T. Huisken, E. P. Carpenter, W. Kuhlbrandt, R. Witzgall and C. Ziegler (2017). "Molecular insights into lipid-assisted Ca(2+) regulation of the TRP channel Polycystin-2." Nat Struct Mol Biol **24**(2): 123-130.

Wojcik, P. and L. Berlicki (2016). "Peptide-based inhibitors of protein-protein interactions." Bioorg Med Chem Lett **26**(3): 707-713.

Woo, D. (1995). "Apoptosis and loss of renal tissue in polycystic kidney diseases." N Engl J Med **333**(1): 18-25.

Wu, G., V. D'Agati, Y. Cai, G. Markowitz, J. H. Park, D. M. Reynolds, Y. Maeda, T. C. Le, H. Hou, Jr., R. Kucherlapati, W. Edelmann and S. Somlo (1998). "Somatic inactivation of Pkd2 results in polycystic kidney disease." Cell **93**(2): 177-188.

Wu, G., G. S. Markowitz, L. Li, V. D. D'Agati, S. M. Factor, L. Geng, S. Tibara, J. Tuchman, Y. Cai, J. H. Park, J. van Adelsberg, H. Hou, Jr., R. Kucherlapati, W. Edelmann and S. Somlo (2000). "Cardiac defects and renal failure in mice with targeted mutations in Pkd2." Nat Genet **24**(1): 75-78.

Xiao, Z., S. Zhang, B. S. Magenheimer, J. Luo and L. D. Quarles (2008). "Polycystin-1 regulates skeletogenesis through stimulation of the osteoblast-specific transcription factor RUNX2-II." J Biol Chem **283**(18): 12624-12634.

Xu, C., S. Rossetti, L. Jiang, P. C. Harris, U. Brown-Glaberman, A. Wandinger-Ness, R. Bacallao and S. L. Alper (2007). "Human ADPKD primary cyst epithelial cells with a novel, single codon deletion in the PKD1 gene exhibit defective ciliary polycystin localization and loss of flow-induced Ca²⁺ signaling." Am J Physiol Renal Physiol **292**(3): F930-945.

Xu, G. M., S. Gonzalez-Perrett, M. Essafi, G. A. Timpanaro, N. Montalbetti, M. A. Arnaout and H. F. Cantiello (2003). "Polycystin-1 activates and stabilizes the polycystin-2 channel." J Biol Chem **278**(3): 1457-1462.

Xu, G. M., T. Sikaneta, B. M. Sullivan, Q. Zhang, M. Andreucci, T. Stehle, I. Drummond and M. A. Arnaout (2001). "Polycystin-1 interacts with intermediate filaments." J Biol Chem **276**(49): 46544-46552.

Xu, H. W., S. Q. Yu, C. L. Mei and M. H. Li (2011). "Screening for intracranial aneurysm in 355 patients with autosomal-dominant polycystic kidney disease." Stroke **42**(1): 204-206.

Yamaguchi, T., S. Nagao, D. P. Wallace, F. A. Belibi, B. D. Cowley, J. C. Pelling and J. J. Grantham (2003). "Cyclic AMP activates B-Raf and ERK in cyst epithelial cells from autosomal-dominant polycystic kidneys." Kidney Int **63**(6): 1983-1994.

Yamaguchi, T., D. P. Wallace, B. S. Magenheimer, S. J. Hempson, J. J. Grantham and J. P. Calvet (2004). "Calcium restriction allows cAMP activation of the B-Raf/ERK pathway, switching cells to a cAMP-dependent growth-stimulated phenotype." J Biol Chem **279**(39): 40419-40430.

Yao, G., X. Su, V. Nguyen, K. Roberts, X. Li, A. Takakura, M. Plomann and J. Zhou (2014). "Polycystin-1 regulates actin cytoskeleton organization and directional cell migration through a novel PC1-Pacsin 2-N-Wasp complex." Hum Mol Genet **23**(10): 2769-2779.

Yoder, B. K., X. Hou and L. M. Guay-Woodford (2002). "The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia." J Am Soc Nephrol **13**(10): 2508-2516.

Yu, S., K. Hackmann, J. Gao, X. He, K. Piontek, M. A. Garcia-Gonzalez, L. F. Menezes, H. Xu, G. G. Germino, J. Zuo and F. Qian (2007). "Essential role of cleavage of Polycystin-1 at G protein-coupled receptor proteolytic site for kidney tubular structure." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(47): 18688-18693.

Yu, Y., M. H. Ulbrich, M. H. Li, Z. Buraei, X. Z. Chen, A. C. Ong, L. Tong, E. Y. Isacoff and J. Yang (2009). "Structural and molecular basis of the assembly of the TRPP2/PKD1 complex." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(28): 11558-11563.

Zatti, A., V. Chauvet, V. Rajendran, T. Kimura, P. Pagel and M. J. Caplan (2005). "The C-Terminal Tail of the Polycystin-1 Protein Interacts with the Na,K-ATPase α -Subunit." Mol Biol Cell **16**(11): 5087-5093.

Annexe I

Ci-dessous, les permissions pour les figures ou tableau qui n'étaient pas libres de droit :

Figure 1.1 Structures anatomiques du rein :

Permission obtenue par courriel le 20.11.17 par Akshaya G R Copyrights Coordinator, GR – Copyrights ELSEVIER | Global Book Production +91 44 4299 4930 office sous conditions d'utilisations spécifiques: “This article was published in Brenner and Rector’s The Kidney, Vol 1, Maarten W. Taal; Glenn M. Chertow; Philip A. Marsden; Karl Skorecki; Alan S. L. Yu; Barry M. Brenner, Diagram of the cut surface of a bisected kidney, depicting important anatomy, Page 32, Copyright Elsevier (2012).”

Figure 1.2 Mécanismes impliqués dans la fonction rénale :

Permission obtenue par document le 23.11.17 par Laura Connolly, DocuSign Envelope ID: D158E19D-D6FC-4B42-9B89-A545CA16DED3. Licensee Work : Jennifer Lake. McGraw-Hill Global Education Holdings, LLC, Attn: Permissions Department, Wells Fargo Bank, Lockbox #6167, PO Box 8500, Philadelphia, Pa. 19178-6167.

Figure 1.4 Reins polykystiques en phase terminale de la maladie :

Permission obtenue par document le 24.10.17 par RightsLink pour nature publishing group. Numéro de Licence : 4215591127539.

Figure 1.5 Le gène *PKD1* et son transcrit et Figure 1.6 Le gène *PKD2* et son transcrit :

Permission obtenue par document le 12.11.17 par RightsLink pour Elsevier. Numéro de Licence : 4226510931399.

Figure 1.7 Structures et domaines protéiques de la polycystine-1 et de la polycystine-2 :

Permission obtenue par document le 12.11.17 par RightsLink pour Elsevier. Numéro de Licence : 4226511419103.

Figure 1.10 Structure et modèle de dimérisation de la polycystine-2 :

Permission obtenue par document le 12.11.17 par RightsLink pour nature publishing group. Numéro de Licence : 4226520971801.

Tableau 1.2. Variants des gènes *PKD1* et *PKD2* selon le type de mutation et la signification clinique : Permission obtenue par document le 12.11.17 par RightsLink pour Elsevier. Numéro de Licence : 4226511195346.