

2M11.2596.4

Université de Montréal

**ANALYSE MUTATIONNELLE DE FAMILLES QUÉBÉCOISES AVEC  
POLYKYSTOSE RÉNALE AUTOSOMIQUE DOMINANTE (ADPKD)**

par

Patrick Hupé

Programme de biologie moléculaire

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.)  
en biologie moléculaire

Novembre, 1997



© Patrick Hupé, 1997

Handwritten text at the top of the page, possibly a date or reference number.

QH  
506  
U54  
1998  
V.002

University of Alberta

ANALYSE MILITATIONNELLE DE FAMILLES QUÉBÉCOISES A F...  
POLYESTERE KÉRIAL AT TERMOLOGIE DOMINANTE (A BIRDI)

1998

1998

1998

1998

1998



1998

1998

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

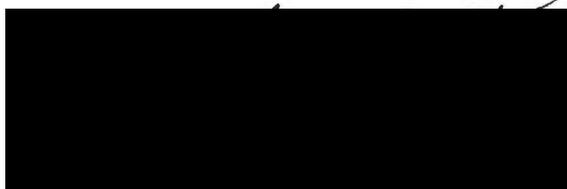
Ce mémoire intitulé:

**ANALYSE MUTATIONNELLE DE FAMILLES QUÉBÉCOISES AVEC  
POLYKYSTOSE RÉNALE AUTOSOMIQUE DOMINANTE (ADPKD)**

présenté par:

Patrick Hupé

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:



Mémoire accepté le:.....18.02.1998.....

## Sommaire.

La polykystose rénale autosomique dominante (ADPKD: *Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease*) est une maladie fréquente affectant 1 individu sur 1000. Elle est deux fois plus fréquente que la fibrose kystique et dix fois plus fréquente que la chorée de Huntington. En date du 31 décembre 1995, le registre canadien des insuffisances et des transplantations d'organes estimait à 9 202 le nombre de patients traités pour insuffisance rénale ou transplantation. De ce nombre, 5% à 6% ont une polykystose rénale héréditaire. Dans la majorité des cas (~80%), il s'agit de la polykystose rénale de type 1 (ADPKD1).

Au niveau génétique, la polykystose rénale est hétérogène, c'est-à-dire que plus d'un locus peut être responsable de la maladie. Jusqu'à présent, deux locus ont été identifiés: *PKD1* situé dans la région 16p13.3; *PKD2* en 4q21-q23. Un troisième locus est suspecté, mais il n'a pas encore été localisé. Le gène *PKD1* s'étend sur une longueur d'environ 53kb divisé en 46 exons. Ce gène est unique par sa situation chromosomique. En effet, trois copies qui correspondent à environ 75% de la partie 5' (exons 1 à 34) du gène *PKD1* se retrouvent dans une région plus centromérique en 16p13.1. Selon des données récentes, les exons 35 à 46 constituent la seule séquence unique de ce gène. Le produit du gène *PKD1*, nommé polycystine-1, est une protéine membranaire de 4 302 acides aminés. Son rôle premier serait d'assurer l'intégrité structurale de l'organe où elle est exprimée par des interactions cellule/cellule et cellule/matrice extracellulaire. De plus, il existe une interaction *in vivo* de type câble torsadé (*coiled-coil*) entre la polycystine-1 et la protéine PKD2 (la polycystine-2). La polycystine-2 a une homologie de structure avec un canal calcique voltage-dépendant.

Les manifestations phénotypiques de la polykystose sont multiples. Il y a apparition de plusieurs kystes aux deux reins. Ces kystes peuvent prendre leur origine à partir de n'importe quel segment du néphron. Tout le processus entourant la formation des kystes a reçu une attention particulière au cours des dix dernières années. La kystogénèse modifie de façon significative l'architecture du rein.

De plus, la morphologie tubulaire normale est perdue de façon localisée. Trois facteurs sont associés à la formation de ces kystes: a) l'accumulation de liquide tubulaire, b) la prolifération des cellules épithéliales tubulaires et c) la perturbation des interactions macromoléculaires de glycoprotéines et de la matrice extracellulaire. La présence de ces kystes provoque une compression et même une obstruction graduelle du parenchyme conduisant à une insuffisance rénale progressive qui nécessitera la dialyse ou la transplantation aux environs de la cinquième décennie de vie. Des manifestations extrarénales sont aussi observées incluant des kystes au foie, au pancréas et des anévrismes cérébro-vasculaires. Il y a en plus, une hétérogénéité génotypique inter- et intrafamiliale.

À partir de ces informations, nous avons élaboré une analyse mutationnelle du gène *PKD1* dans des familles québécoises d'origines ancestrales différentes. Nous avons émis l'hypothèse qu'il existe une hétérogénéité des mutations responsables de l'ADPKD1. Nous avons séquencé la partie unique du gène *PKD1* chez 29 familles avec polykystose rénale où 25 d'entre elles sont liées au locus *PKD1* et 4 ne le sont pas. À l'aide d'oligonucléotides synthétiques nous avons, par des techniques de PCR, amplifié la majorité des exons présents dans la région 3' unique de *PKD1*. Par la suite, nous avons effectué un séquençage de type enzymatique des exons 37 à 41 et 43 à 46 inclusivement. Ceci nous a permis d'identifier cinq nouvelles mutations (51 048delct, R4135T, Y3796C, W3935X et P4211A) que l'on retrouve toutes une seule fois dans des familles différentes et quatre nouveaux polymorphismes (50 938delg, 51 325delg et R3971R) n'ayant jamais été rapportés dans la littérature. Ces altérations de séquence seront utilisées comme des marqueurs génétiques spécifiques aux familles dans lesquelles elles seront identifiées. Ceci amènera un élément supplémentaire aux tests cliniques et aux analyses haplotypiques pour discriminer les sujets pouvant être atteints ou non de l'ADPKD.

