

Université de Montréal

**Étude de la polycystine-1 délété de son motif coiled-coil sur les
mécanismes intracellulaires *in vivo***

Par
Marie-Lorna Paul

Département de Biochimie et Médecine Moléculaire, Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
Biochimie, option Génétique moléculaire et développement

30 Avril 2021

© Marie-Lorna Paul, 2021

Université de Montréal

Unité académique : Biochimie et Médecine Moléculaire, Institut de recherches cliniques à
Montréal, Faculté de Médecine, Université de Montréal

Ce mémoire intitulé

**Étude de la polycystine-1 délété de son motif coiled-coil sur les mécanismes intracellulaires
*in vivo***

Présenté par
Marie-Lorna Paul

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

Luis A Rokeach
Président-rapporteur

Marie Trudel
Directrice de recherche

Mathieu Ferron
Membre du jury

Résumé

La polykystose rénale autosomique dominante (PKRAD) est une maladie génétique rénale qui se manifeste par le développement de kystes au rein. Elle résulte de mutations dans le gène *PKD1*/polycystine-1 (PC-1), contenant un motif coiled-coil et dans le gène *PKD2*/PC-2 dont les fonctions restent à élucider. À partir d'un chromosome artificiel bactérien, le gène *Pkd1* murin (BAC-*Pkd1*) a été modifié afin de générer 4 lignées de souris transgéniques délété du motif coiled-coil *Pkd1*_{Δcoiled-coil} et 3 lignées contrôles *Pkd1*_{TAG} possédant 1-35 copies du transgène. Ces 2 transgènes ont un profil d'expression identique à l'endogène et le niveau dépend du nombre de copies. Alors que les souris *Pkd1*_{TAG} développent la PKRAD de sévérité proportionnelle au niveau d'expression, les lignées *Pkd1*_{Δcoiled-coil} en sont épargnées. Ces résultats démontrent l'importance du motif coiled-coil dans la maladie. Les souris *Pkd1*_{Δcoiled-coil} croisées par *Pkd1*^{-/-} (létale à la naissance), *Pkd1*^{-/-} ; *Pkd1*_{Δcoiled-coil} survivent après la naissance et permettent d'analyser *in vivo* les interactions, la signalisation et le rôle physiologique du motif coiled-coil. Ces souris *Pkd1*^{-/-} ; *Pkd1*_{Δcoiled-coil} avec une copie du transgène présentent des kystes rénaux et meurent ~2 semaines alors que celles à hautes copies n'ont aucun phénotype comme les *Pkd1*_{TAG}. Les résultats génétiques et biochimiques démontrent que *Pc-1*_{Δcoiled-coil} est hypomorphe. Bien que *Pc-1*_{Δcoiled-coil} subit son clivage autoprotéolytique, l'analyse du transport intracellulaire de *Pc1*_{Δcoiled-coil} montre un délai de maturation. Alors qu'*in vitro* le trafic *Pc-1*/*Pc-2* dépend du motif coiled-coil pour leur interaction, *in vivo* une interaction *Pc-1*_{Δcoiled-coil}/*Pc-2* est détectée, suggérant un site d'interaction distinct. Nos études *in vivo* démontrent que le motif coiled-coil de *Pc-1* joue un rôle clé dans sa maturation et l'existence d'un nouveau partenaire de *Pc-1* pour son transport intracellulaire.

Mots-clés : PKRAD, polycystine-1, polycystine-2, coiled-coil, souris transgénique, transport intracellulaire, maturation, interaction

Abstract

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is the most prevalent genetic disorder that is characterized by the formation of bilateral renal cysts and leads to kidney failure. It results from mutations in the *PKD1*/polycystin-1(PC-1) gene, containing a coiled-coil motif, and in the *PKD2*/PC-2 gene, the functions of which remain to be elucidated. From a bacterial artificial chromosome, the murine *Pkd1* gene (Pkd1-BAC) was modified in order to obtain 4 transgenic mouse lines deleted from its coiled-coil motif (Pkd1 Δ coiled-coil) and 3 Pkd1_{TAG} control lines possessing 1-35 copies of the transgene. These two transgenes have an expression profile identical to the endogenous gene and their expression depends on the number of copies. While Pkd1_{TAG} mice develop ADPKD with a severity proportional to the level of expression, the Pkd1 Δ coiled-coil lines are spared. These results demonstrate the importance of the coiled-coil motif in the disease. Pkd1 Δ coiled-coil mice crossed by Pkd1^{-/-} (lethal by birth), Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil survive after birth and allow the interactions, signaling and physiological role of the coiled-coil motif to be analyzed *in vivo*. These Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil mice with one copy of the transgene show kidney cysts and die ~ 2-weeks while high-copy ones have no phenotype as opposed to Pkd1^{-/-}; Pkd1_{TAG} who eventually develop cyst after 1 year. The genetic and biochemical results demonstrate that Pc-1 Δ coiled-coil is hypomorphic. Although Pc-1 Δ coiled-coil undergoes its autoproteolytic cleavage, analysis of the intracellular transport of Pc-1 Δ coiled-coil shows a delay in maturation. While Pc-1 and Pc-2 appear to interact *in vitro* through their coiled-coil motif and co-transport, a Pc-1 Δ coiled-coil -Pc-2 interaction is conserved in the kidney, suggesting a distinct mechanism of interactions *in vivo*. Thus, our results show that the coiled-coil motif of Pc-1 *in vivo* is involved in the maturation independently of Pc-2, highlighting the existence of a critical partner in intracellular transport.

Keywords: ADPKD, polycystin-1, polycystin-2, coiled-coil, transgenic mice, maturation, trafficking, interaction

Table des matières

Résumé.....	V
Abstract.....	VI
Table des matières.....	VII
Liste des tableaux.....	XI
Liste des figures.....	XII
Liste des sigles et abréviations.....	XIII
Remerciement.....	XVII
1. Introduction.....	1
1.1 Anatomie et physiologie du rein chez les mammifères.....	1
1.1.1 Reins des mammifères.....	1
1.1.2 Le développement du rein fonctionnel chez les mammifères.....	2
1.1.3 Structure et Anatomie du rein.....	3
1.1.4 Fonctions physiologiques rénales.....	4
1.2 Les Néphropathies.....	5
1.2.1 La polykystose rénale autosomique récessive.....	5
1.3 La polykystose rénale autosomique dominante chez l'humain (PKRAD).....	6
1.3.1 Manifestations rénales de la PKRAD.....	6
1.3.2 Manifestations extrarénales de la PKRAD.....	7
1.3.3 Les essais cliniques et thérapies.....	8
1.3.4 La génétique moléculaire de la PKRAD.....	9
1.3.5 Expression tissulaire des gènes et protéines PKD1/PC-1 et PKD2/PC-2.....	13
1.3.6 Expression et localisations cellulaires des polycystines.....	16
1.4 Les polycystines.....	17
1.4.1 Structure protéique la polycystine-1.....	17
1.4.2 Le motif coiled-coil.....	22

1.4.3 Les modifications post-traductionnels de la polycystine-1	25
1.4.4 Les partenaires d'interactions intracellulaires de la polycystine-1	28
1.4.5 Structure protéique de la polycystine-2	30
1.4.6 Rôle et fonctions du complexe PC-1/PC-2	31
1.4.7 Mécanisme de transport et de maturation des polycystines	32
1.5 Modèle de souris PKRAD.....	34
1.5.1 Les modèles murins non orthologues	34
1.5.2 Les modèles orthologues Pkd1	35
1.6 Les voies de signalisations impliquées dans la PKRAD.....	38
1.7 Les mécanismes cellulaires dans la PKRAD.....	39
1.7.1 La prolifération	39
1.7.2 L'apoptose.....	39
1.7.3 L'inflammation	40
1.7.4 La fibrose	40
1.7.5 L'autophagie	41
1.8 Les mécanismes pathogénétiques de la PKRAD	41
1.8.1 Le mécanisme du two-hit.....	41
1.8.2 Le mécanisme de dosage fonctionnel	42
1.8.3 Les facteurs non génétiques	42
2. Mon Projet de Recherche.....	44
2.1 Mise en situation	44
2.1.1 Données préliminaires	44
2.2 Objectifs	47
2.3 Approche expérimentale	47
3. Matériel et Méthode.....	48
3.1 Production de souris transgéniques.....	48
3.2 Production de souris mutantes knock-out (Pkd1 ^{-/-}); Absence totale de Pc-1.....	49
3.3 Production de souris transgéniques sur un fond génétique nul	49

3.4 Production de souris mutantes knock-in Pkd1 ^V : Absence de clivage au site GPS de Pc-1	49
3.5 Les lignées contrôlent.....	50
3.6 Génotypage des souris.....	50
3.6.1 Extraction d'ADN.....	50
3.6.2 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et analyse Taqman.....	50
3.6.3 Buvarbage de southern (Southern blot).....	51
3.7 Production de cellules embryonnaires primaire de fibroblaste de souris (MEFs).....	52
3.8 Extraction et quantification des protéines.....	53
3.9 Immunobuvarbage de type Western.....	53
3.9.1 Gels de polyacrylamide.....	53
3.9.2 Immunobuvarbage (Préparation d'échantillons, migration et transfert).....	54
3.10 Déglycosylation de la Polycystine-1.....	55
3.11 Immunoprécipitation et co-immunoprécipitation de la polycystine-2: Analyse de l'interaction Pc-1/Pc-2.....	56
3.12 Immunoprécipitation et co-immunoprécipitation de la polycystine-1: Analyse du clivage GPS de la polycystine-1.....	56
3.13 Purification d'exosomes à partir des MEFs.....	57
3.14 Analyses statistiques.....	58
4. Résultats.....	59
4.1 Expression rénale de la polycystine-1 chez les souris Pkd1 ^{-/-} ; Pkd1 _{Δcoiled-coil}	59
4.2 Le clivage au site GPS ne participe pas au défaut de maturation de PC1 _{Δcoiled-coil}	60
4.3 Implication du motif coiled-coil de la polycystine-1 dans la maturation et le trafic intracellulaire.....	62
4.4 L'expression rénale de la polycystine-2 est modulée chez les souris Pkd1 ^{-/-} ; Pkd1 _{Δcoiled-coil}	65
4.5 L'interaction in vivo entre Pc-1/Pc-2 est indépendante du motif coiled-coil de la polycystine-1.....	66

4.6 Analyse de la signalisation des protéines mal repliées chez les souris Pkd1 ^{-/-} ; Pkd1 _{Δcoiled-coil}	68
4.6.1 Étude de l'autophagie	68
4.6.2 Étude du ER Stress	71
4.7 Étude préliminaire sur le repliement de la polycystine-1 chez les souris Pkd1 ^{-/-} ; Pkd1 _{Δcoiled-coil}	72
5. Discussion	75
6. Conclusion	86
Bibliographie	XVII
Annexe	XXXIX

Liste des tableaux

Tableau 1.1	Liste des gènes pouvant être impliqués à la fois dans la PKRAD et la PKHAD.	12
Tableau 1.2	Liste des gènes rares pouvant mener à la PKRAD	13
Tableau 1.3	Liste de mutations pathogéniques dans le motif coiled-coil causant la PKRAD	24
Tableau 1.4	Partenaires protéiques interagissant le motif coiled-coil de PC-1	29
Tableau 1.5	Partenaires protéiques interagissant avec le domaine intracellulaire de PC-1	30
Tableau 3.1	Liste détaillée des anticorps primaires	55
Tableau 3.2	Liste détaillée des anticorps secondaires	55

Liste des figures

Figure 1.1 Structure anatomique interne du rein	1
Figure 1.2 Structure anatomique du néphron.....	4
Figure 1.3 Rein kystique provenant d'un patient atteint de la PKRAD.....	7
Figure 1.4 Représentation schématique de de la polycystine-1	20
Figure 1.5 Représentation du domaine cytoplasmique intracellulaire de la polycystine-1	22
Figure 1.6 Représentation schématique de la polycystine-2.....	31
Figure 1.7 Résumé de la maturation et du transport intracellulaire de PC-1/PC-2.....	33
Figure 2.1 Analyse préliminaire des souris mutantes $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$	45
Figure 2.2 Analyse préliminaire des souris mutantes $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$	46
Figure 3.1 Représentation schématique de la construction d'ADN du BAC- $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ par recombinaison homologue.	48
Figure 4.1 Expression rénale de la polycystine-1 chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$	60
Figure 4.2 Analyse du clivage au site GPS chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$	62
Figure 4.3.1 Représentation schématique du patron de déglycosylation.....	63
Figure 4.3.2 Analyse des niveaux de glycosylations de $Pc-1_{\Delta Coiled-coil}$ rénale.....	65
Figure 4.4 Expression rénale de la polycystine-2 chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$	66
Figure 4.5 Analyse de l'interaction entre $Pc-1_{\Delta coiled-coil}$ et $Pc-2$	67
Figure 4.6.1.1 Expression rénale de SQSTM1/p62 chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$	69
Figure 4.6.1.2 Expression rénale de LC3 chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$	70
Figure 4.6.2 Analyse du <i>ER stress</i> chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$	72
Figure 4.7.1 Test de sensibilité à la température chez les mutants $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$	73
Figure 4.7.2 Analyse de la sécrétion de $PC-1_{\Delta coiled-coil}$ dans les exosomes à partir de MEFs	74
Figure 5.1 Transport et maturation de la polycystine-1 chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$	84

Liste des sigles et abréviations

μCi : microcurie

μg : microgramme

μM : micro molaire

ADN : acides désoxyribonucléiques

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

ARNm : adénosine ribonucléotide messenger

AVP : vasopressine

BAC : chromosome bactérien artificiel

CFTR : récepteur de la vasopressine

cm, mm : centimètre, millimètre

CMV : corps multi vésiculaire

CTF : fragment C terminal

CTL : lectine de type C

Endo H: endoglycosidase H

EPO: érythropoïétine

FPC: fibrocystine

g, ng : gramme, nano gramme

GBD : site d'activation aux protéines G

GEF : facteurs d'échanges du nucléotide guanine

GPCR : récepteur couplé aux protéines G

GPS : site de clivage couplé aux protéines G

IB : immunobuvardage

IP : immunoprécipitation

IP3R : récepteur de l'inositol triphosphate

kDa: kilo Dalton

L, ml : litre, millilitre

LDL-A : lipoprotéine A à faible densité

LRR : répétition riche en leucine

mM : milimolaire

mTOR : cible de la rapamycine
MEF : fibroblaste embryonnaire de souris
MTS : séquence de ciblage aux mitochondries
NLS : séquence de localisation nucléaire
NTF : fragment N terminal
ND : non digéré
P : post-natal
PC-1 : polycystine-1 (humain)
Pc-1 : polycystine-1 (souris)
PC-2 : polycystine-2 (humain)
Pc-2 : polycystine-2 (souris)
PCR : réaction de polymérisation en chaîne
PKD : polykystose rénale autosomique dominante/polycystic kidney disease
PKD1: polycystic kidney disease 1 (humain)
Pkd1: polycystic kidney disease 1 (souris)
PKD2: polycystic kidney disease 2 (humain)
Pkd2: polycystic kidney disease 2 (souris)
PKHAD : polykystose hépatique autosomique dominante
PKRAD : polykystose rénale autosomique dominante
PKRAR : polykystose rénale autosomique récessive
PLAT : *Polycystin-1, Lipoxygenase, α -toxin*
PNGase F: peptide N- glycosidase F
PTM : modification post-traductionnel
RE : réticulum endoplasmique
REJ : récepteur pour *egg jelly*
RPM : rotation par minute
SH3 : site de liaison d'homologie src 3
Src: tyrosine protéine kinase
TM : transmembranaire
TNG : *trans golgi network*
TRP : potentiel de récepteur transitoire

TUN : tunicamycine

UPR : réponse des protéines mal repliées (unfolded protein response)

VxP : séquence de ciblage ciliaire

À tous ceux qui, comme moi, veulent rendre l'impossible possible.

« Chaque grand rêve commence par un rêveur. Rappelez-vous toujours, vous avez en vous la force, la patience et la passion pour atteindre les étoiles changer le monde. »

Harriet Tubman

Remerciement

Tout d'abord, je voudrais prendre le temps de remercier ma directrice de recherche Dr. Marie Trudel. Merci de m'avoir accueilli si chaleureusement dans votre laboratoire. Merci pour votre pédagogie, votre encadrement, votre dévouement et pour tous vos enseignements qui m'ont permis d'acquérir de nouvelles connaissances. Je voudrais aussi vous remercier pour toutes les opportunités où j'ai eu pu participer à plusieurs congrès et symposium. Grâce à ces opportunités, vous m'avez permis d'évoluer et d'acquérir de l'expérience.

J'aimerais aussi remercier tous les membres du laboratoire ainsi que mes collègues de l'IRCM pour toutes les fois où vous m'avez apporté du soutien et de l'aide notamment, Monica et Almira. Merci pour vos conseils, votre support et pour les multiples discussions.

Finalement, je voudrais remercier toute ma famille et mes amis pour votre support et les multiples encouragements reçus de votre part.

1. Introduction

1.1 Anatomie et physiologie du rein chez les mammifères

1.1.1 Reins des mammifères

Chez l'être humain, un rein (figure 1.1) pèse environ 150 g, mesure : 12 cm de longueur, 6 cm de largeur et 3 cm d'épaisseur. Les deux reins sont situés en position rétropéritonéale dans la région lombaire, c'est-à-dire entre la paroi dorsale et le péritoine pariétal. Positionné sur la face médiale concave du rein se trouve le hile rénal soit une région permettant l'entrée des uretères, des nerfs et des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Tous les jours, les reins filtrent environ 200 L de plasma et excrètent dans l'urine les déchets métaboliques (ex. : urées, ions en excès) ainsi que les toxines en provenance du foie (Elaine N. Marieb, 2005).

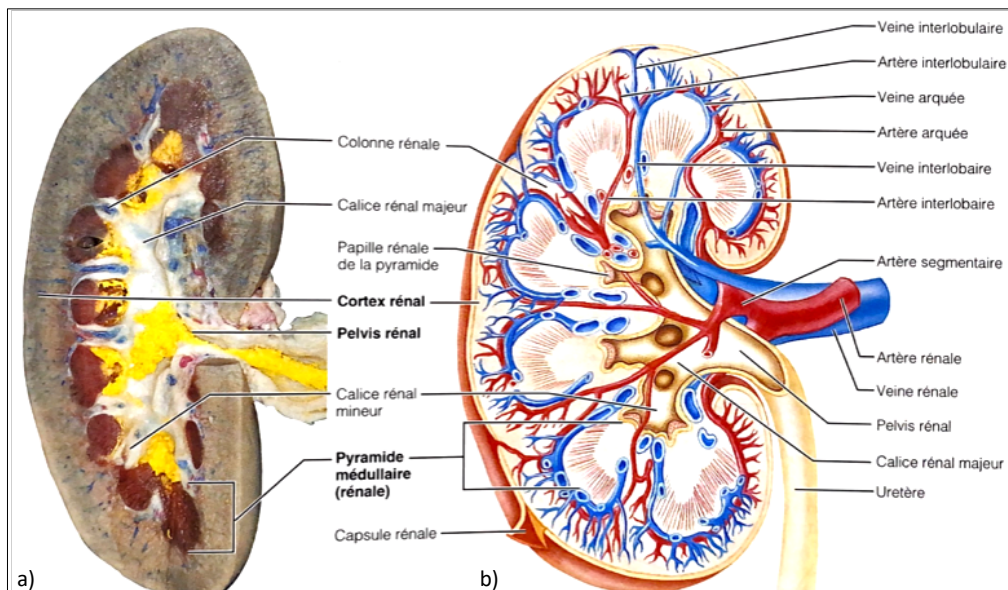


Figure 1.1 Structure anatomique interne du rein

A) Illustration interne d'une coupe frontale d'un rein où trois colorants ont été injectés. Du latex rouge pour les artères, du latex bleu pour les veines et du latex jaune pour le pelvis et les uretères. B) Représentation schématique d'une coupe frontale rénale. Figure provenant du livre : Anatomie et physiologie humaines (Elaine N. Marieb, 2005).

Autorisation de numérisation obtenue.

1.1.2 Le développement du rein fonctionnel chez les mammifères

Une fois la gastrulation (correspond à la deuxième phase du développement embryonnaire) terminée, les reins vont se développer à partir du mésoderme intermédiaire, le long de l'axe antéro-postérieur de l'embryon. La formation du rein durant l'embryogenèse découle de trois étapes importantes soit : le pronéphros, mésonéphros (rein primitif) et métanéphros (rein définitif) (Dressler, 2006). Dans un premier temps, le mésoderme va croître jusqu'à la formation du canal pronéphrogénique. Ce tube épithélial (bilatéral) va s'étendre jusqu'à ce qu'il ait atteint une structure nommée le cloaque. Du canal pronéphrogénique dériveront plusieurs tubules des cellules mésenchymateuses qui sont adjacentes au canal. Le tubule le plus antérieur formé par le canal est le pronéphros. Comme le pronéphros n'est pas fonctionnel, celui-ci est rapidement remplacé par le canal mésonéphrique aussi appelé le canal de Wolff. La région rostrale de ce canal se différenciera pour produire le système reproducteur chez les mâles (épididyme et canaux séminifères) tandis que chez les femelles cette région sera dégénérée. La région caudale quant à elle donnera naissance au mésonéphros (rein primitif). Une fois que la région caudale du mésonéphros atteint sa grandeur maximale, celui-ci va se mettre à régresser et induire à son tour la formation d'un bourgeon urétérique. Le bourgeon urétérique va se ramifier dans le mésenchyme métanéphrique et induire les cellules mésenchymateuses à se condenser autour de la tête du bourgeon. Peu après la formation d'agrégat autour de la tête du bourgeon urétérique, le mésenchyme va subir un changement et se transformer en une vésicule ou une sphère de cellule épithéliale. À leur tour, les cellules épithéliales vont former une invagination au pôle inférieur de la vésicule générant une structure en forme de virgule et changeront d'apparence formant ainsi un corps en forme de S. Ensuite, des cellules endothéliales envahiront l'intérieur du corps en forme de S. Ces cellules donnent éventuellement naissance au capillaire glomérulaire qui ultérieurement mènera à la maturation du glomérule. Cette interaction entre la tête du bourgeon urétérique et le mésenchyme va engendrer une série d'interaction inductive réciproque qui a lieu environ 15 fois afin permettre la formation d'environ 65 000 conduits collecteurs (Al-Awqati & Goldberg, 1998). En effet, le bourgeon urétérique va engendrer la différenciation du mésenchyme métanéphrique alors que le mésenchyme métanéphrique va engendrer la croissance du bourgeon urétérique ainsi que sa ramification (division de branche). Finalement, chaque interaction entre le bourgeon urétérique et le

mésenchyme métanéphrique va donner naissance à un néphron qui à son tour se segmente en tubule distaux, proximaux et collecteur.

1.1.3 Structure et Anatomie du rein

Les néphrons (figure 1.2) sont les unités structurales et fonctionnelles des reins. En effet, un rein en contient plus d'un million et c'est à travers ces unités que le sang est filtré. Chaque néphron est constitué de deux éléments principaux soit un tubule rénal et un corpuscule rénal. Le corpuscule rénal est une vésicule contenant le glomérule soit un bouquet de capillaires artériels entouré d'une capsule glomérulaire rénale aussi appelé capsule de Bowman. Les capillaires du glomérule étant extrêmement poreux permettent le passage d'un liquide appelé le filtrat glomérulaire soit la matière première permettant aux tubules de produire l'urine à partir du sang. La capsule de Bowman est constituée de deux feuillettes, soit le feuillet pariétal ayant un rôle structural et le feuillet viscéral. Le feuillet viscéral est formé de podocytes soit des cellules épithéliales modifiées comportant des ramifications appelées les pédicelles. Ces cellules font partie de la membrane de filtration laissant passer l'eau ainsi que les petites molécules. Une fois le sang filtré par le glomérule, le filtrat glomérulaire formé est acheminé vers les tubules rénaux soit le tubule contourné proximal, passant ensuite vers l'anse du néphron, puis vers le tubule contourné distal et le tubule collecteur.

Le **tubule contourné proximal** est le site majeur de réabsorption pour l'eau ainsi que les solutés selon une proportion 1 : 1, ceci représente 2/3 du filtrat glomérulaire. Ce tubule étant le plus actif, il joue un rôle dans la réabsorption des ions de Na^+ , des cations et des nutriments (glucose, le lactate, acide aminé et vitamine) selon un mécanisme de transport actif et passif.

L'anse du néphron aussi appelé **anse de Henlé** permet de connecter les tubules contournés proximaux et les tubules contournés distaux. L'anse du néphron est aussi un site de réabsorption, mais la réabsorption de l'eau dans ce segment n'est pas couplée à la réabsorption des solutés. Soit la partie descendante du néphron est perméable à l'eau tandis que la partie ascendante permet une plus grande réabsorption des électrolytes.

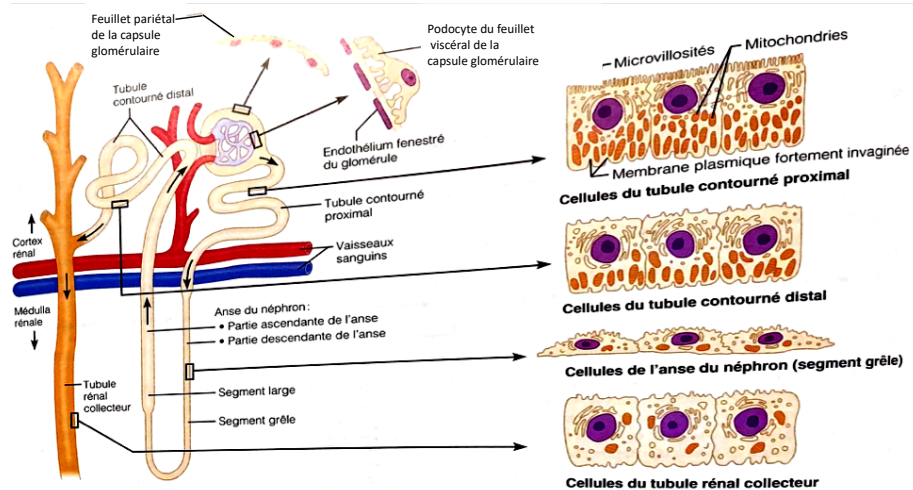


Figure 1.2 Structure anatomique du néphron

Représentation schématique d'un néphron avec les diverses caractéristiques structurales des cellules épithéliales. Figure provenant du livre : Anatomie et physiologie humaines (Elaine N. Marieb, 2005). Autorisation de numérisation obtenue.

Une fois le liquide atteint le **tubule contourné distal**, le fluide à l'intérieur du tubule devient isotonique au plasma et le tubule distal est imperméable à l'eau. Soit, 90 % des solutés et de l'eau retourne dans la circulation sanguine et les substances qui n'ont pas été réabsorbées seront excrétées dans les urines. Finalement, le **tubule collecteur** est le site majeur où la balance de l'eau est régulée tout dépendamment du statut hydrique de l'organisme. Celui-ci reçoit le filtrat qui provient des nombreux néphrons. Ce segment permet aussi l'ajustement de la concentration de sodium/potassium ainsi que du pH afin de maintenir un équilibre homéostatique. Les besoins de réabsorption dans le tubule contourné distal et le tubule collecteur sont principalement liés au besoin de l'organisme et sont régulés par des hormones, des canaux, des co-transporteurs, des protéines etc.

1.1.4 Fonctions physiologiques rénales

La principale fonction du rein est d'assurer l'excrétion des déchets et des corps étrangers via la formation de l'urine. Le rein a aussi pour but d'assurer le maintien de l'homéostasie des milieux extracellulaires de tout l'organisme. L'homéostasie est maintenue par la filtration du sang, la réabsorption de l'eau et des solutés ainsi que par la sécrétion de déchets provenant du sang. De plus, le rein a aussi une fonction endocrine. En effet, plusieurs substances ayant une activité biologique sont synthétisées à partir du rein et ont un effet paracrine sur celui-ci. Par exemple, le

calcitriol qui est la forme active de la vitamine D, elle est synthétisée à l'intérieur des cellules tubulaires proximales. Elle va permettre l'absorption digestive et rénale du calcium ainsi que l'absorption intestinale du phosphate. De plus, le rein synthétise l'érythropoïétine (EPO) via les cellules interstitielles péritubulaires fibroblastiques en réponse à la pression partielle d'oxygène. Ensuite, l'EPO va stimuler la production de globules rouges via la moelle osseuse en réponse aux variations de la pression artérielle en oxygène. Finalement, en réponse aux variations de la volémie le rein va sécréter la rénine via l'appareil juxta glomérulaire. La rénine permet la protéolyse de l'angiotensinogène qui à son tour va permettre la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II. L'angiotensine II va stimuler la sécrétion corticosurrénalienne de l'aldostérone qui favorise la rétention de sodium et la sécrétion de K^+ et H^+ . Ainsi une baisse de pression artérielle stimule la sécrétion de la rénine.

1.2 Les Néphropathies

La néphropathie est un terme général médical qui est utilisé afin qualifier l'ensemble des maladies rénales. Il y a cinq types de néphropathies classifiées selon leurs affections rénales. Soit, les néphropathies glomérulaires, les néphropathies tubulaires aiguës, les néphropathies interstitielles aiguës, les néphropathies tubulées interstitielles chroniques et les néphropathies vasculaires. Il existe aussi des néphropathies congénitales c'est-à-dire d'ordre héréditaire tel que la polykystose rénale autosomique récessive et dominante, le syndrome d'Alport, la cystinose, la néphronophtise, la sclérose tubéreuse de Bourneville, la maladie de Von Hippel-Lindau, le syndrome de Bardet-Biedl et la maladie de Fabry. À ce jour, la maladie génétique rénale la plus fréquente dans la population générale est la polykystose rénale autosomique dominante (Lanktree et al., 2018). Cette maladie sera la thématique principale de cet ouvrage.

1.2.1 La polykystose rénale autosomique récessive

La polykystose rénale autosomique récessive (PKRAR) chez l'humain est une maladie génétique infantile qui affecte environ 1 nouveau-née sur 20 000. Cette maladie se caractérise par la formation de kystes aux reins touchants plus particulièrement les tubules collecteurs. Elle engendre la destruction du parenchyme à un stade avancé (Gunay-Aygun et al., 2006). En général, la PKRAR est diagnostiquée durant la période néonatale par la présence d'une hypertrophie des reins

échogènes. La plupart des patients ayant reçu un diagnostic durant cette période présentent une insuffisance rénale terminale dès la naissance. Les patients qui sont diagnostiqués après la période néo-natale soient vers l'âge de 1 an présentent une néphromégalie avec un faible déclin de la fonction rénale pendant environ 20 ans et des manifestations hépatiques tels que la fibrose hépatique congénitale et/ou une hépatosplénomégalie.

Le gène responsable de la maladie est le *PKHD1*, situé sur le chromosome 6 ce gène encode la polyductine (aussi appelé la fibrocystine) soit la FPC. La FPC est une grande protéine membranaire de type récepteur intégral de 4074 acides aminés (Gunay-Aygun et al., 2006). Contenant un peptide signal, elle présente un large domaine extracellulaire, un seul domaine transmembranaire ainsi qu'une petite séquence intracellulaire cytoplasmique en C terminal. Il a été démontré que la FPC se localise au niveau du cil primaire des cellules épithéliales des tubules rénaux ainsi que dans les cholangiocytes des voies biliaires. Des études chez des rats ont démontré qu'une mutation germinale dans le gène *Pkhd1* engendre une anomalie dans le cil primaire des cholangiocytes (Dorn et al., 2009). D'autres études ont aussi démontré la localisation de la FPC au niveau du corps basal ainsi que la membrane plasmique (Menezes et al., 2004; Olson et al., 2019). Il a été suggéré que la portion intracellulaire cytoplasmique de la FPC présente une séquence de localisation nucléaire. Par conséquent, elle serait clivée et transloquée au noyau en présence de l'activateur de la kinase C ou du Ca^{2+} .

1.3 La polykystose rénale autosomique dominante chez l'humain (PKRAD)

1.3.1 Manifestations rénales de la PKRAD

La polykystose rénale autosomique dominante (PKRAD) est la maladie génétique la plus fréquente qui touche environ entre 1 personne sur 500 et 1 personne sur 1000 dans toute la population générale. Elle se caractérise par la formation de kystes rénaux bilatéraux, c'est à dire au niveau des deux reins. Les kystes sont des tubules dilatés associés avec une prolifération des cellules épithéliales qui sont remplies de fluides et qui se détachent du néphron. Les fluides retrouvés à l'intérieur des kystes proviennent soit du filtrat glomérulaire qui n'a pas été réabsorbé ou des solutés trans épithéliaux (Grantham, Mulamalla, & Swenson-Fields, 2011). Le développement des

kystes sur les différents segments du néphron cause éventuellement la compression du parenchyme adjacent normal ce qui engendre une inflammation interstitielle, de la fibrose et de l'ischémie. Tous ces éléments finissent par diminuer le taux de filtration glomérulaire affectant ainsi la concentration de l'urine (Grantham et al., 2011). De plus, les reins s'élargissent et subissent un remodelage de leur structure (figure 1.3) ce qui mène généralement à une insuffisance rénale en phase terminale chez la moitié des patients lorsque ceux-ci atteignent l'âge de 50-60 ans (Higashihara et al., 2018). La croissance des kystes chez un individu augmente avec l'âge, mais varie toutefois d'un patient à un autre. Il a été suggéré que celui-ci semble être associé au déclin de la fonction rénale (Jared J. Grantham, Deborah A. Baumgarten, & Miller, 2006). Finalement, il est possible de dire que l'expansion des kystes et la taille des reins corrént avec la progression de la maladie (Jared J. Grantham et al., 2006).



Figure 1.3 Rein kystique provenant d'un patient atteint de la PKRAD

A) et C) : Apparence macroscopique d'un rein PKRAD à un stade avancé démontrant une hypertrophie rénale et de multiples kystes rénaux. B) Coupe transversale d'un rein PKRAD montrant les différentes tailles des kystes présents dans le cortex et la médulla. Figure tirée de l'article : *ARPKD and early manifestations of ADPKD: the original polycystic kidney disease and phenocopies* (Bergmann, 2015). Utilisation de reproduction permise sous condition.

1.3.2 Manifestations extrarénales de la PKRAD

En plus des affectations rénales pouvant parfois être très douloureuses, plusieurs personnes PKRAD développent fréquemment des kystes dans d'autres organes (ex. pancréas, ovaires, vésicules séminales, etc.). En effet, 80 % des patients PKRAD développent des kystes au niveau du foie. Une grande proportion de ces patients sont des femmes (Luciano & Dahl, 2014). Les kystes au foie n'engendrent pas nécessairement un dysfonctionnement de la fonction hépatique, mais sont souvent associés à des effets secondaires tels que les douleurs abdominales, une distension et une compression aiguë au niveau de l'estomac ce qui peut entraîner une satiété précoce, des nausées ou des vomissements (Luciano & Dahl, 2014). En plus des manifestations kystiques, les personnes atteintes de la PKRAD peuvent aussi présenter des manifestations non kystiques. Par exemple, des

anomalies cardiaques au niveau de la valve mitrale sont souvent associées aux patients PKRAD (Eccder & Schrier, 2009). De plus, environ 70 % des patients PKRAD développent de l'hypertension, et ce même avant que la fonction rénale devienne compromise ce qui augmente le risque de morbidité et de mortalité auprès de ces personnes (Schrier, 2001). Des études ont aussi démontré que certains patients PKRAD sont plus susceptibles à subir des anévrysmes cérébraux (Saigusa & Bell, 2015) ce qui peut causer un accident vasculaire cérébral. Soit la prévalence de subir un anévrysme cérébral chez les patients PKRAD est de 20 % lorsque la maladie circule dans la même famille et de 5 % pour des patients sans historique familial (Pirson, Chauveau, & Torres, 2002) ce qui est dans les deux cas supérieurs à la population générale (Luciano & Dahl, 2014).

1.3.3 Les essais cliniques et thérapies

Actuellement, il n'y a pas de thérapies disponibles permettant de guérir la PKRAD. Les soins apportés aux patients PKRAD permettent uniquement de traiter les symptômes ainsi que les complications tels que la dialyse et la transplantation d'organe (Chebib et al., 2018). Malgré l'absence de remède, plusieurs études cliniques ont tenté d'apporter un traitement efficace en ciblant diverses voies de signalisations impliquées dans la kystogénèse. Soit par exemple, il a été démontré que la voie de signalisation cible de la rapamycine (mTOR) participe activement à la prolifération épithéliale donc à l'expansion des kystes (Margaria, Campa, De Santis, Hirsch, & Franco, 2020). En effet, lorsqu'une sous-unité du complexe mTOR soit mTORC1 se retrouve dans un état d'hyper activation. Celui-ci engendre la phosphorylation d'un régulateur de la traduction soit le facteur 4EB1 ainsi que la kinase S6K1 qui à leur tour vont favoriser la synthèse de protéines impliquées dans la croissance et la prolifération cellulaire. Soit, il a été observé chez un modèle murin PKRAD que le Sirolimus (un inhibiteur de mTOR) diminuait significativement la taille des reins kystiques (Holditch et al., 2019). Malheureusement, cet inhibiteur n'a pas eu le même effet chez les patients PKRAD lors des études cliniques. En effet, le volume total des reins ainsi que le taux de filtration glomérulaire des patients qui ont reçu l'inhibiteur n'ont pas changé significativement comparativement aux patients recevant le placebo (Serra et al., 2010) (Walz et al., 2010). Ainsi, à ce jour, les inhibiteurs de mTOR ne sont pas conseillés pour les patients PKRAD.

De plus, il a aussi été démontré que chez les patients PKRAD, les niveaux intracellulaires de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) étant élevé participent activement à la formation

ainsi qu'à l'expansion des kystes (Mangoo-Karim et al., 1989) et (Hanaoka & Guggino, 2000). Il est connu que dans les tubules rénaux, la somatostatine une fois liée à son récepteur inhibe l'adénylate cyclase soit l'enzyme responsable de la production d'AMPc (Friedlander & Amiel, 1986). Plusieurs analogues de la somatostatine ont fait l'objet d'études cliniques auprès des patients PKRAD tels que l'ocréotide (Caroli et al., 2013) et lanréotide (Meijer et al., 2018). Alors qu'il a été démontré que ces molécules permettent la réduction du volume total du rein des patients PKRAD, le taux de filtration glomérulaire quant à lui ne semble pas s'améliorer donc les reins continuent de progresser vers une insuffisance rénale. Finalement ce n'est qu'en 2014, que le tolvaptan est approuvé pour son utilisation auprès de patients PKRAD, au Japon et ultérieurement dans d'autres pays tel que le Canada. Le tolvaptan est un antagoniste des récepteurs V2 de la vasopressine soit l'hormone antidiurétique. Celui-ci va bloquer la liaison de l'arginine vasopressine (AVP) au récepteur V2 de la vasopressine situé au niveau du segment distal du néphron (Reif et al., 2011). Ce composé permet aussi de diminuer la production d'AMPc et retarde la formation des kystes aux reins. Malgré la diminution du volume total rénale et du taux de filtration glomérulaire, ce composé ne permet pas de guérir complètement la maladie, celui-ci fait uniquement retarder le déclin de la fonction rénale (Torres et al., 2012). Donc, la compréhension ainsi que l'étude des mécanismes moléculaire et cellulaire menant à la PKRAD est essentielle afin de permettre le développement de nouveaux outils thérapeutiques.

1.3.4 La génétique moléculaire de la PKRAD

1.3.4.1 Les gènes PKD1 et PKD2

La PKRAD est majoritairement causée par une mutation dominante dans le gène *PKD1* ou dans le gène *PKD2* (c'est-à-dire une mutation sur un des allèles du gène *PKD1* ou *PKD2*). Les mutations dans le gène *PKD1* ou dans le gène *PKD2* étant dominantes signifie que le taux de transmission s'élève à 50%. En effet, 80 % des patients présentent des mutations dans le gène *PKD1* (Higashihara et al., 2018). Le gène *PKD1* est un très long gène situé sur le chromosome 16 à la position 13.3 du bras court du chromosome (16p13.3) (Bogdanova et al., 2001). Des analyses indiquent que les exons 1 à 33 du gène *PKD1* sont répétés six fois sur le chromosome 16 étant ainsi des pseudogènes (PKD1P1-P6) (Harris & Rossetti, 2010). Ces pseudogènes présentent une homologie de séquence de 97-99 % (Bogdanova et al., 2001) et ce malgré la présence de délétion

et de réarrangement chromosomique (Harris & Rossetti, 2010). Généralement exprimés, ils présentent toutefois des codons stop précoces ce qui fait qu'ils ne sont pas traduits en protéine. Le gène *PKD1* mesure environ 52 kb et contient 46 exons qui vont générer un transcrit de 14.3 kb (M. Alexandra Gl, 1995). La traduction de l'ARNm de ce gène génère une protéine d'environ 460 kDa appelée polycystine-1 (PC-1). Il y a au-delà de 1000 mutations et variants du gène *PKD1* chez l'humain qui sont répertoriés dans la base de données des mutations PKRAD (*PKD foundation database, 2018*), mais uniquement la moitié d'entre eux semble être pathogénique. Les mutations peuvent être des délétions, des insertions, des substitutions de nucléotide, des décalages du cadre de lecture ou des mutations non-sens. Des études ont démontré que les mutations tronquantes pour le gène *PKD1* progresse plus rapidement vers l'insuffisance rénale comparativement aux mutations non tronquantes (Cornec-Le Gall et al., 2013).