**Mots clés:** ADPKD, ADPKD1, séquençage, mutations et polymorphismes

**-TABLE DES MATIÈRES-**

	<i>Pages</i>
Identification du jury . . . . .	ii
Sommaire . . . . .	iii
Table des matières . . . . .	v
Liste des tableaux . . . . .	viii
Liste des figures . . . . .	x
Liste des abréviations . . . . .	xiii
Remerciements . . . . .	xiv
Dédicace . . . . .	xvi
<b>CHAPITRE I: introduction . . . . .</b>	<b>1</b>
Introduction . . . . .	2
1. Généralités sur les différentes formes de polykystoses rénales . . . . .	5
1.1 La polykystose rénale autosomique récessive (ARPKD) . . . . .	5
1.2 La forme acquise (ACKD) . . . . .	6
1.3 La polykystose rénale autosomique dominante (ADPKD) . . . . .	7
1.3.1 Épidémiologie . . . . .	7
1.3.2 Aspects cliniques . . . . .	7
1.3.2.1 Manifestations rénales . . . . .	9
1.3.2.2 Manifestations extrarénales . . . . .	10
1.3.3 Les outils pour dépister les manifestations . . . . .	11
2. ADPKD1 . . . . .	13
2.1 La génétique de l'ADPKD1 . . . . .	13
2.1.1 La chasse au gène <i>PKD1</i> par le clonage positionnel . . . . .	14

2.1.2 La carte génétique .....	19
2.1.3 La cartographie physique entre les RFLP GGG1 et 26-6prox.	21
2.1.4 Une translocation permet la localisation du locus <i>PKD1</i> ..	26
2.1.5 Caractérisation du gène candidat pour l'ADPKD1 .....	31
2.1.6 La séquence du gène <i>PKD1</i> .....	32
2.1.7 Identification de mutations dans le gène <i>PKD1</i> .....	34
2.2 Le produit du gène <i>PKD1</i> : la polycystine-1 .....	44
2.2.1 Structure et fonction de la polycystine-1 .....	44
2.2.2 Localisation cellulaire et subcellulaire de la polycystine-1 ..	48
3. ADPKD2 .....	51
3.1 Manifestations phénotypiques .. .....	51
3.2 Génétique de l'ADPKD2 .....	52
3.3 La protéine du gène <i>PKD2</i> : la polycystine-2 .....	56
4. Interactions possibles entre la polycystine-1 et la polycystine-2 .....	57
5. Phénomène de kystogénèse dans l'ADPKD1 .....	62
5.1 Bases cellulaires de la kystogénèse .....	63
5.1.1 Prolifération cellulaire anormale .....	63
5.1.2 Accumulation de liquide transépithélial .....	65
5.1.3 La matrice extracellulaire (MEC) .....	67
5.2 Bases moléculaires de la kystogénèse .....	68
6. Projet de recherche .....	75

<b>CHAPITRE II: matériels et méthodes</b> .....	76
1. Recrutement de familles avec ADPKD .....	77
2. Extraction de l'ADN génomique .....	78
3. Caractérisation des familles avec ADPKD .....	79
4. Amplification de la région 3' unique du gène <i>PKDI</i> .....	82
5. Purification des produits de PCR .....	86
6. Séquençage .....	88
7. Électrophorèses et Autoradiographies .....	89
<b>CHAPITRE III: résultats</b> .....	91
1. Les mutations .....	92
2. Les polymorphismes .....	95
3. Le trio I4044V/A4091A/P4209P .....	96
4. Analyse mutationnelle des familles avec ADPKD .....	105
4.1 Famille C1 .....	105
4.2 Famille M18 .....	107
4.3 Famille E6 .....	109
4.4 Famille M19 .....	111
4.5 Famille M5 .....	113
4.6 Famille O3 .....	115
4.7 Famille M12 .....	117
<b>CHAPITRE IV: discussion</b> .....	119
<b>CHAPITRE V: conclusion</b> .....	134
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	136

**- Liste des tableaux -**

Tableau I :	Comparaison de différentes maladies rénales polykystiques . . . . .	3
Tableau II :	Manifestations phénotypiques et leur fréquence d'apparition pour l'ADPKD . . . . .	8
Tableau III :	Répertoire des mutations et des polymorphismes identifiés dans la documentation . . . . .	39
Tableau IV:	Comparaison de l'âge moyen d'apparition de différentes manifestations phénotypiques pour l'ADPKD1 et l'ADPKD2 . . . . .	52
Tableau V:	Variabilité haplotypique des 29 familles québécoises ADPKD choisies pour l'analyse mutationnelle . . . . .	80
Tableau VI:	<i>Lod scores</i> calculés à différentes fréquences de recombinaison ( $\theta$ ) pour les marqueurs SM6 et KG8CA avec les familles C1, M18, E6, M19, M5 et O3 . . . . .	82
Tableau VII:	Caractéristiques des amorces utilisées pour les PCR et les <i>nested</i> -PCR . . . . .	84
Tableau VIII:	Caractéristiques des amorces utilisées pour le séquençage . . . . .	85