10-15 % des cas PKRAD sont causés par des mutations qui sont situées dans le gène *PKD2*. Le gène *PKD2*, se situe sur le chromosome 4 (4q21-23) et comporte 15 exons (68 kb). Celui-ci est transcrit en un ARNm d'environ 5,1 kb (Hayashi et al., 1997). La traduction de cet ARNm génère la polycystine-2 (PC-2) soit une protéine de 110 kDa (Yiqiang Cai, 1999). Il a été observé que les patients avec des mutations dans le gène *PKD2* développent des kystes plus tardivement et progressent plus lentement vers l'insuffisance rénale (soit vers 70 ans vs 50 ans) comparativement aux personnes ayant des mutations dans le gène *PKD1* où le phénotype est plus sévère (développement des kystes plus rapidement) (Jared J. Grantham et al., 2006). Les mutations étant variables dans cette maladie, on parle donc d'une hétérogénéité allélique pour le gène *PKD1* et *PKD2*. En effet, une variabilité du phénotype est observée dans la maladie et même au niveau de la progression, pour des mutations identiques intrafamiliale suggérant l'implication d'un gène modificateur (Ali et al., 2015; Lanktree et al., 2019).

1.3.4.2 Les autres gènes impliqués dans la PKRAD

Environ 7-10 % des cas PKRAD sont dus à de rares mutations qui se retrouvent à l'intérieur d'un autre locus qui n'a pas encore été identifiées génétiquement (P.C. Harris, 1995). Certaines de ces mutations rares engendrent l'apparition d'un phénotype typique, mais moins sévère de la PKRAD ont été identifiées chez des patients. Soit le gène *HNF1B* (un facteur nucléaire hépatocytaire 1β), le gène *GANAB* (glucosidase II, impliquée dans la déglycosylation des protéines) (Porath et al.,

2016) et le gène *DNAJB11* (encode une protéine chaperonne associée à la protéine immunoglobuline de liaison Bip (HSPA5) impliqué dans le repliement des protéines) (Cornec-Le Gall et al., 2018). Il a été démontré que le facteur de transcription *HNF1B* régule à la hausse l'expression de certains gènes associés à la polykystose rénale tels que *PKHD1* et *PKD2* (Bergmann et al., 2018). De plus, certains patients PKRAD présentent des mutations dans des gènes qui sont associés avec la polykystose hépatique autosomique dominante (PKHAD) soit une maladie génétique kystique hépatique avec parfois un phénotype kystique rénale. En plus du gène *GANAB*, parmi ces gènes il y a le gène *SEC63* (Davila et al., 2004) (favorise la translocation des protéines à travers la membrane du réticulum endoplasmique) le gène *PRKCSH* (Drenth, te Morsche, Smink, Bonifacino, & Jansen, 2003) (encode pour la sous unité de la glucosidase II), le gène *ALG8* (encodant la α -1-3-glucosyltransférase), le gène *ALG9* (Besse et al., 2019) (encodant l' α -1-3-manosyltransférase), le gène *LRP5* (corécepteur de *Wnt*), le gène *SEC61A/B* (sous-unité alpha et bêta de l'isoforme 1 de la protéine SEC61), et le gène *PKHD1*. Étant donné que certains de ces gènes peuvent être à la fois impliqués dans la PKRAD et la PKHAD (ex. *GANAB*), il n'est pas encore possible de déterminer avec certitude à quelle maladie spécifique (PKRAD ou PKHAD) ces gènes appartiennent lorsqu'ils sont mutés.

D'autres mutations ont été identifiées dans des gènes qui sont normalement associées à d'autres maladies et qui n'impliquent pas le gène *PKD1* et *PKD2*. Par exemple, le gène *CC2D2A* causant le syndrome de Joubert, et le gène *DNAH5* impliqué dans la dyskinésie ciliaire primitive (Srivastava, Molinari, Raman, & Sayer, 2017; Tan et al., 2018). De plus, certains gènes étant dérégulés dans les cancers ont aussi été identifiés avec des mutations chez des patients PKRAD. Soit, le gène *DNMT3A* le régulateur de la méthylation de la chromatine, le gène *SMARCA2* impliqué dans le remodelage de la chromatine, *HRPT*, *ATM* impliqué dans la régulation du cycle cellulaire, et le gène *MET* (Tan et al., 2018). Cependant, puisque ces mutations sont rares chez les patients PKRAD, les mécanismes pathogéniques n'ont pas été élucidés à ce jour. Se référer au tableau 1.1 et 1.2 pour la liste détaillée des gènes pouvant mener à la PKRAD.

Tableau 1.1 Liste des gènes pouvant être impliqués à la fois dans la PKRAD et la PKHAD.

Gènes	Nom	Fonction	Références
<i>HNF1B</i>	Facteur nucléaire hépatocytaire-1 β	Facteur de transcription	Shao, Chan, & Igarashi, 2020
<i>GANAB</i>	Glucosidase II	Catalyse l'hydrolyse des peptides liés aux oligosaccharides, Repliement des protéines	Besse et al., 2017; Porath et al., 2016
<i>DNAJB11</i>	Membre 11 de la famille des DnaJ	Cofacteur de Bip	Cornec-Le Gall et al., 2018
<i>SEC63</i>	Homologue de la protéine de translocation sec63	Translocation des protéines à travers la membrane du RE	Davila et al., 2004
<i>PRKCSH</i>	Sous-unité bêta de la glucosidase 2	Repliement des protéines	Drenth et al., 2003
<i>LRP5</i>	Protéine 5 lié au récepteur des lipoprotéines	Corécepteur de Wnt	Cnossen et al., 2016
<i>ALG8</i>	α -1,3 glucosyltransférase	N-glycosylation des protéines	Besse et al., 2017
<i>ALG9</i>	α -1,2 manosyltransférase	N-glycosylation des protéines	Besse et al., 2019
<i>SEC61B</i>	Sous-unité β du translocon sec61	Régulation de la qualité des protéines	Besse et al., 2017
<i>PKHD1</i>	Fibrocystine	Tubulogénèse, Duplication des centrosomes	Chandok, 2012

Tableau 1.2 Liste des gènes rares pouvant mener à la PKRAD

Gènes	Protéine	Fonction	Références
<i>UMOD</i>	Uromoduline	Inhibiteur de la cristallisation du calcium dans les fluides rénaux	Hart et al., 2002
<i>MUC1</i>	Mucine-1	Formation d'une barrière protectrice muqueuse dans les cellules épithéliales	Kirby et al., 2013
<i>COL4A1</i>	Sous-unité du collagène de type IV	Interagit avec les composants de la matrice extracellulaire	Cornec-Le Gall, Torres, & Harris, 2018
<i>OFD1</i>	Centriole	Mouvement épithélial du cil, Morphologie embryonnaire	Cornec-Le Gall, Torres, & Harris, 2018
<i>CC2D2A</i>	Coiled-coil et protéine 2A contenant un domaine C2	Barrière protéique entre le cil et la membrane plasmique	Tan et al., 2018
<i>DNAH5</i>	Dynéine	Activité ATPase et Force motrice	Tan et al., 2018
<i>DNMT3A</i>	DNA méthyl-transférase	Méthylation de l'ADN	Tan et al., 2018
<i>SMARCA2</i>	Protéine de la famille SWI/SNF	Remodelage de la chromatine	Tan et al., 2018
<i>HRPT</i>	Glucosyltransférase	Activité enzymatique	Tan et al., 2018
<i>ATM</i>	Protéine de la famille des kinases PI3/P14	Réparation de l'ADN	Tan et al., 2018
<i>MET</i>	Membre des récepteurs des tyrosines kinases	Récepteur du facteur de croissance hépatocytaire	Tan et al., 2018
<i>SEC61A</i>	Sous-unité α du translocon sec61	Régulation de la qualité des protéines	Bolar et al., 2016
<i>Arl3</i>	Protéine 3 de type facteur de ribosylation ADP	Transporte les protéines lipidées dans le cil	Schrick, Vogel, Abuin, Hampton, & Rice, 2006

1.3.5 Expression tissulaire des gènes et protéines *PKD1/PC-1* et *PKD2/PC-2*

1.3.5.1 Expression chez l'humain

Chez l'humain, l'expression des transcrits *PKD1* et *PKD2* est régulée très tôt lors du développement embryonnaire et fœtal. En effet, dès la fécondation le transcrit *PKD1* est exprimé et ce dans tous les tissus. Il a été montré que dans les tissus humains adultes le gène *PKD1* est

principalement détecté dans les tissus cardiaques et le cerveau alors qu'il est faiblement exprimé dans les autres organes tels que le foie et le rein (Ong, Ward, et al., 1999; Véronique Chauvet, 2002; Weston et al., 1997). Le transcrit *PKD2* quant à lui est plus fortement exprimé dans les tissus humains. La présence de ce transcrit a été démontré principalement dans le cœur, le pancréas et le rein, mais est aussi exprimé dans d'autres organes tels que le cerveau le poumon et le foie et ce à plus forte expression dans les tissus adultes comparativement au gène *PKD1* (Véronique Chauvet, 2002). Chauvet et al., ont démontré que les transcrit *PKD1* et *PKD2* sont plus exprimées lors de l'embryogenèse et de la néphrogénèse. En effet, dès la 6^e semaine de gestation le transcrit *PKD1* est fortement exprimé dans le mésonéphros alors que durant la 5^e semaine de l'embryogenèse le transcrit n'est pas encore exprimé dans bourgeon urétérique ni dans le mésenchyme non induit. Dès la 10^e semaine, une forte expression du transcrit *PKD1* a été observée dans les tubules en différenciation. Vers la 15^e semaine, l'expression du transcrit semble être modérée et détectée dans les segments distaux du néphron et des branchements du bourgeon urétérique. Ces niveaux demeurent modérés durant le développement du fœtus et non détectables dans les reins matures. À l'inverse de *PKD1*, le transcrit *PKD2* est observé dès la 5^e semaine du développement embryonnaire dans le mésenchyme métanéphrique non induit et le bourgeon urétérique en plus d'être fortement exprimé dans le mésonéphros. De plus, il a été observé que dès la 10^e semaine, toutes les structures du rein primitif en développement expriment le transcrit *PKD2* incluant les vésicules et les corps en forme de S. L'expression du transcrit demeure élevée jusqu'à la 36^e semaine de gestation dans les structures en différenciation. Une fois différenciée, son expression diminue rapidement. Finalement, dans le rein adulte, une expression stable du transcrit a été observée dans l'anse de Henlé, dans les tubules distaux et collecteurs et dans les vaisseaux sanguins. L'expression des transcrits à un stade aussi précoce du développement suggère un rôle important de ces gènes dans le développement des différentes structures du rein.

Chez l'humain, l'expression des protéines PC-1 et PC-2 sont aussi grandement régulée au cours du développement rénal tel qu'observé pour les transcrits *PKD1* et *PKD2*. En effet, leurs niveaux d'expressions sont à leur maximal durant la néphrogénèse et diminuent de façon significative une fois les reins adultes formés et reste stable tout au long de la vie adulte. Il a été démontré que durant la néphrogénèse, PC-1 est retrouvée dans des segments non contiguë du tubule rénal fœtal soit dans une portion de la capsule de Bowman, le tubule proximal ainsi que le tubule collecteur (Geng et

al., 1996). PC-1 est aussi retrouvée dans le bourgeon urétérique ainsi que dans le corps en forme de S. Au niveau du rein adulte, la polycystine-1 semble être limitée aux structures tubulaires, mais avec un niveau d'expression plus faible. Tout comme PC-1, PC-2 est exprimée dans plusieurs tissus très tôt durant le développement embryonnaire soit dans le cœur, tissus neuronaux, le foie, ganglions en plus du rein (Véronique Chauvet, 2002). Au niveau du rein, PC-2 est détectable dès le stade du mésonéphros dans le canal de Wolff et dans les branchements du bourgeon urétérique (Véronique Chauvet, 2002). Son expression diminue dans les tubules proximaux au cours du développement, mais demeure élevée dans l'anse de Henlé. Contrairement à PC-1, l'expression de la PC-2 reste constante durant la vie d'une personne et est exprimée de façon ubiquitaire dans les tissus extrarénaux.

Chez les patients PKRAD où les mutations tronquantes se situe à l'intérieur du gène *PKD1*, il a été démontré que PC-1 est fortement exprimée dans 90 % de l'épithélium des kystes (Ong, Harris, et al., 1999). PC-1 peut aussi se retrouver à la surface cellulaire ainsi que dans le cytoplasme des cellules épithéliales kystiques. Une faible proportion des kystes soit environs 10 % où l'épithélium est préservé ne sur exprime pas PC-1. De plus, PC-1 est aussi fortement exprimée dans certains tubules non dilatés. Il a aussi été démontré que PC-2 est exprimée dans les kystes des patients (Ong, Ward, et al., 1999).

Homologie de séquences des gènes PKD1 et PKD2

Les gènes *PKD1* et *PKD2* humain présentent une forte homologie de séquence avec la souris. En effet des études de clonage positionnel ont démontré que le gène *Pkd1* murin présente 79 % d'homologie avec le gène *PKD1* humain et se retrouve aussi queue à queue avec le gène *TSC2* (P.G. Olsson, 1996). Soit chez la souris, le gène *Pkd1* est localisé sur le chromosome 17 et est présent en une seule et unique copie. La protéine encodée par le gène *Pkd1* présente elle aussi 79 % d'homologie avec la séquence humaine et tous les motifs présents chez l'humain sont conservés chez la souris. Le gène *Pkd2* murin quant à lui présente 91 % d'homologie avec l'humain et est localisé sur le chromosome 5. La protéine présente toutefois 98 % d'homologie avec la polycystine-2 humaine et les motifs sont aussi tous conservés.

1.3.5.2 Expression chez la souris

Chez la souris, il a été démontré que le profil d'expression des gènes et protéines *Pkd1*/Pc-1 et *Pkd2*/Pc-2 sont aussi régulés au cours du développement comme observé chez l'humain. Des analyses d'hybridation *in situ* ont révélé que le gène *Pkd1* ainsi que le gène *Pkd2* est détectable très tôt lors de l'embryogenèse, soit une faible expression est détectable dès le stade de la morula (stade de 8 à 16 cellules) ainsi que dans les blastocystes isolés jusqu'à l'implantation de celui-ci qui est e6.3 (jours 6 de l'embryogenèse) (Guillaume & Trudel, 2000). Ces analyses ont démontré de forts signaux des deux gènes dans la caduque basale ainsi qu'une expression uniforme et diffuse dans les différentes couches de l'embryon soit dans l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. Entre le jour e9.5 et e10.5, une expression différentielle des gènes a été observée au niveau de la crête neurale, le tube neural ainsi que dans le mésenchyme sclérotique. Au stade e11.5, il est possible d'observer une expression dans les tissus mésenchymateux ainsi que dans les somites. À ce stade, il est possible d'observer une différence d'expression entre les gènes *Pkd1* et *Pkd2*. Soit le gène *Pkd1* est fortement exprimé dans le système nerveux alors que le gène *Pkd2* est faiblement exprimé. L'expression des gènes est maintenue jusqu'au stade e12.5 et devient détectable dans plusieurs organes en développement plus particulièrement, le poumon, le tube intestinal, le cartilage des tissus, et le diaphragme. De plus, à ce stade du développement embryonnaire le gène *Pkd1* est fortement exprimé dans le mésenchyme condensé du métanéphros ainsi que dans le poumon, les glandes salivaires et la peau. À l'inverse de *Pkd1*, l'expression du gène *Pkd2* n'est pas augmentée dans ces tissus lors de la condensation du mésenchyme en épithélium. Au jour e18.5, le gène *Pkd1* est fortement exprimé dans le poumon comparativement aux autres tissus alors que pour le gène *Pkd2*, l'expression est plus forte dans les reins. Finalement, au stade adulte, une faible expression de *Pkd1* a été démontrée dans les reins notamment au niveau des tubules et du glomérule. Le gène *Pkd2* quant à lui demeure fortement exprimé dans l'épithélium du cortex, mais un peu plus faible dans le glomérule.

1.3.6 Expression et localisations cellulaires des polycystines

La polycystine-1 (PC-1) est connue pour se localiser à différents endroits dans les cellules. Dans les cellules épithéliales rénales, celle-ci se localise sur la membrane apicale, basale et latérale. En effet, une étude a révélé que PC-1 favoriserait l'adhésion entre les cellules épithéliales rénales

(adhésion cellule-cellule) (Streets et al., 2003). De plus, étant majoritairement présente sur la membrane apicale elle aurait aussi une fonction mécanorécepteur dans le cil primaire (Cai et al., 2014; S. M. Nauli et al., 2003). Il a été découvert que PC-1 pouvait se trouver dans des vésicules secrétées à la base du cil primaire. Ces corps multivésiculaires (CMV) sont les exosomes (Gainullin, Hopp, Ward, Hommerding, & Harris, 2015), aussi connus sous le nom de vésicules intraluminales, les exosomes sont les plus petites vésicules extracellulaires secrétées par tous les types de cellules. Elles sont secrétées lorsque les CMV fusionnent avec la membrane plasmique de la cellule mère pour être ensuite relâchés dans son environnement voisin. Une fois relâchés les exosomes peuvent intégrer une cellule cible et y modifier son devenir (Mathieu, Martin-Jaular, Lavieu, & Théry, 2019). Ainsi, les exosomes participeraient à la communication intercellulaire et à la maintenance cellulaire (Mathieu et al., 2019). Chez l'humain, les exosomes peuvent être retrouvés dans plusieurs types de fluides extracellulaire tels que le sang, la salive, l'urine, le liquide amniotique, le liquide céphaloridien et même dans le lait maternel (Keller, Ridinger, Rupp, Janssen, & Altevogt, 2011; Lässer et al., 2011; Street et al., 2012). Une étude a démontré que PC-1 est très abondant à l'intérieur des exosomes urinaires en situation normale (Hogan et al., 2009). À l'inverse, les patients PKRAD présentent une diminution de PC-1 à l'intérieur des exosomes (Hogan et al., 2015). Pour continuer, des études *in vitro* ont révélé la présence de la portion C terminal de PC-1 dans le noyau des cellules épithéliales rénales (Chauvet et al., 2004) ainsi que dans les mitochondries (C. C. Lin et al., 2018). Pour ce qui est de la polycystine-2 (PC-2), celle-ci se trouve majoritairement dans le réticulum endoplasmique. Par contre, il a aussi été démontré que PC-2 peut être présente dans le cil primaire avec PC-1 sous forme d'un complexe (Ong & Harris, 2015) ainsi que dans les exosomes urinaires (Hogan et al., 2009).

1.4 Les polycystines

1.4.1 Structure protéique la polycystine-1

PC-1 est une glycoprotéine membranaire ~460 kDa (P.C. Harris, 1995) comportant 4303 acides aminés (figure 1.4). La présence d'un peptide signal auprès de cette protéine suggère qu'elle serait synthétisée et traitée par la voie sécrétoire des cellules.

Domaine extracellulaire de la polycystine-1

PC-1 contient un large domaine extracellulaire en N terminal qui représente 70 % des acides aminés soit 3074 acides aminés.

Les répétitions riches en leucine (LRR) sont des séquences d'environ 20 à 30 acides aminés contenant un ou plusieurs leucines ainsi qu'un acide aminé hydrophobe leur permettant d'adopter la forme d'un solénoïde (Purevjav Enkhbayar, 2003). La portion extracellulaire de PC-1 contient deux motifs complets LRR et un motif incomplet suivi d'un motif riche en cystéine. Il a été démontré que le motif LRR de PC-1 peut interagir avec les composantes de la matrice extracellulaire *in vitro*, dont le collagène de type I, la laminine et la fibronectine (Ashraf N. Malhas, 2001). Ces interactions suggèrent un rôle important de PC-1 dans le développement des tissus.

Le motif lectine de type C (*C-type lectin*) est un domaine de reconnaissance pour les carbohydrates dépendant de la présence de Ca^{2+} . En effet, des analyses *in vitro* ont aussi permis de démontrer une interaction entre le motif lectine de type C de PC-1 avec des carbohydrates de la matrice extracellulaire en présence de Ca^{2+} (Benjamin S. Weston 1, 2001).

Le domaine lipoprotéine A à faible densité (LDL-A) est un domaine riche en cystéine d'environ 40 acides aminés pouvant aussi être impliqué dans des interactions cellule-cellule ou cellule-matrice avec un ligand (Schmidt, Noureen, Kronenberg, & Utermann, 2016).

Le domaine PKD représente 30 % de la portion extracellulaire de PC-1. Ce domaine est répété 16 fois et tous sont homologues. Ce domaine contient un pli similaire au feuillet bêta. Il a également été suggéré que ces répétitions présentent une homologie avec les membres de la superfamille des immunoglobulines (Mark Bycroft, 1999).

Situé après le dernier domaine PKD et avant premier domaine transmembranaire ce situe le domaine REJ (récepteur pour *egg jelly*). Chez l'ourson de mer, ce domaine a pour rôle de favoriser l'ancrage du spermatozoïde à la membrane glycoprotéique de l'œuf permettant à ceux-ci de fusionner. Ce processus est contrôlé par la présence d'influx de Ca^{2+} . Comme ce module contient

une région homologue de 1000 acides aminés avec celui de PC-1, il a donc été suggéré un rôle au niveau de l'ancrage de la protéine à la membrane plasmique (Jim Hughes, 1999).

PC-1 est considérée comme un récepteur couplé aux protéines G atypiques (GPCR). En effet, tout comme les GPCRs elle contient un domaine *GPCR autoproteolysis-inducing domain* (GAIN) typique des récepteurs couplés aux protéines G d'environ 320 acides aminés à l'intérieur duquel s'y trouve un site de clivage couplé aux protéines G (GPS) d'environ 50 acides aminés (Trudel, Yao, & Qian, 2016).

Domaine transmembranaire de la polycystine-1

Des analyses de structures ont permis d'identifier onze domaines transmembranaires (TM) au lieu de sept ce qui est typique des récepteurs couplés aux protéines G. En effet, les domaines TM sur la polycystine-1 s'étalent de l'acide aminé 3075 à 4104 et contiennent des boucles extracellulaires et intracellulaires (Wilson, 2001). Alors que la fonction de ces domaines demeure peu connue, des séquences d'acides aminés ont été identifiées à l'intérieur des domaines transmembranaires soit entre la boucle du domaine intracellulaire 5 et 6 une tyrosine à la position 3614 ainsi qu'une séquence riche en proline à l'intérieur de la boucle intracellulaire entre les domaines 3 et 4. Ces deux séquences semblent être cohérente avec une séquence consensus pour un site de liaison d'homologie src 3 (SH3). Ces éléments suggèrent la possibilité d'une fonction de la transmission de signal de la protéine (Wilson, 2001).

Situé dans la première loop intracellulaire de la polycystine-1 est le domaine PLAT (Polycystin-1, Lipoxygenase, α -toxin) aussi identifié chez plus de 1000 protéines (Y. Xu et al., 2016). Leurs fonctions sont généralement en lien avec leurs liaisons aux molécules lipidiques généralement dépendante de la présence de Ca^{2+} . Ce motif semble aussi être impliqué dans la régulation de la localisation des protéines.

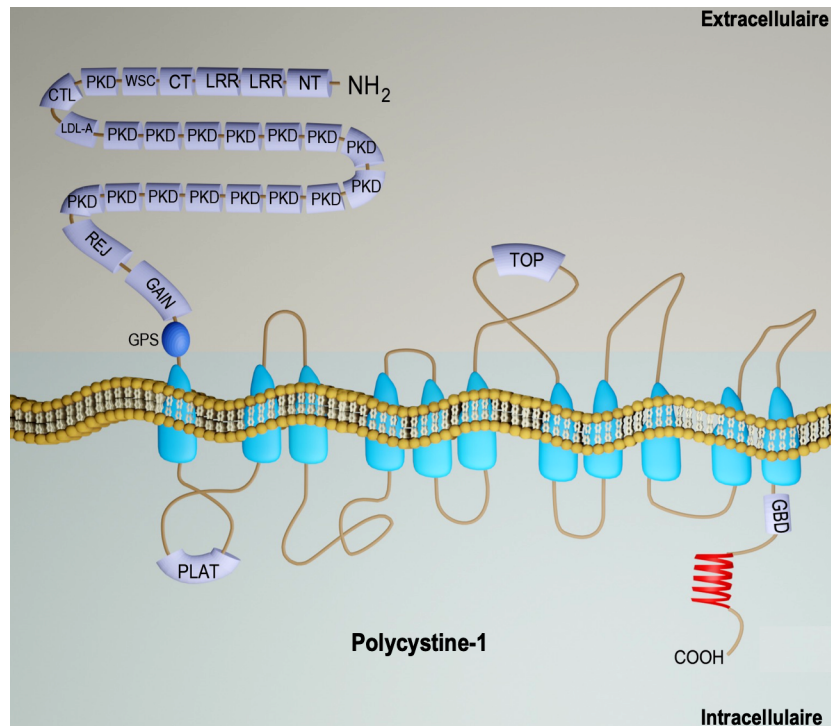


Figure 1.4 Représentation schématique de de la polycystine-1

Le domaine et les motifs connus de la polycystine-1 sont représentés sous forme d'un schéma. NT : domaine N terminale riche en cystéine (Hardy & Tsiokas, 2020) , LRR : répétition riche en leucine, CT : domaine C terminale riche en cystéine(Hardy & Tsiokas, 2020, WSC : domaine d'intégrité de de la paroi cellulaire et des composants du stress (Hardy, 2020 #243, CTL : domaine de lectine de type C, LDL-A : Lipoprotéine A à faible densité, PKD : répétition PKD, REJ : sea urchin receptor for egg jelly, GAIN : GPCR autoproteolysis-inducing domain, GPS: site de clivage au protéine G, PLAT : Polycystin-1, Lipoxygenase, α -toxin),TOP : ouverture tétragonale pour les polycystines (Hardy & Tsiokas, 2020) GBD : Site de liaison aux protéines G. Les 11 domaines transmembranaires sont identifiés en bleu et le motif coiled-coil est identifié en rouge. *Illustration faite par moi-même avec l'aide de Rey Christian Pacis.*

Domaine intracellulaire de la polycystine-1

La séquence cytoplasmique intracellulaire en C terminal contient environ 200 acides aminés (figure 1.5) et semble être la portion la plus importante de la PC-1. En effet, celle-ci contient de nombreux motifs qui semblent être importants pour la signalisation de la protéine.

Un site de clivage protéolytique a été identifié dans la troisième boucle intracellulaire de PC-1(Woodward et al., 2010). Ce clivage résulterait en un fragment contenant les 6 derniers domaines transmembranaires et la queue cytoplasmique de PC-1.

PC-1 contient une séquence de ciblage aux mitochondries (MTS) de l'acide aminé 4129 à 4154. Cette séquence a été démontrée comme étant importante pour la translocation de la queue cytoplasmique de PC-1 à l'intérieur des mitochondries (C. C. Lin et al., 2018). Cependant son rôle dans les mitochondries n'est pas connu.

La polycystine-1 contient aussi une séquence de localisation nucléaire (NLS) de l'acide aminé 4135 à 4154 permettant la translocation de la queue cytoplasmique de PC-1 au noyau cellulaire (Chauvet et al., 2004).

La portion intracellulaire de PC-1 comporte aussi un site d'activation aux protéines G (GBD) (4135-4154). Ce domaine permet à PC-1 de lier et d'activer les sous-unités α des protéines G. Des études *in vitro* démontrent que la PC-1 peut lier les sous-unités de type $G\alpha_{i/o}$, $G\alpha_{12}$, $G\alpha_s$, et $G\alpha_{q/11}$ démontrant ainsi le rôle potentiel de PC-1 dans les voies de signalisations (Hama & Park, 2016).

La polycystine-1 contient un domaine PEST (4173-4182), ce domaine permet à la protéine d'être ciblé pour une dégradation rapide. D'ailleurs, une expérience *in vitro* a démontré que la délétion de cette séquence engendre une augmentation des niveaux de protéines (Tsiokas, Kim, Arnould, Sukhatme, & Walz, 1997).

PC-1 contient une séquence de ciblage ciliaire soit le motif VxP de l'acide aminé 4298 à 4300 (Ward et al., 2011 ; Su et al., 2015). De manière générale ce motif favorise le trafic des protéines au cil primaire. Cependant, des analyses d'immunofluorescences ont démontré que ce motif est dispensable pour le trafic de PC-1 au cil primaire (X. Su et al., 2015).

Finalement, PC-1 contient un motif **COILED-COIL** qui se situe entre l'acide aminé 4219 à 4246 (Qian et al., 1997). Ce motif a été découvert par Pauling et Cory en 1953 et est composé de 5 répétitions consécutives d'heptade ayant les caractéristiques d'une hélice α hélicoïdale. Comme mon projet porte principalement sur l'étude du motif coiled-coil de PC-1 une description plus détaillée de ce motif sera discutée dans la prochaine section.

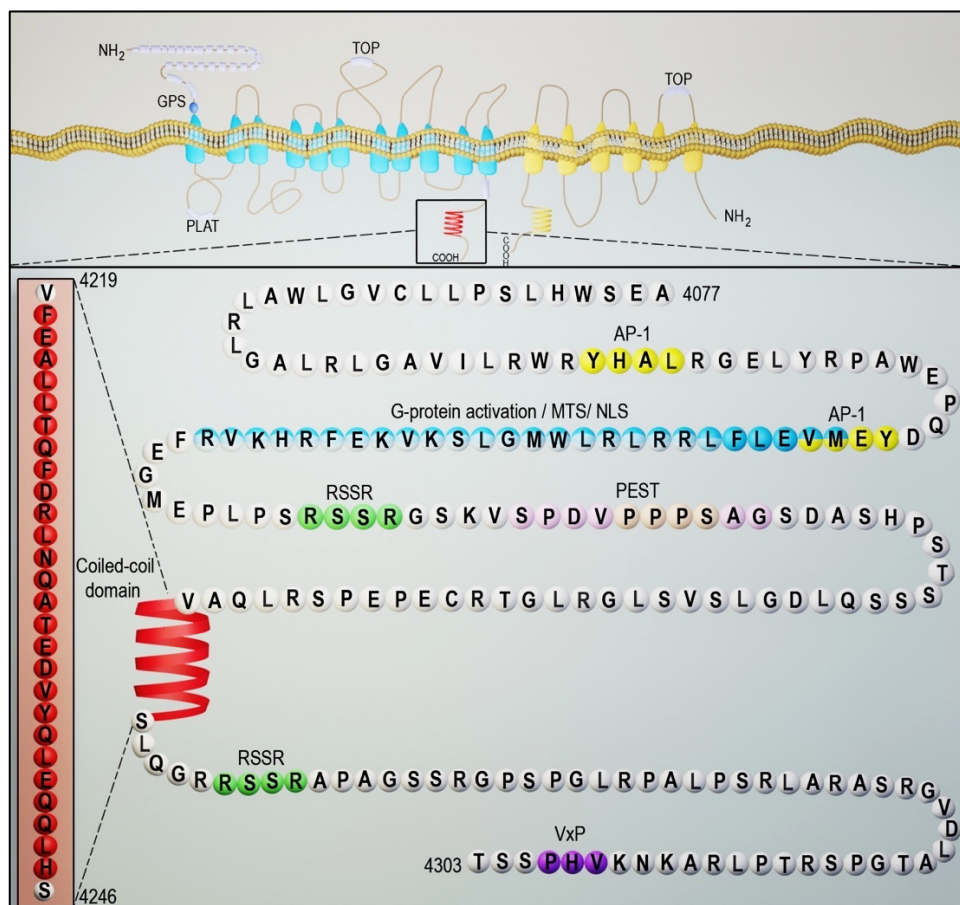


Figure 1.5 Représentation du domaine cytoplasmique intracellulaire de la polycystine-1

Agrandissement du domaine cytoplasmique intracellulaire de la polycystine-1. La polycystine-1 se trouve en haut à gauche et la polycystine-2 se trouve en haut à droite. Les acides aminés sont représentés par les lettres majuscules dans les cercles. Les différents domaines sont identifiés à l'aide de différentes couleurs. Jaune : site d'interaction potentiel des protéines adaptatrices (AP-1) (X. Su et al., 2015), bleu foncé : séquence de ciblage aux mitochondries (MTS), bleu pâle : séquence de localisation nucléaire (NLS), bleu très pâle : site d'activation aux protéines G, vert : séquences consensus RSSR, rose : domaine PEST, orange : séquence riche en proline (Hardy & Tsiokas, 2020) (site WW), rouge : motif coiled-coil et mauve : séquence de ciblage ciliaire (VxP). Cette représentation a été selon la version humaine de PC-1. *Illustration faite par moi-même avec l'aide de Rey Christian Pacis.*

1.4.2 Le motif coiled-coil

1.4.2.1 Structure générale du motif coiled-coil

En 1952, Francis Crick a découvert une nouvelle structure protéique qui fut nommée coiled-coil. Cette structure totalise 10 % du protéome d'un organisme eucaryote (Rose, Schraegle, Stahlberg, & Meier, 2005). La longueur de ce motif varie d'une protéine à une autre pouvant aller de deux à sept hélices alpha qui s'enroulent les uns autour des autres. Bien que ce motif soit conservé, la fonction du motif coiled-coil semble être assez variable. En effet, plusieurs fonctions ont été

proposées pour le motif coiled-coil. D'une part, certains motifs coiled-coil se présentent comme étant des *spacer* moléculaires permettant la séparation des domaines fonctionnels ou encore des échafaudages pour des complexes macromoléculaires. Par exemple, une étude de la ségrégation de la chromatine *in vitro* chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* a permis d'établir un vaste réseau d'interactions protéiques à motif coiled-coil (conservé durant l'évolution) à l'intérieur des kinétochores formant un pont reliant les extrémités des microtubules aux centromères des ADNs (Y. Wang et al., 2012). Wang et al., ont démontré que ce réseau d'interactions régule l'assemblage et le désassemblage dynamique des composantes des kinétochores. De plus, plusieurs protéines contenant un motif coiled-coil ont aussi été identifiées dans les centrosomes. Le motif coiled-coil de ces protéines servirait d'échafaud (Kuhn, Hyman, & Beyer, 2014). Il a aussi été démontré que certaines protéines du *trans Golgi network* (TGN) contenant un motif coiled-coil (les Golgins) peuvent participer à l'attachement de vésicules aux membranes de l'appareil de Golgi ce qui suggère un rôle du motif pour le trafic et le transport membranaire des protéines (Witkos & Lowe, 2015). D'ailleurs, il y a au moins 15 motifs coiled-coil qui ont été retrouvés dans les vésicules de fusion soit les molécules SNARES, les synptobrevins et les SNAPs (Wilson, 2001) soutenant l'hypothèse que ce motif peut jouer un rôle dans le transport et le trafic membranaire des protéines. Il a aussi été suggéré que le motif coiled-coil de la protéine Sec2p appartenant à la famille des facteurs d'échanges du nucléotide guanine (GEFs) qui permet de catalyser l'échange de nucléotide pour les GTPases Rab permettant de réguler le transport et le trafic membranaire via l'exocytose ou l'endocytose (Dong, Medkova, Novick, & Reinisch, 2007). Ainsi, ceci suggère donc que le motif coiled-coil peut être impliqué dans le transport ou le trafic des protéines ou avoir un rôle catalytique. Finalement, les motifs coiled-coil peuvent aussi être importants pour la communication allostérique permettant un changement de conformation du motif. En effet, il a été proposé que le changement de conformation du motif serait essentiel pour l'activité des complexes protéiques motrices qui serait impliquée dans le transport cellulaire (Truebestein & Leonard, 2016).

1.4.2.2 Le motif coiled-coil de la polycystine-1

Chez, l'humain, plusieurs mutations à l'intérieur du motif coiled-coil de PC-1 sont connues pour mener à l'apparition d'un phénotype PKRAD (voir tableau 1.3). Le motif coiled-coil de PC-1 semble jouer un rôle dans la signalisation. Effectivement, lorsque ce motif est tronqué (Xiao, Zhang, Magenheimer, Luo, & Quarles, 2008) ou muté par mutagenèse dirigée (C. Xu et al., 2007),

les interactions avec certains de ces partenaires importants pour sa signalisation sont perdues. De plus, certaines évidences permettent de croire que PC-1 et PC-2 peuvent interagir via leur motif coiled-coil (Qian et al., 1997; Tsiokas et al., 1997). En effet, des études *in vitro* démontrent que l'interaction entre PC-1 et PC-2 dépend de l'intégrité du motif coiled-coil de PC-1 et non de PC-2 (Qian et al., 1997; Tsiokas et al., 1997).

Tableau 1.3 Liste de mutations pathogéniques dans le motif coiled-coil causant la PKRAD

Mutations	Position	Acide aminé modifié	Type de mutations	Références
E4220X	4220	Glu4220X	Non-sens	Garcia-Gonzalez et al., 2007; S. Rossetti et al., 2007
12666_12667insG	4223	Leu4223fs5X	Décalage de cadre de lecture	Audrézet et al., 2012
Q4225P	4225	Gln4225Pro	Substitution	Badenas et al., 1999
F4226_Q4231del6	4226	Phe4226_Gln4231 del6	Délétion	Athena Diagnostitics
R4228X	4228	Arg4228X	Non-sens	Athena Diagnostitics
R4228P	4228	Arg4228Pro	Substitution	Athena Diagnostitics
Q4231X	4231	Gln4231X	Non-sens	Audrézet et al., 2012; Stekrova et al., 2009
12710_12711insA	4237	Tyr4237X	Décalage de cadre de lecture	Audrézet et al., 2012
Y4237X	4237	Tyr4237X	Non-sens	Audrézet et al., 2012; Perrichot, Mercier, Carre, Cledes, & Ferec, 2000
Q4238X	4238	Gln4238X	Non-sens	Athena Diagnostitics
E4240X	4240	Glu4240X	Non-sens	Athena Diagnostitics
Q4241X	4241	Gln4241X	Non-sens	Athena Diagnostitics
Q4242X	4242	Gln4242X	Non-sens	Hoefele, Mayer, Scholz, & Klein, 2011; Stekrova et al., 2009

De plus, il a aussi été rapporté qu'une mutation non-sens dans le domaine coiled-coil engendre la perte de la liaison entre PC-1 et PC-2 dans la PKRAD (Peral et al., 1996). De façon fonctionnelle, le motif coiled-coil est important dans la régulation de PC-2. D'ailleurs, il semblerait que cette interaction permettrait la localisation de PC-2 au cil primaire (X. Su et al., 2015). Il a aussi été montré qu'une mutation dans ce domaine (L4229 et L4233) engendrait une dérégulation du canal PC-2 (X. Su et al., 2015). En somme, PC-1 et PC-2 forment un complexe via le domaine coiled-coil de PC-1, mais son rôle exact dans la polycystine-1 reste encore à être élucidé.

1.4.3 Les modifications post-traductionnels de la polycystine-1

Les modifications post-traductionnelles (PTMs) sont des modifications chimiques ayant comme fonction de réguler l'activité, la localisation, la stabilité ainsi que l'interaction des protéines avec d'autres molécules telles que des acides nucléiques, des lipides, des cofacteurs ou encore d'autres protéines. Ces PTMs peuvent avoir lieu sur la chaîne latérale des acides aminés ou sur des protéines en N terminal ou en C terminal. PC-1 comme plusieurs autres protéines subit de nombreuses PTMs notamment la phosphorylation, la glycosylation, des clivages auto protéolytiques, l'ubiquitination ainsi que la palmitoylation.