Tableau IX:	Répertoire des mutations et des polymorphismes	
	identifiés .....	93

**- Liste des figures -**

Figure 1	Schématisation des différentes étapes normalement employées lors du clonage positionnel d'un gène . . . . .	15
Figure 2	Localisation relative et grossière du gène <i>PKDI</i> sur le bras court du chromosome 16, par rapport aux loci de l' $\alpha$ -globine et du 3'HVR . . . . .	22
Figure 3	Arbre généalogique de la famille 77 . . . . .	28
Figure 4	Carte génétique de la région 16p13.3 du bras court du chromosome 16 . . . . .	30
Figure 5	Schéma du chromosome 16 où l'on peut observer l'emplacement des <i>HG</i> et du locus <i>TSC2</i> . . . . .	33
Figure 6	Structure intron/exon du gène <i>PKDI</i> sur l'ADN génomique et illustration de sa région répétée et unique . . . . .	35
Figure 7	Structure hypothétique de la polycystine-1, le produit du gène <i>PKDI</i> . . . . .	45
Figure 8	Carte génétique de la région 4q21-23 du bras long du chromosome 4 . . . . .	53
Figure 9	Structure intron/exon du gène <i>PKD2</i> situé sur le bras long du chromosome 4 dans la partie 4q21-q23 . . . . .	55

Figure 10	Schéma illustrant la structure du câble torsadé . . . . .	58
Figure 11	Schéma explicatif du système deux-hybrides ( <i>two hybrid system</i> ) utilisé pour déterminer une interaction possible entre la polycystine-1 et la polycystine-2 . . . . .	60
Figure 12	Schéma illustrant la disposition des amorces utilisées pour amplifier les régions de la partie unique du gène <i>PKDI</i> que l'on a séquencée . . . . .	87
Figure 13	Photos de gels de séquençage ou de tests enzymatiques montrant quelques mutations identifiées et les trois polymorphismes qui forment le trio-polymorphisme . . . . .	98
Figure 14	Chronologie d'apparition hypothétique de certains polymorphismes du gène <i>PKDI</i> à partir du tronc commun composé <b>I4044V/A4091A/P4209P</b> . . . . .	102
Figure 15	Illustration des 4 derniers passages transmembranaires de la polycystine-1, correspondant à la région séquencée au cours de notre analyse . . . . .	104
Figure 16	Arbre généalogique de la famille C1 . . . . .	106
Figure 17	Arbre généalogique de la famille M18 . . . . .	108
Figure 18	Arbre généalogique de la famille E6 . . . . .	110
Figure 19	Arbre généalogique de la famille M19 . . . . .	112

Figure 20	Arbre généalogique de la famille M5 .....	114
Figure 21	Arbre généalogique de la famille O3 .....	116
Figure 22	Arbre généalogique de la famille M12 .....	118

**- Liste des Abréviations -**

a.a.:	acide aminé
ADN:	acide désoxyribonucléique
ADNc:	acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPc:	adénosine monophosphate cyclique
ARN:	acide ribonucléique
ARNm:	acide ribonucléique messenger
cM:	centimorgan
ddATP:	didésoxyadénosine-2',3'-triphosphate
ddNTP:	didésoxynucléoside-2',3'-triphosphate
dATP:	désoxyadénosine-2'-triphosphate
dNTP:	désoxynucléoside-2'-3'-triphosphate
DMSO:	diméthyle sulfoxyde
D.O.:	densité optique
EDTA:	ethylenediamine-tetraacetic acid
kb:	Kilobase(s)
kD:	KiloDalton(s)
MEC:	matrice extracellulaire
mL:	millilitre(s)
nm:	nanomètre(s)
PAGE:	polyacrylamide gel electrophoresis
pb:	paire de bases
PCR:	polymerase chain reaction
PIC:	polymorphisms informative content
SDS:	dodécylsulfate sodique
U:	unité(s)

**- Remerciements -**

Mon séjour au Centre de recherche de l'hôpital du Sacré-Coeur de Montréal m'a permis de côtoyer des gens extraordinaires qui m'ont donné tout le support technique et scientifique nécessaire à la réalisation de ce projet.

Tout d'abord, j'aimerais remercier tous les patients des différentes régions du Québec qui ont bien voulu participer et collaborer à cette étude. Sans eux ce genre de projet n'aurait évidemment pas été possible.

Je remercie mon directeur de recherche, le Dr. Daniel G. Bichet, pour son support, son enthousiasme et son éternel optimisme face à ce projet. Je le remercie plus particulièrement pour toutes les opportunités qu'il m'a permis de saisir au cours de ma maîtrise.

Je ne pourrais passer sous silence l'aide précieuse des assistantes de recherche Marie-Françoise Arthus et Michèle Lonergan pour leur patience et leur précieux conseils. Merci entre autres pour la rigueur et le sens de l'organisation que vous m'avez inculqués au cours des deux dernières années passées avec vous.

Merci à Martin Daoust, étudiant au doctorat, pour son support, les précieux conseils et sa passion pour les sciences biologiques qu'il m'a transmise tout au long des différentes étapes de ma maîtrise.

Je remercie monsieur Réginald Garon pour les corrections orthographiques et syntaxiques de ce mémoire.

J'aimerais aussi souligner le support financier du GRSNA au cours de ma recherche.

Enfin, merci à mon père et ma mère qui m'ont permis d'étudier dans un climat serein et stimulant, pour leur grande générosité et pour m'avoir sensibilisé à l'importance de l'acquisition de connaissances. Merci pour votre patience et votre don de soi.