1.4.3.1 La phosphorylation de la polycystine-1

Une des PTMs le plus souvent retrouvée est la phosphorylation. Ce mécanisme permet de réguler l'activité de plusieurs enzymes. La phosphorylation est un mécanisme réversible qui ajoute des phosphates sur des résidus d'acide aminé notamment la sérine, la thréonine et la tyrosine. Ce mécanisme est opéré par des enzymes notamment par des protéines kinase et engendre un changement de polarité de la protéine entraînant une modification conformationnelle. PC-1 contient de nombreux sites potentiels de phosphorylation. Parmi les nombreux sites de phosphorylations, il y a celui se trouvant sur la sérine 3164 du domaine PLAT (Y. Xu et al., 2016). À l'état non phosphorylé, le PLAT domaine de PC-1 peut lier les phospholipides anioniques, les phosphatidylsérine (Yamaguchi et al.) et les α - phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P) qui sont présent à la membrane plasmique. Xu et al., ont démontré qu'à l'état phosphorylé, l'affinité entre le domaine PLAT de PC-1 et PI4P est diminuée. Par conséquent, la β -arrestine ainsi que les protéines adaptatrices de la clathrine (complexe AP2) sont recrutées et engendrent l'internalisation

de PC-1 pour être soit recyclé ou dégradé par les lysosomes. De plus, d'autres sites de phosphorylations ont été découverts dans la portion cytoplasmique intracellulaire de PC-1. En effet, des analyses ont permis d'identifier deux séquences consensus RSSR de l'acide aminé 4162-4167 et de 4250-4253 (Wilson, 2001) comme étant des sites potentiels de phosphorylations par la protéine kinase A (S4164 et S4252). Trois autres sites de phosphorylation potentiels ont été suggérés par et Li et al., soit S4166 par la protéine kinase X suggérant un rôle dans la migration cellulaire (X. Li, Burrow, et al., 2008), Y4237 par une tyrosine protéine kinase (c-Src) et Y4127 par la focale adhésion kinase (FAK) (H. P. Li, Geng, Burrow, & Wilson, 1999) suggérant un rôle dans l'adhésion cellulaire. En somme, ces nombreux sites de phosphorylations permettraient de moduler la transduction de signaux de PC-1

1.4.3.2 La glycosylation de la polycystine-1

Une autre PTM qui est souvent retrouvée au sein des protéines eucaryotes est la glycosylation. Il existe deux types de glycosylation soit la N-glycosylation et la O-glycosylation. Ce processus est une réaction enzymatique qui est catalysée par des glucosyltransférases et des glucosidases. La N-glycosylation débute dans le réticulum endoplasmique et se termine dans l'appareil de Golgi. Elle permet l'ajout de molécules de glycans sur le squelette peptidique des protéines. La O-glycosylation débute dans l'appareil de Golgi et permet l'ajout de glucides sur les résidus OH des acides aminés sérines et thréonines. La glycosylation permet de promouvoir le repliement des protéines ainsi que d'augmenter la stabilité de ceux-ci. PC-1 est une protéine hautement N-glycosylée, en effet des analyses de séquences ont permis d'identifier au moins 60 sites de glycosylation en N terminal (Newby et al., 2002). Des analyses de glycosylation sur PC-1 ont permis d'identifier deux formes de la polycystine-1. Soit une forme mature hautement glycosylée pouvant se retrouver dans le trans-Golgi, la membrane plasmique, le cil primaire et les exosomes et une forme immature principalement présente dans le réticulum endoplasmique. Des analyses *in vivo* ont suggéré que 50 % de PC-1 à l'intérieur d'une cellule serait mature (Gainullin et al., 2015) et cette maturation dépendrait de la présence de PC-2. Le processus de maturation de PC-1 sera discuté un peu plus tard.

1.4.3.3 Les sites de clivages auto protéolytiques de la polycystine-1

Une autre forme de PTM est le clivage autoprotéolytique permettant aux protéines d'acquérir une forme mature. Comme mentionné un peu plus tôt, PC-1 contient un site de clivage couplé aux protéines G (GPS). Une fois PC-1 nouvellement synthétisée dans le réticulum endoplasmique suivie de la N-glycosylation, un mécanisme de clivage cis-autoprotéolytique similaire aux protéines réceptrices E2 (EMR2) a lieu (H. H. Lin et al., 2004). Ainsi, ce site induit l'auto-protéolyse de PC-1 dans le réticulum endoplasmique générant ainsi deux fragments distincts. Soit un fragment en N-terminal d'environ 325 kDa (Pc-1^{NTF}) et un fragment d'environ 150 kDa en C-terminal (Pc-1^{CTF}) (Trudel et al., 2016). Malgré les deux fragments générés, il semblerait que ceux-ci demeurent liés de manière non covalente. Ainsi, ce clivage donne lieu à deux formes distinctes de PC-1 soit une forme clivée et une forme non clivée. Des études *in vivo* chez la souris suggèrent que PC-1 non clivée jouerait un rôle dans le développement embryonnaire alors que la forme clivée soit la plus abondante serait plus prédominante au niveau du développement postnatal (S. Yu et al., 2007). Il a aussi été suggéré que le clivage *in vivo* aurait une fonction dans la biogenèse de PC-1 et favoriserait son transport intracellulaire et sa maturation (Kurbegovic et al., 2014). Il a été proposé que PC-1 présente trois autres sites de clivage supplémentaire dans son domaine intracellulaire. De ces trois sites, il a été suggéré que le premier site de clivage se situe dans la troisième boucle intracellulaire et génère un fragment d'environ 100 kDa (P100) contenant les 6 derniers domaines transmembranaires ainsi que sa queue cytoplasmique (Woodward et al., 2010). D'ailleurs, il a été démontré que l'expression unique du fragment P100 de PC-1 permet de réguler le SOCE (*store-operated calcium entry*) causant l'inhibition du flux calcique de PC-1 à la membrane plasmique (Z.Wang et al., 2019). De plus, il a été suggéré que les deux autres sites de clivage intracellulaire de PC-1 permettraient la libération d'un fragment cytosolique d'environ 34 kDa et de 17 kDa. Alors qu'il a été observé que le fragment de 34 kDa s'accumule dans le noyau de cellules épithéliales (Chauvet et al., 2004), le fragment de 17 kDa quant à lui pourrait interagir avec des activateurs transcriptionnels tels que STAT3, STAT6 et le co-activateur P100 (Low et al., 2006). Contrairement au site de clivage GPS, les fonctions spécifiques de ces trois clivages ne sont pas encore élucidées.

1.4.3.4 L'ubiquitination de la polycystine-1

L'ubiquitination est une PTM qui par un processus de réaction enzymatique engendre la fixation de l'ubiquitine sur des résidus lysines de protéines cibles causant la dégradation des protéines cibles via le complexe protéasome ou la voie lysosomale. En plus de contenir un domaine PEST permettant d'être ciblé pour la dégradation, des analyses *in vitro* ont permis de démontrer que le motif coiled-coil de PC-1 peut interagir avec la protéine Siah-1. Cette interaction permettrait de cibler PC-1 pour une dégradation dépendante de l'ubiquitine via le protéasome (H. Kim, Jeong, Ahn, Ahn, & Kang, 2004).

1.4.3.5 La palmitoylation de la polycystine-1

Une nouvelle modification post-traductionnel sur la polycystine-1 a récemment été découverte soit la palmitoylation (Roy & Marin, 2018). Cette PTM consiste à former une liaison covalente par l'ajout d'un acide soit l'acide palmitique sur un résidu de cystéine de la polycystine-1 en c-terminal suggérant ainsi un rôle pour l'expression et la localisation cellulaire de PC-1.

1.4.4 Les partenaires d'interactions intracellulaires de la polycystine-1

PC-1 est connue pour interagir avec de nombreux partenaires protéiques. Parmi ces partenaires, certains sont connus pour interagir via leur domaine extracellulaire de PC-1 tel que certaines composantes de la matrice extracellulaire (annexin, collagène, laminine, et fibronectine) (Retailleau & Duprat, 2014) cependant la majorité des partenaires de PC-1 interagissent via son domaine intracellulaire et plus particulièrement via son motif coiled-coil (voir le tableau 1.4). En effet, des analyses *in vitro* et *in vivo* ont permis d'identifier les protéines des filaments intermédiaires soit la vimentine, la cytokératine K8/K18 ainsi que la desmine comme étant des protéines interagissant avec la polycystine-1 (G. M. Xu et al., 2001). Ces interactions ont été démontrées comme étant toutes dépendantes de la présence du motif coiled-coil de PC-1 suggérant ainsi un rôle pour PC-1 dans la structure ainsi que la signalisation cellulaire. De plus, le motif coiled-coil de PC-1 a aussi été démontré comme partenaire d'interaction avec la protéine pascine-2 suggérant un rôle dans l'architecture du cytosquelette (Yao et al., 2014). Dans un autre ordre d'idée, une étude a permis de démontrer une interaction entre le facteur de transcription Jade-1 et le motif coiled-coil de PC-1 (Foy et al., 2012). À l'inverse de Siah-1 c'est PC-1 qui favoriserait

l'ubiquitination de Jade-1 pour sa dégradation via le protéasome. De plus, PC-1 via son motif coiled-coil, semble aussi interagir avec la protéine Rabep-1 ce qui favoriserait le transport, la maturation ainsi que son trafic intracellulaire (H. Kim et al., 2014).

Tableau 1.4 Partenaires protéiques interagissant le motif coiled-coil de PC-1

Partenaire de PC1	Localisation	Rôles	Références
Cytokératine K8/K18	Desmosome	Structure et signalisation	Xu et al, 2001
Desmine	Desmosome	Structure et signalisation	Xu et al, 2001
Vimentine	Complexe desmosome	Structure et signalisation	Xu et al, 2001
Pascine-2	Membrane Plasmique Cytoplasme	Organisation du cytosquelette et migration cellulaire	Yao et al, 2014
Siah-1	Intracellulaire	Dégradation de PC-1	Kim et al, 2004
Jade-1	Intracellulaire	Co-activateur de la transcription	Foy et al, 2012
Polycystine-2	Membrane plasmique Réticulum endoplasmique	Formation d'un canal ionique	Qian et al, 2006 ; Tsiokas et al, 1997
Rabep-1	Réticulum endoplasmique/ Golgi	Transport /Trafic	Kim et al, 2014

Mis à part les partenaires spécifiques au motif coiled-coil de la polycystine-1 plusieurs autres protéines ont été identifiées comme étant des partenaires d'interaction avec la polycystine-1 via son domaine intracellulaire en C terminale tels que les sous-unités des protéines G, les caténines, CHOP, JAK2, TAZ, etc. Voir le tableau 1.5 pour une liste plus détaillée.

Tableau 1.5 Partenaires protéiques interagissant avec le domaine intracellulaire de PC-1

Partenaire de PC1	Localisation	Rôles	Références
Arf4	Golgi et Membrane	Transport	H. H. Ward et al., 2011
Caténine (α, β, γ)	Jonction adhérente	Formation des jonctions adhérente et signalisation	Geng, Burrow, Li, & Wilson, 2000; Huan & van Adelsberg, 1999
CHOP	Intracellulaire	Régulation apoptose et prolifération	Merrick et al., 2012
Flotilin-2	Membrane Plasmique	Signalisation	Roitbak, Surviladze, Tikkanen, & Wandinger-Ness, 2005
G-protéines α	Membrane Plasmique	Transduction signal	Parnell et al., 1998
γ-Sécrétase	Réticulum endoplasmique	Transduction signal	Merrick et al., 2012
IP3R	Réticulum endoplasmique	Relâchement du Ca^{2+} à partir du réticulum endoplasmique	Y. Li et al., 2009
JAK2	Intracellulaire	Régulation cycle cellulaire	Bhunja et al., 2002
Na⁺-K⁺-ATPase	Membrane Plasmique	Flux Na^{2+} et K^{+} de l'épithélium rénal	Zatti et al., 2005
Nephrocystine-1 (NPHP1)	Cellule-Cellule, Cellule MEC, Cil primaire, jonction	Résistance à l'apoptose	Wodarczyk et al., 2010
P100	Cil primaire	Transduction signal	Low et al., 2006
PP1α	Intracellulaire	Régulation de la signalisation de PC-1	Parnell, Puri, Wallace, & Calvet, 2012
RGS7	Intracellulaire	Régulation négative de la signalisation des protéines G	E. Kim et al., 1999
RPTPγ	Cil primaire	Régulation PC-1	Boucher et al., 2011
TCF	Intracellulaire	Régulation de l'apoptose et de la prolifération	Merrick et al., 2012
TSC2	Intracellulaire	Régulation de mTOR	Dere, Wilson, Sandford, & Walker, 2010
TAZ	Membrane Plasmique, noyau et cytoplasme	Ostéoblastogénèse	Xiao et al., 2018

1.4.5 Structure protéique de la polycystine-2

La polycystine-2 (PC-2) est une protéine membranaire de 968 acides aminés beaucoup plus petite (110 kDa) que PC-1 (figure 1.6). Cette protéine est connue comme étant membre de la famille des canaux potentiels de récepteur transitoire (TRP). Elle contient 6 domaines transmembranaires qui

sont homologues aux canaux calciques voltages dépendant de la famille TRP (potentiel de récepteur transitoire) (Giamarchi et al., 2006). Initialement, PC-2 avait été rapportée comme étant un canal ionique qui permettait la conduction du Ca^{2+} (Cai et al., 2004). Cependant, des études récentes ont permis de démontrer que PC-2 conduirait des molécules cationiques monovalentes telles que le Na^+ , et le H^+ (Shen et al., 2016) plutôt que le Ca^{2+} . Le domaine N terminal et C terminal de PC-2 sont tous les deux intracellulaire. Alors que les caractéristiques de la portion N terminal sont encore peu connues, la séquence en C terminal de la protéine contient des motifs qui semblent être importants au fonctionnement de la protéine. En effet, elle contient un domaine *EF-hand* qui permet la liaison du Ca^{2+} et elle contient aussi un motif coiled-coil qui s'étend de l'acide aminé 832 à 895 (Yang & Ehrlich, 2016).

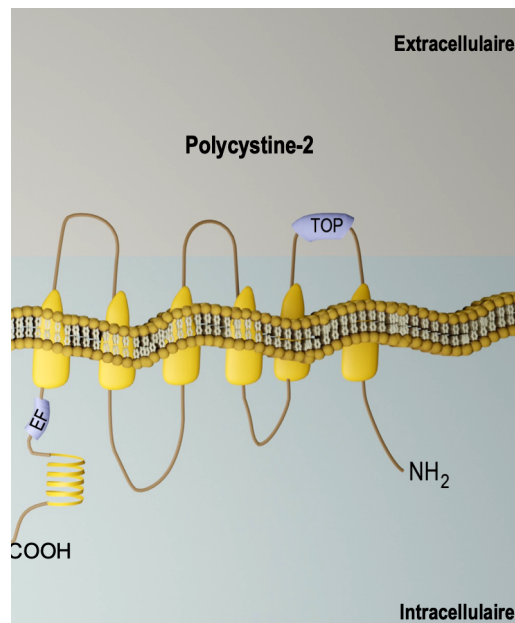


Figure 1.6 Représentation schématique de la polycystine-2

Les domaines et motifs connus de la polycystine-2 sont représentés sous forme d'un schéma. EF : domaine *EF-hand*, TOP : ouverture tétragonale pour les polycystines (Hardy & Tsiokas, 2020). Les 6 domaines transmembranaires et le motif coiled-coil sont représentés en jaune. *Illustration faite par moi-même avec l'aide de Rey Christian Pacis.*

1.4.6 Rôle et fonctions du complexe PC-1/PC-2

Comme mentionné un peu plus haut, le domaine coiled-coil de PC-1 est connu pour interagir avec le motif coiled-coil de PC-2 (Qian et al., 1997; Tsiokas et al., 1997). Des analyses de cristallographies ont révélé que PC-2 forme un homotrimer à travers son motif coiled-coil en plus de former un complexe avec PC-1 (Y. Yu et al., 2009). C'est-à-dire que pour une molécule de PC-

1, il y a 3 molécules de PC-2 (ratio 1 : 3) qui participent à la formation du complexe PC-1/PC-2. Soit, une mutation à l'intérieur d'un des deux domaines résulterait en la perte d'activité de la fonction du canal (Yang & Ehrlich, 2016). De plus, des analyses de structure ont révélé que les domaines transmembranaires de PC-2 sont homologues aux domaines transmembranaires 7 à 11 de la polycystine-1 favorisant ainsi l'assemblage de PC-1 avec les trimères de PC-2 (Z. Wang et al., 2019). Il a aussi été suggéré que les deux derniers domaines transmembranaires de PC-1 contribuent à la formation du pore du canal ionique PC-1/PC-2 (Q. Su et al., 2018). Certaines études suggèrent aussi que dans le complexe PC-1/PC-2, permettrait de produire un canal mécano-senseur détectant les changements pouvant se produire à l'extérieur de la cellule au niveau du cil primaire (Surya M. Nauli et al., 2003). De plus, PC-1 dans le complexe PC-1/PC-2 agirait aussi comme un récepteur de stimuli extracellulaires créé par des forces mécaniques ou encore par des ligands tels que Wnt (S. Kim et al., 2016). D'un autre côté, des études ont démontré que le complexe PC-1/PC-2 peut activer le récepteur de l'inositol triphosphate (IP3R) qui va permettre le relâchement du calcium provenant du réticulum endoplasmique au cytoplasme (D.Y. Kim and J.H. Park, 2016). PC-1 dans le complexe participerait à la diminution des niveaux de calcium intracellulaire en inhibant l'interaction de IP3R et PC-2.

1.4.7 Mécanisme de transport et de maturation des polycystines

Afin que la PC-1 puisse être fonctionnelle, celle-ci doit suivre un processus de maturation à travers lequel des modifications post-traductionnelles doivent survenir. Un mécanisme suggère que le complexe PC-1/PC-2 est en mesure de quitter le réticulum endoplasmique pour traverser l'appareil de Golgi, une fois que PC-1 est clivée au site GPS (H. Kim et al., 2014). Une fois dans ce compartiment, il y a plusieurs hypothèses dictant le transport des deux protéines. Certains chercheurs rapportent que le complexe traversera en acquérant maturité dans le trans-Golgi pour se rendre vers le post-Golgi ciblant ainsi les cils (Gainullin et al., 2015). D'autres suggèrent que PC-1 se défait du complexe et peut transiter vers le post-Golgi seul c'est-à-dire sans la présence de PC-2 (Hoffmeister et al., 2011), mais qu'une fois dans le post-Golgi, PC-2 viendrait à nouveau se lier à PC-1 pour se rendre soit dans les cils, dans la membrane plasmique ou encore dans les corps multi-vésiculaires pour ensuite être excrété dans les exosomes (Ong & Harris, 2015). De plus, il a été suggéré que le mécanisme de maturation de PC-1 serait dépendant de PC-2 (Gainullin et al., 2015). Chez la souris, lorsque le gène *Pkd2* est muté sur les deux allèles, Pc-1 ne peut se rendre

dans le cil primaire et la forme glycosylée de Pc-1 (mature) est absente (Gainullin et al., 2015). Ceci montre donc l'importance de la Pc-2 dans la maturation de Pc-1, et aussi l'importance de l'interaction entre Pc-1 et Pc-2. De plus, il est possible que la maturation de Pc-1 ne dépende pas uniquement de Pc-2, mais d'un autre partenaire qui se lie à Pc-2 et régule Pc-1 de manière indirecte. Ces résultats permettent aussi de penser que le domaine intracellulaire de Pc-1 pourrait être important pour sa maturation et son transport puisqu'il a été suggéré que les protéines interagissent via le motif coiled-coil de Pc-1. En bref, le processus de transport et de maturation du complexe ainsi que des protéines individuelles sont encore à l'étude.

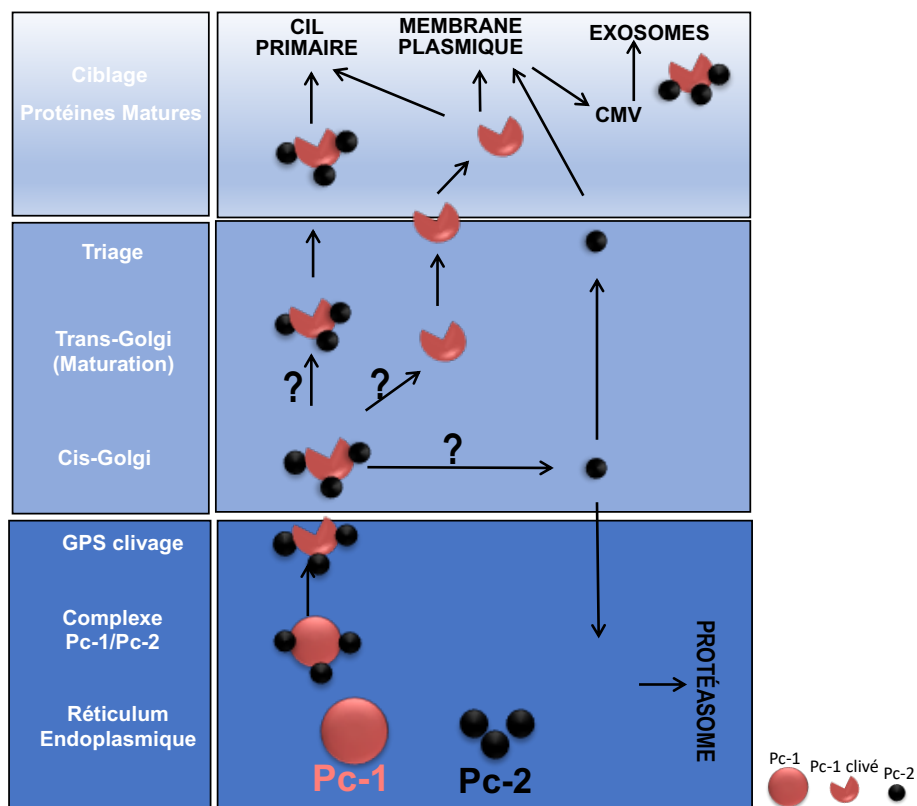


Figure 1.7 Résumé de la maturation et du transport intracellulaire de PC-1/PC-2

1) PC-1 (rouge) forme un complexe avec le trimère PC-2 (noir) dans le réticulum endoplasmique avant le clivage au site GPS de PC-1. 2) Le complexe est ensuite transporté dans le cis-Golgi où la maturité sera acquise en passant par le trans-Golgi. Un deuxième modèle suggère que PC-1 peut acquérir la maturité au trans-Golgi indépendamment de la présence de PC-2 et que PC-2 peut traverser le cis-Golgi sans acquérir la maturité au trans-Golgi. Le complexe pourrait se reformer au post-Golgi pour ensuite être ciblé et trié. Les différentes cibles de PC-1 et PC-2 sont le cil primaire, la membrane plasmique et les exosomes.

1.5 Modèle de souris PKRAD

Plusieurs modèles murins ont été générés afin de comprendre la pathogenèse de la PKRAD et ce dans le but de trouver de nouveaux outils thérapeutiques. Parmi ces modèles on y retrouve des modèles murins non orthologues et des modèles murins orthologues pour le gène *Pkd1* et *Pkd2*. Étant donné le nombre élevé de modèles murins PKRAD, la prochaine section résumera les modèles les plus utilisés au sein de la littérature.

1.5.1 Les modèles murins non orthologues

Comme mentionné plus haut, il existe plusieurs gènes qui lorsqu'ils sont mutés ou tronqués peuvent causer l'apparition de kystes rénaux et mener à la PKRAD. Ainsi, quelques modèles de souris non orthologues ont été générés dans le but d'étudier l'effet de ces gènes dans la PKRAD. Soit, un des premiers modèles murins non orthologues qui a été mis en évidence est le modèle transgénique SBM. Ce modèle de souris transgéniques consiste en une combinaison d'éléments régulateurs de l'enhancers *SV40(S)*, du promoteur humain minimal de la bêta-globine(B) joint au gène murin *c-myc* (M) (Trudel, D'Agati, & Costantini, 1991). Cette fusion SBM engendre une dérégulation l'expression du proto-oncogène *c-myc* dans l'épithélium rénal des souris transgéniques SBM. Cette augmentation rénale du gène *c-myc* résulte en la formation de kystes rénaux dans plusieurs lignées indépendantes de souris transgéniques avec des symptômes rénaux comparables à la forme humaine PKRAD. En effet, ces souris présentent des kystes rénaux bilatéraux avant la naissance, une glomérulosclérose progressive, une hyperplasie épithéliale des tubules rénaux ainsi que des micro-adénomes dans les tubules rénaux. Ultimement, ces souris décèdent d'insuffisance rénale vers l'âge de 3-4 mois. D'autres modèles murins non orthologues ont aussi été générés tels que le modèle *Kif3a* : cre^{Ksp} . Ce modèle murin engendre l'inactivation spécifique dans le rein du gène *kif3a* qui encode pour la sous-unité de la kinésine II soit une protéine essentielle à la formation du cil primaire (F. Lin et al., 2003). Ainsi, l'inactivation de ce gène engendre l'apparition de la PKRAD avec un remplacement du parenchyme rénal par de très gros kystes.

1.5.2 Les modèles orthologues *Pkd1*

1.5.2.1 Les modèles knock-out

Plusieurs études ont démontré que les souris qui portent une mutation homozygote pour le gène *Pkd1* et même pour le gène *Pkd2* sur chacun des deux allèles ne sont pas viables. Par exemple, les mutants *Pkd1*^{del34}(W. Lu et al., 1999), *Pkd1*^{del43}(K. Kim, Drummond, Ibraghimov-Beskrovnaya, Klinger, & Arnaout, 2000), *Pkd1*^{del17}(Boulter et al., 2001), *Pkd1*^{del2-6}(Muto et al., 2002), *Pkd1*^{del2-11}(Lantinga-van Leeuwen et al., 2007), *Pkd1*^{null}(Weining Lu et al., 2001) et *Pkd1*^{ΔL}(Parnell et al., 2018) pour le gène *Pkd1* et *Pkd2*^{null}(Wu et al., 1998), *Pkd2*^{LacZ}(Pennekamp et al., 2002), *Pkd2*^{d3}(I. Kim et al., 2009) pour le gène *Pkd2*. En effet, lorsque ces souris sont homozygotes pour ces mutations, elles développent des kystes à un stade embryonnaire et meurent en période périnatale ou à la naissance. Cependant, les souris hétérozygotes développent très peu (un ou deux) ou pas de kystes et vivent jusqu'à plus d'un an d'âge (Wu et al., 2002). Ainsi, il est donc possible d'associer la formation de kystes chez les souris PKRAD à une perte de fonction du gène et de la protéine Pc-1 ou Pc-2.

1.5.2.2 Les modèles d'inactivation conditionnel

Dans le but d'éviter la létalité embryonnaire observée par les modèles murins *Pkd1*^{-/-} et *Pkd2*^{-/-}, plusieurs modèles d'inactivation conditionnels pour les gènes *Pkd1* et *Pkd2* ont été générés. Soit l'approche utilisée est le système de recombinaison Cre-LoxP. Ce système permet la délétion spécifique des gènes *Pkd1* ou *Pkd2* sur les deux allèles, et ce dans les tissus spécifiques où le promoteur de la Cre recombinase est actif. Plusieurs modèles de *knock-out* pour un tissu spécifiques ont été obtenus en croisant des souris avec des exons qui sont dits « floxés » (c'est-à-dire l'exon cible flanqué de séquences lox P) (Starremans et al., 2008) pour le gène *Pkd1* ou *Pkd2*. Ensuite, ces souris « floxées » sont croisées par des souris qui expriment un transgène tel que Cre sous le contrôle d'un promoteur tissu spécifique comme le rein (Lantinga-van Leeuwen et al., 2007). Parmi les modèles conditionnels, il y a des modèles inductibles et non inductibles pour les gènes *Pkd1* et *Pkd2*. Puisque l'inactivation des gènes prend place dès que le promoteur de la Cre est actif, les modèles murins conditionnels non inductibles montrent généralement une progression variable des kystes (de lent à rapide) (Shibazaki et al., 2008). Le système de recombinaison Cre-LoxP inductible permet d'activer la recombinase Cre à un moment spécifique par exemple en utilisant un agent

inductible durant le développement postnatal ou encore chez les souris adultes (Lantinga-van Leeuwen et al., 2006) (Ayumi Takakura, Contrino, Beck, & Zhou, 2008) (I. Kim et al., 2009). Avec ce système, lorsque le gène *Pkd1* est inactivé avant le jour postnatal 13(P13) chez les souris, ceux-ci développent rapidement des kystes et décèdent dans les semaines suivantes de polykystose rénale (Piontek et al, 2007). Par contre lorsque le gène est inactivé après P13 les souris développent peu ou pas de kyste et survivent jusqu'à plus d'un an d'âge. Ainsi, ce modèle a permis de produire des souris avec un phénotype kystique plus tardif.

1.5.2.3 Les modèles hypomorphiques

Les modèles murins hypomorphiques sont des modèles pour lesquelles les produits des gènes *Pkd1* ou *Pkd2* soit Pc-1 et Pc-2 sont synthétisés en plus faibles quantités par toutes les cellules générant ainsi une protéine moins active et moins fonctionnelle. Ces modèles survivent la létalité embryonnaire observée par les mutants homozygotes *Pkd1*^{-/-} et *Pkd2*^{-/-}, mais développent toutefois un phénotype de PKRAD (Lantinga-van Leeuwen et al., 2004). Un des premiers modèles murins qui a été démontré comme étant un hypomorphe est le modèle *Pkd1*^{nl/nl}. En effet, par ciblage génétique, le mutant *Pkd1*^{nl} a été généré en introduisant une cassette *néo* qui contient le gène de résistance à la néomycine dans l'intron 1 du gène *Pkd1* flanqué par des sites Lox P. Un troisième site de Lox P a été ajouté dans l'intron 11 ce qui engendre la délétion de l'exon 2 à 11 du gène *Pkd1* (Lantinga-van Leeuwen et al., 2004). Alors que les souris hétérozygotes pour la mutation ne présentent pas de phénotype, les souris homozygotes quant à elles présentent un phénotype typique de la PKRAD avec les reins dilatés et les tubules kystiques. Ce modèle murin a permis de démontrer que l'insertion intronique de la cassette *néo* dans le gène *Pkd1* cause un épissage alternatif étant donné que 15-20 % du transcrit est correctement épissé chez les mutants homozygotes. Ainsi, ce modèle de souris hypomorphe a permis de démontrer qu'une faible expression du gène *Pkd1* sauvage est suffisante afin de surmonter la létalité embryonnaire observée chez les souris *Pkd1*^{null}, cependant elles développent toutefois la PKRAD avec des reins kystiques et des phénotypes extrarénaux.

Les modèles hypomorphiques se sont aussi avérés être très importants pour l'étude et la compréhension de la fonction des domaines de Pc-1. Soit, le modèle de souris *Pkd1*^V présente une mutation au site HL* T³⁰⁴¹ du gène *Pkd1* (S. Yu et al., 2007). Cette mutation faux-sens change la

thréonine pour une valine dans sa séquence et empêche ainsi la protéine endogène d'être clivée au site GPS. Les souris transgéniques pour lesquelles la mutation est présente dans les deux allèles ($Pkd1^{v/v}$) développent des kystes rénaux à partir de P3 et présentent un phénotype similaire à la PKRAD. Ainsi, les souris $Pkd1^{v/v}$ exprimant uniquement la forme non clivée de la Pc-1 ont permis de démontrer l'importance du clivage au site GPS dans la prévention de la PKRAD. Pour continuer, un autre modèle hypomorphe a été généré soit le modèle $Pkd1^{RC/RC}$ ce modèle présentant une mutation résultante à une substitution d'acide aminé similaire à une mutation qui a été observée chez les patients PKRAD soit le variant pR3277C ($Pkd1$ c.9805.9807AGA > TGC) (Hopp et al., 2012). Cet hypomorphe développe graduellement la PKRAD avec des reins kystiques sur un an. L'analyse de cet hypomorphe a aussi permis d'associer ces mutations à des défauts de repliement protéiques et de transports de la polycystine-1 (Gainullin et al., 2015).

1.5.2.4 Les modèles de surexpressions

Puisque PC-1 et PC-2 peuvent se trouver à des niveaux élevés dans la majorité des kystes rénaux chez les patients PKRAD, des modèles de souris transgéniques ont été générés afin d'étudier si une expression élevée pouvait causer la PKRAD. Les premières souris transgéniques pour le gène *Pkd1* ont été générées à partir d'un chromosome bactérien artificiel (BAC) qui contenait le gène *Pkd1* murin. Ce BAC a été modifiée par recombinaison homologue afin d'y insérer une mutation silencieuse au niveau protéique et de distinguer le transgène versus l'endogène au niveau nucléotidique. Ainsi, trois lignées de souris transgéniques ($SBPkd1_{TAG}$) ont été générées où le transgène $Pkd1_{TAG}$ est surexprimé de 2 à 15 fois de plus que l'endogène dans les reins (Thivierge et al., 2006). Ces souris ont été le premier modèle de surexpression rénal du gène orthologue *Pkd1* avec un phénotype PKRAD comparable à ce qui est observé chez l'humain. En effet, ces souris présentent des kystes rénaux bilatéraux, de la fibrose interstitielle, des infiltrats lymphoïdes péri vasculaire et décèdent éventuellement d'insuffisance rénale après quelques mois. Dans le même ordre d'idée, un autre modèle de souris fort intéressant fut généré à partir du même principe soit le modèle de souris $Pkd1_{TAG}$ (Kurbegovic et al., 2010). Le transgène $Pkd1_{TAG}$ a été généré à partir d'un chromosome artificiel bactérien (BAC) où le gène *Pkd1* murin fut modifié par deux recombinaisons homologues. La première recombinaison avait pour but d'y retirer le gène TSC2 et la deuxième avait pour but d'y insérer une mutation silencieuse « TAG » dans l'exon 10 du gène

Pkd1. La construction transgénique nommée *Pkd1*_{TAG} a été micro-injecté dans des œufs fertilisés de souris et 3 lignées *Pkd1*_{TAG} ont été produit contenant entre 2 et 16 copies du transgène. L'analyse de ces souris a permis d'observer une augmentation de l'expression systémique de l'ARNm du gène *Pkd1* et de la protéine Pc-1. De plus, ces souris développent la PKRAD avec une sévérité corrélant au nombre de copies. C'est-à-dire que la lignée qui a plus haut nombre de copies soit les souris *Pkd1*_{TAG26} avec 16 copies présentent un phénotype plus sévère que les souris *Pkd1*_{TAG6} avec 2 copies. Ainsi, ces résultats obtenus ont permis de suggérer que le développement de la maladie pouvait être dû à un niveau d'expression du gène *Pkd1*. Des modèles de souris transgéniques ont aussi été effectués avec le gène *Pkd2* et comme ce qui est observé chez l'humain les phénotypes rénaux étaient beaucoup plus tardifs tels qu'observés chez les patients PKRAD portant des mutations sur le gène *Pkd2* (Park et al., 2009).

1.6 Les voies de signalisations impliquées dans la PKRAD

Plusieurs voies de signalisations sont impliquées dans la PKRAD. Parmi les différentes voies de signalisations d'activée, il y a les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). Comme mentionné dans la section 1.4, la PC-1 est considéré comme une protéine G atypique puisqu'elle présente des similarités avec les GPCR. En effet, PC-1 peut lier les sous-unités *Gai/o*, *Gas*, et *Ga12/13* des protéines G via son domaine GBD en C terminal (Hama & Park, 2016). De plus, il a même été démontré que ces interactions permettaient l'activation des voies de signalisation c-Jun H kinase et la voie de signalisation du facteur de transcription de la protéine activatrice 1 (AP-1) qui a leur tour permettent de réguler plusieurs mécanismes cellulaires tels que la différenciation, la prolifération et l'apoptose. Il a aussi été suggéré que des mutations de PC-1 et même de PC-2 pourraient initier anormalement la signalisation des protéines G dans la PKRAD. Par exemple, il a été démontré que l'activateur de la signalisation des protéines G 3 (AGS3) est surexprimé dans les reins des patients PKRAD (Nadella et al., 2010) et même récemment dans leur exosomes urinaire (Keri, Regner, Dall, & Park, 2018). Dans le même ordre d'idée, la voie de signalisation Wnt est aussi dérégulée dans la PKRAD. En effet, une augmentation de la voie Wnt a été observée dans les kystes des patients PKRAD (A. Li et al., 2018). Tandis qu'en situation normale, il a été suggéré que la portion soluble du fragment C terminal de PC-1 agirait comme un régulateur négatif de la signalisation canonique de Wnt en formant un complexe avec la β -caténine(Lal et al., 2008).

Plusieurs modèles d'études animales et même auprès de patients PKRAD ont permis de démontrer que la voie de signalisation de mTOR est augmentée dans la PKRAD (Ibraghimov-Beskrovnaya & Natoli, 2011; Torres et al., 2010). Cette activation a été démontrée par une augmentation de la phosphorylation de la protéine ribosomale S6 (RPS6K), 4E-BP1 ainsi que Akt (Distefano et al., 2009; Liu et al., 2018; Margaria et al., 2020). De plus, en condition normale, il a aussi été démontré que le fragment C terminal de PC-1 peut interagir avec les composantes du complexe TSC1/TSC2 causant l'inhibition de l'activité de mTOR (Dere et al., 2010). De ce fait, en situation PKRAD où PC-1 serait muté, l'interaction entre PC-1 et le complexe TSC1/TSC2 seraient altérée dû à une perte de fonction de PC-1 et résulterait en une augmentation de l'activité de mTOR favorisant ainsi la croissance des kystes et la prolifération cellulaire. Finalement, il est aussi connu que les niveaux intracellulaires d'AMPc sont augmentés dans la PKRAD autant chez l'humain que chez les modèles animaux (Saigusa & Bell, 2015). En effet, il a été démontré que l'AMPc favorise d'une part la prolifération des cellules épithéliales en activant d'une part la voie de signalisation B-Raf/MEK/ERK (Chebib, Sussman, Wang, Harris, & Torres, 2015) et d'autre part en causant une sécrétion anormale de fluide qui mène à l'expansion des kystes dans la PKRAD.

1.7 Les mécanismes cellulaires dans la PKRAD

1.7.1 La prolifération

Plusieurs mécanismes cellulaires sont affectés dans la PKRAD. La prolifération cellulaire est l'un des mécanismes le plus dérégulée dans la maladie (Lee, 2016). Effectivement, que ce soit chez l'humain ou les modèles animaux, dans la PKRAD la prolifération est augmentée de manière significative (Saigusa & Bell, 2015). Cette augmentation est principalement due aux dérégulations dans les diverses voies de signalisations : Wnt, mTOR, AMPc et protéine G telle que mentionnée dans section précédente.

1.7.2 L'apoptose

En plus de la prolifération cellulaire, il a aussi été montré que l'apoptose est dérégulée dans la PKRAD (Lee, 2016). En effet les marqueurs spécifiques de l'apoptose soient les caspases 3, 7 et 8

ainsi que le cytochrome C sont anormalement élevés dans la PKRAD (Lanoix, D'Agati, Szabolcs, & Trudel, 1996), ce qui suggère une augmentation de l'apoptose dans la maladie. Il a même été proposé que la présence d'apoptose dans les reins PKRAD contrairement aux reins normaux non kystiques jouerait un rôle dans la perte des néphrons lors du développement des kystes (Woo, 1995).

1.7.3 L'inflammation

Typiquement dans la PKRAD, il a été reporté que plusieurs molécules associées à l'inflammation et la fibrose sont augmentées (Mun & Park, 2016). Parmi les molécules qui sont impliquées dans l'inflammation il y a le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) en plus de jouer un rôle sur l'activation de mTOR cette cytokine semble être présente dans le fluide des kystes des patients PKRAD. Elle serait aussi impliquée dans la progression des kystes dans la maladie, et ce en inhibant les interactions entre PC-1 et PC-2 (X. Li, Magenheimer, et al., 2008). Certaines études ont aussi démontré que le facteur nucléaire (NF)- κ B, soit un facteur de transcription impliqué dans la survie cellulaire et la réponse immunitaire est augmenté dans la PKRAD engendrant une réponse inflammatoire dans la maladie (Qin, Taglienti, Cai, Zhou, & Kreidberg, 2012). De plus, la voie JAK-STAT qui est normalement activée lors de l'inflammation a été suggérée comme l'un des facteurs qui contribue à la formation de kystes dans la PKRAD (Weimbs & Talbot, 2013). Par exemple, une augmentation de l'activité de STAT3 a été observée dans les reins de modèles murins PKRAD et même chez les patients (A. Takakura et al., 2011). D'ailleurs, une étude a démontré que la queue cytoplasmique de PC-1 régule l'activation de STAT3 via la protéine tyrosine kinase Src (Talbot et al., 2014).

1.7.4 La fibrose

La fibrose est caractérisée par une production excessive et une accumulation de collagène accompagné par une décomposition des tissus connectifs. Dans la PKRAD, la fibrose est causée par une abondance de TGF- β (Leonhard et al., 2016) et une diminution des marqueurs de transition épithéliale mésenchymateuse (EMT) dans les cellules kystiques ce qui mène à l'insuffisance rénale terminale (Fragiadaki, Macleod, & Ong, 2020).

1.7.5 L'autophagie

Finalement, des études *in vitro* et *in vivo* permettent de croire que l'autophagie serait aussi impliquée dans la PKRAD (Nowak & Edelstein, 2019). En effet, une étude *in vitro* a démontré que les cellules humaines déficientes pour le gène *PKDI* présentent une diminution d'autophagosome et d'autolysosome (Zhu, Sieben, Xu, Harris, & Lin, 2017). Soit, après un traitement avec la bafilomycine A1 (inhibiteur de lysosome empêchant la fusion entre autophagosome et le lysosome) les mutants n'ont pas réussi à augmenter les niveaux de LC3II aussi efficacement que les contrôles sauvages suggérant ainsi un déficit du flux autophagique ainsi qu'une accumulation d'agrégats protéiques chez ces mutants.

1.8 Les mécanismes pathogénétiques de la PKRAD

Les mécanismes pathogénétiques qui causent l'apparition des kystes auprès des personnes atteintes de la PKRAD sont encore méconnus. Il existe cependant trois hypothèses proposées, soit le mécanisme du « *two-hit* », le dosage fonctionnel et la nécessité des facteurs non génétiques.

1.8.1 Le mécanisme du *two-hit*

Chez les patients PKRAD, moins de 10 % des néphrons sont kystiques, et ce malgré la présence d'une mutation germinale à l'intérieur d'un des allèles du gène *PKDI* ou *PKD2* (Reeders, 1992). Chez la souris, la présence d'une mutation dominante n'est pas suffisante pour initier la formation des kystes et causer l'apparition d'un phénotype PKRAD. Le mécanisme du *two-hit* a été proposé afin d'expliquer la kystogénèse engendrée par la perte d'hétérozygotie chez différents modèles murins PKRAD. Soit, l'hypothèse du *two-hit* suggère que la kystogénèse prend forme lorsqu'une mutation somatique se produit et engendre le *knock-out* du deuxième allèle normal PKRAD. Chez l'humain, cette hypothèse fut appuyée par la présence de mutation somatique pour le gène *PKDI* ou *PKD2* dans environ 16 à 24 % des kystes rénaux (Pei et al., 1999) et hépatiques (Watnick et al., 1998) de patients PKRAD. Elle fut par la suite validée par des modèles murins conventionnels de *knock-out* où la perte des deux copies du gène *Pkd1* ou *Pkd2* engendre la formation de kystes dans les reins en développement tel que décrit dans la section 1.5. Cependant, le modèle du *two-hit* a fait

l'objet de plusieurs débats dans la littérature, et n'est plus accepté à ce jour. En effet, si on prend l'exemple des modèles murins d'ablation génique conditionnel, ils viennent réfuter totalement cette hypothèse, car lorsque la mutation apparaît après P13, les souris n'ont peu ou pas de kystes comme indiqué plus haut alors que chez l'humain les kystes progressent avec l'âge. Ceci suggère ainsi un autre facteur causant l'apparition des kystes.

1.8.2 Le mécanisme de dosage fonctionnel

Le mécanisme de dosage fonctionnel est une hypothèse de pathogénèse qui semble pouvoir expliquer la cause d'apparition des kystes dans la PKRAD. En effet, des analyses ont permis d'observer une augmentation de l'expression de PC-1 dans les reins de certains patients PKRAD suggérant ainsi un mécanisme de dosage pour le gène *PKDI* dans la maladie (Geng et al., 1996; C. J. Ward et al., 1996). De plus, de manière surprenante l'expression des polycystines dans les kystes s'est avéré être variable. Soit, il a été observé que certains kystes surexprime PC-1 ou PC-2 alors que d'autres kystes ne présentent aucune expression (Ong, Ward, et al., 1999). Ces observations sont importantes puisqu'elles démontrent qu'il y a un effet de dosage dans la pathogénèse de la maladie. De plus, une étude faite auprès de deux familles consanguines ont permis de détecter différentes mutations tronquantes pour le gène *PKDI*. L'analyse de ces cas ont permis de démontrer une variation dans la sévérité de la maladie possiblement dû à une pénétrance incomplète pour l'allèle *PKDI* (Sandro Rossetti et al., 2009). Chez la souris, le mécanisme de dosage fut appuyé par les modèles de surexpressions tel que les souris *Pkd1_{TAG}*, où la sévérité du phénotype PKRAD corrèle avec le niveau d'expression du transgène (Kurbegovic et al., 2010) De plus, les modèles hypomorphiques ont aussi permis de démontrer qu'une diminution du niveau d'expression du gène *Pkd1* était suffisante pour causer l'apparition d'un phénotype PKRAD tels que les modèle *Pkd1^{nl}* et *Pkd1^{RC}*.

1.8.3 Les facteurs non génétiques

Un troisième mécanisme qui nécessite la présence de facteurs non génétiques a été proposé dans le but de justifier la pathogénèse des modèles murins PKRAD. Ce mécanisme cherche à expliquer pourquoi l'inactivation somatique du gène *Pkd1* ne provoque pas ou très peu de kystes après P13

ou chez la souris adulte. De ce fait, ce mécanisme non identifié a été introduit en suggérant que la progression rapide des kystes serait enclenchée par d'autres facteurs tels que des facteurs environnementaux, des gènes modificateurs des lésions ischémiques et néphrotoxiques tous identifiés comme des événements causant un stress et menant à la croissance des kystes (S. Rossetti et al., 2007).

2. Mon Projet de Recherche

2.1 Mise en situation

L'implication des différents domaines de la polycystine-1 (PC-1) dans le développement de la polykystose rénale autosomique dominante est encore peu connue à ce jour. Cependant, parmi tous les différents domaines de PC-1, son domaine intracellulaire en C terminal semble être le plus important. En effet, en plus d'être impliqué dans diverses voies de signalisations, son domaine intracellulaire est connu pour interagir avec de nombreux partenaires protéiques. Comme il a été mentionné précédemment, des évidences suggèrent que PC-1 peut interagir avec la polycystine-2 (PC-2) via son motif coiled-coil en C terminal (Qian et al., 1997). De plus, l'importance de ce motif dans la PKRAD a été suggérée par des mutations dans ce motif chez des patients PKRAD. Cependant son implication dans la pathogenèse menant à l'apparition de la maladie demeure encore méconnue.

2.1.1 Données préliminaires

Dans le laboratoire plusieurs modèles de souris ont été générés afin d'étudier les mécanismes moléculaires dans la PKRAD. Soit, à partir d'un chromosome artificiel bactérien (BAC) le gène *Pkd1* murin a été modifié par recombinaison homologue afin d'obtenir un fragment $Pkd1_{TAG}$ dépourvu du vecteur BAC et d'en produire trois lignées de souris transgéniques soit $Pkd1_{TAG}$ 6, 18 et 26 (Kurbegovic et al., 2010). Ces souris transgéniques expriment entre 1 et 16 copies du transgène $Pkd1_{TAG}$. L'analyse des trois lignées de souris $Pkd1_{TAG}$ montre une stabilité au niveau de l'expression des transcrits et de la protéine Pc-1. De plus, ces souris développent les phénotypes rénaux et extrarénaux la PKRAD (Kurbegovic et al., 2010) avec une sévérité qui corrèle avec le nombre de copies. À partir du BAC- $Pkd1_{TAG}$, un fragment de $Pkd1_{TAG}$ délété des 25 acides aminés du motif coiled-coil a été produit et micro-injecté dans les ovocytes de souris pour générer 4 lignées de souris transgéniques $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$. Les lignées $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 30, 32 et 49 présentent 1 copie du transgène alors que la lignée $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 42 contient 35 copies. Les analyses préliminaires faites sur ces souris indiquent que les souris surexprimant le transgène $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ ne développent pas la PKRAD et survivent même à plus d'un an d'âge contrairement aux souris transgéniques $Pkd1_{TAG}$

qui développement la PKRAD et décèdent à 5-7 mois. De plus, les analyses moléculaires effectuées sur ces souris indiquent un niveau d'expression stable du transcrit $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ ainsi qu'une corrélation avec le nombre de copies du transgène (figure 2.1).

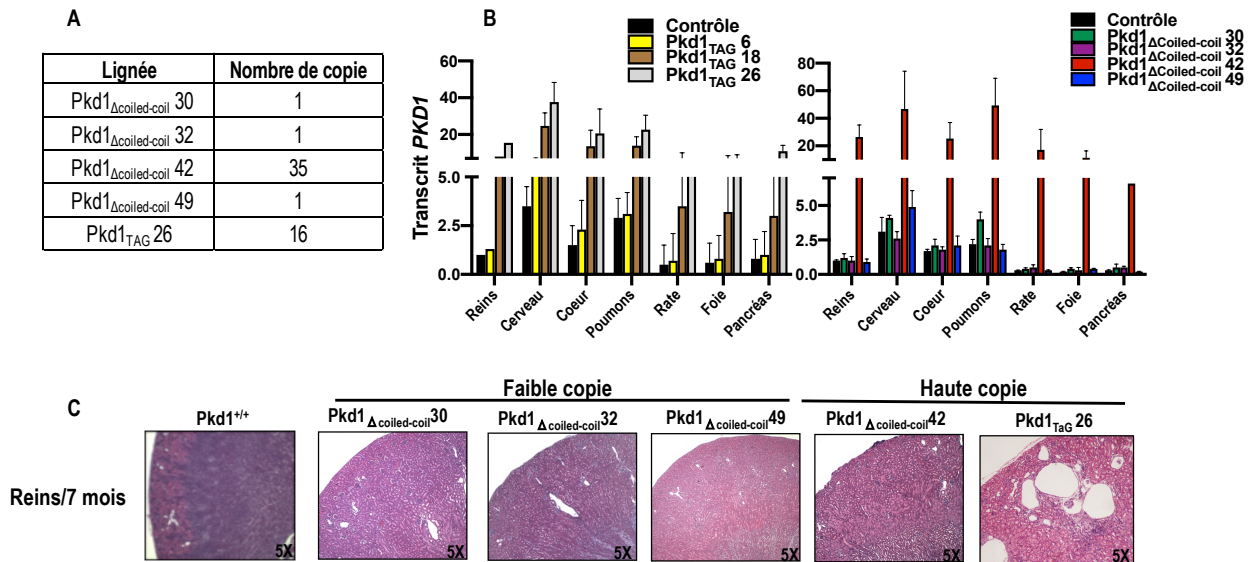


Figure 2.1 Analyse préliminaire des souris mutantes $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$

A) Nombre de copie de transgène pour chacune des lignées. B) Analyse de l'expression relative du transcrit $Pkd1_{\text{TAG}}$ (à gauche) et $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ (à droite) avec le contrôle normalisateur S16 effectuée par PCR quantitatif dans différents organes (reins, cerveau, cœur, poumon, rate, foie et pancréas). C) Coupe histologique de rein de souris contrôle ($Pkd1^{+/+}$), $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ 30, 32, 42 et 49, $Pkd1_{\text{TAG}}$ 26 à 7 mois. Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine. Les résultats préliminaires présentés en B et C ont été obtenus par le laboratoire de Dr Trudel.

Par la suite, le laboratoire a généré des souris mutantes nulles pour le gène $Pkd1$ ($Pkd1^{-/-}$) et les ont croisés avec les souris transgéniques $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ 30, 32, 42, et 49 ainsi que le contrôle $Pkd1_{\text{TAG}}$ 26 afin d'analyser le transgène $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ indépendamment du gène endogène. Il est à noter que les souris $Pkd1^{-/-}$ développent des kystes dès le jour embryonnaire 15.5 (e15.5) et décèdent avant ou à la naissance (P0). Le transgène $Pkd1_{\text{TAG}}$ 26 confère une complémentation totale du phénotype de polykystose rénale qui est observée chez les souris $Pkd1^{-/-}$ de la naissance à plusieurs mois d'âge (figure 2.2 a). Ensuite, le transgène $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ compense aussi la létalité néonatale des souris $Pkd1^{-/-}$, toutefois, le degré de compensation est en fonction du nombre de copies du transgène. Soit, à 1 copie du transgène $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$, les souris tri- transgéniques développent la polykystose rénale et décèdent ~13-14 jours postnatal (figure 2.2 a et b). Cependant, à ~35 copies, ces souris ne développent pas de kystes et survivent à plus d'un an (figure 2.2 f). Les résultats préliminaires sur la figure 2.2 montrent l'implication intrinsèque du motif coiled-coil dans le

développement précoce de la polykystose rénale et supportent un mécanisme de dosage de Pc-1 dans la maladie.

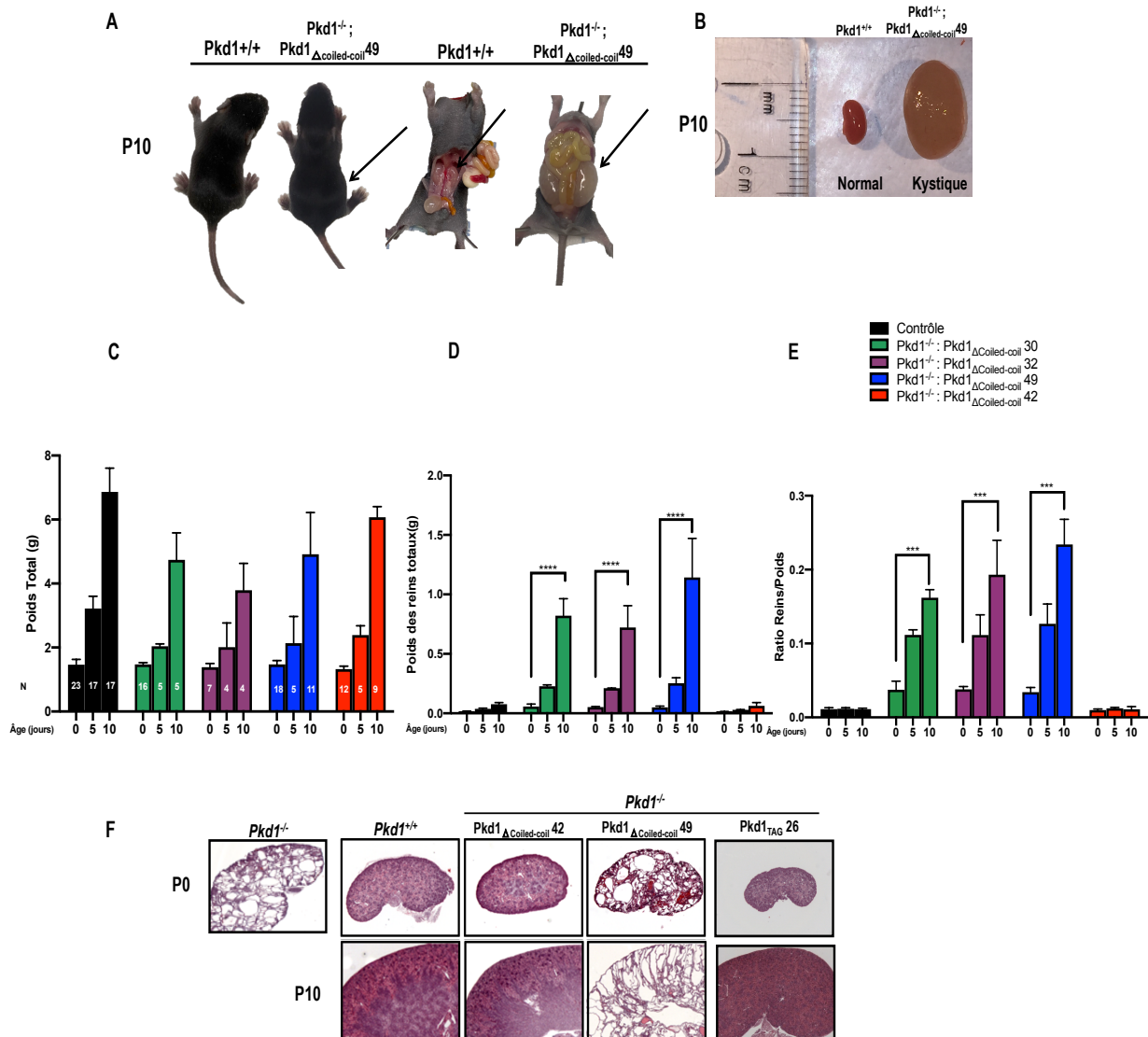


Figure 2.2 Analyse préliminaire des souris mutantes $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$

A) Photographie de deux souris à 10 jours post-natal (P10), soit une souris sauvage $Pkd1^{+/+}$, et une souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 49 avec un phénotype sévère PKRAD. B) Photographie d'un rein provenant d'une souris $Pkd1^{+/+}$ (à gauche) et d'une souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 49 (à droite). C) Comparaison du poids total des souris contrôle $Pkd1^{+/+}$ (noir) au souris mutante $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 30 (vert), $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 32 (mauve), $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 49 (bleu) et $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 42 (rouge). D) Comparaison du poids total des reins des souris contrôle $Pkd1^{+/+}$ (noir) au souris mutante $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 30 (vert), $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 32 (mauve), $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 49 (bleu) et $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 42 (rouge). E) Ratio relatif du poids des reins totaux sur la masse total souris contrôle $Pkd1^{+/+}$ (noir) au souris mutante $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 30 (vert), $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 32 (mauve), $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 49 (bleu) et $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 42 (rouge). Le n pour C, D et E est inscrit en blanc sur la figure C. F) Coupe histologique de rein à la naissance (P0) et à P10 des souris $Pkd1^{+/+}$, $Pkd1^{-/-}$, $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 42, $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 49 et $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{TAG}$ 26. Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine. F est un résultat obtenu par le laboratoire de Dr Trudel.

*** P value ≤ 0.001 , **** P value ≤ 0.0001 .

2.2 Objectifs

L'objectif de mon projet de recherche est de définir le rôle *in vivo* du motif coiled-coil dans la fonction physiologique de Pc-1 ainsi que son implication dans la kystogénèse menant à la PKRAD. La souris étant utilisée comme modèle d'étude permettra des analyses *in vivo* et *ex vivo* du transgène Pkd1 Δ coiled-coil. Ainsi, une étude approfondie sur les modifications post traductionnel de Pc-1 ainsi que sur les mécanismes moléculaires (ex. interactions protéiques) et cellulaires (ex. autophagie, ER stress) impliqués dans la PKRAD seront effectués.

2.3 Approche expérimentale

Dans le but d'étudier la fonction du motif coiled-coil dans la PKRAD, j'ai utilisé plusieurs approches combinées biochimiques et de biologie moléculaire. En effet, j'ai effectué des croisements sur un fond génétique Pkd1^{+/-} afin d'obtenir des souris tri-transgéniques Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil (knock-out; transgéniques) ainsi que leurs contrôles Pkd1^{-/-}; Pkd1_{TAG} imitant des situations « knock-in » et mutations humaines. Ces croisements ont été effectués dans le but d'obtenir des tissus provenant des souris binaires et afin d'établir des lignées de fibroblaste primaires (MEFs) à partir de ces souris au stade embryonnaire 13.5. Les tissus rénaux obtenus à P0, à P10 et les MEFs (à e13.5) ont été étudiés en parallèle afin de déterminer dans un premier temps les niveaux d'expression de Pc-1 Δ coiled-coil et de Pc-2. La caractérisation du transport intracellulaire dans les exosomes et la maturation de la Pc-1 Δ coiled-coil en comparaison avec le contrôle Pkd1_{TAG} et Pc-1 endogène ont aussi été analysés et ce en étudiant diverses modifications post-traductionnelles de déglycosylation et du clivage auto protéolytique. De plus, l'interaction entre Pc-1 et Pc-2 sera étudiée afin de déterminer si la délétion du motif coiled-coil de Pc-1 prévient les interactions entre ces partenaires. Des analyses préliminaires sur le potentiel de repliement et la structure de Pc-1 Δ coiled-coil selon une réponse de sensibilité à la température ont été effectuées dans le but de déterminer si la Pc-1 Δ coiled-coil cause un stress au niveau du réticulum endoplasmique ou induit de l'autophagie.

3. Matériel et Méthode

3.1 Production de souris transgéniques

Notre laboratoire a préalablement isolé le gène *Pkd1* murin (129 Sv) cloné dans un chromosome artificiel bactérien (BAC) chez la souche *E. coli* DH10B (Thivierge et al., 2006). Une fois isolé, ce BAC-*Pkd1* a été modifié par l'approche de recombinaison homologue. Une première recombinaison homologue avait pour but d'insérer une mutation silencieuse un «TAG» dans l'exon de 10 en substituant le nucléotide G par le nucléotide A générant ainsi un site de restriction *EcoRI*. L'insertion de cette mutation permettra de différencier ultérieurement le gène endogène du transgène appelé *Pkd1*_{TAG}. Une deuxième construction soit le *Pkd1*_{Δcoiled-coil} a été générée également par recombinaison homologue à partir du BAC-*Pkd1*_{TAG}. Cette construction a permis la délétion de 75 nucléotides dans l'exon 46 correspondant au motif coiled-coil (acide aminé 4212-4236) du gène *Pkd1* initié par Côté, O (Côté, 2009).

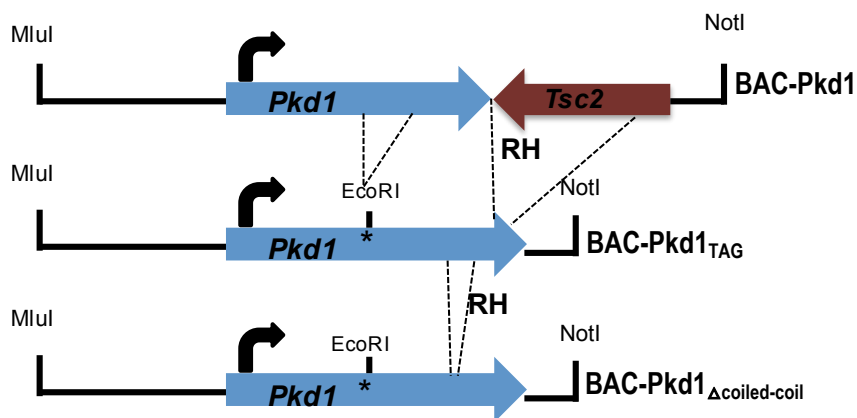


Figure 3.1 Représentation schématique de la construction d'ADN du BAC- *Pkd1*_{Δcoiled-coil} par recombinaison homologue.

À partir du BAC-*Pkd1*, deux constructions ont été générées par recombinaisons homologues (Thery et al.): BAC-*Pkd1*_{TAG} (milieu) et BAC-*Pkd1*_{Δcoiled-coil} (bas). Le BAC-*Pkd1* (haut) a le gène *mPkd1* (bleu) et queue à queue le gène *mTsc2* (rouge) qui est délété par RH. Une mutation silencieuse générant un site de digestion *EcoRI* est intégrée (milieu et bas). Les 75 nucléotides dans l'exon 46 ont été délétés par RH générant le BAC-*Pkd1*_{Δcoiled-coil} (bas).

À partir de ces vecteurs (BAC-*Pkd1*_{TAG} et BAC-*Pkd1*_{Δcoiled-coil}), un fragment d'ADN de *Pkd1*_{TAG} et *Pkd1*_{Δcoiled-coil} a premièrement été isolé et purifié afin de retirer le BAC puisqu'il nuit à l'expression des gènes. Ensuite, ces fragments ont été micro-injectés dans le pronucléus d'ovule de souris

fertilisées soit (C57BL/6J XCBA/J) F2 produisant ainsi les souris Pkd1_{TAG26}, et les souris Pkd1_{Δcoiled-coil 30,32,42,49}. Depuis la création de ces souris transgéniques, elles ont été croisées sur le fond génétique C57BL/6 pour plusieurs générations.

3.2 Production de souris mutantes knock-out (Pkd1^{-/-}); Absence totale de Pc-1

Afin d'inactiver le gène *Pkd1*, une cassette contenant le gène de résistance à la néomycine, soit la néomycine phosphotransférase (Néo^R), a été insérée au codon 4 de l'exon 1 du gène *Pkd1* tel que décrit par (Wu et al., 2002) ce qui engendre l'inactivation du gène sur un des allèles de *Pkd1* (Pkd1^{+/-}).

3.3 Production de souris transgéniques sur un fond génétique nul

Les différentes lignées transgéniques (Pkd1_{TAG} et Pkd1_{Δcoiled-coil}) sont conservées par croisement en retour sur le fond génétique de la souche consanguine C57BL/6J depuis ~40 générations. Les lignées transgéniques ont été croisées successivement avec des souris hétérozygotes Pkd1^{+/-} afin d'obtenir des souris Pkd1_{TAG26} et Pkd1_{Δcoiled-coil 30,32,42,49} sur un fond génétique nul soit les souris Pkd1^{-/-}; Pkd1_{TAG26} et Pkd1^{-/-}; Pkd1_{Δcoiled-coil 30,32,42,49}.

3.4 Production de souris mutantes *knock-in Pkd1^V* : Absence de clivage au site GPS de Pc-1

Dans le but de détecter le site de clivage autoprotéolytique au site GPS, le codon ACT codant pour la thréonine a été remplacé par le codon GTT codant pour la valine (Val) à la position 3041, soit HL^{*}T/V³⁰⁴¹ tel que décrit par (S. Yu et al., 2007). L'insertion de cette mutation T3041V au site de clivage GPS empêche le clivage de Pc-1 générant une protéine Pc-1 non clivée soit Pc-1^{Non-clivé}. Les souris mutantes pour les deux allèles du gène *Pkd1* sont nommées Pkd1^{V/V}.

3.5 Les lignées contrôlent

Les lignées de souris contrôles correspondent aux souris de type sauvage présentant les allèles endogènes du gène *Pkd1* soit les souris $Pkd1^{+/+}$ pour faire des comparaisons. Les souris ont été croisées sur un fond génétique C57BL/6 provenant la souche consanguine C57BL/6J, ou de souris négative d'une même porté d'un croisement $Pkd1^{+/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil } 30,32,42,49} \times Pkd1^{+/-}$. Les souris $Pkd1^{-/-}$ sont quant à eux utilisées comme contrôles négatifs et ont été obtenues par un croisement $Pkd1^{+/-} \times Pkd1^{+/-}$.

3.6 Génotypage des souris

3.6.1 Extraction d'ADN

Dans le but de déterminer le génotype des souris provenant des croisements mentionnés dans la section 3.3 et 3.4, 1 à 2 mm de queues de souris sont coupées et digérées dans un tampon de digestion contenant 50 mM Tris pH 8.0, 100 mM EDTA pH 8.5, 05 % SDS et 0,7 mg/ml de pronase (11 459 643 001, Roche) à 55°C sous agitation pendant 5 heures ou toute la nuit. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 5 minutes à 13 000 rotations par minute (RPM). Le surnageant contenant l'ADN est ensuite précipité en ajoutant un volume équivalent d'éthanol à 100% et 1/10 de volume d'acétate de sodium (NaOAc) 3M pH 6.4. Les tubes sont fortement agités et centrifugés pendant 5 minutes à 13 000 RPM. Le surnageant est éliminé et le culot d'ADN est lavé avec ½ volume d'éthanol 70 % et un coup de vortex. Finalement, les culots sont centrifugés à nouveau pendant 5 minutes à 13 000 RPM. Une fois les culots séchés, l'ADN est resuspendu dans un tampon contenant 10 mM Tris pH 8.0 et 1mM EDTA pH 8.0.

3.6.2 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et analyse Taqman

Afin d'analyser le génotype de mes souris des réactions de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel ainsi que les analyses de style Taqman du gène *Pkd1* sont effectuées à partir de l'ADN génomique extrait de la section précédente. Dans un premier temps, pour la détection du transgène $Pkd1_{\text{TAG}}$, les amorces utilisées permettant la détection du transgène par PCR sont: sens 5'-TGG TAC CTG ATT GGG CAT GAT-3' (intron 9 *Pkd1*) et anti-sens 5'-GTT TTG CCT GGA TCC

GCT GTT G-3' (exon 11 *Pkd1*). Pour le transgène *Pkd1*_{Δcoiled-coil}, il est possible de détecter la délétion du motif coiled-coil en utilisant les amorces suivantes: sens 5' -GAA GGA ATG GAT CCA CTG CC-3' (exon 46 *Pkd1*) et anti-sens 5'- GGC CTA CAG TCT GAT CCA GC-3' (exon 46). Afin de détecter la présence du gène Néo^R, les amorces utilisées (exon 1 *Pkd1*) sont : sens 5'- AGC GCA TCG CCT TCT ATC GC-3' et anti-sens 5'-CAG GGT CTC CGG CCA G-3'. Dans le but de déterminer le nombre d'allèles de *Pkd1* qui présente le gène de résistance Néo^R, soit 0, 1 ou 2 (*Pkd1*^{+/+}, *Pkd1*^{+/-}, *Pkd1*^{-/-}), une analyse de type *Taqman* est effectuée par PCR quantitative (via 7) avec une paire d'amorces permettant de reconnaître spécifiquement le gène Néo^R soit : sens 5'- TCG ACC ACC AAG CGA AAC A-3' et anti-sens 5'- CCG GCT TCC ATC CGA GTA C-3'. Le gène normalisateur utilisé dans cet essai est le gène *Dolt* détecté par les amorces suivantes : sens 5'-TAG TTG GCA TCC TTA TGC TTC ATC-3' et anti-sens 5'-GCC CCA GCA CCA TT-3'. Finalement, les amorces utilisées afin d'identifier les souris mutantes *Pkd1*^{V/V} sont: sens 5' — CCA AAC AAC TCA GAC CAG G — 3' (exon 23 *Pkd1*) et anti-sens 5' — ACC AGG ACA GCA AGA AAA C — 3' (intron 23 *Pkd1*) (Kurbegovic et al., 2014).

3.6.3 Buvardage de southern (Southern blot)

Dans le but de détecter les transgènes *Pkd1*_{Δcoiled-coil}, à faibles copies, un southern blot peut être également effectué. Dans un premier temps, un minimum de 5µg d'ADN des queues de souris sont digérées toute la nuit à 37°C avec 50 unités de l'enzyme EcoRI (R0101L, New England Biolab). Le lendemain les ADN sont migrés sur un gel d'agarose (800-05-LG, Wisent Inc) de 1 % dans un tampon de migration TAE 1X pendant 4 heures. Une fois la migration terminée, le gel est placé dans une solution de dénaturation (1 mole NaCl et 0.5 moles NaOH) pendant 30 minutes suivies d'une solution de neutralisation (12 moles NaCl, 2 moles Tris-Base pH 7.4) pendant 1 heure. Le gel est ensuite lavé dans une solution SSC 10X (1.5 moles NaCl, 0.15 moles citrate de sodium) pour être transféré sur une membrane de nylon (1213403, GVS filter technology) par capillarité toute une nuit. Le jour suivant, la membrane est « cross linké» à l'aide de l'UV stratalinker 2400 à 120 000 µjoules afin de permettre à l'ADN de se lier sur la membrane. La membrane est par la suite incubée dans une solution de préhybridation (10X Denahart ; 5X SSC; 0.1 % SDS ; 0.1 mg/ml ssDNA), pendant 3 heures à 65°C. Pendant ce temps, 100ng d'une sonde contenant les amorces permettant la détection du transgène sont mélangés à 600ng de PdN6 et sont bouillis pendant 5

minutes et laissés sur glace 5 autres minutes. Ensuite, 200 μ M d'ATG, 500 mM Tris pH 7.5, 50mM MgCl₂, 100mM bêta-mercaptoéthanol, 10 unités de *Large Fragment polymerase/Klenow* (18-039-012, Fisher Scientific) et 25 μ Ci dCTP sont incubés à 37°C pendant une heure dans un bain-marie. Ainsi, une fois la sonde incubée, celle-ci est ajoutée à la solution de préhybridation et est incubée avec la membrane toute la nuit à 65°C. Le lendemain, la membrane est lavée avec 3 solutions distinctes soit 20 minutes avec 10 % SDS ; 20 X SSC, 12 minutes avec 0,1 % SDS ; 1X SSC et 6 minutes avec 0,1% SDS ; 0,1X SSC. La membrane est ensuite placée sur un film Kodak (X-OMAT 2000A, *processor*) dans une cassette. La cassette est placée à -80°C pendant 72 heures avant de développer le film en chambre noire.

3.7 Production de cellules embryonnaires primaire de fibroblaste de souris (MEFs).

Pour générer des cellules primaires de fibroblastes à partir d'embryon de souris, une femelle est euthanasiée à 13.5 jours du stade embryonnaire (e13.5) et les embryons sont placés dans du PBS 1X froid. Le sac embryonnaire et le placenta de chaque embryon sont retirés. Une fois les embryons libérés, les organes internes sont éliminés et la tête est conservée à des fins de génotypage. Le tissu restant est transféré dans un milieu de culture MEFs contenant: 87 % de DMEM (319-005-CL, Wisent Inc), 1 % de L-Glutamine (609-065-EL, Wisent Inc), 1 % d'acides aminés non essentiels (321-011, Wisent Inc), 1 % pénicilline/streptomycine (450-201-EL, Wisent Inc) et 10 % de sérum fœtal bovin préalablement inactivé à 55°C pendant 30 minutes (FBS, 080-150, Wisent Inc). Le tissu embryonnaire est ensuite découpé en petit morceau et digéré dans 1mL de 0,25 % Trypsine/2.21 mM d'EDTA 4Na (325-053-EL, Wisent Inc) pendant 15 minutes à 37°C. Deux volumes de milieu MEFs sont ajoutés pour inactiver la trypsine. Les morceaux de tissus sont homogénéisés avec une pipette (P1000). Les échantillons sont incubés à température pièce pendant 10 minutes. Une fois décanté, le surnageant contenant les cellules de fibroblaste primaires sont récupérés dans un pétri de 100 mm avec 7 mL de milieu de culture MEFs. Après 24 heures, le milieu de culture est changé afin d'éliminer les cellules non adhérentes ou mortes et les fibroblastes primaires sont incubés à 37°C avec 5% de CO₂ jusqu'à l'obtention de 80 et 90 % de confluence.

3.8 Extraction et quantification des protéines

La préparation des extraits protéiques est effectuée par différentes approches. À des fins d'utilisation pour des immunobuvardages, un culot d'extrait cellulaire de fibroblaste à confluence ou entre ¼ reins ou les deux reins entiers à P10 sont homogénéisés dans un tampon (RIPA) contenant 20 mM Tris-HCL pH 7.5, 2mM EDTA pH 8.0, 150 mM NaCl et 0,5 % triton X-100 (v/v) supplémenté avec 1mM PMSF et de *protéase inhibitor cocktail* 1:100 (Sigma Aldrich (P8340)). À P0 (pour l'analyse du clivage: voir plus bas) tous les organes (reins et poumons) sont homogénéisés dans un tampon de lyse contenant 20 mM de sodium phosphate pH 7.2, 1 mM EDTA pH 8.0, 150 mM NaCl, 10% glycérol (v/v) et 0,5 % triton X-100 (v/v). Le tampon est supplémenté avec les palettes cOmplete™ *mini protéase Inhibitor cocktail* (11836153001, Roche). Une fois lysé, les extraits de protéines sont laissés sur glace ou à 4°C pendant 45 minutes et sont ensuite centrifugés à 4°C à 15 000 RPM pendant 15 minutes. Le surnageant protéiques est ensuite récolté et conservé à -80°C jusqu'à utilisation. Afin de déterminer la concentration des protéines pour chacun des échantillons utilisés, la méthode BCA (Acide BiCinchoninique) est utilisée telle que mentionnée par le fabricant en utilisant la trousse de dosage Pierce™ *BCA protein Assay* fabriqué par Thermo Fisher, soit réactif A (23223, Thermo Scientific), réactif B (23224, Thermo Scientific). La courbe standard est préparée en utilisant de l'albumine de sérum bovin à 20 mg/ml.

3.9 Immunobuvardage de type Western

3.9.1 Gels de polyacrylamide

Pour les analyses de Pc-1, les gels employés sont soit des gels gradient d'Invitrogen NuPAGE™ 3-8 % Tris-Acétate (EA0378BOX, life technologies) dans un tampon de migration NuPAGE™ Tris-Acétate SDS (LA0041, life technologies) ou des gels gradients de 4-12 % Bis-Tris (NP0321BOX, life technologies) dans un tampon de migration NuPAGE™ MES SDS Running Buffer (NP0002, life technologies). Pour toutes les autres analyses (Pc-2, SQSTM1/p62 et LC3), le gel de concentration est de 4% bis acrylamide (1:29) et le gel de résolution est de 8%, 10 % et 15 % migrés avec un tampon contenant 25 mM Tris, 192 mM de glycine et 0,1 % de SDS (m/v).

3.9.2 Immunobuvardage (Préparation d'échantillons, migration et transfert)

En général, entre 10-60 µg d'extraits protéiques totaux sont bouillis pendant 10 minutes dans un tampon Laemmli contenant : 0,1875M Tris pH 6.8, 6 % SDS (m/v), 30 % glycérol (v/v), 0,006% bleu de bromophénol, et 10 % bêta-mercaptoéthanol. Pour la détection de Pc-1, les protéines sont incubées à 65°C pendant 10 minutes avec un tampon de chargement d'Invitrogen LDS NP0007 ayant un ratio final 3:1:1 (LDS Invitrogen: SDS 10%: bêta-mercaptoéthanol). Les échantillons sont migrés sur les gels de polyacrylamides à 100 volts(V) pendant 3-5 heures à la température pièce ou à 4°C (dans le cas de Pc-1). Après la migration, les protéines sont transférées par électrophorèse à 65 Amp ou à 20 V toute la nuit, sur une membrane de polyvinylidene fluoride (PVDF) (IPVH00010, millipore) dans un tampon de transfert composé de 25 mM de Tris, 192 mM de glycine, et 20 % méthanol (v/v). Le lendemain, les membranes sont ensuite bloquées dans 5% TBST-lait (100 mM pH 7.5 ; 150 mM NaCl; 0,1% Tween-20 et 5% lait m/v) pendant 2-4 heures. Les membranes sont par la suite incubées avec les anticorps primaires (voir le tableau 3.1 pour la liste détaillée) pendant 18 ou 36 heures et les anticorps secondaires pendant 2 heures (voir le tableau 3.2 pour la liste détaillée) selon le manufacturier. Les protéines sont détectées par chimiluminescence avec les solutions de détection d'AmershamTM soit l'ECLTM (*GE healthcare life sciences* RPN2106) et ECLTM Prime (*GE healthcare life sciences* RPN2236) telle que suggérée par le manufacturier. Finalement, les bandes sont détectées en chambre noire en exposant les membranes pendant différents temps sur des films *hyblot CL autoradiography* (Thomas Scientific, E3018) et à l'aide de l'appareil *ChemiDoc XRS+ System* de biorad les bandes obtenues par immunobuvardage de Western sont quantifiées en utilisant le logiciel *ImageLab* de Bio-Rad. Le programme Excel est ensuite utilisé afin de calculer les différents niveaux d'expressions relatifs, la moyenne, les écarts-types ainsi que pour effectuer la normalisation.

Tableau 3.1 Liste détaillée des anticorps primaires

Anticorps	Cible	Concentration	Dilution	Solution	Poids moléculaire (kDa)	Source	Références
Souris Anti-LRR (7e12)	Domaine LRR de Pc-1 (24-180)	1.6 mg/ml	1/1000	5 % TBST 1X	450	Université du Kansas	Don de Christopher Ward
Rat Anti-Pc-2 (YCC2)	Pc-2 (acide aminé 687-992 de l'humain)	1.03 µg/mg	1/5000	5 % TBST 1X	110	Université d'Alabama de Birmingham	Don de Mary Ann Accavitti-Loper
Poulet Anti-cCC (5828)	Pc-1 CTF (4123-4291)	N/D	N/A	N/A	18	Centre de recherche PKD de Baltimore	EJH001
Lapin Anti-rCC (5183)	Pc-1 CTF (4123-4291)	N/D	1/1400	5 % TBST 1X	18	Centre de recherche PKD de Baltimore	EJH002
Lapin Anti-SQSTM1/p62	SQSTM1/p62	0.43 mg/ml	1/1000	3 % BSA	62	Abcam	AB109012
Lapin Anti-LC3B	LC3 I, LC3 II	1.021 mg/ml	1/1000	3 % BSA	14 & 16	Abcam	AB221794
Souris Anti-AIP1 (Alix)	Alix	250 µg/ml	1/1000	5 % TBST 1X	100	Laboratoire de BD Transduction	611620
Souris Anti-Gapdh	Gapdh	1 mg/ml	1/10 000	5 % TBST 1X	37	Thermo Fisher	MA5-15738

Tableau 3.2 Liste détaillée des anticorps secondaires

Anticorps	Dilution	Solution	Source	Références
Chèvre anti-Souris	1/2000 - 1/15000	5 % TBST 1X	Sigma Aldrich	A4416
Chèvre anti-Lapin	1/2000 - 1/5000	5 % TBST 1X	Sigma Aldrich	A6154
Lapin anti-Rat	1/2000 - 1/5000	5 % TBST 1X	Rockland antibodies & assays	612-4304

3.10 Déglycosylation de la Polycystine-1

Afin d'effectuer les analyses au niveau de la glycosylation de Pc-1, entre 6,7µg et 13,3µg d'extraits protéiques sont dénaturés à 100°C dans un tampon de dénaturation (B1704S 10X, New England

Bio-labs). Les protéines sont ensuite traitées par le peptide N-glycosidase F (PNGase F, P0704S, New England Bio-labs) ou l'endoglycosidase H (Endo H, P0702S, New England Bio-labs) pendant 1 heure à 37°C selon les instructions fournies par le manufacturier. Les échantillons sont ensuite mis à 4°C pendant 10 minutes. Une analyse d'immunobuvardage de Pc-1 est effectuée tel que décrit à la section 3.9.