*à mes parents, Nicole et Georges  
ainsi qu'à la mémoire de Laurette Vidal.*

# **CHAPITRE I**

## **Introduction**

## Introduction

Depuis la publication des recherches de Gregor Mendel sur les principes de base de l'hérédité en 1866, la somme des connaissances sur la génétique n'a jamais cessé de croître. La détermination structurale de l'acide désoxyribonucléique (ADN), "la molécule de la vie", par James Watson et Francis Crick en 1953 a permis l'élaboration d'études génétiques à un niveau moléculaire. Depuis, plusieurs centaines de maladies génétiques ont été identifiées et leur caractérisation est en cours. Quoique toutes aient un impact majeur chez l'être humain, certaines semblent plus graves et beaucoup plus répandues selon l'organe touché. Le rein par exemple, véritable centre de contrôle de la filtration sanguine, de la régulation partielle de la pression artérielle via le système rénine-angiotensine et de la préservation adéquate de concentrations de la majorité des électrolytes, occupe un rôle primordial chez l'homme. Un dérèglement de son intégrité en tant qu'organe menace la viabilité d'un individu.

Plusieurs maladies rénales polykystiques affectent le rein dont la sclérose tubéreuse, le syndrome de von Hippel-Lindau, le syndrome de Zellweger (syndrome cérébro-hépatorenal), le syndrome de Meckel, la néphronoptose juvénile familiale et la polykystose rénale autosomique de type dominante, récessive ou acquise. De toutes ces maladies, c'est sur la polykystose rénale autosomique dominante (ADPKD) que nous porterons notre attention au cours de ce mémoire. L'ADPKD est la plus fréquente de ces pathologies puisqu'un individu sur 400 à 1 individu sur 1000<sup>1</sup>, en est atteint. Le tableau I présente, selon certaines caractéristiques les traits distinguant l'ADPKD des autres maladies kystiques communes où le rein est affecté. En plus des divers critères illustrés au tableau I, l'histoire familiale, la présentation clinique et la liste des différents organes impliqués demeurent des outils utiles pour émettre un diagnostic précis. Dans les prochaines sections, nous discuterons sommairement des différentes formes de polykystose, pour ensuite s'attarder aux aspects touchant les deux principaux types de polykystose rénale autosomique dominante que sont l'ADPKD1 et l'ADPKD2.

**Tableau I** Comparaison de différentes maladies rénales polykystiques.

Critères	ADPKD	Sclérose Tubéreuse	von Hippel-Lindau	ARPKD	ACKD	Simplex kystes
<i>Hérédité</i>	autosomique dominante	autosomique dominante	autosomique dominante	autosomique récessive		
<i>Chromosomes impliqués</i>	16p13.3( <i>PKD1</i> ) 4q23 ( <i>PKD2</i> )	9q34 ( <i>TSC1</i> ) 16p13 ( <i>TSC2</i> )	3p25-26	6p21.3		
<i>Incidence</i>	1:400-1:1000	1:10 000	1:36 000	1:6000-1:55000	90% des sujets traités en dialyse depuis 10 ans	1,5% des sujets âgés de 50 à 70 ans
<i>Âge d'apparition de la maladie.</i>	âge adulte	enfants et adultes	âge adulte	enfants(rarement les jeunes adultes)	adultes et enfant	âge adulte
<i>Méthode pour diagnostiquer.</i>	échographie, étude de liaison	échographie, IRM, étude de liaison TC	échographie, TC IRM et étude de liaison	échographie, biopsie rénale ou hépatique	échographie, TC	
<i>Symptômes apparents.</i>	douleur, infection, hématurie	arythmie cardiaque, lésions cutanées, retard mental, hémorragie rénale	tumeurs à la rétine, au cerveau ou au rein, phéochromocytome	masse abdominale, hypertension artérielle et portale, insuffisance rénale	hématurie, douleur, malignité	localisation fortuite de kystes par échographie
<i>Hypertension.</i>	60 à 75% des adultes	présente à l'occasion	pour les patients avec phéochromocytome	commune	dépend de la gravité de la maladie	aucune
<i>Manifestation extrarénales.</i>	kystes au foie, anomalies des valves cardiaques et anévrismes cérébraux	tumeurs à la peau, au cerveau, au coeur et à la rétine	tumeurs à la rétine, au cerveau et des phéochromocytomes	fibrose hépatique congénitale	aucune	aucune

*Légende.* IRM: Imagerie par résonance magnétique; TC: Tomographie par ordinateur; ACKD: Acquired Cystic Kidney Disease; ADPKD: Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease, ARPKD: Autosomal Recessive polycystic kidney disease (adapté de la référence 1)

Les notions cliniques et génétiques de l'ADPKD1 et de l'ADPKD2 seront traitées. Une revue de la structure et des fonctions hypothétiques des protéines codées par les gènes *PKD1* et *PKD2* (polycystine-1 et polycystine-2) et de la relation possible entre ces deux polypeptides sera aussi abordée. Nous traiterons aussi des aspects moléculaires et cellulaires de la kystogénèse ainsi que des récents modèles proposés pour expliquer ce phénomène pour l'ADPKD1. Finalement, à partir de cette revue générale sur l'ADPKD, nous définirons notre projet de recherche.

## 1. Généralités sur les différentes formes de polykystoses rénales.

### 1.1 La polykystose rénale autosomique récessive (ARPKD: *Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease*)

Lié à un locus de la région chromosomique 6p21.3, le type récessif de la polykystose rénale est beaucoup plus rare que la forme dominante<sup>2</sup>. L'incidence de la maladie varie de 1:6 000 à 1: 55 000. La majorité des sujets atteints sont de jeunes enfants, qui souvent n'atteignent pas l'âge adulte<sup>3</sup>. Selon un pronostic optimiste, 86% des enfants atteints vont survivre jusqu'à l'âge de 3 mois. De ces 86%, seulement 79% d'entre eux atteindront l'âge de 1 an, 51% l'âge de 10 ans et 46% l'âge de 15 ans<sup>4</sup>. La grande variabilité phénotypique de cette maladie décrite par Blyth et Ockenden<sup>5</sup> se présente sous quatre formes distinctes: a) dans la forme *périnatale*, les kystes rénaux sont palpables et la mort survient quelques jours après la naissance; b) dans la forme *néonatale*, il existe une néphromégalie et 90% des tubules rénaux sont dilatés provoquant la mort quelques mois après la naissance; c) dans la forme *infantile*, les néphrons sont kystiques et les patients peuvent vivre quelques années; d) finalement, dans la forme *juvénile* les kystes sont présents dans seulement 10% des tubules, mais la fibrose hépatique est importante.

Le diagnostic clinique de cette maladie demeure difficile, car il en existe plusieurs formes, la pathologie est récessive et les sujets atteints meurent très jeunes. De plus, étant donné que les deux parents sont porteurs du gène morbide sans présenter de signes cliniques, le dépistage prénatal est délicat. Pour ce qui est du diagnostic postnatal, les images obtenues par échographie peuvent ressembler à celles observées pour l'ADPKD. Cependant, la combinaison de plusieurs techniques dont l'échographie et la tomographie par ordinateur utilisées en parallèle avec des études de liaisons génétiques permet d'établir un diagnostic plus précis.

## 1.2 La forme acquise (ACKD: *Acquired Cystic Kidney Disease*)

Contrairement à la forme précédente, l'ACKD touche plutôt les adultes. Elle a été reconnue pour la première fois en 1847 par Simon<sup>6</sup>. Plus d'un siècle plus tard, l'équipe de Dunnill<sup>7</sup> décrivait cette maladie comme étant une complication des traitements d'hémodialyse. En effet, l'ACKD est présente chez 8% des patients qui commencent un traitement d'hémodialyse. Après 3 ans de traitement, les risques de développer l'ACKD augmentent à 40% puis à 90% pour les patients ayant cumulé de 5 à 9 ans de traitement<sup>8</sup>. Les caractéristiques cliniques de cette maladie se traduisent par l'apparition de kystes dans le cortex rénal et la médulla. Ces kystes demeurent plus petits que ceux rencontrés chez les patients avec ADPKD.

Dans l'ACKD, les kystes acquis peuvent être associés à des tumeurs classées selon trois types, basées sur leur aspect histologique<sup>7</sup>. Le premier type a une apparence granuleuse, le second est composé de structures tubulaires interkystiques et finalement, le troisième type présente des tumeurs sans différenciation tubulaire avec hémorragie et nécrose. Les facteurs qui engendrent les kystes et les tumeurs des patients en dialyse ne sont pas connus. Cependant, Grantham et al.<sup>9</sup> ont proposé qu'une augmentation de la production de facteurs de croissance, en réponse à la diminution de néphrons fonctionnels, amènerait une hyperplasie des tubules collecteurs et des néphrons. La stimulation rénotropique soutenue provoquerait donc l'apparition de kystes ou de tumeurs dans les cas extrêmes. Ces kystes sont habituellement détectés par une échographie ou une tomographie par ordinateur.

### **1.3 La polykystose rénale autosomique dominante (ADPKD: *Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease*)**

#### **1.3.1 Épidémiologie**

Contrairement aux deux précédents types de polykystoses rénales, l'ADPKD est la plus répandue et représente l'une des maladies systémiques et dominantes les plus communes. L'incidence varie entre 1:400 à 1:1000 chez les individus de descendance européenne<sup>10,11,12,13</sup>. Seulement aux États-Unis, près d'un demi-million de personnes sont atteintes, faisant de l'ADPKD l'une des maladies héréditaires les plus répandues. Il est à noter que peu d'études ont été menées sur la fréquence d'apparition de la maladie chez des populations dont les origines sont autres qu'européennes. Par conséquent, nous devons demeurer prudents avant de généraliser l'incidence mentionnée ci-haut à l'ensemble de la population mondiale.

#### **1.3.2 Aspects cliniques**

Les personnes atteintes de l'ADPKD le sont à des degrés variés. Ceci dépend bien sûr de la forme génétique de la maladie (ADPKD1, ADPKD2 et ADPKD3)<sup>14</sup>. Cependant, la phénotypie chez différents patients, liée à une même forme de la maladie, est aussi très hétérogène et ce, non seulement de façon inter- mais aussi intrafamiliale. De plus, la seule différence observable entre les deux principales formes de la maladie (ADPKD1 et ADPKD2), concerne le moment d'apparition des signes cliniques. Par exemple, chez l'ADPKD2 l'âge moyen des gens en insuffisance rénale est de 69 ans contrairement à 57 ans pour les individus atteints de l'ADPKD1<sup>15</sup>. Le tableau II dresse la liste des complications qui peuvent apparaître chez un individu atteint de l'ADPKD et la fréquence d'apparition pour chacune d'elles. Les manifestations phénotypiques sont de deux ordres, soit rénales et extrarénales.