3.11 Immunoprécipitation et co-immunoprécipitation de la polycystine-2: Analyse de l'interaction Pc-1/Pc-2

Pour effectuer une immunoprécipitation, entre 100µg et 1000µg d'extraits de protéines obtenues à partir du tampon RIPA (voir section 3.8) sont incubés contre l'anticorps PC-2 (YCC2) pendant 2 heures sous agitation à 4°C. 20µL de billes A/G (Sc-2003, Santa Cruz) préalablement lavé avec du PBS 1X sont ensuite ajoutés et incubés toute la nuit sous agitation à 4°C. Le lendemain, les échantillons sont centrifugés et lavés 5 fois avec du RIPA pendant 3 minutes à 2500 RPM 4°C. Les billes sont ensuite resuspendues dans le tampon de chargement d'Invitrogen 1X LDSNP0007. Les protéines précipitées sont éluées pendant 10 minutes à 100 °C. Le surnageant est chargé sur un gel en gradient d'Invitrogen NuPAGE™ de 4-12% Bis-Tris pour évaluer l'interaction entre Pc-1 et Pc-2 par immunobuvardage de type western.

3.12 Immunoprécipitation et co-immunoprécipitation de la polycystine-1: Analyse du clivage GPS de la polycystine-1

Pour effectuer une précipitation, entre 2000µg et 4000µg d'extraits protéiques sont incubés avec l'anticorps (partie C terminal du gène *Pkd1*) mCC-Pkd1 pendant 2 heures sous agitations à 4°C. En parallèle, 30µL billes d'anticorps de chèvre anti-poulet (IgY agarose P1010, Aves Lab. Inc.) sont préparés et lavés avec le tampon de lyse spécifiquement conçu pour l'analyse du clivage soit 20mM de sodium phosphate pH7.2, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH8.5, 10% glycérol et 0,5% TritonX-100. Le tampon est supplémenté avec cOmplete™ (1 tablette/10mL de tampon) *mini protease Inhibitor cocktail* (11 836 153 001, Roche). Après 2h d'incubation avec l'anticorps, les billes lavées sont ajoutées aux extraits protéiques et incubés toute la nuit sous agitations à 4°C. Le lendemain, les échantillons sont lavés 3 fois avec le tampon de lyse soit: 3 minutes de centrifugation

à 2500 RPM 4°C (inversion entre chaque lavage). Les protéines précipitées sont par la suite éluées avec le Laemmli contenant: 0,187 5 M Tris pH 6.8, 6% SDS (m/v), 30% glycérol (v/v), 0,006% bleu de bromophénol, et 10% bêta-mercaptoéтанол pendant 5 minutes à 100°C. Les protéines sont placées sur glace mouillée pendant 3 minutes et le surnageant récupéré est chargé sur un gel en gradient d'Invitrogen NuPAGE™ 3-8 % Tris-Acétate pour analyser la co-immunoprécipitation des différents fragments de la polycystine-1 générée par le clivage au site GPS.

3.13 Purification d'exosomes à partir des MEFs

Afin de récupérer les exosomes provenant des MEFs, une quantité significative de cellules doit être générée soit un minimum de $1,2 \times 10^7$ cellules pour chacune des lignées. Les cellules sont premièrement séparées en 12 pétris de 150mm ($1,00 \times 10^6$ cellules/pétris de 150mm) pour chaque génotype et ils sont incubées à 37°C avec 5% de CO₂ dans le milieu de culture pour les MEFs (voir section 3.7). Une fois la confluence atteinte (environ 70-75%), le milieu de culture est éliminé, les cellules sont lavées 2 fois abondamment avec du PBS 1X. Ensuite, les cellules sont à nouveau incubées pendant 48 heures avec du milieu de culture MEFs mais cette fois ci sans l'ajout de sérum (97% de DMEM (319-005-CL, Wisent Inc) 1% de L-Glutamine (609-065-EL, Wisent Inc), 1% d'acide aminé non essentiel (321-011-EL, Wisent Inc) et 1% pénicilline/streptomycine (450-201-EL, Wisent Inc). Les milieux provenant des pétris sont récupérés et centrifugés deux fois à 1000g pendant 10 minutes à 4°C et une fois à 10 000g pendant 30 minutes à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires. Afin de récolter les exosomes, le surnageant est récupéré et centrifugé à 100 000g (ultracentrifugeuse Beckman L8-60M) pendant 110 minutes à 4°C dans les tubes de polypropylène 25x89 mm (Beckman Coulter, 326 823) à l'aide du rotor Sorval IAH-629. Le surnageant est jeté et le culot exosomal est lavé avec 1mL de PBS 1X. Les tubes sont à nouveau centrifugés pendant 110 minutes à 100 000g. Le surnageant est jeté et le culot exosomal est resuspendu dans un petit volume de RIPA (entre 50µL et 100µL) selon la grosseur du culot obtenu. Les exosomes sont ensuite analysés par immunobuvardage sur un gel de 3-8% selon la méthode décrite au paravent le contrôle de chargement utilisé pour cette approche est le marqueur exosomal Alix (Anti-AIP1).

3.14 Analyses statistiques

Finalement, les analyses statistiques sont effectuées pour des $N \geq 4$ à l'aide du logiciel GraphPad. Une analyse de variance *one-way* Anova est effectuée afin de déterminer si les échantillons démontrent une homogénéité lorsque plusieurs groupes sont analysés. Puis le test T a été utilisé pour comparer les moyennes de deux groupes.

4. Résultats

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

Comme mentionné précédemment, le croisement des souris transgéniques $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 30, 32 42 et 49 par des souris mutantes nulles pour le gène *Pkd1* ($Pkd1^{-/-}$) permet d'analyser le transgène $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ indépendamment du gène *Pkd1* endogène. L'analyse de l'expression du transgène $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ sur un fond génétique nul ($Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$) permet de corriger le phénotype de polykystose rénal des souris $Pkd1^{-/-}$ qui est létal à la naissance. Les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 30, 32 et 49, tous à une copie du transgène, développent un phénotype kystique rénal et décèdent ~2 semaines. En revanche, les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 42, à 35 copies ne développent aucun phénotype (figure 2.1a et 2.2). Puisque le degré de correction semble varier en fonction du nombre de copie du transgène et du niveau d'expression de $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$, l'expression rénale de la polycystine-1 (Pc-1) a été analysée par immunobuvardage de type western blot. Pour ce faire, un anticorps spécifique au domaine LRR de Pc-1 a été utilisé soit le 7e12 (Kurbegovic & Trudel, 2013). L'anti-Gapdh est utilisé comme contrôle interne. Sur la figure 4.1a et b, Pc-1 est détectée dans les extraits totaux de protéines rénales des souris $Pkd1^{+/+}$ (n= 5), $Pkd1^{+/-}$ (n= 2), $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 30 (n= 2), $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 32 (n= 2), $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 42 (n= 4), $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 49 (n= 4) et $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{TAG}$ 26 (n= 3). La figure 4.1a montre que l'intensité des bandes pour les souris transgéniques à 1 copie est équivalente ou inférieure à l'intensité des bandes du contrôle sauvage $Pkd1^{+/+}$, mais légèrement supérieur à l'intensité des bandes des souris $Pkd1^{+/-}$. À l'inverse, sur la figure 4.1b, l'intensité des bandes pour les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 42 (35 copies) et les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{TAG}$ 26 (16 copies) est beaucoup plus forte que le contrôle sauvage, ce qui montre un niveau d'expression rénal plus élevé de Pc-1 pour ces lignées. La figure 4.1c montre la quantification de l'expression relative des souris transgéniques par rapport aux contrôles. Soit, $Pkd1^{+/+}$ (1,00 ± 0,09), $Pkd1^{+/-}$ (0,51 ± 0,02), $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 30 (0,93 ± 0,18), 32 (0,78 ± 0,20) et 49 (0,83 ± 0,09). Le niveau d'expression de Pc-1 observé chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 42 est de 6 à 8 fois supérieur (7,07 ± 1,18) au contrôle sauvage $Pkd1^{+/+}$ et près de 1,4 fois supérieure au niveau d'expression des souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{TAG}$ 26 (5,21 ± 0,51) (figure 4.1b

et c). Ces données suggèrent donc que le transgène $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ semble être un hypomorphe fonctionnel puisque les souris hétérozygote $Pkd1^{+/-}$ ne développent pas la PKRAD même avec 50% de la protéine produite. Puisque, les niveaux d'expression et le phénotype est similaire pour chacune des trois lignées à une copie, la suite des expériences a été faite avec la lignée $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}49}$.

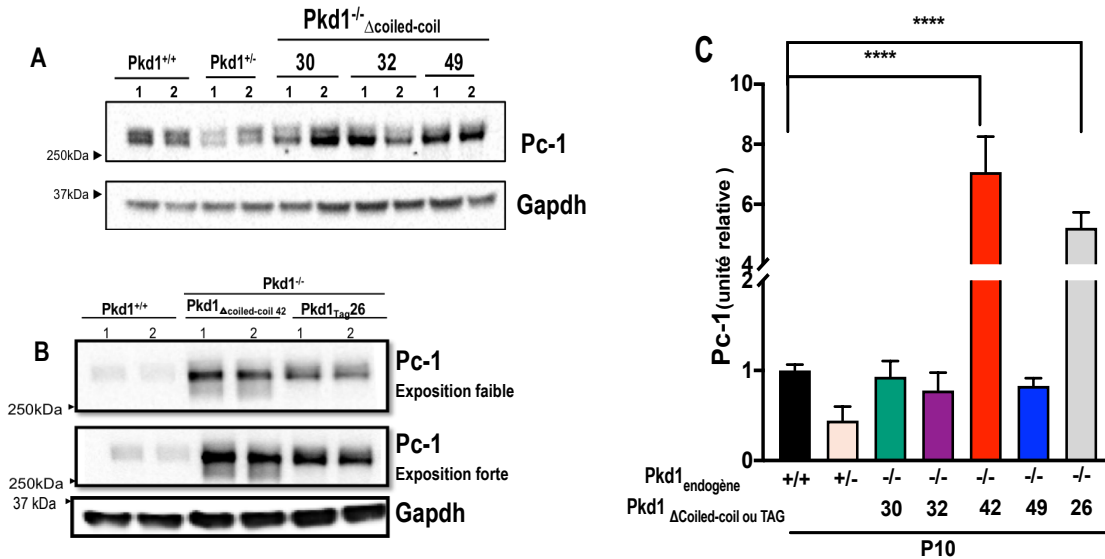


Figure 4.1 Expression rénale de la polycystine-1 chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$

A) Analyse par immunobuvardage de Pc-1 sur 20 μ g d'extrait total de protéines rénales à P10 provenant de souris contrôles $Pkd1^{+/+}$ (n= 5), $Pkd1^{+/-}$ (n=2) et des souris transgéniques $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{Coiled-coil}}$ 30 (n=2), 32 (n=2) et 49 (n=4). B) Analyse d'immunobuvardage de Pc-1 sur 10 μ g d'extrait total de protéines rénales à P10 issus de souris contrôles $Pkd1^{+/+}$ et des souris transgéniques $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{Coiled-coil}}$ 42 (n=4) et $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\text{TAG}26}$ (n=3). En A et B, les protéines ont migrés sur un gel gradient de 4-12% et Pc-1 est détecté avec l'anticorps 7e12 (anti-LRR). C) Expression relative de la Pc-1 rénale quantifiée contre le contrôle interne Gapdh pour les souris contrôles $Pkd1^{+/+}$, $Pkd1^{+/-}$ et les souris transgéniques $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{Coiled-coil}}$ 30, 32, 42, et 49 et $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\text{TAG}26}$. Chaque lignée a été comparée individuellement au contrôle sauvage en utilisant le test T.

**** P value ≤ 0.0001 . * A est un résultat obtenu par le laboratoire de Dre Trudel.

4.2 Le clivage au site GPS ne participe pas au défaut de maturation de $PC1_{\Delta\text{coiled-coil}}$

Le clivage au site GPS est une étape préliminaire très importante de la maturation de Pc-1 et qui se déroule dans le réticulum endoplasmique. Ainsi, l'objectif de cette expérience est de déterminer si le motif coiled-coil de Pc-1 influence le clivage au site GPS. Comme indiqué sur la figure 4.2a, le clivage autoprotéolytique de Pc-1 à lieu au site HL*T3041. Lorsque Pc-1 est clivée au site GPS ($Pc-1^{\text{clivé}}$), deux fragments sont générés: N terminal ($Pc-1^{\text{NTF}}$) d'environ 450 kDa, et C terminal

(Pc-1^{CTF}) de 150 kDa. En premier lieu, 2mg d'extrait de protéines rénales sont immunoprécipités avec l'anticorps anti-cCC et les billes IgY agarose ce qui permet de reconnaître le fragment C terminal de Pc-1 qu'il soit clivé ou non clivé. Une fois Pc-1 précipitée, il est possible de visualiser les fragments de Pc-1 générés par le clivage au site GPS. Pour ce faire, une analyse d'immunobuvardage de type Western est effectuée avec l'anticorps anti-rCC pour détecter la présence du fragment C terminal de Pc-1 (Pc-1^{CTF}) qui est généré par le clivage. Ensuite la même membrane est hybridée à l'aide de l'anticorps anti-LRR (7e12) afin de visualiser le fragment N terminal de Pc-1 (Pc-1^{NTF}). La détection des deux fragments de Pc-1, soient Pc-1^{CTF} et Pc-1^{NTF}, indique qu'il y a eu clivage au site GPS (voir figure 4.2a). La figure 4.2b permet de comparer les reins d'une souris sauvage (gauche) lorsque Pc-1 est clivé à une souris mutante Pkd1^{V/V} qui exprime uniquement la forme non clivée de Pc-1(droite). Le défaut de clivage chez la souris Pkd1^{V/V} cause l'apparition d'un phénotype de polykystose rénal (Kurbegovic et al., 2014). Sur la figure 4.2c, il est possible de voir les deux fragments de Pc-1, soient le fragment PC1^{CTF} (en bas) et Pc-1^{NTF} (en haut) pour chacune des lignées de souris. Cependant, l'intensité des bandes pour la transgénique à faible nombre de copie, soit les souris Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil49 (n= 3), est beaucoup plus faible que pour les souris contrôlent Pkd1^{+/+} (n=3). À l'inverse, l'intensité des bandes observées chez les souris à haut nombre de copies Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil42(n=3) et Pkd1^{-/-}; Pkd1_{TAG26}(n=3) est beaucoup plus élevée. Ainsi, ces résultats démontrent qu'en absence de son motif coiled-coil, la structure du domaine GAIN/GPS de Pc-1 n'est pas altéré puisque la protéine subit un clivage autoprotéolytique.

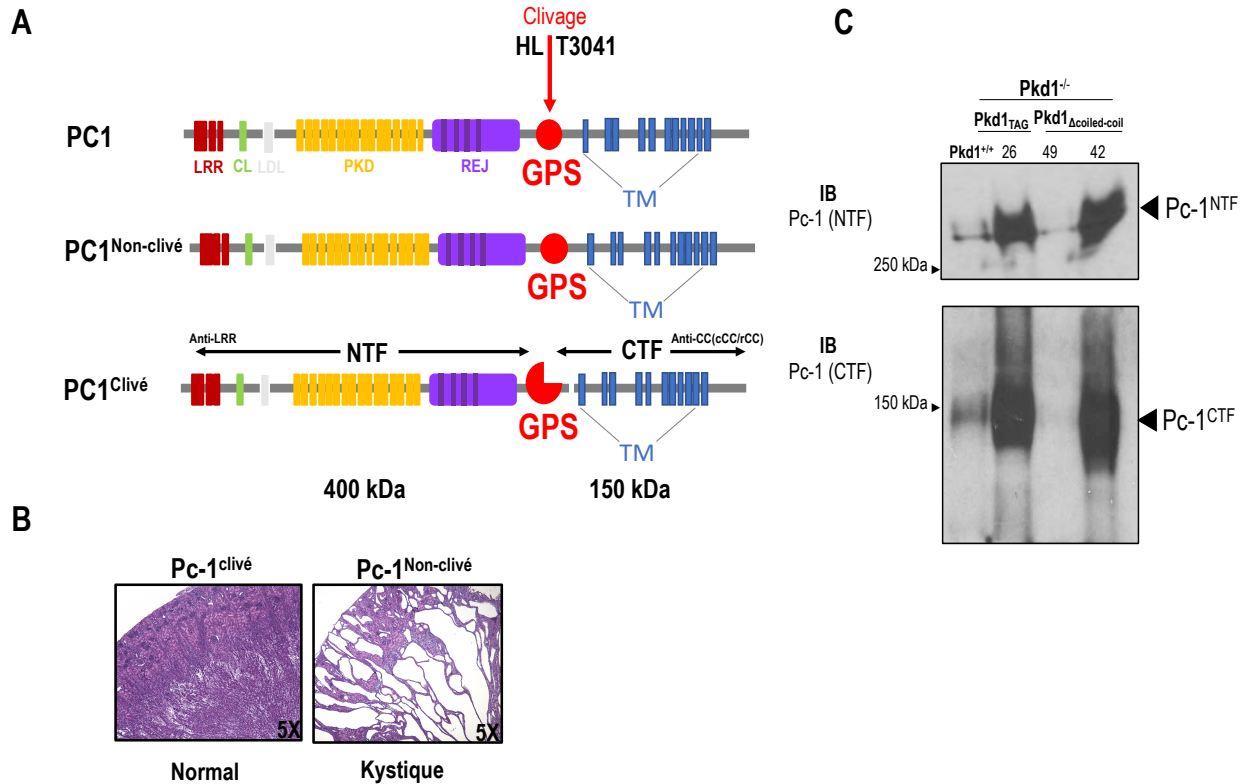


Figure 4.2 Analyse du clivage au site GPS chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$

A) Représentation de la structure schématique du clivage de la polycystine-1. Le clivage autoprotéolytique a lieu au site HL*T3041 et génère deux fragments, soit un en N terminal (NTF) et un en C terminal (CTF). LRR: répétition riche en leucine, CL: lectine de type C, LDL: lipoprotéine à basse densité, PKD: répétition PKD, REJ: récepteur pour egg jelly et GPS: site protéolytique du récepteur couplé aux protéines G. B) Coupe histologique d'un rein à P10 issus de souris $Pkd1^{+/+}$ (gauche) et d'une souris $Pkd1^{\Delta coiled-coil}$ (droite) qui exprime uniquement la forme non clivée de Pc-1 (droite). Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine. C) Pour chaque échantillon ($n=3$ /lignée), 2mg de protéines rénales à P0 ont été immunoprécipité (IP) avec l'anticorps anti-cCC (PC-1^{CTF}) et les billes d'agarose IgY. Les produits ont été analysés par immunobuvardage de type western blot (IB) sur un gel en gradient de 3-8% contre l'anticorps anti-rCC (PC-1^{CTF}) et anti-LRR(PC-1^{NTF}). Les flèches noires indiquent les fragments de la polycystine-1 observés, soit PC-1^{CTF} (en bas) et PC-1^{NTF} (en haut). B est un résultat obtenu par le laboratoire de Dr Trudel.

4.3 Implication du motif coiled-coil de la polycystine-1 dans la maturation et le trafic intracellulaire

Puisque le transgène $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ semble être un hypomorphe fonctionnel, la maturation de la Pc-1 a été analysée afin d'investiguer l'effet de la délétion du motif coiled-coil. Cette analyse importante permet de déterminer si, en absence de son motif coiled-coil, Pc-1 est en mesure de procéder à sa maturation et de subir les modifications post-traductionnelles adéquates permettant son transport jusque dans le trans-Golgi. Pour ce faire, des analyses de déglycosylation ont été effectuées sur des extraits totaux de protéines rénales. Les analyses de déglycosylation consistent à traiter les protéines avec les enzymes N-glycosidase F (de PNGase F) et endoglycosidase H (ou

Endo H). La PNGase F clive tous les sucres présents sur les glycoprotéines alors que l'endo H clive tous les glycanes à teneur élevée en mannose qui ont été ajoutés spécifiquement dans le réticulum endoplasmique, sans cliver les glycanes ayant été ajoutés dans le trans-Golgi. Ainsi, les protéines qui sont sensibles à l'endo H sont dites immatures, puisqu'elles présentent un état de glycosylation acquis dans le réticulum endoplasmique, alors que les protéines qui résistent au clivage de l'endo H sont dites matures, puisqu'elles présentent un état de glycosylation témoignant de leur présence dans le trans-Golgi (figure 4.3.1).

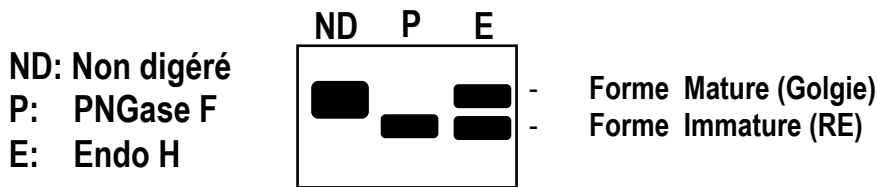
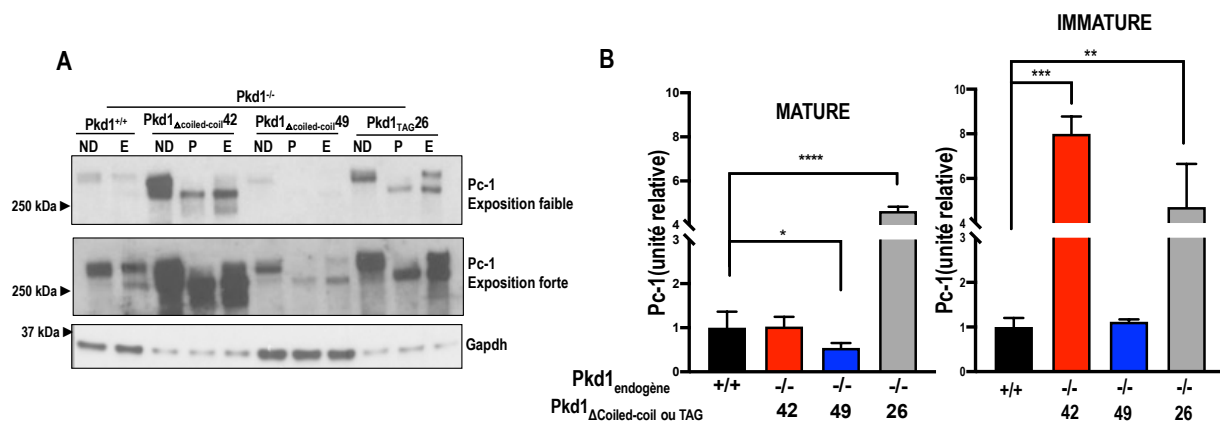


Figure 4.3.1 Représentation schématique du patron de déglycosylation

Représentation schématique du profil de glycosylation obtenu après les digestions enzymatiques. Soit ND (non digéré), P (PNGase F) et E (Endo H). Les protéines qui résistent à l'Endo H (matures) se trouvent dans le trans-Golgi alors que celles qui ont été déglycosylées par l'enzyme (immatures) se trouvent dans le réticulum endoplasmique.

Une fois les protéines digérées, celles-ci sont analysées par une immunobuvardage de type Western. L'anticorps 7e12 est utilisé afin d'évaluer les niveaux d'expression rénale de Pc-1 Δ coiled-coil après la déglycosylation. Puisque les souris Pkd1^{+/+} (n = 4) et les souris Pkd1^{-/-} ; Pkd1 Δ coiled-coil49 (n = 4) expriment faiblement Pc-1, 15 μ g de protéines ont été analysées pour ces échantillons alors que 7,5 μ g ont été analysés pour les souris Pkd1^{-/-} ; Pkd1 Δ coiled-coil 42 (n= 4) et les souris Pkd1^{-/-} ; Pkd1_{TAG26} (n = 4). La figure 4.3.2a montre les protéines non digérées et traitées en condition dénaturante normal (ND), les protéines traitées à la PNGase F (P) ainsi que les protéines traitées à l'endo H (E). Comparativement aux échantillons non-digérés, la position de migration des protéines traitées à la PNGase F diminue. Soit la hauteur de la bande obtenue pour les échantillons Pkd1^{-/-} ; Pkd1_{TAG26}, Pkd1^{-/-} ; Pkd1 Δ coiled-coil 49 et Pkd1^{-/-} ; Pkd1 Δ coiled-coil 42 (puit P) diminue par rapport aux mêmes échantillons non-digérés (puit ND). Ensuite, lorsque ces échantillons sont traités à l'Endo H (puit E), deux bandes distinctes sont observées pour toutes les lignées de souris. La bande la plus haute témoigne de la présence de Pc-1 ayant résisté à la digestion enzymatique de l'endo H (Pc-1^{Mature}). À l'inverse, la bande inférieure témoigne de la présence de protéines sensibles à l'endo H (Pc-1^{Immature}). En observant la figure 4.3.2a, l'intensité de la bande Pc-1^{Mature} chez les

souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ semble être plus faible que leurs contrôles respectifs soient $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}49}$ vs $Pkd1^{+/+}$ et $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}42}$ vs $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\text{TAG}26}$. De plus, il est aussi possible d'observer une plus grande intensité pour la bande $Pc-1^{\text{Immature}}$ chez la souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}42}$, ce qui suggère un défaut de maturation chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$. Ainsi, comme indiqué plus haut, en utilisant le *Gapdh* comme contrôle interne, il a été possible d'évaluer les niveaux d'expressions de $Pc-1^{\text{Mature}}$ et de $Pc-1^{\text{Immature}}$ pour les mêmes échantillons (figure 4.3.2b). En comparant les niveaux d'expression relative de la polycystine-1 mature, il est possible d'affirmer que la lignée $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}49}$ ($0,543 \pm 0,109$) exprime environ deux fois moins de $Pc-1^{\text{Mature}}$ comparativement au contrôle sauvage ($1,00 \pm 0,363$) alors que la lignée $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}42}$ ($1,03 \pm 0,221$) exprime un niveau équivalent de $Pc-1^{\text{Mature}}$ comparé au contrôle sauvage, mais jusqu'à 4 fois moins que les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\text{TAG}26}$ ($4,63 \pm 0,193$). Pour continuer, l'analyse de l'expression relative de $Pc-1^{\text{Immature}}$ montre une expression équivalente chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}49}$ ($1,12 \pm 0,05$) par rapport au contrôle $Pkd1^{+/+}$ ($1,00 \pm 0,204$). À l'inverse les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}42}$ ($7,99 \pm 0,775$) expriment environ 8 fois plus de $Pc-1^{\text{Immature}}$ que les souris $Pkd1^{+/+}$ et deux fois plus que les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\text{TAG}26}$ ($4,71 \pm 1,93$). L'analyse du ratio relatif de $Pc-1^{\text{Mature}}/Pc-1^{\text{Immature}}$ (figure 4.3.2c) montre un défaut de maturation chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}49}$ ($0,774 \pm 0,112$) et les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}42}$ ($0,183 \pm 0,009$) comparativement au contrôle sauvage $Pkd1^{+/+}$ ($1,00 \pm 0,150$) et aux souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\text{TAG}26}$ ($0,980 \pm 0,168$). Ces données permettent donc d'affirmer que l'absence du motif coiled-coil de *Pc-1* entraîne un délai dans sa maturation.



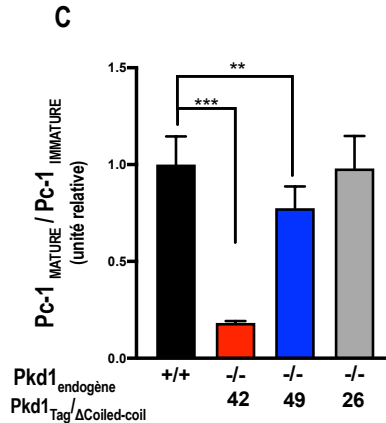


Figure 4.3.2 Analyse des niveaux de glycosylations de Pc-1 Δ Coiled-coil rénale

A) Analyse des niveaux de glycosylation de Pc-1 sur 15 μ g d'extraits totaux de protéines rénales à P10 issus de souris contrôles Pkd1^{+/+} (n = 4), de souris mutantes Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ Coiled-coil 49 (n = 4) et 7,5 μ g pour les souris Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ Coiled-coil 42 (n = 4) et les souris Pkd1^{-/-}; Pkd1_{TAG26} (n=4). Les protéines sont migrées sur un gel en gradient de 4-12 % et Pc-1 est détectée avec l'anticorps 7e12 (anti-LRR). B) Expression relative de la Pc-1^{Mature} (gauche) et de Pc-1^{Immature} (droite) rénale quantifiée avec le contrôle interne Gapdh pour les souris contrôles Pkd1^{+/+} et les souris mutantes Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ Coiled-coil49, Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ Coiled-coil42 et Pkd1^{-/-}; Pkd1_{TAG26}. C) Ratio relatif de Pc-1 mature sur Pc-1 immature pour les souris contrôles Pkd1^{+/+} et les souris mutantes Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ Coiled-coil49, Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ Coiled-coil42 et Pkd1^{-/-}; Pkd1_{TAG26}.

* P value ≤ 0.05 , ** P value ≤ 0.01 , *** P value ≤ 0.001 , **** P value ≤ 0.0001 .

4.4 L'expression rénale de la polycystine-2 est modulée chez les souris Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil

Le niveau d'expression rénale de Pc-2 a également été analysé afin de déterminer si l'absence du motif coiled-coil de Pc-1 pouvait moduler l'expression de Pc-2. Pour ce faire, un anticorps spécifique aux acides aminés 687 à 992 de Pc-2 (YCC2) a été utilisé afin d'évaluer son niveau d'expression rénale. L'anti-Gapdh est utilisé comme contrôle interne. Pc-2 est détectée dans les extraits totaux de protéines rénales chez des souris sauvages Pkd1^{+/+} (n= 5) des souris transgéniques Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil 30 (n= 1), Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil32 (n= 1), Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil42 (n= 7), Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil49 (n= 8) et des souris Pkd1^{-/-}; Pkd1_{TAG 26} (n= 9). La figure 4.4a montre une augmentation de l'intensité des bandes correspondant à Pc-2 chez les souris Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil à 1 copie, ainsi qu'une légère diminution de l'intensité pour les souris Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil 42 (35 copies). L'analyse de l'expression relative de Pc-2 montrée sur la figure 4.4b indique que les souris à 1 copie, Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil30, Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil32 et Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil49 ($2,85 \pm 0,376$) expriment 2 à 3 fois plus de Pc-2 que les contrôles sauvages ($1,00 \pm 0,01$). À l'opposé, l'expression relative de Pc-2 chez les souris à haut nombre de copies, Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil42

(0,489 ± 0,100), semble être diminuée de moitié alors qu'elle demeure inchangée chez les souris Pkd1^{-/-} ; Pkd1_{TAG 26} (1,02 ± 0,60).

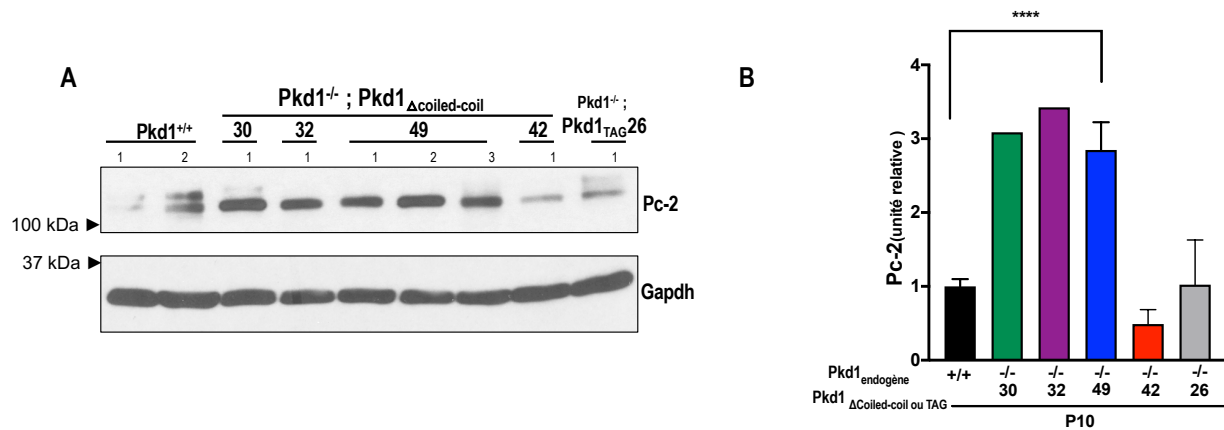


Figure 4.4 Expression rénale de la polycystine-2 chez les souris Pkd1^{-/-} ; Pkd1_{Δcoiled-coil}
 A) Analyse d'immunobuvardage de Pc-2 sur 60μg d'extrait total de protéines rénales à P10 issus de souris contrôles Pkd1^{+/+} (n= 5), les souris Pkd1^{-/-} ; Pkd1_{ΔCoiled-coil} 30 (n=1), 32(n=1), 49 (n=8) et 42 (n = 7) et les souris et Pkd1^{-/-} ; Pkd1_{TAG26} (n=9). Les protéines sont migrées sur un gel de résolution à 8%. Pc-2 est détectée avec l'anticorps YCC2.
 B) Expression relative de Pc-2 rénale quantifiée contre le contrôle interne Gapdh pour les souris contrôles Pkd1^{+/+} et les souris transgéniques Pkd1_{ΔCoiled-coil} 30,32,42, et 49 et Pkd1^{-/-} ; Pkd1_{TAG26}. **** P value ≤0.0001.

4.5 L'interaction *in vivo* entre Pc-1/Pc-2 est indépendante du motif coiled-coil de la polycystine-1

L'importance de l'interaction entre Pc-1 et Pc-2 a été démontrée pour la maturation et le trafic intracellulaire de Pc-1 (Gainullin et al., 2015). De ce fait, l'objectif de cette expérience est de déterminer si l'absence du motif coiled-coil de Pc-1 abolit l'interaction entre Pc-1 et Pc-2, ce qui pourrait ainsi être la cause du délai de maturation observé. Dans un premier temps, les extraits de protéines rénales à P10 sont immunoprécipités avec l'anticorps anti-Pc-2 (YCC2) et des billes chargées A/G plus. Une fois précipité, l'interaction Pc-1/Pc-2 et Pc-2/Pc-2 est analysée par immunobuvardage avec l'anticorps 7e12 (figure 4.5 panneau 1) et YCC2 (figure 4.5 panneau 2). Cinq microgrammes d'extrait protéiques non précipités ont été aussi analysés avec l'anti-LRR pour chaque échantillon (figure 4.5 panneau 3). Le panneau 4 représente le contrôle négatif des extraits protéiques incubés uniquement en présence de billes chargées A/G plus. Il est à noter que différentes quantités de protéines ont été immunoprécipité pour chacune des lignées à cause de la faible expression de Pc-1 pour les souris à une copie du transgène, et la surexpression de Pc-1 pour les souris à 35 copies du transgène (voir la légende de la figure 4.5). Le panneau 1 de la figure 4.5

montre l'interaction Pc-1 Δ coiled-coil /Pc-2 pour les lignées Pkd1 $^{-/-}$; Pkd1 Δ coiled-coil49(n=7) et Pkd1 $^{-/-}$; Pkd1 Δ coiled-coil42(n=7). En comparant l'interaction Pc-1/Pc-2 des souris contrôles Pkd1 $^{+/+}$ (n=7) avec la lignée Pkd1 $^{-/-}$; Pkd1 Δ coiled-coil49 on remarque que l'intensité de la bande Pc-1 est beaucoup plus forte pour le contrôle sauvage, bien que deux fois plus de protéines aient été immunoprécipitées. Pareillement, les souris transgéniques à haut nombre de copie (Pkd1 $^{-/-}$; Pkd1 Δ coiled-coil42) montrent une faible intensité en comparaison aux souris Pkd1 $^{-/-}$; Pkd1 Δ coiled-coil26 (n=7) et aux contrôles Pkd1 $^{+/+}$. Le panneau 2 de la figure 4.5 montre l'interaction Pc-2/Pc-2 ainsi que l'efficacité d'immunoprécipitation pour les différents mutants et le contrôle sauvage Pkd1 $^{+/+}$. L'ensemble de ces données suggère qu'en absence de son motif coiled-coil, Pc-1 peut interagir avec Pc-2 *in vivo*. Cependant, l'efficacité de cette interaction semble être modulée à la baisse, suggérant la présence d'un autre partenaire protéique jouant un rôle de chaperonne entre Pc-1 et Pc-2 (figure 4.5 panneau 1).

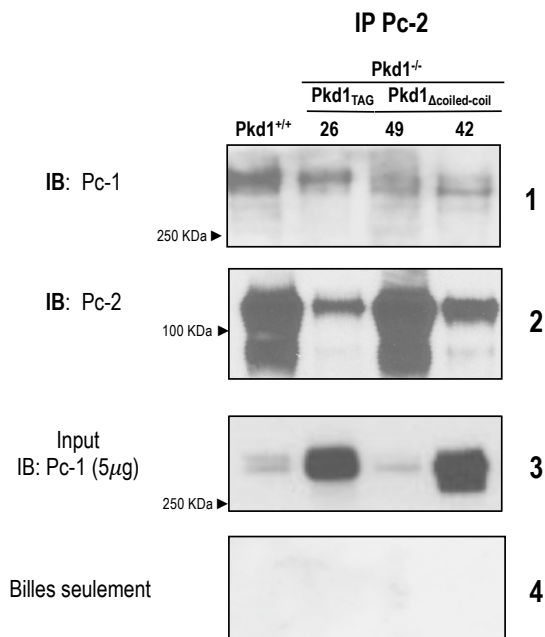


Figure 4.5 Analyse de l'interaction entre Pc-1 Δ coiled-coil et Pc-2

Différentes quantités de protéines ont été immunoprécipité (IP) selon la lignée soit : 500μg pour les souris contrôles Pkd1 $^{+/+}$, 1000μg pour les souris Pkd1 $^{-/-}$; Pkd1 Δ coiled-coil 49, et 100μg pour les lignées Pkd1 $^{-/-}$; Pkd1 Δ coiled-coil 42 et Pkd1 $^{-/-}$; Pkd1 Δ coiled-coil26. N= 7/lignée. Les extraits totaux de protéines rénales à P10 ont été soumis à une immunoprécipitation (IP) avec 3,09μg l'anti-Pc-2(YCC2) et les billes A/G plus de santa cruz. Le contrôle négatif de l'immunoprécipitation consiste en les extraits totaux incubés uniquement en présence de billes. Les produits ont été analysés par immunobuvardage de type western blot (IB) sur un gel à gradient de 4-12 % contre l'anticorps anti-LRR de Pc-1 (7e12) ou anti-Pc-2 (YCC2).

4.6 Analyse de la signalisation des protéines mal repliées chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$

Les résultats jusqu'à présent démontrent que l'absence du motif coiled-coil de Pc-1 engendre un retard dans sa maturation. Notamment, les souris transgéniques à une copie expriment faiblement la forme mature de Pc-1 alors que les transgéniques à 35 copies expriment une forte quantité de la protéine Pc-1 dans le réticulum endoplasmique (RE). La prochaine section aura pour but de déterminer si ce délai est causé par la présence d'un stress et d'un mauvais repliement de $Pc-1_{\Delta coiled-coil}$. Ainsi, le mécanisme d'autophagie, la présence d'un stress dans le réticulum endoplasmique (*ER stress*), suivie du mécanisme de réponse des protéines mal repliées (*URP: unfolded protein response*) seront étudiés chez les lignées $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ et seront uniquement comparés au contrôle sauvage $Pkd1^{+/+}$.