**Tableau II Manifestations phénotypiques et leur fréquence d'apparition pour l'ADPKD.**

<i>Manifestations Phénotypiques</i>	<i>Fréquence d'apparition</i>
<b>1) RÉNALES:</b>	
a) Anatomiques:	
-kystes rénaux.....	100% des cas (par définition)
-adénome rénal.....	environ 21% des patients
-calcification de kystes.....	commune
b) Fonctionnelles	
-diminution de l'habilité à concentrer l'urine.....	probablement tous les adultes atteints
-diminution de l'habilité à excréter l'acide citrique.....	environ 67% des patients
c) Altérations hormonales	
-augmentation de la production de rénine.....	affecte tous les adultes hypertendus
-maintien de la production d'érythropoïétine.....	affecte tous les patients en insuffisance rénale
d) Complications	
-hypertension.....	plus de 80% des patients en insuffisance rénale
-hématurie et /ou hémorragie.....	environ 50% des patients
-douleurs soudaines et chroniques.....	environ 60% des patients
-infection des conduits urinaires.....	commun
-néphrolithiase.....	environ 20% des patients
-néphromégalie.....	100% des cas
-insuffisance rénale.....	affecte 45% des patients à partir de 60ans
<b>2) EXTRARÉNALES:</b>	
a) Gastrointestinales	
-kystes hépatiques.....	environ 50% des patients (il y a augmentation avec l'âge)
-cholangiocarcinome.....	rare
-fibrose hépatique congénitale.....	rare
-kystes pancréatiques.....	environ 10% des patients
-diverticules au côlon.....	environ 80% des patients en insuffisance rénale
b) Cardiovasculaires	
-valvules cardiaques anormales.....	environ 26% des patients
-anévrismes intracrâniens.....	environ 5 à 10% des patients

(adapté de la référence 17)

### 1.3.2.1 Manifestations rénales.

La présence de kystes rénaux est évidemment la manifestation rénale la plus importante<sup>16</sup>. Les kystes qui se développent le long du néphron, unité fonctionnelle du rein, et du tubule collecteur sont parfois détectables *in utero* par échographie. Avec les années, les kystes prendront des proportions de plus en plus importantes variant en diamètre de quelques millimètres à quelques centimètres<sup>17,18</sup>. Ceci mène à la compression et même à l'obstruction du parenchyme, cause directe de l'insuffisance rénale. L'insuffisance rénale touche, tous âges confondus, 50% des patients atteints de l'ADPKD<sup>19</sup>.

Toutefois, avant d'en arriver à une insuffisance rénale, le patient voit ses reins se détériorer à trois niveaux : anatomique, fonctionnel et hormonal. C'est surtout l'apparition de kystes qui altère l'intégrité anatomique du rein entraînant plusieurs complications dont la plus commune est l'hypertension artérielle<sup>17</sup>. En fait, l'hypertension est présente chez 30% des enfants atteints, 60% des adultes avec une fonction rénale encore normale et 80% des patients en insuffisance rénale. L'étiologie de l'hypertension artérielle liée à l'ADPKD n'est pas encore connue. Par contre, les cliniciens soupçonnent une activation prononcée du système rénine-angiotensine-aldostérone pour les reins avec de larges kystes<sup>17</sup>. Le contrôle de l'hypertension demeure capital, car elle est l'une des premières causes de l'insuffisance rénale. L'hématurie, directement liée à l'expansion des reins et à l'hypertension, et la protéinurie, qui touche un tiers des patients avec ADPKD, sont d'autres complications qui peuvent survenir. Bien sûr, le développement de kystes et les diverses conséquences qui y sont rattachées amènent des douleurs lombaires et abdominales<sup>20</sup>. La multiplicité des kystes provoque également une compression des différents tubules le long du néphron.

Au niveau fonctionnel, il y aura une diminution de la concentration d'urine et de l'excrétion des déchets azotés chez la majorité des patients atteints. Les kystes altèrent ainsi l'architecture physiologique et fonctionnelle de la médullaire rénale et induisent un défaut de concentration urinaire. Cet aspect est spécifique à l'ADPKD et n'est pas rencontré dans l'insuffisance rénale secondaire à d'autres pathologies.

Les kystes influencent aussi les fonctions endocrines du rein. Une production constante en érythropoïétine et une augmentation du niveau de rénine ont été observées<sup>17</sup> chez des patients ADPKD1. Eckardt et al.<sup>21</sup> affirment que les cellules interstitielles situées à proximité des kystes d'origine tubulaire produisent à l'intérieur de ces derniers de l'érythropoïétine indépendamment de leur pression en oxygène. Donc, contrairement à la majorité des patients en insuffisance rénale, les individus atteints de l'ADPKD maintiennent leur niveau d'érythropoïétine. Quant à l'augmentation de la production de rénine, elle entraîne une série de réactions, dont le résultat net est la vasoconstriction soutenue des artères et une augmentation de la réabsorption en sodium (effet de l'aldostérone). Ces deux effets provoquent alors une augmentation de la pression artérielle, principale manifestation extra-rénale de l'ADPKD.

### **1.3.2.2 Manifestations extrarénales.**

Les différentes manifestations extrarénales de l'ADPKD se subdivisent en deux catégories: kystiques et non-kystiques. Des kystes peuvent se retrouver au foie, au pancréas, aux ovaires, dans l'utérus, dans la rate, à l'oesophage, au cerveau et dans le système nerveux central<sup>10,22</sup>. Le foie est le second organe le plus touché. Les kystes hépatiques sont présents chez 38 à 63% des patients avec ADPKD et la probabilité de kystogénèse au niveau du foie augmente avec l'âge. Une étude de Grünfeld et al.<sup>23</sup> a montré que 10,5% des patients ADPKD traités en dialyse meurent de complications hépatiques.

La formation de kystes dans les autres organes mentionnés précédemment se produit beaucoup plus rarement et peu d'études cliniques ont été rapportées.