4.6.1 Étude de l'autophagie

L'autophagie fait partie des mécanismes cellulaires qui peut être déclenché lorsqu'un stress se fait ressentir dans une cellule. Ce processus catabolique permet d'envoyer les protéines vers les lysosomes, lieu où la dégradation et le recyclage des composantes cellulaires s'effectue. Ce mécanisme peut être activé par la voie UPR lorsque les protéines mal repliées s'accumulent dans le RE. Le séquestrosome-1 (SQSTM1/p62) est une protéine adaptatrice de l'autophagie qui permet de cibler les protéines marquées à l'ubiquitine pour une éventuelle dégradation. Elle interagit avec la protéine MAP1LC3B (LC3) (17 kDa), qui se trouve à la membrane de l'autophagosome. Lorsqu'il y a de l'autophagie dans une cellule, LC3, aussi appelée LC3 I, change de conformation et adopte une deuxième forme nommée LC3 II (15 kDa). Ce changement de conformation permet la fusion de l'autophagosome avec le lysosome. Afin d'étudier le mécanisme d'autophagie chez les souris transgéniques $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$, l'expression rénale des deux marqueurs d'autophagie a été étudiée. Un anticorps spécifique à la protéine SQSTM1/p62, qui mesure environ 62 kDa, a été utilisé comme premier marqueur avec le Gapdh comme contrôle interne. Sur la figure 4.6.1.1a SQSTM1/p62 est détectée sur les extraits totaux de protéines rénales des souris contrôles $Pkd1^{+/+}$ (n= 6), et des souris transgéniques $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 49 (n= 6) et $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ 42 (n=6). L'intensité des bandes obtenues semble varier entre les deux lignées de souris. En effet,

la lignée $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}} 49$ à une copie semble peu exprimer la protéine SQSTM1/p62 comparativement aux souris sauvages. À l'inverse, l'intensité des bandes pour la lignée $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}} 42$ (35 copies) est beaucoup plus prononcée, suggérant une forte expression de la protéine comparativement au contrôle sauvage $Pkd1^{+/+}$. L'expression relative de la protéine SQSTM1/p62 montrée sur la figure 4.6.1.1b indique que les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}} 49$ ($0,353 \pm 0,165$) expriment jusqu'à 3 fois moins la protéine que les contrôles $Pkd1^{+/+}$ ($1,00 \pm 0,187$) alors que les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}} 42$ ($1,61 \pm 0,167$) l'expriment jusqu'à 0,6 fois plus. De prime abord, ces données suggèrent une activation d'autophagie et/ou d'un stress cellulaire, spécifiquement chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}} 42$.

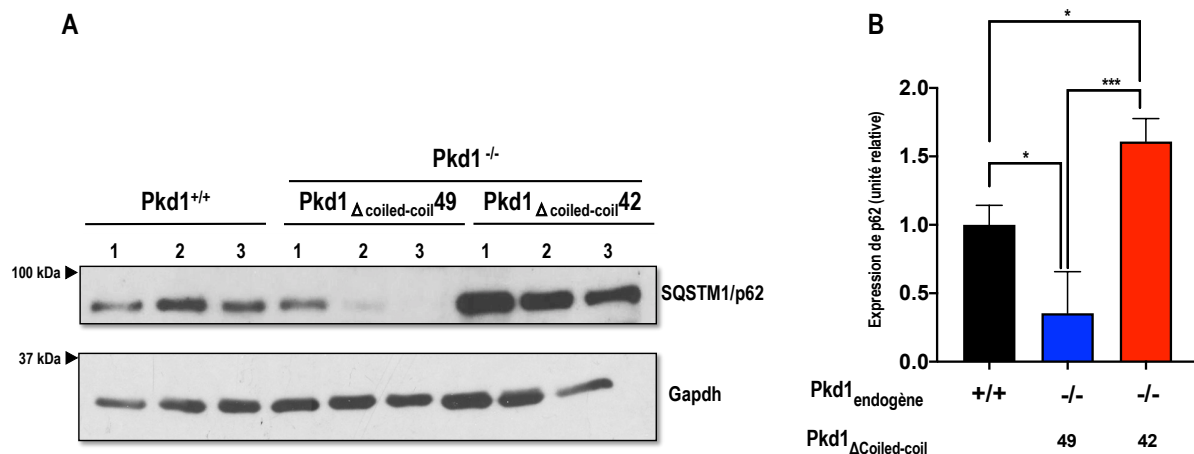


Figure 4.6.1.1 Expression rénale de SQSTM1/p62 chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$
 A) Analyse d'immunobuvardage de SQSTM1/p26 sur 15 μ g de protéines rénales à P10 issus des souris contrôles $Pkd1^{+/+}$ (n= 6), des souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{Coiled-coil}} 49$ (n=6) et des souris et $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{Coiled-coil}} 42$ (n=6). Les protéines sont migrées sur un gel de résolution à 10% et SQSTM1/p62 est détectées avec l'anticorps anti SQSTM1/p62. B) Expression relative de SQSTM1/p62 rénale quantifiée avec le contrôle interne Gapdh pour les souris contrôles $Pkd1^{+/+}$ et les souris mutantes $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{Coiled-coil}} 49$ et 42.
 * P value ≤ 0.05 , *** P value ≤ 0.001 .

Afin de confirmer l'activation de l'autophagie chez les mutants de souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}} 42$, l'expression rénale de la protéine LC3 a aussi été étudiée en utilisant encore une fois le Gapdh comme contrôle interne. Sur la figure 4.6.1.2a, les deux isoformes du marqueur d'autophagosome sont détectées, soit l'isoforme LC3 I à ~17 kDa et LC3 II à ~15 kDa, pour chacune des lignées. Chez les contrôles $Pkd1^{+/+}$ (n = 6), l'intensité des bandes pour l'isoforme LC3 I semblent être légèrement plus forte que l'isoforme LC3 II. Chez la lignée $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}} 49$ (n= 6), l'intensité de l'isoforme LC3 I semble être plus prononcée que celle de l'isoforme LC3 II tel

qu'observé chez les souris $Pkd1^{+/+}$. L'intensité des bandes pour les deux isoformes observés pour la lignée $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}} 42$ (n=6) semble être plus forte. Soit sur la figure 4.6.1.2b, l'expression relative de LC3 I comparativement au contrôle $Pkd1^{+/+}$ ($1,00 \pm 0,01$). L'expression relative de LC3 I pour la lignée $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}49$ ($0,68 \pm 0,13$) et la lignée $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}42$ ($0,72 \pm 0,22$) semble être légèrement diminuée. Ensuite, la figure 4.6.1.2c montre l'expression relative de LC3 II. Les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}49$ ($0,59 \pm 0,09$) montre aussi une diminution comparativement au contrôle sauvage $Pkd1^{+/+}$ ($1,00 \pm 0,18$). Par contre, l'expression relative de LC3 II des souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}42$ ($1,53 \pm 0,3$) est légèrement augmentée. La figure 4.6.1.2d illustre le ratio relatif de LC3 I/II des souris sauvages $Pkd1^{+/+}$ ($1,00 \pm 0,100$) comparées aux souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}49$ ($0,869 \pm 0,003$) et $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}42$ ($0,430 \pm 0,054$). Ces données suggèrent une augmentation de la présence des autophagosomes dans le rein des souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}42$.

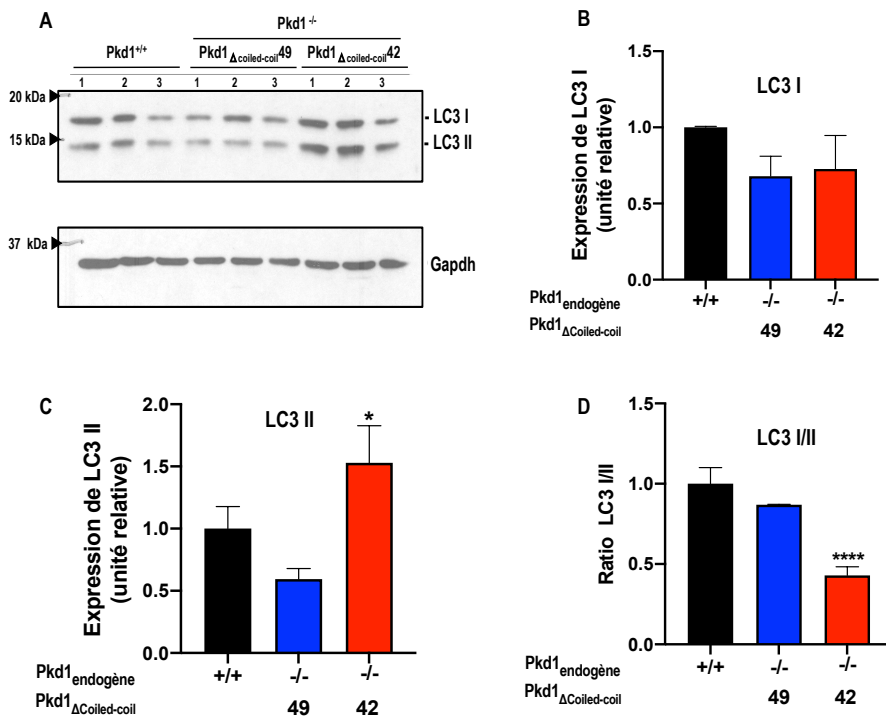


Figure 4.6.1.2 Expression rénale de LC3 chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$

A) Analyse d'immunobuvardage de LC3 sur 15 µg de protéines rénales à P10 issus de souris contrôles $Pkd1^{+/+}$ (n= 6), de souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}} 49$ (n=6) et de souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}} 42$ (n=6). Les protéines sont migrées sur un gel de 15 % et LC3 est détectées avec l'anticorps anti-LC3B. La bande du haut représente LC3 I qui migre à 17 kDa alors que la bande du bas représente LC3 II qui migre à 14 kDa. B) L'expression relative de LC3 I est quantifiée avec le contrôle interne Gapdh pour les souris contrôles $Pkd1^{+/+}$ et les souris transgéniques $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}} 49$ et 42. C) L'expression relative de LC3 II est quantifiée avec le contrôle interne Gapdh pour les souris contrôles $Pkd1^{+/+}$ et

les souris mutantes Pkd1^{-/-}; Pkd1^{ΔCoiled-coil}49 et 42.D) Ratio relatif de LC3 I sur LC3 II chez les souris contrôles Pkd1^{+/+} et les souris Pkd1^{-/-}; Pkd1^{ΔCoiled-coil}49 et Pkd1^{-/-}; Pkd1^{ΔCoiled-coil}42.* P value ≤0.05, **** P value ≤0.0001.

4.6.2 Étude du ER Stress

Le mécanisme de réponse UPR (*unfolded protein response*) est activé lorsqu'un stress dans le réticulum endoplasmique est causé par la présence de protéines mal repliées. Afin de déterminer si la délétion du motif coiled-coil de Pc-1 engendre un mauvais repliement de la protéine, l'expression de la chaperonne Grp78/Bip a été analysée. Dans le but de déterminer si cette chaperonne est augmentée chez les lignées Pkd1^{-/-}; Pkd1^{Δcoiled-coil} l'expression a été évaluée par immunobuvardage sur des extraits totaux de protéines qui dérivent de cellules embryonnaires fibroblastiques (MEFs) primaires de souris à e13.5 afin de les comparer à des MEFs qui sont en condition de ER stress. Dans un premier temps, les cellules du contrôles sauvages Pkd1^{+/+}(n=2) ont été traitées avec 2μM de tunicamycine (TUN) pendant 2h. Cet antibiotique a pour but d'induire un stress dans le réticulum endoplasmique et d'activer le mécanisme de réponse UPR. Ensuite, l'expression de Bip pour ces cellules a été comparée avec des MEFs contrôles Pkd1^{+/+}(n=2) sans traitement et des MEFs provenant des lignées Pkd1^{-/-}; Pkd1^{Δcoiled-coil}49(n=3) et Pkd1^{-/-}; Pkd1^{Δcoiled-coil}42 (n=3). Ainsi sur la figure 4.6.2a, se trouve l'expression de Bip pour toutes ces lignées ainsi que le contrôle interne Gapdh. On y remarque une augmentation de l'intensité des bandes correspondant à Bip pour les deux lignées Pkd1^{-/-}; Pkd1^{Δcoiled-coil} en comparaison avec les contrôles Pkd1^{+/+} sans traitement et avec le contrôle TUN. La figure 4.6.2b montre l'expression relative de Bip pour chaque lignée MEF, comparé au MEFs de contrôle sauvage non traité (1,00 ± 0,03). Soit, TUN (1,23± 0,00), les souris Pkd1^{-/-}; Pkd1^{Δcoiled-coil}49 (1,61 ± 0,21) et Pkd1^{-/-}; Pkd1^{Δcoiled-coil}42 (1,45 ± 0,09). Ces résultats suggèrent la présence d'un stress dans le réticulum endoplasmique (RE) potentiellement causé par l'absence du motif coiled-coil de Pc-1.

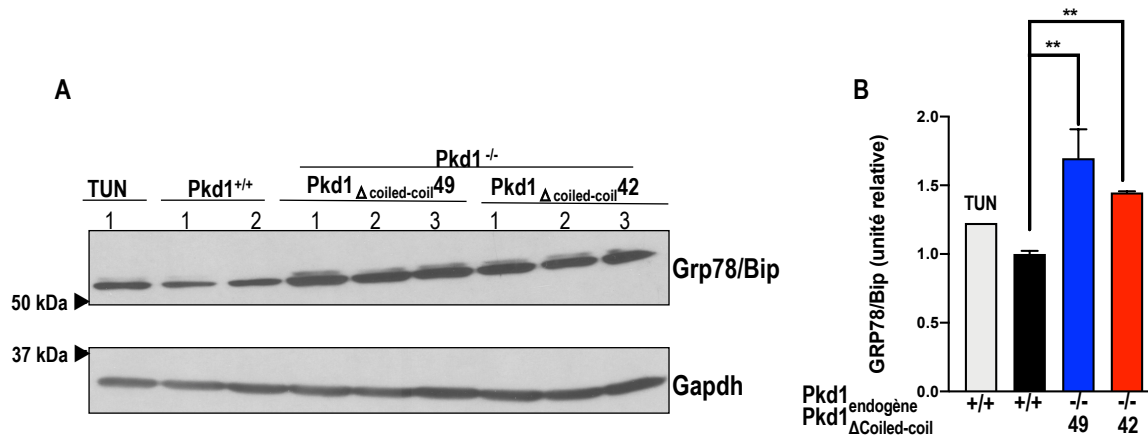


Figure 4.6.2 Analyse du ER stress chez les souris Pkd1^{-/-} ; Pkd1 Δ coiled-coil

A) Analyse d'immunobuvardage de Grp78/Bip sur 15 μ g d'extraits totaux de protéines provenant de MEFs à e13.5 pour les lignées Pkd1^{+/+} (n=1) traité avec 2 μ M de tunicamycine, Pkd1^{+/+} (n=2) sans traitement, Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ Coiled-coil 49 (n=3) et Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ Coiled-coil 42 (n=3). Les protéines sont migrées sur un gel de résolution à 10 % et Grp78/Bip est détectées avec l'anticorps anti-Grp78. B) Expression relative de Grp78/Bip est quantifiée avec le contrôle interne Gapdh pour les souris contrôles Pkd1^{+/+} et les souris transgéniques Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ Coiled-coil. ** P value \leq 0.01.

4.7 Étude préliminaire sur le repliement de la polycystine-1 chez les souris Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil

Certaines études ont rapporté qu'une diminution de température entraîne un environnement propice pour le repliement des protéines (X. Wang, Koulov, Kellner, Riordan, & Balch, 2008). Comme les souris Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil présentent un délai de maturation pour Pc-1 en plus d'un stress dans le RE (*ER stress*), des tests de sensibilité à la température ont été effectués afin de vérifier l'effet de la température sur le trafic de Pc-1. Dans un premier temps, des MEFs primaires ont été préparées à e13.5 pour les contrôles sauvages Pkd1^{+/+} et pour les lignées Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil 49 et 42. Les cellules ont ensuite été incubées à 33°C et à 37 °C afin d'évaluer si le trafic Pc-1 serait plus facilité à 33°C et si par le fait même une diminution de température favorise le repliement de la protéine notamment chez les hypomorphes. L'expression de Pc-1 a été analysée à partir des extraits totaux de protéines des MEFs à l'aide de l'anticorps 7e12. Le contrôle de chargement interne utilisé pour cette expérience est anti-AIP1 (Alix) soit un marqueur d'exosomes. L'expression de Pc-1 est montrée sur la figure 4.7.1a et b. En a, la lignée Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil 49 (n=2) présentent une légère augmentation d'intensité de Pc-1 à 33°C comparativement à 37°C. Il ne semble toutefois pas y avoir de différence observée chez les mutants Pkd1^{-/-}; Pkd1 Δ coiled-coil 42 (n=2) pour les deux températures testées. La figure 4.7.1c montre l'expression relative de Pc-1 pour les deux températures testées. L'analyse de ces données préliminaires montrent une expression de

Pc-1 plus élevée à 33°C pour les lignées $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}49}$ ($1,62 \pm 0,40$) qu'à 37 °C ($0,3 \pm 0,09$). De plus, l'expression à 33°C semble être équivalente à l'expression du contrôle sauvage $Pkd1^{+/+}$ à 33°C ($1,54 \pm 0,54$) et plus élevée que l'expression du même contrôle à 37°C ($1,00 \pm 0,01$). Par contre, l'expression relative de Pc-1 pour la lignée $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}42}$ semble être similaire pour les deux températures soit à 33°C ($5,94 \pm 0,05$) et à 37°C ($6,04 \pm 0,78$). En résumé, ces résultats suggèrent que Pc-1 est stable à 33°C pour la lignée $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}49}$ et que la baisse de température semble favoriser le repliement de Pc-1 en absence du motif coiled-coil.

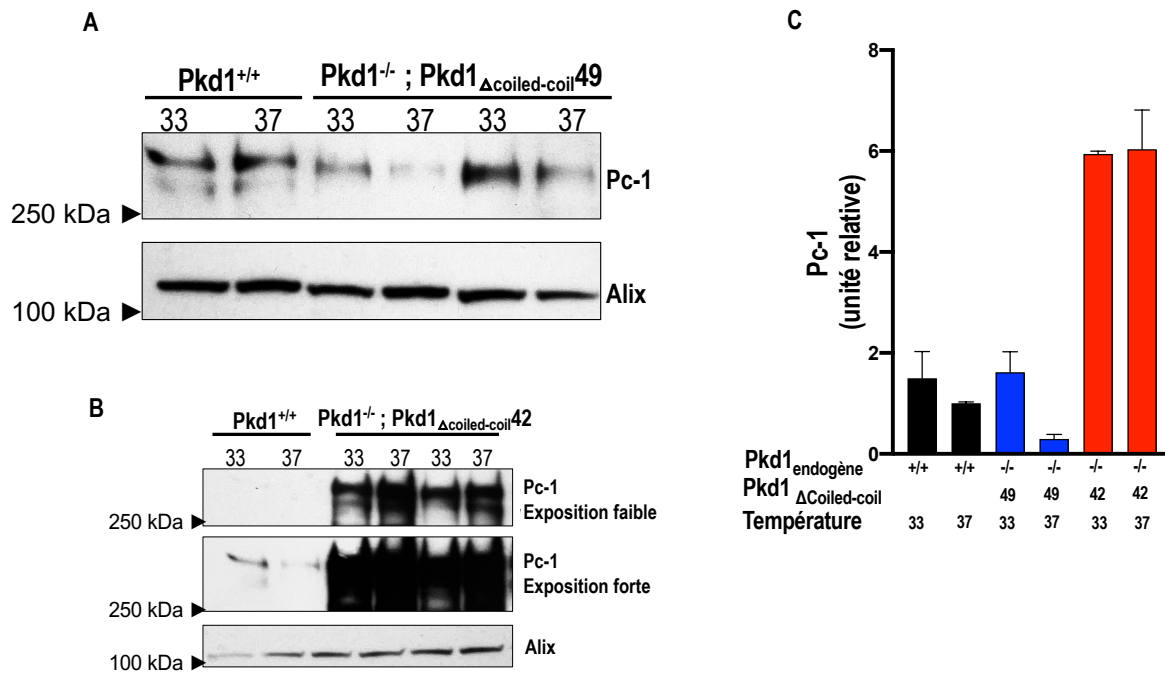


Figure 4.7.1 Test de sensibilité à la température chez les mutants $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$

A) Analyse d'immunobuvardage de Pc-1 sur 15µg d'extraits totaux de protéines provenant de MEFs à e13.5 incubées à 33°C et à 37°C pour les lignées $Pkd1^{+/+}$ (n=1), $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{Coiled-coil}49}$ (n=2). Les protéines sont migrées sur un gel en gradient de 3-8 % et Pc-1 est détectée avec l'anticorps anti-LRR et Alix est détectée avec l'anticorps anti-AIP1. B) Analyse d'immunobuvardage de Pc-1 sur 10µg d'extraits totaux de protéines provenant de MEFs à e13.5 incubées à 33°C et à 37°C pour les lignées $Pkd1^{+/+}$ (n=1), $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{Coiled-coil}42}$ (n=2). Les protéines sont migrées sur un gel en gradient de 3-8 % et Pc-1 est détectée avec l'anticorps anti-LRR et Alix est détectée avec l'anticorps anti-AIP1. C) Expression relative de Pc-1 quantifiée avec le contrôle interne Alix pour les contrôles $Pkd1^{+/+}$ et les mutants $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{Coiled-coil}}$.

Pour continuer, Pc-1 a été analysée dans les exosomes provenant de ces mêmes MEFs afin de déterminer dans un premier temps si $Pc-1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ est en mesure de se rendre post le trans-Golgi et si le trafic intracellulaire de $Pc-1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ est favorisé à 33°C vs à 37°C. Encore une fois, l'expression de Pc-1 a été détectée à l'aide de l'anticorps 7e12 et Alix a été utilisé comme contrôle

interne. La figure 4.7.2a montre la présence de Pc-1 dans les exosomes. Bien que ce résultat soit préliminaire, l'intensité des bandes observées pour Pc-1 à 33°C semble être plus élevée que les bandes à 37°C, et ce pour les deux lignées $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ 49 (n = 1) et $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ 42 (n=2). À première vue, l'expression relative de Pc-1 dans les exosomes pour les deux lignées $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ semble être plus élevée à 33°C qu'à 37°C et même plus élevée que le contrôle sauvage $Pkd1^{+/+}$ (n=1) à 33°C (figure 4.7.2b). En somme ces résultats préliminaires montrent que $Pc-1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ parvient à se déplacer jusqu'au trans-Golgi, et à se rendre dans les exosomes malgré l'absence du motif coiled-coil. De plus, il semble y avoir un meilleur trafic intracellulaire à 33°C chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$, suggérant un défaut de repliement de Pc-1 en absence du motif coiled-coil. Ces données étant préliminaires, d'autres analyses sont nécessaires afin de valider un défaut de repliement de la part de Pc-1 en absence de son motif coiled-coil.

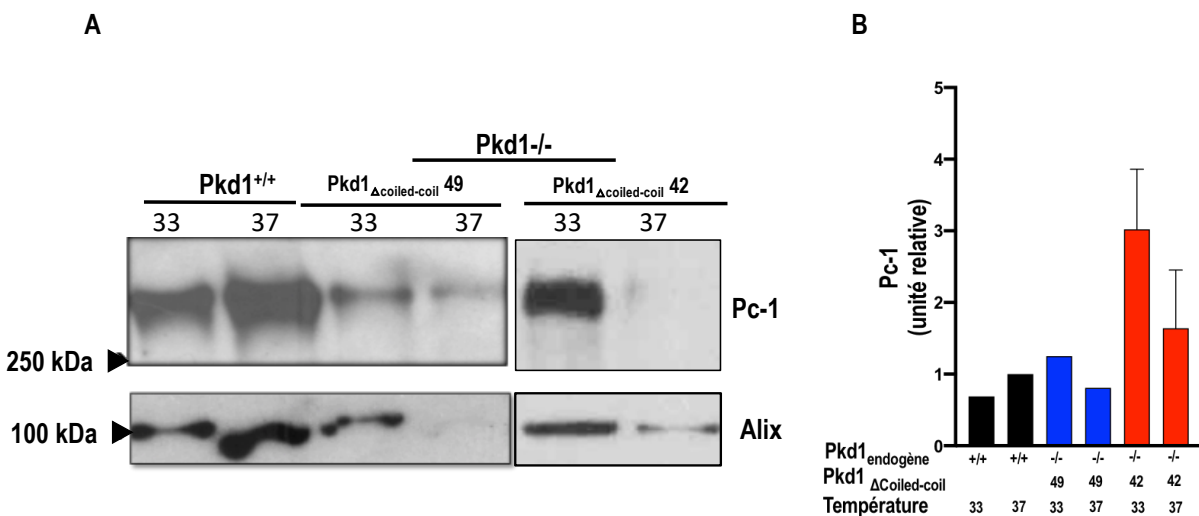


Figure 4.7.2 Analyse de la sécrétion de $PC-1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ dans les exosomes à partir de MEFs

A) Différentes quantités d'exosomes provenant des MEFs à e13.5 ont été analysé par immunobuvardage selon la quantité recueillie. Soit, à 33 °C, 3µg de protéines ont été analysé pour la lignée $Pkd1^{+/+}$ (n=1) et la lignée $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{Coiled-coil}}$ 49(n=1). Ensuite, à 37°C, 5 µg et 1µg ont été analysé chez la lignée $Pkd1^{+/+}$ (n=1) et la lignée $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{Coiled-coil}}$ 49(n=1) Puis, pour la lignée $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{Coiled-coil}}$ 42(n=2) incubé à 33°C et à 37°C, 3 µg et 2µg ont été analysé respectivement. Les protéines sont migrées sur un gel en gradient de 3-8 % et Pc-1 est détectée avec l'anticorps anti-LRR. Le contrôle interne, Alix, un marqueur d'exosomes est détecté avec l'anticorps anti-AIP1. B) Expression relative de Pc-1 quantifiée avec le contrôle interne Alix pour les contrôles $Pkd1^{+/+}$ et les lignées $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{Coiled-coil}}$. Il est à noter que ces données sont des résultats préliminaires.

5. Discussion

Cette étude porte sur l'analyse d'un nouveau modèle de souris PKRAD $Pkd1^{-/-}; Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ où le motif coiled-coil du gène *Pkd1* a été enlevé sur un fond génétique endogène nul. Le modèle de souris transgénique $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ produit à partir d'un BAC-*Pkd1* montre une délétion efficace des 25 acides aminés correspondants au motif coiled-coil du gène *Pkd1* murin. Les trois lignées de souris transgéniques $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ 30,32 et 49 exprime 1 copie du transgène alors que la lignée $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ 42 en exprime 35. De manière intéressante, toutes ne présentent aucuns phénotypes rénaux alors que les souris $Pkd1_{\text{TAG}}26$ qui exprime 16 copies du transgène $Pkd1_{\text{TAG}}$ (gène *Pkd1* entier) montre un phénotype kystique rénaux avec des manifestations extrarénales typique de la PKRAD. La différence de phénotype observé chez les souris $Pkd1_{\text{TAG}}$ et les souris $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ montre le rôle important du motif coiled-coil dans la protéine Pc-1, sur l'homéostasie rénal et sur la pathogénèse menant à la PKRAD.

Les lignées de souris $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ croisées sur un fond génétique endogène nul permet d'analyser uniquement l'effet de l'expression du transgène $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ en absence du motif coiled-coil sans l'expression endogène du gène *Pkd1*. Les trois lignées $Pkd1^{-/-}; Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ soit la 30, 32 et 49 permet de compléter partiellement la létalité des souris $Pkd1^{-/-}$ causé par un phénotype polykystose rénale observé à la naissance. Or, les souris $Pkd1^{-/-}; Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ soit la 30, 32 et 49 décèdent tous autour de 2 semaines dû à un phénotype sévère de la PKRAD. Étonnamment, la lignée $Pkd1^{-/-}; Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ 42 avec 35 copies du transgène ne développe pas la maladie et survit à plus d'un an d'âge alors qu'en présence du motif coiled-coil, la lignée $Pkd1^{-/-}; Pkd1_{\text{TAG}}26$ montre une complémentation du phénotype rénal des souris $Pkd1^{-/-}$ pendant plusieurs mois. Cependant, les souris $Pkd1^{-/-}; Pkd1_{\text{TAG}}26$ développent des kystes rénaux plus tardivement sur une période d'un an. Ceci suggère que le transgène $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ n'est probablement pas aussi fonctionnel que le transgène $Pkd1_{\text{TAG}}$. D'ailleurs, plusieurs modèles de souris ont permis de démontrer qu'une dérégulation de l'expression du gène *Pkd1* (soit une augmentation ou une diminution) peut mener au développement de kystes. Notamment les modèles de surexpression, de perte de fonction ou d'allèle hypomorphe (Hopp et al., 2012; Kurbegovic et al., 2010; Kurbegovic & Trudel, 2013; Lantinga-van Leeuwen et al., 2004; Thivierge et al., 2006; Wu et al., 2002). Les modèles $Pkd1^{-/-};$

$Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ et $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\text{TAG}}$ montre que la perte de fonction de Pc-1 chez les souris $Pkd1^{-/-}$ peut être complétée par une réexpression ou encore une surexpression du gène *Pkd1*. Ainsi, ces résultats montrent le rôle important du motif coiled-coil de Pc-1 dans la polykystose rénale en plus d'appuyer l'un des mécanismes pathogénétiques proposées soit l'effet de dosage. De plus, la sévérité de la PKRAD étant similaire chez les trois lignées de souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ (30, 32, et 49), il est fort probable que le site d'intégration du transgène n'influence pas le phénotype induit par la présence du transgène $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$.

Les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ 30, 32, et 49 (figure 4.1) montre un niveau d'expression rénale de $Pc-1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ supérieur aux souris $Pkd1^{+/+}$ mais légèrement inférieur aux souris sauvages. Toutefois, ce n'est pas suffisant pour compléter totalement la létalité des souris $Pkd1^{-/-}$. En revanche, les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ 42, montre qu'un niveau d'expression rénale de $Pc-1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ d'environ 8 fois plus que les niveaux endogènes est suffisant pour compléter totalement la létalité des souris $Pkd1^{-/-}$. Les souris portant une allèle nulle hétérozygotes pour le gène *Pkd1* (soit $Pkd1^{+/+}$) présente une perte de 50% de Pc-1 et ne présente aucun phénotype jusqu'à un âge (Wu et al., 2002). Ainsi, il est possible de suggérer que le transgène $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ agit comme un hypomorphe fonctionnel, car la fonction de $Pc-1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ semble être conservée partiellement. Les niveaux d'expressions de Pc-1 entre les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ 42 et les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\text{TAG}26}$, montrent que $Pc-1_{\Delta\text{coiled-coil}42}$ n'est pas aussi élevé que ce qui serait attendu étant donné le nombre de copies du transgène. Dans ce cas, ce résultat suggère un défaut ou un retard dans la synthèse de $Pc-1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ en plus d'un défaut dans la fonction de la protéine.

Dans un autre ordre d'idée, en observant l'expression de Pc-1 chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ il est possible de constater une augmentation de la forme non glycosylée (bande à 370 kDa) de Pc-1 par rapport à la forme glycosylée (bande à 450 kDa) (figure 4.1a et b) suggérant un défaut potentiel de la maturation de $Pc-1_{\Delta\text{coiled-coil}}$. En effet, Pc-1 contient plus de 60 sites de glycosylation, donc il est possible que l'absence motif coiled-coil de Pc-1 modifie la structure de la protéine et empêche la glycosylation de certains sites (Hughes et al., 1995).

L'analyse de la première modification post-traductionnelle de Pc-1 soit le clivage au site protéolytique GPRC (GPS) (Qian et al., 2002) montre que les deux fragments de Pc-1 (NTF et CTF) semble être conservés chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ (figure 4.2). En effet, malgré qu'elle soit faiblement visible chez les hypomorphes, la lignée $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}42}$ montre que le clivage au site GPS est conservé indiquant que l'absence du motif coiled-coil de Pc-1 ne semble pas empêcher la protéine d'être clivée et de potentiellement de procéder à sa maturation. Ainsi, le clivage au site GPS ne semble pas être responsable des kystes observées chez les hypomorphes qui se développent *in utero* selon des résultats antérieurs obtenus par d'anciens membres du laboratoire (Côté, 2009). En effet, selon le modèle de souris PKRAD $Pkd1^{V/V}$ (figure 4.2b), le clivage n'est pas essentiel avant la naissance (Kurbegovic et al., 2014; Trudel et al., 2016; S. Yu et al., 2007) et les premiers kystes sont observées dès l'âge de 3 jours post-natal (P3) chez ce modèle. Les kystes étant développés plus tardivement chez ce modèle de souris suggèrent que la présence de kystes chez les $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ hypomorphes ne peuvent être attribués à un défaut de clivage au site GPS de Pc-1. D'une autre part, les résultats obtenus concordent avec les résultats de deux études où le motif coiled-coil et/ou la portion C terminal de Pc-1 fut délété *in vitro*, soit les mutants $PC1^{R4204}$, $PC1^{Y4100X}$ (Cai et al., 2014) et PC1-CTD (Chapin, Rajendran, & Caplan, 2010). Ces mutants démontrent un clivage normal au site GPS dans les cellules épithéliales LLC-PK1. Le clivage au site GPS étant conservé chez les $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ indique que la première étape du processus de maturation de $Pc-1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ n'est pas affecté par l'absence du motif coiled-coil de la protéine Pc-1.

Les essais de déglycosylation rénales effectués chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ montrent un délai de maturation entre le réticulum endoplasmique et le trans-Golgi (figure 4.3a). En effet, les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}49}$ présentent moins de Pc-1 mature comparativement au contrôle sauvage. De plus, les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}42}$ montrent aussi moins de Pc-1 mature que les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\text{TAG}26}$. Il est connu que la N-glycosylation des protéines membranaires débute peu après la translocation des protéines dans le réticulum endoplasmique (RE), mais avant que les protéines procèdent à leur repliement (C. Xu & Ng, 2015). De ce fait, il est probable que le motif coiled-coil de Pc-1 présente un ou plusieurs sites de glycosylation. L'absence potentielle de ces sites due à la délétion du motif coiled-coil chez les souris pourrait empêcher la protéine d'être entièrement glycosylée comme le contrôle sauvage et la souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\text{TAG}26}$ qui semblent

avoir autant de Pc-1^{Mature} que de Pc-1^{Immature}. D'ailleurs, il est bien connu que lorsque les protéines membranaires ne sont pas bien glycosylées dans le RE un défaut de repliement protéique survient généralement et ralentit le trafic intracellulaire des protéines (Moremen & Molinari, 2006). Donc, il est tout à fait possible que Pc-1 Δ coiled-coil présente aussi un défaut de repliement protéique. Toutefois, la souris Pkd1^{-/-} ; Pkd1 Δ coiled-coil42 exprimant une grande quantité de Pc-1 Δ coiled-coil produirait une fraction plus abondante de la protéine et pourrait compenser suffisamment le délai de glycosylation et n'entraînerait pas de phénotypes détectables. Cependant, le délai de maturation de Pc-1 Δ coiled-coil observé chez les hypomorphes semble être problématique étant donnée le phénotype PKRAD. Des études antérieures ont déjà montré qu'un défaut de maturation et du trafic intracellulaire de Pc-1 était associé avec une diminution de la forme mature de Pc-1 et mène à une PKRAD sévère (Cai et al., 2014; Gainullin et al., 2015). Soit, un mutant hypomorphe pour Pc-1, le Pkd1^{RC/RC} présente un défaut de maturation en plus d'un défaut de repliement protéique (Hopp et al., 2012). Cependant, ce mutant présente un phénotype PKRAD beaucoup moins sévère puisque les kystes se développent sur une période de 1 an. Ainsi, le défaut de maturation observé chez les souris Pkd1^{-/-} ; Pkd1 Δ coiled-coil à faible copie ne peut pas justifier totalement le développement et la progression rapide des kystes chez ce modèle. De plus, ce qui est surprenant c'est que la lignée Pkd1^{-/-} ; Pkd1 Δ coiled-coil42 ne présente pas de phénotype malgré qu'elle présente un niveau très élevé de Pc-1^{Immature} dans le RE ce qui suggère l'activation d'un mécanisme permettant d'éliminer le surplus de Pc-1 Δ coiled-coil puisque ces souris ne présentent aucun phénotype.

Nos résultats concordent aussi, avec l'étude de deux mutants de Pc-1 faite par Cai et al., en 2014. En effet, le mutant PC1^{R4204X} tronqué juste avant le motif coiled-coil est en mesure de se rendre jusqu'au cil ce qui montre que le motif coiled-coil n'est pas obligatoirement nécessaire au trafic intracellulaire de Pc-1. Dans cette étude un autre mutant PC1^{Y4100X} a été généré où toute la région C terminale de Pc-1 est délétée. Ce mutant n'étant pas en mesure de procéder à son trafic intracellulaire montre qu'une des régions primordiales pour le trafic de Pc-1 se situe entre l'acide aminé 4100 et 4204, soit juste avant le motif coiled-coil. Ainsi, le motif coiled-coil n'est pas essentiel à la maturation et au trafic intracellulaire de Pc-1, mais son absence le rend certainement moins efficace.

L'analyse de l'expression rénale de Pc-2 chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ montre que Pc-1 peut moduler l'expression de Pc-2 de manière directe ou indirectement. En effet, la surexpression de Pc-2 de 2 à 3 fois observée chez les hypomorphes et la diminution de Pc-2 observée chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ pourrait être due à une diminution de l'activité fonctionnelle de Pc-1 tel qu'un mécanisme compensatoire. D'ailleurs, d'autres études en plus de celle-ci démontrent qu'une altération au niveau de l'expression de Pc-1 module l'expression de Pc-2 (Cebotaru et al., 2014; Freedman et al., 2013; Kurbegovic & Trudel, 2013; Nauli et al., 2006). Néanmoins, nos résultats concordent avec les hypothèses qui suggèrent que Pc-1 est un régulateur négatif de Pc-2. Soit, Pc-1 a été démontré comme un régulateur négatif de Pc-2. Soit, une surexpression de Pc-1 engendre la dégradation de Pc-2 via les autophagosomes (Cebotaru et al., 2014). Ainsi, la diminution de l'expression de Pc-2 observé chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ peut être expliquée par l'expression élevée de Pc-1 chez ce modèle de souris. Il faut cependant noter qu'une dérégulation de l'expression de Pc-2 soit par une augmentation (A. Li et al., 2015)) ou par une diminution (I. Kim et al., 2009) peut aussi mener à l'apparition d'un phénotype PRKAD. De manière intéressante, la baisse d'expression rénale de Pc-2 observé chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ ne cause pas l'apparition d'un phénotype PKRAD.

Il est intéressant de comparer le niveau d'expression rénale des hypomorphes avec un modèle de souris où le gène *PKD2* humain ($PKD2^{Tg}$) a été surexprimé sur un fond génétique endogène *Pkd2* nul ($Pkd2^{-/-}$; $PKD2^{Tg}$) (A. Li et al., 2015). La létalité embryonnaire chez les souris $Pkd2^{-/-}$ est complétée avec ce modèle. En effet, ces souris survivent plus de 12 mois, toutefois ils présentent des kystes rénaux, pancréatiques et hépatiques. Li et al., ont démontré une amélioration du phénotype PKRAD par une augmentation dose dépendante du transgène $PKD2^{Tg}$. D'ailleurs dans ce modèle, Pc-2 est surexprimé environ jusqu'à 4 fois dans le rein par rapport au contrôle sauvage ce qui pourrait possiblement être comparable au niveau d'expression de Pc-2 observé chez les hypomorphes $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ qui surexprime jusqu'à 3 fois plus Pc-2 dans le rein. Le niveau d'expression rénal de Pc-2 chez les deux modèles n'étant pas identique suggère toutefois que, la surexpression de Pc-2 chez les hypomorphes n'est probablement pas suffisante pour prévenir et ralentir la progression des kystes dans la maladie.

Nos études d'interaction de Pc-1/Pc-2 *in vivo* chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$, montre une conservation d'interaction en l'absence du motif coiled-coil (figure 4.5), ce qui suggère la présence d'un nouveau site d'interaction et/ou d'un troisième partenaire d'interaction. Des analyses *in vitro* rapportent que Pc-1 et Pc-2 interagissent via le motif coiled-coil de Pc-1 (Qian et al., 1997); (Tsiokas et al., 1997) et que cette interaction est importante pour la maturation et la localisation de Pc-1 (Gainullin et al., 2015). Les données des souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ évoque en fait la possibilité d'une interaction directe pour les deux protéines via un autre site sur Pc-1 ou d'une interaction indirecte avec l'aide un troisième partenaire protéique. Cependant, comme le niveau d'interaction paraît plus faible en absence du motif coiled-coil, il est possible que le motif coiled-coil de Pc-1 facilite l'interaction entre les deux protéines en rendant la protéine Pc-2 plus accessible à Pc-1. Il est aussi possible que cette baisse d'efficacité soit due à la présence d'une protéine chaperonne qui facilite l'interaction entre Pc-1 et Pc-2 en présence de son motif coiled-coil. De plus, ce résultat obtenu concorde avec l'étude *in vitro* de Chapin et al., où le mutant PC1-CTD interagait quand même avec Pc-2 malgré l'absence de la portion C terminale de Pc-1 suggérant un autre site d'interaction (Chapin et al., 2010).

Nos résultats suggèrent qu'il est tout à fait probable que Pc-2 conserve son rôle de chaperonne auprès de Pc-1 pour sa maturation et sa localisation. Effectivement, il est probable que le motif coiled-coil de Pc-1 ne soit pas nécessaire pour la fonction chaperonne de Pc-2 alors que le contraire a été soutenu par le passé (Cai et al., 2014; Chapin et al., 2010; Gainullin et al., 2015; H. Kim et al., 2014). Soit, des études rapportent que Pc-2 est essentiel pour la maturation de Pc-1 ainsi que sa localisation à la membrane plasmique. Notamment, Kim et al., ont effectué une étude *in vitro* avec le mutant R4227X, où le motif coiled-coil de Pc-1 fut tronqué. Ce mutant n'était pas en mesure d'interagir avec Pc-2 et de procéder à son trafic intracellulaire avec la protéine Rabep1. D'ailleurs, Rabep1 a été démontrée pour interagir avec Pc-1 via le motif coiled-coil de Pc-1 (H. Kim et al., 2014). Ainsi, le délai de maturation de $Pc-1_{\Delta\text{coiled}}$ chez les $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ pourrait être expliqué par un défaut d'interaction possible avec ce partenaire protéique qui joue un rôle important dans le trafic intracellulaire de Pc-1 du RE au trans-Golgi.

Sachant que les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ présentent un délai de maturation entre le RE et le trans-Golgi les mécanismes responsables de la clairance des protéines ont été étudiés. L'analyse

d'une diminution d'expression des marqueurs typiques d'autophagie observée chez les souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil}$ hypomorphes (figure 4.6.1.1 et figure 4.6.1.2) suggère un déficit ou un défaut du mécanisme de l'autophagie. Ces résultats concordent avec des données provenant de la littérature. Parmi elles, un modèle de souris PKRAD hypomorphique, le *PKD1 miR Tg* a permis de démontrer une diminution significative de l'expression de l'ARNm de plusieurs gènes impliqués dans l'autophagie incluant p62 (Chou et al., 2018). Il a même été démontré qu'une suppression de l'autophagie contribue à la pathogenèse de la PKRAD (Nowak & Edelstein, 2019). Donc, il se peut que Pc-1 soit impliqué dans l'autophagie de manière directe par exemple via son motif coiled-coil ou indirectement. Il a aussi été montré qu'un déficit ou un défaut de l'autophagie peut s'expliquer par la difficulté à éliminer les agrégats de protéines (Fleming, Noda, Yoshimori, & Rubinsztein, 2011) donc, il se peut que l'absence du motif coiled-coil empêche Pc-1 d'être correctement reconnue par les activateurs de l'autophagie. De plus, les modèles $Pkd1^{-/-}$ présentent un déficit dans la clairance des protéines et accumule donc plus d'agrégats protéiques (Zhu et al., 2017). Ces données suggèrent donc que Pc-1 aurait un rôle dans la clairance des protéines direct ou indirectement. Donc, il se peut que le motif coiled-coil de Pc-1 présente une fonction dans la clairance des protéines et que sa délétion sur un fond endogène nul engendre la diminution d'autophagie telle qu'observée chez les hypomorphes et cause la présence de kystes rénaux.

Dans le cas des souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil42}$, l'expression de p62 (figure 4.6.1.1) et de LC3 II (figure 4.6.1.2a et c) étant élevé suggère une activation d'autophagie. Toutefois, LC3 I n'est pas diminué significativement donc il est difficile d'affirmer qu'il y a élévation d'autophagie (figure 4.6.1.2b). En effet, la présence d'autophagie est toujours marquée par une conversion de LC3 I en LC3 II (Zhu et al., 2017). Ainsi, puisque LC3 I n'est pas diminué significativement, il n'est pas possible d'affirmer que l'autophagie permet d'éliminer le surplus de Pc-1 observé dans le RE de la part des souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil42}$. D'ailleurs, il a été démontré qu'une altération de l'autophagie est souvent accompagnée par une accumulation de la protéine p62 qui se résulte en la formation de gros agrégats protéiques (Komatsu et al., 2007). De ce fait, il est tout à fait possible que l'accumulation de Pc-1 observé dans le RE des souris $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta coiled-coil42}$ génère de l'encombrement stérique empêchant p62 de recruter Pc-1 efficacement pour que celui-ci soit dégradé. Toutefois, il n'est pas impossible qu'un autre mécanisme parvienne à éliminer le surplus de $Pc-1_{\Delta coiled-coil}$ présent dans le RE.

Le retard dans les modifications post-traductionnelles et le délai de maturation de Pc-1 Δ coiled-coil observé chez les souris Pkd1 $^{-/-}$; Pkd1 Δ coiled-coil semblent être associés à un stress dans le RE. A partir des lignées MEFs Pkd1 $^{-/-}$; Pkd1 Δ coiled-coil, nous avons observé une augmentation de l'expression de la protéine Grp78/Bip (figure 4.6.2) ce qui sous-entend une activation d'un stress dans le RE. En effet, il est bien connu que l'expression de Grp78/Bip augmente lors d'un stress (Tsai et al., 2015) afin de corriger le repliement et l'assemblage des protéines et ainsi empêcher de procéder au trafic intracellulaire (Ibrahim, Abdelmalek, & Elfiky, 2019). En effet, Pc-1 Δ coiled-coil n'étant pas bien glycosylé, elle pourrait donc présenter un problème de repliements protéiques et Bip serait activé pour stimuler une des voies de dégradation de l'UPR.

L'augmentation de Bip observée chez les hypomorphes pourrait être en lien avec le taux élevé de Pc-2 chez ces souris. En effet, il a été démontré récemment qu'une augmentation à la hausse de Pc-2 est une conséquence directe de la présence d'un stress dans le RE (Brill et al., 2020). Cependant, cette étude ne permet pas d'expliquer la hausse de protéine Bip chez les Pkd1 $^{-/-}$; Pkd1 Δ coiled-coil⁴² puisque ceux-ci expriment moins de Pc-2 par rapport au contrôle sauvage. Toutefois, il ne faut pas oublier que les souris Pkd1 $^{-/-}$; Pkd1 Δ coiled-coil⁴² expriment une forte quantité de Pc-1 Δ coiled-coil dans le RE. Ainsi l'augmentation de Bip chez les Pkd1 $^{-/-}$; Pkd1 Δ coiled-coil⁴² peut simplement être due à une accumulation excessive de Pc-1 Δ coiled-coil mal replié dans le RE. La protéine présente en grande quantité dans le RE est probablement dégradée via la voie UPR. Cela étant dit, des analyses supplémentaires sont requises afin de déterminer laquelle des trois voies UPR est activées (IRE1, ATF6 ou PERK) chez les souris Pkd1 $^{-/-}$; Pkd1 Δ coiled-coil.

L'augmentation marquée de l'expression de Pc-1 Δ coiled-coil de la part des MEFs spécifiquement chez les hypomorphes à 33°C (comparativement à 37°C) confirme un défaut de repliement de la protéine (figure 4.7.1). En effet, le repliement des protéines peut être favorisé en modulant la température de son environnement (X. Wang et al., 2008). De plus, la présence d'un stress dans le RE et le délai de maturation de Pc-1 Δ coiled-coil chez les souris Pkd1 $^{-/-}$; Pkd1 Δ coiled-coil, supporte le défaut de repliement de Pc-1 Δ coiled-coil observé chez les MEFs des souris Pkd1 $^{-/-}$; Pkd1 Δ coiled-coil⁴⁹. L'expression similaire de Pc-1 testé pour les deux températures observées chez les MEFs de la lignée Pkd1 $^{-/-}$; Pkd1 Δ coiled-coil⁴² peut s'expliquer par l'expression des deux formes de Pc-1 (mature

et immature), Ainsi, puisque Pc-1 est surexprimée dans cette lignée, il n'est pas possible de détecter si la baisse de température à 33°C est bénéfique pour le rapport de Pc-1 mature comparativement à Pc-1 immature.

Bien que cette analyse demeure préliminaire, il est intéressant de constater une augmentation de la sécrétion de Pc-1 Δ coiled-coil dans les exosomes des MEFs primaires des Pkd1 $^{-/-}$; Pkd1 Δ coiled-coil. En effet, il a été pertinent de vérifier la sécrétion de Pc-1 Δ coiled-coil dans les exosomes auprès des mutants Pkd1 $^{-/-}$; Pkd1 Δ coiled-coil (figure 4.7.2) pour les deux températures (33°C et à 37°C). Il est intéressant de noter que le résultat obtenu pour les hypomorphes bien qu'il soit préliminaire, concorde avec l'étude de Hopp et al., faite en 2012. En effet, le même type d'expérience a été effectué à partir de cellules primaires isolées des tubules collecteurs des souris Pkd1 $^{RC/RC}$ hypomorphes qui présentent un problème de repliement protéique. Le défaut de maturation/trafic intracellulaire de Pc-1 RC dans ces cellules a été corrigé totalement à 33°C par la présence de Pc-1 mature dans les exosomes secrétées par les cellules des tubules collecteurs comparativement à une expression de 40% lorsque les cellules sont incubées à 37°C (Hopp et al., 2012). Nos résultats des MEFs primaires des Pkd1 $^{-/-}$; Pkd1 Δ coiled-coil montrent que l'absence du motif coiled-coil de Pc-1 engendre un défaut de repliement protéique ce qui retarde le trafic intracellulaire de la protéine. Ainsi une correction de ce défaut de repliement protéique permet à Pc-1 Δ coiled-coil de transiter autant si ce n'est pas un peu plus que le contrôle sauvage dans les exosomes. En somme, cette étude permet d'évoquer la possibilité d'utiliser une protéine chaperonne à des fins d'outil thérapeutique dans le but de promouvoir un repliement adéquat de Pc-1 Δ coiled-coil pour sa maturation et son trafic intracellulaire. Il y a plusieurs protéines mutées tel que CFTR, récepteur de la Vasopressine qui ont pu être corrigé grâce aux développements de chaperonnes permettant de faire transiter ces protéines à la membrane plasmique (Okiyoneda et al., 2013). En effet, des molécules chimiques et/ou biologiques se sont avérées être efficace afin de favoriser le repliement adéquat de protéine mutée dans certaines maladies leur permettant ainsi de procéder à leur trafic intracellulaire et de corriger un phénotype pathogénique (Van Goor et al., 2011). Ainsi, sachant que des mutations dans le motif coiled-coil de Pc-1 a déjà été répertoriées auprès de patients PKRAD, cette nouvelle analyse du motif coiled-coil donne une ouverture sur la possibilité des approches thérapeutiques pouvant être utilisées dans la PKRAD.

L'ensemble de l'analyse du transport et de la maturation de $Pc-1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ est résumé sur la figure 5.1. Les souris $Pkd1^{-/-}; Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ expriment $Pc-1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ selon le nombre de copie du transgène dans le RE. L'expression de $Pc-2$ est modulée à la baisse chez les souris $Pkd1^{-/-}; Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}42$ (35 copies) et à la hausse dans le RE des souris $Pkd1^{-/-}; Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}49$ (1 copie). L'augmentation de $Pc-1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ chez la lignée $Pkd1^{-/-}; Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}42$ (spécifiquement dans le RE) et l'augmentation de $Pc-2$ chez la lignée $Pkd1^{-/-}; Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}49$ semblent causer un stress au niveau du RE. Ce stress activerait l'une des trois voies de UPR afin d'éliminer l'excès de protéines présents dans le RE. Cependant, l'absence du motif coiled-coil de $Pc-1$ n'empêche pas l'interaction $Pc-1/Pc-2$ et n'altère pas le clivage au site GPS qui est la première étape de la maturation de $Pc-1$ (Qian et al., 2002). Le complexe $Pc-1/Pc-2$ est donc en mesure de transiter vers l'appareil de Golgi indépendamment de la présence du motif coiled-coil.

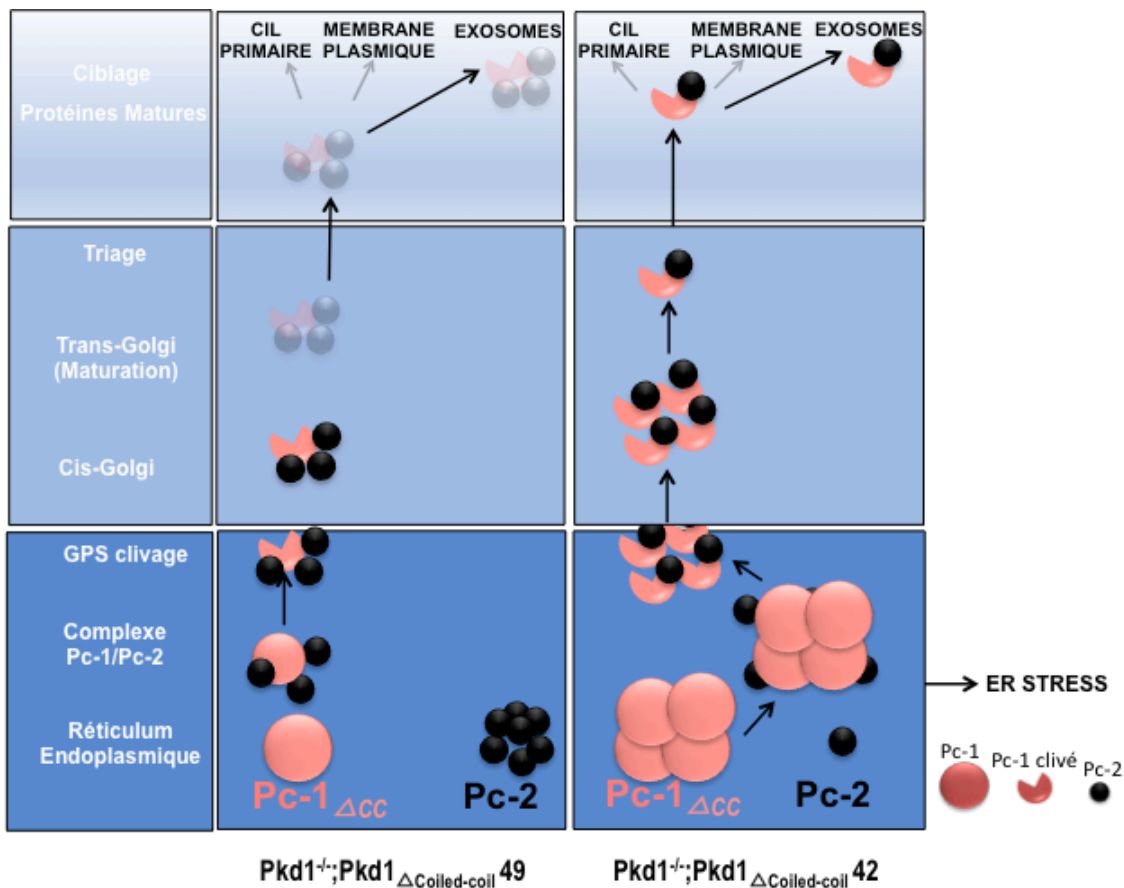


Figure 5.1 Transport et maturation de la polycystine-1 chez les souris $Pkd1^{-/-}; Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ $Pc-1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ (rouge) à une copie est un hypomorphe fonctionnel (gauche) et $Pc-2$ (noir) est modulé à la hausse. Lorsque $Pc-1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ est surexprimé (droite), $Pc-2$ est modulé à la baisse. La présence accrue de $Pc-1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ dans le RE sur la lignée $Pkd1^{-/-}; Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}42$ et l'augmentation de $Pc-2$ chez les hypomorphes cause un stress dans le RE et active

une des 3 voies de l'UPR. Ensuite, Pc-1 Δ coiled-coil interagit avec Pc-2 dans le réticulum endoplasmique et le clivage au site GPS de Pc-1 Δ coiled-coil n'est pas altéré. Le complexe Pc-1 Δ coiled-coil/Pc-2 est ensuite transporté dans le cis-Golgi. Un délai de maturation est encouru en absence du motif coiled-coil, mais Pc-1 Δ coiled-coil est en mesure de se rendre dans les exosomes.

Une fraction de Pc-1 Δ coiled-coil parvient à se rendre au trans-Golgi possiblement dû à un défaut de repliement de la protéine générant ainsi un délai de maturation. Malgré le défaut de maturation, Pc-1 Δ coiled-coil est quand même en mesure de se rendre dans les exosomes ce qui suggère que la protéine pourrait transiter à la membrane plasmique et se rendre aussi dans le cil primaire (Cai et al., 2014; S. M. Nauli et al., 2003). Finalement, lorsque Pc-1 Δ coiled-coil est surexprimé, les interactions et le trafic intracellulaire de Pc-1 demeurent quand même suffisants pour éviter le développement de la PKRAD. Donc, le motif coiled-coil de Pc-1 aurait une fonction dans l'efficacité du transport et de la maturation de Pc-1. Une correction de cette de cette inefficacité par des approches thérapeutiques biochimique permettrait à Pc-1 Δ coiled-coil de transiter normalement dans le trans-Golgi.

6. Conclusion

En conclusion, l'étude du nouveau modèle murin $Pkd1^{-/-}$; $Pkd1_{\Delta\text{coiled-coil}}$ permet d'élucider le rôle du motif coiled-coil de la polycystine-1 dans la protéine, l'homéostasie rénale et dans la kystogénèse. De prime abord, ces lignées de souris ont permis de démontrer deux résultats importants soit l'effet de dosage dans la pathogenèse de la PKRAD et le rôle essentiel du motif coiled-coil de la polycystine-1 dans le développement et l'homéostasie rénal. En effet, sur un fond génétique nul ($Pkd1^{-/-}$), l'expression de la polycystine-1 délété de son motif coiled-coil mène à l'apparition d'un phénotype de polykystose rénale chez la souris, alors qu'une surexpression de la protéine tronquée ne cause pas de phénotype. En revanche, lorsque la polycystine-1 est surexprimée en présence de son motif coiled-coil et ce sur un fond génétique endogène ($Pkd1^{+/+}$) il y a développement de la PKRAD alors qu'en absence de son motif, il n'y a aucun phénotype. Ainsi, le motif coiled-coil a une fonction importante non seulement dans la protéine polycystine-1, mais aussi dans le mécanisme pathogénétique de la PKRAD. Notre étude a aussi démontré le rôle critique du motif coiled-coil de la polycystine-1 dans la maturation et le transport intracellulaire de la protéine. Effectivement, l'absence du motif coiled-coil de la polycystine-1 engendre un délai du trafic intracellulaire et de maturation. Le retard dans le transit de la polycystine-1, potentiellement causé par un problème de repliement, entraîne un stress dans le réticulum endoplasmique et mène à l'activation d'une des trois voies de réponses aux protéines mal repliées. Malgré l'absence de son motif coiled-coil, l'interaction entre la polycystine-1 et la polycystine-2 est maintenue. Ce résultat illustre que la polycystine-1 est en mesure d'interagir avec la polycystine-2 via un autre domaine avec/ou sans la présence d'un troisième partenaire protéique. Cette étude nous permet d'envisager le développement de cibles thérapeutiques visant le motif coiled-coil pour les patients PKRAD ayant des mutations similaires dans ce motif. D'un point de vue biochimique, le développement de chaperonnes chimiques adaptées à la polycystine-1 comme outil thérapeutique permettrait finalement de minimiser la formation et la progression de kystes dans la PKRAD.

Bibliographie

- Al-Awqati, Q., & Goldberg, M. R. (1998). Architectural patterns in branching morphogenesis in the kidney. *Kidney International*, 54(6), 1832-1842. doi:10.1046/j.1523-1755.1998.00196.x
- Ali, H., Hussain, N., Naim, M., Zayed, M., Al-Mulla, F., Kehinde, E. O., . . . Harris, P. C. (2015). A novel PKD1 variant demonstrates a disease-modifying role in trans with a truncating PKD1 mutation in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *BMC Nephrology*, 16, 26. doi:10.1186/s12882-015-0015-7
- Ashraf N. Malhas, R. A. A., and Robert G. Price. (2001). Interaction of the Leucine-Rich Repeats of Polycystin-1 with Extracellular Matrix Proteins: Possible Role in Cell Proliferation. *Journal of the American Society of Nephrology*, 13, 19-26.
- Audrézet, M. P., Cornec-Le Gall, E., Chen, J. M., Redon, S., Quéré, I., Creff, J., . . . Férec, C. (2012). Autosomal dominant polycystic kidney disease: comprehensive mutation analysis of PKD1 and PKD2 in 700 unrelated patients. *Human Mutation*, 33(8), 1239-1250. doi:10.1002/humu.22103
- Badenas, C., Torra, R., San Millán, J. L., Lucero, L., Milà, M., Estivill, X., & Darnell, A. (1999). Mutational analysis within the 3' region of the PKD1 gene. *Kidney International*, 55(4), 1225-1233. doi:10.1046/j.1523-1755.1999.00368.x
- Benjamin S. Weston 1, C. B. r., Robert G. Price, John L. Stirling. (2001). The polycystin-1 C-type lectin domain binds carbohydrate in a calcium-dependent manner, and interacts with extracellular matrix proteins in vitro. (1536), 161-176.
- Bergmann, C. (2015). ARPKD and early manifestations of ADPKD: the original polycystic kidney disease and phenocopies. *Pediatric Nephrology*, 30(1), 15-30. doi:10.1007/s00467-013-2706-2
- Bergmann, C., Guay-Woodford, L. M., Harris, P. C., Horie, S., Peters, D. J. M., & Torres, V. E. (2018). Polycystic kidney disease. *Nat Rev Dis Primers*, 4(1), 50. doi:10.1038/s41572-018-0047-y
- Besse, W., Chang, A. R., Luo, J. Z., Triffo, W. J., Moore, B. S., Gulati, A., . . . Mirshahi, T. (2019). ALG9 Mutation Carriers Develop Kidney and Liver Cysts. *Journal of the American Society of Nephrology*, 30(11), 2091-2102. doi:10.1681/asn.2019030298

- Besse, W., Dong, K., Choi, J., Punia, S., Fedeles, S. V., Choi, M., . . . Somlo, S. (2017). Isolated polycystic liver disease genes define effectors of polycystin-1 function. *J Clin Invest*, *127*(5), 1772-1785. doi:10.1172/JCI90129
- Bhunja, A. K., Piontek, K., Boletta, A., Liu, L., Qian, F., Xu, P. N., . . . Germino, G. G. (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. doi:10.1016/s0092-8674(02)00716-x
- Bogdanova, N., Markoff, A., Gerke, V., McCluskey, M., Horst, J., & Dworniczak, B. (2001). Homologues to the first gene for autosomal dominant polycystic kidney disease are pseudogenes. *Genomics*, *74*(3), 333-341. doi:10.1006/geno.2001.6568
- Bolar, N. A., Golzio, C., Zivna, M., Hayot, G., Van Hemelrijk, C., Schepers, D., . . . Loeys, B. L. (2016). Heterozygous Loss-of-Function SEC61A1 Mutations Cause Autosomal-Dominant Tubulo-Interstitial and Glomerulocystic Kidney Disease with Anemia. *American Journal of Human Genetics*, *99*(1), 174-187. doi:10.1016/j.ajhg.2016.05.028
- Boucher, C. A., Ward, H. H., Case, R. L., Thurston, K. S., Li, X., Needham, A., . . . Sandford, R. N. (2011). Receptor protein tyrosine phosphatases are novel components of a polycystin complex. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1812*(10), 1225-1238. doi:10.1016/j.bbadis.2010.11.006
- Boulter, C., Mulroy, S., Webb, S., Fleming, S., Brindle, K., & Sandford, R. (2001). Cardiovascular, skeletal, and renal defects in mice with a targeted disruption of the Pkd1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(21), 12174-12179. doi:10.1073/pnas.211191098
- Brill, A. L., Fischer, T. T., Walters, J. M., Marlier, A., Sewanan, L. R., Wilson, P. C., . . . Ehrlich, B. E. (2020). Polycystin 2 is increased in disease to protect against stress-induced cell death. *Scientific Reports*, *10*(1), 386. doi:10.1038/s41598-019-57286-x
- Cai, Y., Anyatonwu, G., Okuhara, D., Lee, K. B., Yu, Z., Onoe, T., . . . Somlo, S. (2004). Calcium dependence of polycystin-2 channel activity is modulated by phosphorylation at Ser812. *J Biol Chem*, *279*(19), 19987-19995. doi:10.1074/jbc.M312031200
- Cai, Y., Fedeles, S. V., Dong, K., Anyatonwu, G., Onoe, T., Mitobe, M., . . . Somlo, S. (2014). Altered trafficking and stability of polycystins underlie polycystic kidney disease. *J Clin Invest*, *124*(12), 5129-5144. doi:10.1172/JCI67273
- Caroli, A., Perico, N., Perna, A., Antiga, L., Brambilla, P., Pisani, A., . . . Ruggenti, P. (2013). Effect of longacting somatostatin analogue on kidney and cyst growth in autosomal dominant polycystic kidney disease (ALADIN): a randomised, placebo-controlled, multicentre trial. *The Lancet*, *382*(9903), 1485-1495. doi:10.1016/s0140-6736(13)61407-5

- Cebotaru, V., Cebotaru, L., Kim, H., Chiaravalli, M., Boletta, A., Qian, F., & Guggino, W. B. (2014). Polycystin-1 Negatively Regulates Polycystin-2 Expression via the Aggresome/Autophagosome Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(10), 6404-6414. doi:10.1074/jbc.M113.501205
- Chandok, N. (2012). Polycystic liver disease: a clinical review. *Annals of Hepatology*, *11*(6), 819-826.
- Chapin, H. C., Rajendran, V., & Caplan, M. J. (2010). Polycystin-1 surface localization is stimulated by polycystin-2 and cleavage at the G protein-coupled receptor proteolytic site. *Molecular Biology of the Cell*, *21*(24), 4338-4348. doi:10.1091/mbc.E10-05-0407
- Chauvet, V., Tian, X., Husson, H., Grimm, D. H., Wang, T., Hieseberger, T., . . . Caplan, M. J. (2004). Mechanical stimuli induce cleavage and nuclear translocation of the polycystin-1 C terminus. *Journal of Clinical Investigation*, *114*(10), 1433-1443. doi:10.1172/jci21753
- Chebib, F. T., Perrone, R. D., Chapman, A. B., Dahl, N. K., Harris, P. C., Mrug, M., . . . Torres, V. E. (2018). A Practical Guide for Treatment of Rapidly Progressive ADPKD with Tolvaptan. *Journal of the American Society of Nephrology*, *29*(10), 2458-2470. doi:10.1681/asn.2018060590
- Chebib, F. T., Sussman, C. R., Wang, X., Harris, P. C., & Torres, V. E. (2015). Vasopressin and disruption of calcium signalling in polycystic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*, *11*(8), 451-464. doi:10.1038/nrneph.2015.39
- Chou, L. F., Cheng, Y. L., Hsieh, C. Y., Lin, C. Y., Yang, H. Y., Chen, Y. C., . . . Chang, M. Y. (2018). Effect of Trehalose Supplementation on Autophagy and Cystogenesis in a Mouse Model of Polycystic Kidney Disease. *Nutrients*, *11*(1). doi:10.3390/nu11010042
- Cnossen, W. R., te Morsche, R. H., Hoischen, A., Gilissen, C., Venselaar, H., Mehdi, S., . . . Drenth, J. P. (2016). LRP5 variants may contribute to ADPKD. *European Journal of Human Genetics*, *24*(2), 237-242. doi:10.1038/ejhg.2015.86
- Cornec-Le Gall, E., Audrézet, M. P., Chen, J. M., Hourmant, M., Morin, M. P., Perrichot, R., . . . Le Meur, Y. (2013). Type of PKD1 mutation influences renal outcome in ADPKD. *Journal of the American Society of Nephrology*, *24*(6), 1006-1013. doi:10.1681/asn.2012070650
- Cornec-Le Gall, E., Olson, R. J., Besse, W., Heyer, C. M., Gainullin, V. G., Smith, J. M., . . . Harris, P. C. (2018). Monoallelic Mutations to DNAJB11 Cause Atypical Autosomal-Dominant Polycystic Kidney Disease. *American Journal of Human Genetics*, *102*(5), 832-844. doi:10.1016/j.ajhg.2018.03.013

- Côté, O. (2009). *Analyse fonctionnelle de la polycystine-1 et de son domaine intracellulaire dans le développement de la polykystose rénale autosomique dominante*. (Maîtrise). Université de Montréal,
- Davila, S., Furu, L., Gharavi, A. G., Tian, X., Onoe, T., Qian, Q., . . . Somlo, S. (2004). Mutations in SEC63 cause autosomal dominant polycystic liver disease. *Nat Genet*, *36*(6), 575-577. doi:10.1038/ng1357
- Dere, R., Wilson, P. D., Sandford, R. N., & Walker, C. L. (2010). Carboxy terminal tail of polycystin-1 regulates localization of TSC2 to repress mTOR. *PloS One*, *5*(2), e9239. doi:10.1371/journal.pone.0009239
- Distefano, G., Boca, M., Rowe, I., Wodarczyk, C., Ma, L., Piontek, K. B., . . . Boletta, A. (2009). Polycystin-1 regulates extracellular signal-regulated kinase-dependent phosphorylation of tuberin to control cell size through mTOR and its downstream effectors S6K and 4EBP1. *Mol Cell Biol*, *29*(9), 2359-2371. doi:10.1128/mcb.01259-08
- Dong, G., Medkova, M., Novick, P., & Reinisch, K. M. (2007). A catalytic coiled coil: structural insights into the activation of the Rab GTPase Sec4p by Sec2p. *Molecular Cell*, *25*(3), 455-462. doi:10.1016/j.molcel.2007.01.013
- Dorn, L., Menezes, L. F., Mikuz, G., Otto, H. F., Onuchic, L. F., & Sergi, C. (2009). Immunohistochemical detection of polyductin and co-localization with liver progenitor cell markers during normal and abnormal development of the intrahepatic biliary system and in adult hepatobiliary carcinomas. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *13*(7), 1279-1290. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00519.x
- Drenth, J. P., te Morsche, R. H., Smink, R., Bonifacino, J. S., & Jansen, J. B. (2003). Germline mutations in PRKCSH are associated with autosomal dominant polycystic liver disease. *Nat Genet*, *33*(3), 345-347. doi:10.1038/ng1104
- Dressler, G. R. (2006). The cellular basis of kidney development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *22*, 509-529. doi:10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104340
- Eceder, T., & Schrier, R. W. (2009). Cardiovascular abnormalities in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*, *5*(4), 221-228. doi:10.1038/nrneph.2009.13
- Elaine N. Marieb, R. L. (2005). Le système urinaire (R. Lachaine, Trans.). In R. P. Inc (Ed.), *Anatomie et physiologie humaines* (pp. 1027-1028).
- Fleming, A., Noda, T., Yoshimori, T., & Rubinsztein, D. C. (2011). Chemical modulators of autophagy as biological probes and potential therapeutics. *Nature Chemical Biology*, *7*(1), 9-17. doi:10.1038/nchembio.500

- Foy, R. L., Chitalia, V. C., Panchenko, M. V., Zeng, L., Lopez, D., Lee, J. W., . . . Cohen, H. T. (2012). Polycystin-1 regulates the stability and ubiquitination of transcription factor Jade-1. *Human Molecular Genetics*, 21(26), 5456-5471. doi:10.1093/hmg/dd3391
- Fragiadaki, M., Macleod, F. M., & Ong, A. C. M. (2020). The Controversial Role of Fibrosis in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23). doi:10.3390/ijms21238936
- Freedman, B. S., Lam, A. Q., Sundsbak, J. L., Iatrino, R., Su, X., Koon, S. J., . . . Bonventre, J. V. (2013). Reduced ciliary polycystin-2 in induced pluripotent stem cells from polycystic kidney disease patients with PKD1 mutations. *Journal of the American Society of Nephrology*, 24(10), 1571-1586. doi:10.1681/ASN.2012111089
- Friedlander, G., & Amiel, C. (1986). Somatostatin and alpha 2-adrenergic agonists selectively inhibit vasopressin-induced cyclic AMP accumulation in MDCK cells. *FEBS Letters*, 198(1), 38-42. doi:10.1016/0014-5793(86)81180-2
- Gainullin, V. G., Hopp, K., Ward, C. J., Hommerding, C. J., & Harris, P. C. (2015). Polycystin-1 maturation requires polycystin-2 in a dose-dependent manner. *J Clin Invest*, 125(2), 607-620. doi:10.1172/JCI76972
- Garcia-Gonzalez, M. A., Jones, J. G., Allen, S. K., Palatucci, C. M., Batish, S. D., Seltzer, W. K., . . . Watnick, T. J. (2007). Evaluating the clinical utility of a molecular genetic test for polycystic kidney disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, 92(1-2), 160-167. doi:10.1016/j.ymgme.2007.05.004
- Geng, L., Burrow, C. R., Li, H. P., & Wilson, P. D. (2000). Modification of the composition of polycystin-1 multiprotein complexes by calcium and tyrosine phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1535(1), 21-35. doi:10.1016/s0925-4439(00)00079-x
- Geng, L., Segal, Y., Peissel, B., Deng, N., Pei, Y., Carone, F., . . . Zhou, J. (1996). Identification and localization of polycystin, the PKD1 gene product. *J Clin Invest*, 98(12), 2674-2682. doi:10.1172/jci119090
- Giamarchi, A., Padilla, F., Coste, B., Raoux, M., Crest, M., Honore, E., & Delmas, P. (2006). The versatile nature of the calcium-permeable cation channel TRPP2. *EMBO Rep*, 7(8), 787-793. doi:10.1038/sj.embor.7400745
- Grantham, J. J., Mulamalla, S., & Swenson-Fields, K. I. (2011). Why kidneys fail in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*, 7(10), 556-566. doi:10.1038/nrneph.2011.109

- Guillaume, R., & Trudel, M. (2000). Distinct and common developmental expression patterns of the murine Pkd2 and Pkd1 genes. *Mechanisms of Development*, 93(1-2), 179-183. doi:10.1016/s0925-4773(00)00257-4
- Gunay-Aygun, M., Avner, E. D., Bacallao, R. L., Choyke, P. L., Flynn, J. T., Germino, G. G., . . . Gahl, W. A. (2006). Autosomal recessive polycystic kidney disease and congenital hepatic fibrosis: summary statement of a first National Institutes of Health/Office of Rare Diseases conference. *Journal of Pediatrics*, 149(2), 159-164. doi:10.1016/j.jpeds.2006.03.014
- Hama, T., & Park, F. (2016). Heterotrimeric G protein signaling in polycystic kidney disease. *Physiological Genomics*, 48(7), 429-445. doi:10.1152/physiolgenomics.00027.2016
- Hanaoka, K., & Guggino, W. B. (2000). cAMP regulates cell proliferation and cyst formation in autosomal polycystic kidney disease cells. *Journal of the American Society of Nephrology*, 11(7), 1179-1187.
- Hardy, E., & Tsiokas, L. (2020). Polycystins as components of large multiprotein complexes of polycystin interactors. *Cellular Signalling*, 72, 109640. doi:10.1016/j.cellsig.2020.109640
- Harris, P. C., & Rossetti, S. (2010). Molecular diagnostics for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*, 6(4), 197-206. doi:10.1038/nrneph.2010.18
- Hart, T. C., Gorry, M. C., Hart, P. S., Woodard, A. S., Shihabi, Z., Sandhu, J., . . . Bleyer, A. J. (2002). Mutations of the UMOD gene are responsible for medullary cystic kidney disease 2 and familial juvenile hyperuricaemic nephropathy. *Journal of Medical Genetics*, 39(12), 882-892. doi:10.1136/jmg.39.12.882
- Hayashi, T., Mochizuki, T., Reynolds, D. M., Wu, G., Cai, Y., & Somlo, S. (1997). Characterization of the exon structure of the polycystic kidney disease 2 gene (PKD2). *Genomics*, 44(1), 131-136. doi:10.1006/geno.1997.4851
- Higashihara, E., Horie, S., Kinoshita, M., Harris, P. C., Okegawa, T., Tanbo, M., . . . Nutahara, K. (2018). A potentially crucial role of the PKD1 C-terminal tail in renal prognosis. *Clinical and Experimental Nephrology*, 22(2), 395-404. doi:10.1007/s10157-017-1477-7
- Hoefele, J., Mayer, K., Scholz, M., & Klein, H. G. (2011). Novel PKD1 and PKD2 mutations in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 26(7), 2181-2188. doi:10.1093/ndt/gfq720
- Hoffmeister, H., Babinger, K., Gurster, S., Cedzich, A., Meese, C., Schadendorf, K., . . . Witzgall, R. (2011). Polycystin-2 takes different routes to the somatic and ciliary plasma membrane. *Journal of Cell Biology*, 192(4), 631-645. doi:10.1083/jcb.201007050

- Hogan, M. C., Bakeberg, J. L., Gainullin, V. G., Irazabal, M. V., Harmon, A. J., Lieske, J. C., . . . Ward, C. J. (2015). Identification of Biomarkers for PKD1 Using Urinary Exosomes. *Journal of the American Society of Nephrology*, 26(7), 1661-1670. doi:10.1681/ASN.2014040354
- Hogan, M. C., Manganelli, L., Woollard, J. R., Masyuk, A. I., Masyuk, T. V., Tammachote, R., . . . Ward, C. J. (2009). Characterization of PKD protein-positive exosome-like vesicles. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(2), 278-288. doi:10.1681/ASN.2008060564
- Holditch, S. J., Brown, C. N., Atwood, D. J., Lombardi, A. M., Nguyen, K. N., Toll, H. W., . . . Edelstein, C. L. (2019). A study of sirolimus and mTOR kinase inhibitor in a hypomorphic Pkd1 mouse model of autosomal dominant polycystic kidney disease. *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, 317(1), F187-f196. doi:10.1152/ajprenal.00051.2019
- Hopp, K., Ward, C. J., Hommerding, C. J., Nasr, S. H., Tuan, H. F., Gainullin, V. G., . . . Harris, P. C. (2012). Functional polycystin-1 dosage governs autosomal dominant polycystic kidney disease severity. *J Clin Invest*, 122(11), 4257-4273. doi:10.1172/JCI64313
- Huan, Y., & van Adelsberg, J. (1999). Polycystin-1, the PKD1 gene product, is in a complex containing E-cadherin and the catenins. *J Clin Invest*, 104(10), 1459-1468. doi:10.1172/jci5111
- Hughes, J., Ward, C. J., Peral, B., Aspinwall, R., Clark, K., San Millán, J. L., . . . Harris, P. C. (1995). The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nature Genetics*, 10(2), 151-160. doi:10.1038/ng0695-151
- Ibraghimov-Beskrovnyaya, O., & Natoli, T. A. (2011). mTOR signaling in polycystic kidney disease. *Trends in Molecular Medicine*, 17(11), 625-633. doi:10.1016/j.molmed.2011.06.003
- Ibrahim, I. M., Abdelmalek, D. H., & Elfiky, A. A. (2019). GRP78: A cell's response to stress. *Life Sciences*, 226, 156-163. doi:10.1016/j.lfs.2019.04.022
- Jared J. Grantham, M. D., Vicente E. Torres, M.D., Arlene B. Chapman, M.D., Lisa M. Guay-Woodford, M.D., Kyongtae T. Bae, M.D., Ph.D., Bernard F. King, Jr., M.D., Louis H. Wetzell, M.D., Deborah A. Baumgarten, M. D., Phillip J. Kenney, M.D., Peter C. Harris, Ph.D., Saulo Klahr, M.D., William M. Bennett, M.D., Gladys N. Hirschman, M.D., Catherine M. Meyers, M.D., Xiaoling Zhang, M.S., Fang Zhu, M.D., & Miller, a. J. P. (2006). Volume Progression in Polycystic Kidney Disease. *The new england journal of medicine*, 354, 2122-2130.