Au niveau non-kystique, deux manifestations majeures touchent les patients avec ADPKD, soit une anomalie des valves cardiaques et des anévrismes cérébro-vasculaires intracrâniens. Par exemple, l'équipe de Hossack et al.<sup>24</sup> a examiné la fonction cardiaque de gens atteints de l'ADPKD. Une localisation inadéquate de la valvule mitrale a été observée dans 26% des cas. L'incidence pour une même anomalie chez la population en général est de 2%. Les chercheurs proposent donc la présence du produit du gène de l'ADPKD au niveau cardiaque où comme dans le rein, un rôle d'adhésion pourrait lui être attribué. Une complication beaucoup plus importante est l'anévrisme cérébro-vasculaire intracrânien. Depuis l'association établie par Dunger<sup>25</sup> en 1904 entre l'ADPKD et les anévrismes, des données récentes ont démontré que ce phénomène apparaît chez 4,5 à 11,0% des patients ADPKD<sup>22,26,27,28</sup>. Les cliniciens suspectent l'hypertension comme étant le facteur déterminant pouvant provoquer la rupture d'un anévrisme. Cependant, aucun lien direct n'a encore été établi entre les deux traits. Les techniques modernes confirmeront peut-être ces allégations.

### **1.3.3 Les outils pour dépister les manifestations cliniques.**

En attendant, des techniques d'imagerie permettent maintenant d'établir plus facilement un diagnostic de l'ADPKD. La détection des kystes rénaux se fait aux moyens de l'ultrasonographie ou échographie, la tomographie par ordinateur (CT) et l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Toutefois, l'échographie s'avère être le choix par excellence pour le diagnostic de l'ADPKD<sup>29</sup>. En effet, elle ne requiert pas d'agents chimiques ou de produits radiocontrastants. Ces caractéristiques permettent de l'utiliser sans risque chez de jeunes enfants et les femmes enceintes. L'échographie est aussi utilisée pour le dépistage de kystes situés sur d'autres organes abdominaux et pelviens.

Il semble cependant que la tomographie par ordinateur (CT) soit plus sensible que l'échographie. Dans un échantillon de 62 patients examinés à l'aide des deux techniques, un résultat semblable a été obtenu dans 90% des cas. Chez 6% des sujets, seule la CT a diagnostiqué l'ADPKD et seulement 2% des individus déclarés ADPKD par échographie étaient normaux selon la CT<sup>30</sup>. Par contre, bien qu'efficace, la technique par CT utilise une substance radiocontrastante. De plus, chez de jeunes enfants, une anesthésie générale est requise pour optimiser les résultats de l'examen. Les cliniciens font donc appel au CT seulement pour confirmer un résultat incertain obtenu par échographie ou pour des patients avec des complications rénales.

Quant à l'IRM, elle demeure la technique la moins employée compte tenu de son coût d'opération élevé. Aucune étude comparative entre l'échographie, la CT et l'IRM n'a encore été élaborée. La pertinence de son utilisation dans le dépistage de kystes rénaux et hépatiques demeure donc entière<sup>31</sup>. Le dépistage génétique associé à l'échographie demeure sans doute le moyen le plus fiable pour identifier les sujets ADPKD. Bien sûr, toutes ces techniques ne permettent pas de distinguer clairement les types d'ADPKD (ADPKD1, ADPKD2 et ADPKD3) comme les outils génétiques sont en mesure de le faire.

## 2. ADPKD1

La majorité des familles avec polykystose rénale autosomique dominante possèdent des mutations à l'intérieur du gène *PKD1*, situé dans la région 16p13.3. La pénétrance de l'ADPKD1 est complète, c'est-à-dire que 100% des sujets atteints vont développer la maladie. Près de 80% de tous les cas recensés de polykystose rénale sont associés au locus morbide *PKD1*<sup>14</sup>. Il s'agit en fait du type d'ADPKD le mieux connu, surtout au niveau pathologique et génétique. Au cours de cette section, nous aborderons donc les différents aspects de l'ADPKD1 en commençant par le clonage positionnel du locus *PKD1*, la détermination de sa séquence génomique et la caractérisation de sa protéine; la polycystine-1.