- Jim Hughes, C. J. W., Richard Aspinwall, Robin Butler and Peter C. Harris. (1999). Identification of a human homologue of the sea urchin receptor for egg jelly: a polycystic kidney disease-like protein. *Human Molecular Genetics*, 8(3), 543-549.
- Keller, S., Ridinger, J., Rupp, A. K., Janssen, J. W., & Altevogt, P. (2011). Body fluid derived exosomes as a novel template for clinical diagnostics. *Journal of Translational Medicine*, 9, 86. doi:10.1186/1479-5876-9-86
- Keri, K. C., Regner, K. R., Dall, A. T., & Park, F. (2018). Urinary exosomal expression of activator of G protein signaling 3 in polycystic kidney disease. *BMC Research Notes*, 11(1), 359. doi:10.1186/s13104-018-3467-6
- Kim, E., Arnould, T., Sellin, L., Benzing, T., Comella, N., Kocher, O., . . . Walz, G. (1999). Interaction between RGS7 and polycystin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(11), 6371-6376. doi:10.1073/pnas.96.11.6371
- Kim, H., Jeong, W., Ahn, K., Ahn, C., & Kang, S. (2004). Siah-1 interacts with the intracellular region of polycystin-1 and affects its stability via the ubiquitin-proteasome pathway. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15(8), 2042-2049. doi:10.1097/01.ASN.0000133490.00348.59
- Kim, H., Xu, H., Yao, Q., Li, W., Huang, Q., Outeda, P., . . . Qian, F. (2014). Ciliary membrane proteins traffic through the Golgi via a Rabep1/GGA1/Arl3-dependent mechanism. *Nat Commun*, 5, 5482. doi:10.1038/ncomms6482
- Kim, I., Ding, T., Fu, Y., Li, C., Cui, L., Li, A., . . . Wu, G. (2009). Conditional mutation of Pkd2 causes cystogenesis and upregulates beta-catenin. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(12), 2556-2569. doi:10.1681/asn.2009030271
- Kim, K., Drummond, I., Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Klinger, K., & Arnaout, M. A. (2000). Polycystin 1 is required for the structural integrity of blood vessels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(4), 1731-1736. doi:10.1073/pnas.040550097
- Kim, S., Nie, H., Nesin, V., Tran, U., Outeda, P., Bai, C. X., . . . Tsiokas, L. (2016). The polycystin complex mediates Wnt/Ca(2+) signalling. *Nature Cell Biology*, 18(7), 752-764. doi:10.1038/ncb3363
- Kirby, A., Gnirke, A., Jaffe, D. B., Baresova, V., Pochet, N., Blumenstiel, B., . . . Daly, M. J. (2013). Mutations causing medullary cystic kidney disease type 1 lie in a large VNTR in MUC1 missed by massively parallel sequencing. *Nat Genet*, 45(3), 299-303. doi:10.1038/ng.2543

- Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y. S., Ueno, T., Hara, T., . . . Tanaka, K. (2007). Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell*, *131*(6), 1149-1163. doi:10.1016/j.cell.2007.10.035
- Kuhn, M., Hyman, A. A., & Beyer, A. (2014). Coiled-coil proteins facilitated the functional expansion of the centrosome. *PLoS Computational Biology*, *10*(6), e1003657. doi:10.1371/journal.pcbi.1003657
- Kurbegovic, A., Cote, O., Couillard, M., Ward, C. J., Harris, P. C., & Trudel, M. (2010). Pkd1 transgenic mice: adult model of polycystic kidney disease with extrarenal and renal phenotypes. *Human Molecular Genetics*, *19*(7), 1174-1189. doi:10.1093/hmg/ddp588
- Kurbegovic, A., Kim, H., Xu, H., Yu, S., Cruanes, J., Maser, R. L., . . . Qian, F. (2014). Novel functional complexity of polycystin-1 by GPS cleavage in vivo: role in polycystic kidney disease. *Mol Cell Biol*, *34*(17), 3341-3353. doi:10.1128/MCB.00687-14
- Kurbegovic, A., & Trudel, M. (2013). Progressive development of polycystic kidney disease in the mouse model expressing Pkd1 extracellular domain. *Human Molecular Genetics*, *22*(12), 2361-2375. doi:10.1093/hmg/ddt081
- Lal, M., Song, X., Pluznick, J. L., Di Giovanni, V., Merrick, D. M., Rosenblum, N. D., . . . Caplan, M. J. (2008). Polycystin-1 C-terminal tail associates with beta-catenin and inhibits canonical Wnt signaling. *Human Molecular Genetics*, *17*(20), 3105-3117. doi:10.1093/hmg/ddn208
- Lanktree, M. B., Guiard, E., Li, W., Akbari, P., Haghghi, A., Iliuta, I. A., . . . Pei, Y. (2019). Intrafamilial Variability of ADPKD. *Kidney Int Rep*, *4*(7), 995-1003. doi:10.1016/j.ekir.2019.04.018
- Lanktree, M. B., Haghghi, A., Guiard, E., Iliuta, I. A., Song, X., Harris, P. C., . . . Pei, Y. (2018). Prevalence Estimates of Polycystic Kidney and Liver Disease by Population Sequencing. *Journal of the American Society of Nephrology*, *29*(10), 2593-2600. doi:10.1681/asn.2018050493
- Lanoix, J., D'Agati, V., Szabolcs, M., & Trudel, M. (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., Dauwerse, J. G., Baelde, H. J., Leonhard, W. N., van de Wal, A., Ward, C. J., . . . Peters, D. J. (2004). Lowering of Pkd1 expression is sufficient to cause polycystic kidney disease. *Human Molecular Genetics*, *13*(24), 3069-3077. doi:10.1093/hmg/ddh336

- Lantinga-van Leeuwen, I. S., Leonhard, W. N., van de Wal, A., Breuning, M. H., Verbeek, S., de Heer, E., & Peters, D. J. (2006). Transgenic mice expressing tamoxifen-inducible Cre for somatic gene modification in renal epithelial cells. *Genesis*, *44*(5), 225-232. doi:10.1002/dvg.20207
- Lantinga-van Leeuwen, I. S., Leonhard, W. N., van der Wal, A., Breuning, M. H., de Heer, E., & Peters, D. J. (2007). Kidney-specific inactivation of the Pkd1 gene induces rapid cyst formation in developing kidneys and a slow onset of disease in adult mice. *Human Molecular Genetics*, *16*(24), 3188-3196. doi:10.1093/hmg/ddm299
- Lässer, C., Alikhani, V. S., Ekström, K., Eldh, M., Paredes, P. T., Bossios, A., . . . Valadi, H. (2011). Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *Journal of Translational Medicine*, *9*, 9. doi:10.1186/1479-5876-9-9
- Lee, E. J. (2016). Cell Proliferation and Apoptosis in ADPKD. In J. H. Park & C. Ahn (Eds.), *Cystogenesis* (pp. 25-34). Singapore: Springer Singapore.
- Leonhard, W. N., Kunnen, S. J., Plugge, A. J., Pasternack, A., Jianu, S. B., Veraar, K., . . . Peters, D. J. (2016). Inhibition of Activin Signaling Slows Progression of Polycystic Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, *27*(12), 3589-3599. doi:10.1681/asn.2015030287
- Li, A., Tian, X., Zhang, X., Huang, S., Ma, Y., Wu, D., . . . Wu, G. (2015). Human polycystin-2 transgene dose-dependently rescues ADPKD phenotypes in Pkd2 mutant mice. *American Journal of Pathology*, *185*(10), 2843-2860. doi:10.1016/j.ajpath.2015.06.014
- Li, A., Xu, Y., Fan, S., Meng, J., Shen, X., Xiao, Q., . . . Wu, D. (2018). Canonical Wnt inhibitors ameliorate cystogenesis in a mouse ortholog of human ADPKD. *JCI Insight*, *3*(5). doi:10.1172/jci.insight.95874
- Li, H. P., Geng, L., Burrow, C. R., & Wilson, P. D. (1999). Identification of phosphorylation sites in the PKD1-encoded protein C-terminal domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *259*(2), 356-363. doi:10.1006/bbrc.1999.0780
- Li, X., Burrow, C. R., Polgar, K., Hyink, D. P., Gusella, G. L., & Wilson, P. D. (2008). Protein kinase X (PRKX) can rescue the effects of polycystic kidney disease-1 gene (PKD1) deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1782*(1), 1-9. doi:10.1016/j.bbadis.2007.09.003
- Li, X., Magenheimer, B. S., Xia, S., Johnson, T., Wallace, D. P., Calvet, J. P., & Li, R. (2008). A tumor necrosis factor-alpha-mediated pathway promoting autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nature Medicine*, *14*(8), 863-868. doi:10.1038/nm1783
- Li, Y., Santoso, N. G., Yu, S., Woodward, O. M., Qian, F., & Guggino, W. B. (2009). Polycystin-1 interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor to modulate intracellular Ca²⁺

- signaling with implications for polycystic kidney disease. *J Biol Chem*, 284(52), 36431-36441. doi:10.1074/jbc.M109.068916
- Lin, C. C., Kurashige, M., Liu, Y., Terabayashi, T., Ishimoto, Y., Wang, T., . . . Germino, G. G. (2018). A cleavage product of Polycystin-1 is a mitochondrial matrix protein that affects mitochondria morphology and function when heterologously expressed. *Scientific Reports*, 8(1), 2743. doi:10.1038/s41598-018-20856-6
- Lin, F., Hiesberger, T., Cordes, K., Sinclair, A. M., Goldstein, L. S., Somlo, S., & Igarashi, P. (2003). Kidney-specific inactivation of the KIF3A subunit of kinesin-II inhibits renal ciliogenesis and produces polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(9), 5286-5291. doi:10.1073/pnas.0836980100
- Lin, H. H., Chang, G. W., Davies, J. Q., Stacey, M., Harris, J., & Gordon, S. (2004). Autocatalytic cleavage of the EMR2 receptor occurs at a conserved G protein-coupled receptor proteolytic site motif. *J Biol Chem*, 279(30), 31823-31832. doi:10.1074/jbc.M402974200
- Liu, Y., Pejchinovski, M., Wang, X., Fu, X., Castelletti, D., Watnick, T. J., . . . Serra, A. L. (2018). Dual mTOR/PI3K inhibition limits PI3K-dependent pathways activated upon mTOR inhibition in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Scientific Reports*, 8(1), 5584. doi:10.1038/s41598-018-22938-x
- Low, S. H., Vasanth, S., Larson, C. H., Mukherjee, S., Sharma, N., Kinter, M. T., . . . Weimbs, T. (2006). Polycystin-1, STAT6, and P100 function in a pathway that transduces ciliary mechanosensation and is activated in polycystic kidney disease. *Developmental Cell*, 10(1), 57-69. doi:10.1016/j.devcel.2005.12.005
- Lu, W., Fan, X., Basora, N., Babakhanlou, H., Law, T., Rifai, N., . . . Zhou, J. (1999). Late onset of renal and hepatic cysts in Pkd1-targeted heterozygotes. *Nat Genet*, 21(2), 160-161. doi:10.1038/5944
- Lu, W., Shen, X., Pavlova, A., Lakkis, M., Ward, C. J., Pritchard, L., . . . Zhou, J. (2001). Comparison of Pkd1-targeted mutants reveals that loss of polycystin-1 causes cystogenesis and bone defects. *Human Molecular Genetics*, 10(21), 2385-2396. doi:10.1093/hmg/10.21.2385
- Luciano, R. L., & Dahl, N. K. (2014). Extra-renal manifestations of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD): considerations for routine screening and management. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, 29(2), 247-254. doi:10.1093/ndt/gft437
- M. Alexandra Gl, J.-K., Olga Tayber, Elizabeth A. Woolf, Lydie Bougueleret, Nanhua Deng, Geoffrey D. Alperin, Francois Iris, Fiona Hawkins, Cheryl Munro, Nathan Lakey, and Geoffrey Duyk. (1995). Polycystic Kidney Disease: The Complete Structure of the PKD1 Gene and Its Protein. *CellPress, Vol.81*, 289-298.

- Mangoo-Karim, R., Uchic, M. E., Grant, M., Shumate, W. A., Calvet, J. P., Park, C. H., & Grantham, J. J. (1989). Renal epithelial fluid secretion and cyst growth: the role of cyclic AMP. *FASEB Journal*, *3*(14), 2629-2632. doi:10.1096/fasebj.3.14.2480260
- Margaria, J. P., Campa, C. C., De Santis, M. C., Hirsch, E., & Franco, I. (2020). The PI3K/Akt/mTOR pathway in polycystic kidney disease: A complex interaction with polycystins and primary cilium. *Cellular Signalling*, *66*, 109468. doi:10.1016/j.cellsig.2019.109468
- Mark Bycroft, A. B., Jane Clarke, Stefan J.Hamill, Richard Sandford, Ruth L.Thomas and Cyrus Chothia. (1999). The structure of a PKD domain from polycystin-1: implications for polycystic kidney disease. *The EMBO Journal*, *18*(2), 297-305.
- Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Lavieu, G., & Théry, C. (2019). Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nature Cell Biology*, *21*(1), 9-17. doi:10.1038/s41556-018-0250-9
- Meijer, E., Visser, F. W., van Aerts, R. M. M., Blijdorp, C. J., Casteleijn, N. F., D'Agnolo, H. M. A., . . . Gansevoort, R. T. (2018). Effect of Lanreotide on Kidney Function in Patients With Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: The DIPAK 1 Randomized Clinical Trial. *JAMA*, *320*(19), 2010-2019. doi:10.1001/jama.2018.15870
- Menezes, L. F., Cai, Y., Nagasawa, Y., Silva, A. M., Watkins, M. L., Da Silva, A. M., . . . Onuchic, L. F. (2004). Polyductin, the PKHD1 gene product, comprises isoforms expressed in plasma membrane, primary cilium, and cytoplasm. *Kidney International*, *66*(4), 1345-1355. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00844.x
- Merrick, D., Chapin, H., Baggs, J. E., Yu, Z., Somlo, S., Sun, Z., . . . Caplan, M. J. (2012). The γ -secretase cleavage product of polycystin-1 regulates TCF and CHOP-mediated transcriptional activation through a p300-dependent mechanism. *Developmental Cell*, *22*(1), 197-210. doi:10.1016/j.devcel.2011.10.028
- Moremen, K. W., & Molinari, M. (2006). N-linked glycan recognition and processing: the molecular basis of endoplasmic reticulum quality control. *Current Opinion in Structural Biology*, *16*(5), 592-599. doi:10.1016/j.sbi.2006.08.005
- Mun, H., & Park, J. H. (2016). Inflammation and Fibrosis in ADPKD. In J. H. Park & C. Ahn (Eds.), *Cystogenesis* (pp. 35-44). Singapore: Springer Singapore.
- Muto, S., Aiba, A., Saito, Y., Nakao, K., Nakamura, K., Tomita, K., . . . Horie, S. (2002). Pioglitazone improves the phenotype and molecular defects of a targeted Pkd1 mutant. *Human Molecular Genetics*, *11*(15), 1731-1742. doi:10.1093/hmg/11.15.1731

- Nadella, R., Blumer, J. B., Jia, G., Kwon, M., Akbulut, T., Qian, F., . . . Park, F. (2010). Activator of G protein signaling 3 promotes epithelial cell proliferation in PKD. *Journal of the American Society of Nephrology*, *21*(8), 1275-1280. doi:10.1681/ASN.2009121224
- Nauli, S. M., Alenghat, F. J., Luo, Y., Williams, E., Vassilev, P., Li, X., . . . Zhou, J. (2003). Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet*, *33*(2), 129-137. doi:10.1038/ng1076
- Nauli, S. M., Alenghat, F. J., Luo, Y., Williams, E., Vassilev, P., Li, X., . . . Zhou, J. (2003). Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nature Genetics*, *33*(2), 129-137. doi:10.1038/ng1076
- Nauli, S. M., Rossetti, S., Kolb, R. J., Alenghat, F. J., Consugar, M. B., Harris, P. C., . . . Zhou, J. (2006). Loss of polycystin-1 in human cyst-lining epithelia leads to ciliary dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology*, *17*(4), 1015-1025. doi:10.1681/ASN.2005080830
- Newby, L. J., Streets, A. J., Zhao, Y., Harris, P. C., Ward, C. J., & Ong, A. C. (2002). Identification, characterization, and localization of a novel kidney polycystin-1-polycystin-2 complex. *J Biol Chem*, *277*(23), 20763-20773. doi:10.1074/jbc.M107788200
- Nowak, K. L., & Edelstein, C. L. (2019). Apoptosis and autophagy in polycystic kidney disease (PKD). *Cellular Signalling*, 109518. doi:10.1016/j.cellsig.2019.109518
- Okiyoneda, T., Veit, G., Dekkers, J. F., Bagdany, M., Soya, N., Xu, H., . . . Lukacs, G. L. (2013). Mechanism-based corrector combination restores $\Delta F508$ -CFTR folding and function. *Nature Chemical Biology*, *9*(7), 444-454. doi:10.1038/nchembio.1253
- Olson, R. J., Hopp, K., Wells, H., Smith, J. M., Furtado, J., Constans, M. M., . . . Harris, P. C. (2019). Synergistic Genetic Interactions between Pkhd1 and Pkd1 Result in an ARPKD-Like Phenotype in Murine Models. *Journal of the American Society of Nephrology*, *30*(11), 2113-2127. doi:10.1681/asn.2019020150
- Ong, A. C., & Harris, P. C. (2015). A polycystin-centric view of cyst formation and disease: the polycystins revisited. *Kidney International*, *88*(4), 699-710. doi:10.1038/ki.2015.207
- Ong, A. C., Harris, P. C., Davies, D. R., Pritchard, L., Rossetti, S., Biddolph, S., . . . Ward, C. J. (1999). Polycystin-1 expression in PKD1, early-onset PKD1, and TSC2/PKD1 cystic tissue. *Kidney International*, *56*(4), 1324-1333. doi:10.1046/j.1523-1755.1999.00659.x
- Ong, A. C., Ward, C. J., Butler, R. J., Biddolph, S., Bowker, C., Torra, R., . . . Harris, P. C. (1999). Coordinate expression of the autosomal dominant polycystic kidney disease proteins, polycystin-2 and polycystin-1, in normal and cystic tissue. *American Journal of Pathology*, *154*(6), 1721-1729. doi:10.1016/s0002-9440(10)65428-4

- P.C. Harris, C. J. W., B. Peral, J. Hughes, and James Hug. (1995). Polycystic Kidney Disease 1: Identification and Analysis of the Primary Defect1. *Journal of the American Society of Nephrology*, 6, 1125-1133.
- P.G. Olsson, C. L., S. Horsly, L. Kearney, P.C Harris, A-M. Frischauf. (1996). The mouse homologue of polycystic kidney disease gene (Pkd1) is a single-copy gene.
- Park, E. Y., Sung, Y. H., Yang, M. H., Noh, J. Y., Park, S. Y., Lee, T. Y., . . . Park, J. H. (2009). Cyst formation in kidney via B-Raf signaling in the PKD2 transgenic mice. *J Biol Chem*, 284(11), 7214-7222. doi:10.1074/jbc.M805890200
- Parnell, S. C., Magenheimer, B. S., Maser, R. L., Pavlov, T. S., Havens, M. A., Hastings, M. L., . . . Calvet, J. P. (2018). A mutation affecting polycystin-1 mediated heterotrimeric G-protein signaling causes PKD. *Human Molecular Genetics*, 27(19), 3313-3324. doi:10.1093/hmg/ddy223
- Parnell, S. C., Magenheimer, B. S., Maser, R. L., Rankin, C. A., Smine, A., Okamoto, T., & Calvet, J. P. (1998). The polycystic kidney disease-1 protein, polycystin-1, binds and activates heterotrimeric G-proteins in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 251(2), 625-631. doi:10.1006/bbrc.1998.9514
- Parnell, S. C., Puri, S., Wallace, D. P., & Calvet, J. P. (2012). Protein phosphatase-1 α interacts with and dephosphorylates polycystin-1. *PloS One*, 7(6), e36798. doi:10.1371/journal.pone.0036798
- Pei, Y., Watnick, T., He, N., Wang, K., Liang, Y., Parfrey, P., . . . St George-Hyslop, P. (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. *Journal of the American Society of Nephrology*, 10(7), 1524-1529.
- Pennekamp, P., Karcher, C., Fischer, A., Schweickert, A., Skryabin, B., Horst, J., . . . Dworniczak, B. (2002). The ion channel polycystin-2 is required for left-right axis determination in mice. *Current Biology*, 12(11), 938-943. doi:10.1016/s0960-9822(02)00869-2
- Peral, B., San Millán, J. L., Ong, A. C., Gamble, V., Ward, C. J., Strong, C., & Harris, P. C. (1996). Screening the 3' region of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene reveals six novel mutations. *American Journal of Human Genetics*, 58(1), 86-96.
- Perrichot, R., Mercier, B., Carre, A., Cledes, J., & Ferec, C. (2000). Identification of 3 novel mutations (Y4236X, Q3820X, 11745+2 ins3) in autosomal dominant polycystic kidney disease 1 gene (PKD1). *Human Mutation*, 15(6), 582. doi:10.1002/1098-1004(200006)15:6<582::Aid-humu20>3.0.Co;2-b

- Pirson, Y., Chauveau, D., & Torres, V. (2002). Management of cerebral aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 13(1), 269-276.
- Porath, B., Gainullin, V. G., Cornec-Le Gall, E., Dillinger, E. K., Heyer, C. M., Hopp, K., . . . Harris, P. C. (2016). Mutations in GANAB, Encoding the Glucosidase IIalpha Subunit, Cause Autosomal-Dominant Polycystic Kidney and Liver Disease. *American Journal of Human Genetics*, 98(6), 1193-1207. doi:10.1016/j.ajhg.2016.05.004
- Purevjav Enkhbayar, M. K., Mitsuru Osaki, Takeshi Matsumoto, and Norio Matsushima^{3*}. (2003). Structural Principles of Leucine-Rich Repeat (LRR) Proteins. 54, 394-403.
- Qian, F., Boletta, A., Bhunia, A. K., Xu, H., Liu, L., Ahrabi, A. K., . . . Germino, G. G. (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. doi:10.1073/pnas.252484899
- Qian, F., Germino, F. J., Cai, Y., Zhang, X., Somlo, S., & Germino, G. G. (1997). PKD1 interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain. *Nat Genet*, 16(2), 179-183. doi:10.1038/ng0697-179
- Qin, S., Taglienti, M., Cai, L., Zhou, J., & Kreidberg, J. A. (2012). c-Met and NF-kappaB-dependent overexpression of Wnt7a and -7b and Pax2 promotes cystogenesis in polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 23(8), 1309-1318. doi:10.1681/ASN.2011030277
- Reeders, S. T. (1992). Multilocus polycystic disease. *Nature Genetics*, 1(4), 235-237. doi:10.1038/ng0792-235
- Reif, G. A., Yamaguchi, T., Nivens, E., Fujiki, H., Pinto, C. S., & Wallace, D. P. (2011). Tolvaptan inhibits ERK-dependent cell proliferation, Cl⁻ secretion, and in vitro cyst growth of human ADPKD cells stimulated by vasopressin. *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, 301(5), F1005-1013. doi:10.1152/ajprenal.00243.2011
- Retailleau, K., & Duprat, F. (2014). Polycystins and partners: proposed role in mechanosensitivity. *Journal of Physiology*, 592(12), 2453-2471. doi:10.1113/jphysiol.2014.271346
- Roitbak, T., Surviladze, Z., Tikkanen, R., & Wandinger-Ness, A. (2005). A polycystin multiprotein complex constitutes a cholesterol-containing signalling microdomain in human kidney epithelia. *Biochemical Journal*, 392(Pt 1), 29-38. doi:10.1042/bj20050645
- Rose, A., Schraegle, S. J., Stahlberg, E. A., & Meier, I. (2005). Coiled-coil protein composition of 22 proteomes--differences and common themes in subcellular infrastructure and traffic control. *BMC Evolutionary Biology*, 5, 66. doi:10.1186/1471-2148-5-66

- Rossetti, S., Consugar, M. B., Chapman, A. B., Torres, V. E., Guay-Woodford, L. M., Grantham, J. J., . . . Consortium, C. (2007). Comprehensive molecular diagnostics in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, *18*(7), 2143-2160. doi:10.1681/ASN.2006121387
- Rossetti, S., Kubly, V. J., Consugar, M. B., Hopp, K., Roy, S., Horsley, S. W., . . . Harris, P. C. (2009). Incompletely penetrant PKD1 alleles suggest a role for gene dosage in cyst initiation in polycystic kidney disease. *Kidney International*, *75*(8), 848-855. doi:10.1038/ki.2008.686
- Roy, K., & Marin, E. P. (2018). Polycystin-1, the product of the polycystic kidney disease gene PKD1, is post-translationally modified by palmitoylation. *Molecular Biology Reports*, *45*(5), 1515-1521. doi:10.1007/s11033-018-4224-6
- Saigusa, T., & Bell, P. D. (2015). Molecular pathways and therapies in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Physiology (Bethesda, Md.)*, *30*(3), 195-207. doi:10.1152/physiol.00032.2014
- Schmidt, K., Noureen, A., Kronenberg, F., & Utermann, G. (2016). Structure, function, and genetics of lipoprotein (a). *Journal of Lipid Research*, *57*(8), 1339-1359. doi:10.1194/jlr.R067314
- Schrier, T. E. a. R. W. (2001). Hypertension in Autosomal-Dominant Polycystic Kidney Disease: Early Occurrence and Unique Aspects. *Journal of the American Society of Nephrology*, *12*, 194-200.
- Serra, A. L., Poster, D., Kistler, A. D., Krauer, F., Raina, S., Young, J., . . . Wüthrich, R. P. (2010). Sirolimus and kidney growth in autosomal dominant polycystic kidney disease. *New England Journal of Medicine*, *363*(9), 820-829. doi:10.1056/NEJMoa0907419
- Shao, A., Chan, S. C., & Igarashi, P. (2020). Role of transcription factor hepatocyte nuclear factor-1beta in polycystic kidney disease. *Cellular Signalling*, *71*, 109568. doi:10.1016/j.cellsig.2020.109568
- Shen, P. S., Yang, X., DeCaen, P. G., Liu, X., Bulkley, D., Clapham, D. E., & Cao, E. (2016). The Structure of the Polycystic Kidney Disease Channel PKD2 in Lipid Nanodiscs. *Cell*, *167*(3), 763-773 e711. doi:10.1016/j.cell.2016.09.048
- Shibazaki, S., Yu, Z., Nishio, S., Tian, X., Thomson, R. B., Mitobe, M., . . . Somlo, S. (2008). Cyst formation and activation of the extracellular regulated kinase pathway after kidney specific inactivation of Pkd1. *Human Molecular Genetics*, *17*(11), 1505-1516. doi:10.1093/hmg/ddn039

- Srivastava, S., Molinari, E., Raman, S., & Sayer, J. A. (2017). Many Genes-One Disease? Genetics of Nephronophthisis (NPHP) and NPHP-Associated Disorders. *Front Pediatr*, 5, 287. doi:10.3389/fped.2017.00287
- Starremans, P. G., Li, X., Finnerty, P. E., Guo, L., Takakura, A., Neilson, E. G., & Zhou, J. (2008). A mouse model for polycystic kidney disease through a somatic in-frame deletion in the 5' end of Pkd1. *Kidney International*, 73(12), 1394-1405. doi:10.1038/ki.2008.111
- Stekrova, J., Reiterova, J., Svobodova, S., Kebrdlova, V., Lnenicka, P., Merta, M., . . . Kohoutova, M. (2009). New mutations in the PKD1 gene in Czech population with autosomal dominant polycystic kidney disease. *BMC Medical Genetics*, 10, 78. doi:10.1186/1471-2350-10-78
- Street, J. M., Barran, P. E., Mackay, C. L., Weidt, S., Balmforth, C., Walsh, T. S., . . . Dear, J. W. (2012). Identification and proteomic profiling of exosomes in human cerebrospinal fluid. *Journal of Translational Medicine*, 10, 5. doi:10.1186/1479-5876-10-5
- Streets, A. J., Newby, L. J., O'Hare, M. J., Bukanov, N. O., Ibraghimov-Beskrovnaya, O., & Ong, A. C. (2003). Functional analysis of PKD1 transgenic lines reveals a direct role for polycystin-1 in mediating cell-cell adhesion. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14(7), 1804-1815. doi:10.1097/01.asn.0000076075.49819.9b
- Su, Q., Hu, F., Ge, X., Lei, J., Yu, S., Wang, T., . . . Shi, Y. (2018). Structure of the human PKD1-PKD2 complex. *Science*, 361(6406). doi:10.1126/science.aat9819
- Su, X., Wu, M., Yao, G., El-Jouni, W., Luo, C., Tabari, A., & Zhou, J. (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. doi:10.1242/jcs.160556
- Takakura, A., Contrino, L., Beck, A. W., & Zhou, J. (2008). Pkd1 Inactivation Induced in Adulthood Produces Focal Cystic Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 19(12), 2351-2363. doi:10.1681/asn.2007101139
- Takakura, A., Nelson, E. A., Haque, N., Humphreys, B. D., Zandi-Nejad, K., Frank, D. A., & Zhou, J. (2011). Pyrimethamine inhibits adult polycystic kidney disease by modulating STAT signaling pathways. *Human Molecular Genetics*, 20(21), 4143-4154. doi:10.1093/hmg/ddr338
- Talbot, J. J., Song, X., Wang, X., Rinschen, M. M., Doerr, N., LaRiviere, W. B., . . . Weimbs, T. (2014). The cleaved cytoplasmic tail of polycystin-1 regulates Src-dependent STAT3 activation. *Journal of the American Society of Nephrology*, 25(8), 1737-1748. doi:10.1681/ASN.2013091026
- Tan, A. Y., Zhang, T., Michael, A., Blumenfeld, J., Liu, G., Zhang, W., . . . Rennert, H. (2018). Somatic Mutations in Renal Cyst Epithelium in Autosomal Dominant Polycystic Kidney

- Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 29(8), 2139-2156. doi:10.1681/asn.2017080878
- They, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., . . . Zuba-Surma, E. K. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*, 7(1), 1535750. doi:10.1080/20013078.2018.1535750
- Thivierge, C., Kurbegovic, A., Couillard, M., Guillaume, R., Cote, O., & Trudel, M. (2006). Overexpression of PKD1 causes polycystic kidney disease. *Mol Cell Biol*, 26(4), 1538-1548. doi:10.1128/MCB.26.4.1538-1548.2006
- Torres, V. E., Boletta, A., Chapman, A., Gattone, V., Pei, Y., Qian, Q., . . . Wüthrich, R. P. (2010). Prospects for mTOR inhibitor use in patients with polycystic kidney disease and hamartomatous diseases. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 5(7), 1312-1329. doi:10.2215/cjn.01360210
- Torres, V. E., Chapman, A. B., Devuyst, O., Gansevoort, R. T., Grantham, J. J., Higashihara, E., . . . Investigators, T. T. (2012). Tolvaptan in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *New England Journal of Medicine*, 367(25), 2407-2418. doi:10.1056/NEJMoa1205511
- Trudel, M., D'Agati, V., & Costantini, F. (1991). C-myc as an inducer of polycystic kidney disease in transgenic mice. *Kidney International*, 39(4), 665-671. doi:10.1038/ki.1991.80
- Trudel, M., Yao, Q., & Qian, F. (2016). The Role of G-Protein-Coupled Receptor Proteolysis Site Cleavage of Polycystin-1 in Renal Physiology and Polycystic Kidney Disease. *Cells*, 5(1). doi:10.3390/cells5010003
- Truebestein, L., & Leonard, T. A. (2016). Coiled-coils: The long and short of it. *Bioessays*, 38(9), 903-916. doi:10.1002/bies.201600062
- Tsai, Y. L., Zhang, Y., Tseng, C. C., Stanciuskas, R., Pinaud, F., & Lee, A. S. (2015). Characterization and mechanism of stress-induced translocation of 78-kilodalton glucose-regulated protein (GRP78) to the cell surface. *J Biol Chem*, 290(13), 8049-8064. doi:10.1074/jbc.M114.618736
- Tsiokas, L., Kim, E., Arnould, T., Sukhatme, V. P., & Walz, G. (1997). Homo- and heterodimeric interactions between the gene products of PKD1 and PKD2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(13), 6965-6970. doi:10.1073/pnas.94.13.6965

- Van Goor, F., Hadida, S., Grootenhuis, P. D., Burton, B., Stack, J. H., Straley, K. S., . . . Negulescu, P. A. (2011). Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(46), 18843-18848. doi:10.1073/pnas.1105787108
- Véronique Chauvet, F. Q., Nicolas Boute, Yiqiang Cai, Bunyong Phakdeekitacharoen, Luis F. Onuchic, Tania Attié -Bitach, Liliane Guicharnaud, Olivier Devuyst, Gregory G. Germino, and Marie-Claire Gubler. (2002). Expression of PKD1 and PKD2 Transcripts and Proteins in Human Embryo and during Normal Kidney Development. *American Journal of Pathology*, Vol 160. No 3, 973-983.
- Walz, G., Budde, K., Manna, M., Nürnberger, J., Wanner, C., Sommerer, C., . . . Eckardt, K. U. (2010). Everolimus in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *New England Journal of Medicine*, *363*(9), 830-840. doi:10.1056/NEJMoa1003491
- Wang, X., Koulov, A. V., Kellner, W. A., Riordan, J. R., & Balch, W. E. (2008). Chemical and biological folding contribute to temperature-sensitive DeltaF508 CFTR trafficking. *Traffic*, *9*(11), 1878-1893. doi:10.1111/j.1600-0854.2008.00806.x
- Wang, Y., Zhang, X., Zhang, H., Lu, Y., Huang, H., Dong, X., . . . Jiang, T. (2012). Coiled-coil networking shapes cell molecular machinery. *Molecular Biology of the Cell*, *23*(19), 3911-3922. doi:10.1091/mbc.E12-05-0396
- Wang, Z., Ng, C., Liu, X., Wang, Y., Li, B., Kashyap, P., . . . Yu, Y. (2019). The ion channel function of polycystin-1 in the polycystin-1/polycystin-2 complex. *EMBO Rep*, *20*(11), e48336. doi:10.15252/embr.201948336
- Ward, C. J., Turley, H., Ong, A. C., Comley, M., Biddolph, S., Chetty, R., . . . Harris, P. C. (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. doi:10.1073/pnas.93.4.1524
- Ward, H. H., Brown-Glaberman, U., Wang, J., Morita, Y., Alper, S. L., Bedrick, E. J., . . . Wandinger-Ness, A. (2011). A conserved signal and GTPase complex are required for the ciliary transport of polycystin-1. *Molecular Biology of the Cell*, *22*(18), 3289-3305. doi:10.1091/mbc.E11-01-0082
- Watnick, T. J., Torres, V. E., Gandolph, M. A., Qian, F., Onuchic, L. F., Klinger, K. W., . . . Germino, G. G. (1998). Somatic mutation in individual liver cysts supports a two-hit model of cystogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Molecular Cell*, *2*(2), 247-251. doi:10.1016/s1097-2765(00)80135-5

- Weimbs, T., & Talbot, J. J. (2013). STAT3 Signaling in Polycystic Kidney Disease. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 10(3-4), e113-e118. doi:10.1016/j.ddmec.2013.03.001
- Weston, B. S., Jeffery, S., Jeffrey, I., Sharaf, S. F., Carter, N., Saggar-Malik, A., & Price, R. G. (1997). Polycystin expression during embryonic development of human kidney in adult tissues and ADPKD tissue. *Histochemical Journal*, 29(11-12), 847-856. doi:10.1023/a:1026489723733
- Wilson, P. D. (2001). Polycystin: new aspects of structure, function, and regulation. *Journal of the American Society of Nephrology*, 12(4), 834-845.
- Witkos, T. M., & Lowe, M. (2015). The Golgin Family of Coiled-Coil Tethering Proteins. *Front Cell Dev Biol*, 3, 86. doi:10.3389/fcell.2015.00086
- Wodarczyk, C., Distefano, G., Rowe, I., Gaetani, M., Bricoli, B., Muorah, M., . . . Boletta, A. (2010). Nephrocystin-1 forms a complex with polycystin-1 via a polyproline motif/SH3 domain interaction and regulates the apoptotic response in mammals. *PloS One*, 5(9), e12719. doi:10.1371/journal.pone.0012719
- Woo, D. (1995). Apoptosis and loss of renal tissue in polycystic kidney diseases. *New England Journal of Medicine*, 333(1), 18-25. doi:10.1056/nejm199507063330104
- Woodward, O. M., Li, Y., Yu, S., Greenwell, P., Wodarczyk, C., Boletta, A., . . . Qian, F. (2010). Identification of a polycystin-1 cleavage product, P100, that regulates store operated Ca entry through interactions with STIM1. *PloS One*, 5(8), e12305. doi:10.1371/journal.pone.0012305
- Wu, G., D'Agati, V., Cai, Y., Markowitz, G., Park, J. H., Reynolds, D. M., . . . Somlo, S. (1998). Somatic inactivation of Pkd2 results in polycystic kidney disease. *Cell*, 93(2), 177-188. doi:10.1016/s0092-8674(00)81570-6
- Wu, G., Tian, X., Nishimura, S., Markowitz, G. S., D'Agati, V., Park, J. H., . . . Somlo, S. (2002). Trans-heterozygous Pkd1 and Pkd2 mutations modify expression of polycystic kidney disease. *Human Molecular Genetics*, 11(16), 1845-1854. doi:10.1093/hmg/11.16.1845
- Xiao, Z., Baudry, J., Cao, L., Huang, J., Chen, H., Yates, C. R., . . . Quarles, L. D. (2018). Polycystin-1 interacts with TAZ to stimulate osteoblastogenesis and inhibit adipogenesis. *J Clin Invest*, 128(1), 157-174. doi:10.1172/JCI93725
- Xiao, Z., Zhang, S., Magenheimer, B. S., Luo, J., & Quarles, L. D. (2008). Polycystin-1 regulates skeletogenesis through stimulation of the osteoblast-specific transcription factor RUNX2-II. *J Biol Chem*, 283(18), 12624-12634. doi:10.1074/jbc.M710407200

- Xu, C., & Ng, D. T. (2015). Glycosylation-directed quality control of protein folding. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, 16(12), 742-752. doi:10.1038/nrm4073
- Xu, C., Rossetti, S., Jiang, L., Harris, P. C., Brown-Glaberman, U., Wandinger-Ness, A., . . . Alper, S. L. (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. *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, 292(3), F930-945. doi:10.1152/ajprenal.00285.2006
- Xu, G. M., Sikaneta, T., Sullivan, B. M., Zhang, Q., Andreucci, M., Stehle, T., . . . Arnaout, M. A. (2001). Polycystin-1 interacts with intermediate filaments. *J Biol Chem*, 276(49), 46544-46552. doi:10.1074/jbc.M107828200
- Xu, Y., Streets, A. J., Hounslow, A. M., Tran, U., Jean-Alphonse, F., Needham, A. J., . . . Ong, A. C. (2016). The Polycystin-1, Lipoxygenase, and alpha-Toxin Domain Regulates Polycystin-1 Trafficking. *Journal of the American Society of Nephrology*, 27(4), 1159-1173. doi:10.1681/ASN.2014111074
- Yamaguchi, T., Wallace, D. P., Magenheimer, B. S., Hempson, S. J., Grantham, J. J., & Calvet, J. P. (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. doi:10.1074/jbc.M405079200
- Yang, Y., & Ehrlich, B. E. (2016). Structural studies of the C-terminal tail of polycystin-2 (PC2) reveal insights into the mechanisms used for the functional regulation of PC2. *Journal of Physiology*, 594(15), 4141-4149. doi:10.1113/JP270933
- Yao, G., Su, X., Nguyen, V., Roberts, K., Li, X., Takakura, A., . . . Zhou, J. (2014). Polycystin-1 regulates actin cytoskeleton organization and directional cell migration through a novel PC1-Pacsin 2-N-Wasp complex. *Human Molecular Genetics*, 23(10), 2769-2779. doi:10.1093/hmg/ddt672
- Yiqiang Cai, Y. M., Anna Cedzich, Vicente E. Torres, Guanqing Wu, Tomohito Hayashi, Toshio Mochizuki, Jong Hoon Park, Ralph Witzgall, and Stefan Somlo. (1999). Identification and Characterization of Polycystin-2, the PKD2 Gene Product. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, Vol.274, No. 40(Issue of October 1), 28557-28565.
- Yu, S., Hackmann, K., Gao, J., He, X., Piontek, K., Garcia-Gonzalez, M. A., . . . Qian, F. (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. doi:10.1073/pnas.0708217104

- Yu, Y., Ulbrich, M. H., Li, M. H., Buraei, Z., Chen, X. Z., Ong, A. C., . . . Yang, J. (2009). Structural and molecular basis of the assembly of the TRPP2/PKD1 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(28), 11558-11563. doi:10.1073/pnas.0903684106
- Zatti, A., Chauvet, V., Rajendran, V., Kimura, T., Pagel, P., & Caplan, M. J. (2005). The C-terminal tail of the polycystin-1 protein interacts with the Na,K-ATPase alpha-subunit. *Molecular Biology of the Cell*, *16*(11), 5087-5093. doi:10.1091/mbc.e05-03-0200
- Zhu, P., Sieben, C. J., Xu, X., Harris, P. C., & Lin, X. (2017). Autophagy activators suppress cystogenesis in an autosomal dominant polycystic kidney disease model. *Human Molecular Genetics*, *26*(1), 158-172. doi:10.1093/hmg/ddw376

Annexe

Figure 1.1 Structure anatomique interne du rein

Autorisation de numérisation obtenue par courriel le 23 mars 2021 par Nicolas Boudreault.
Agent-éducation postsecondaire de Copibec au nom de l'éditeur Pearson ERPI.

Figure 1.2 Structures anatomique du néphron

Autorisation de numérisation obtenue par courriel le 23 mars 2021 par Nicolas Boudreault.
Agent-éducation postsecondaire de Copibec au nom de l'éditeur Pearson ERPI.

Figure 1.3 Rein kystique provenant d'un patient atteint de la PKRAD

Permission obtenue le 05 Avril 2021 par Marko Randjelovic Customer Account Specialist,
Copyright clearance center, sous les termes de la licence Creative Commons Attribution 4.0
International (CC BY 4.0)