### 2.1 La génétique de l'ADPKD1.

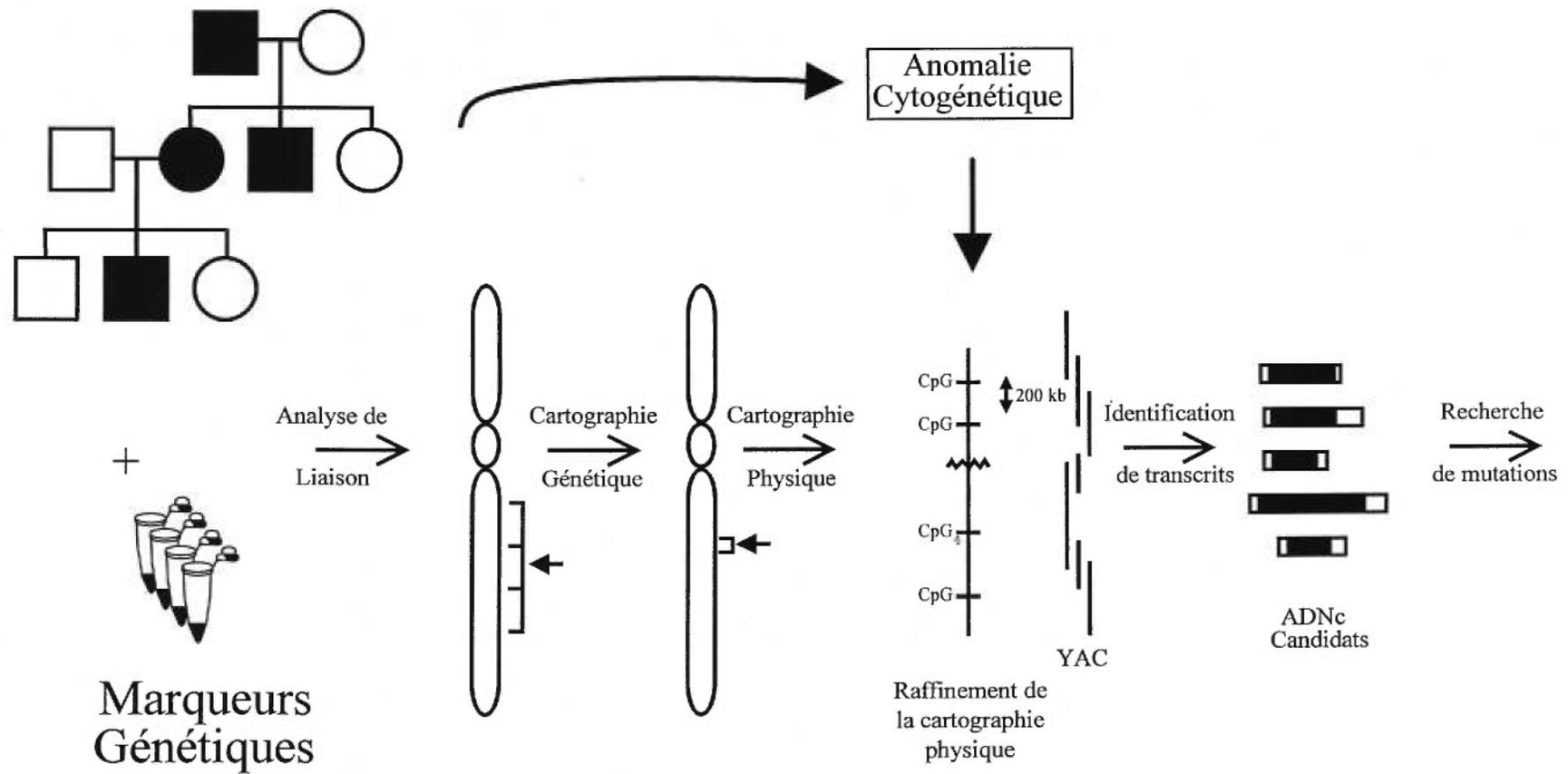
Durant plusieurs années, la localisation chromosomique des gènes à travers le génome humain s'est réalisée à partir de la protéine: le produit du gène. En effet, le clonage d'un gène se faisait grâce aux informations que l'on possédait sur la protéine. À l'aide de caractéristiques moléculaires et physiques de la protéine, nous pouvions déduire la taille de l'ARNm (acide ribonucléique messager). Dans un deuxième temps des anticorps étaient fabriqués pour identifier le schéma d'expression tissulaire et cellulaire du gène recherché. La synthèse d'oligonucléotides à partir de l'ARNm servait de sondes pour fabriquer de l'ADNc et localiser éventuellement le gène recherché sur l'ADN génomique. Plusieurs loci liés à l'hémophilie et aux hémoglobinopathies ont entre autres été identifiés de cette façon.

Depuis le début des années 80, avec l'application de technologies liées à l'ADN recombinant, la mise en place de nouveaux outils a permis de localiser un gène sans connaître son produit. Cette technique, le clonage positionnel, combine à la fois la cartographie génétique et physique.

Une fois l'emplacement chromosomique du gène trouvé, sa séquence est ensuite déterminée pour finalement accéder à la caractérisation subséquente du transcrit et de la protéine. Ces différentes étapes ont contribué à la localisation puis à la caractérisation du gène *PKDI*. À travers les 23 paires de chromosomes et les 3 milliards de bases que compte notre génome, aucun indice, telle une aberration chromosomique ou un gène candidat, ne permettait de favoriser une région bien précise où le gène *PKDI* pouvait se trouver. D'autres gènes comme celui du rétinoblastome (gène *RB*) ont bénéficié d'un tel indice. En effet, une délétion interstitielle située sur le chromosome 13, dans la région 13q14, était associée à la maladie du rétinoblastome. Les recherches du locus *RB* se sont donc concentrées dans cette région où on a effectivement isolé le gène.

### 2.1.1 La chasse au gène *PKDI* par le clonage positionnel.

À l'inverse du rétinoblastome mais comme pour la myopathie de Duchenne et la chorée de Huntington, c'est l'utilisation de marqueurs génétiques qui a permis de suspecter une région du génome pouvant contenir le locus de l'ADPKD1. À la suite de cette première étape, une carte physique a été élaborée. Des clones comprenant cette région ont été isolés et étudiés. Ceux-ci ont contribué à l'identification d'une séquence codante. La figure 1, inspirée des travaux de Collins<sup>32</sup>, résume l'ensemble des étapes qui ont permis la réalisation du clonage positionnel. Avant d'examiner en détail les différents marqueurs et les autres outils employés pour localiser le gène *PKDI*, nous définirons chacune des étapes impliquées dans le clonage positionnel. Nous préciserons donc les principes qui gouvernent la mise sur pied d'une cartographie génétique et physique ainsi que les critères nous permettant d'affirmer que le locus identifié est bel et bien celui qui nous intéresse. Pour la plupart des locus localisés par cartographie génétique, nous nous basons habituellement sur la fréquence de recombinaison représentée par le symbole  $\theta$ . Cette fréquence de recombinaison contribue à l'évaluation d'une distance relative entre deux locus. Ces recombinaisons de type méiotique (*crossing-over*) se produisent lorsque les cellules germinales, suite à une méiose, deviennent des gamètes.



**Figure 1.** Schématisation des différentes étapes normalement employées lors du clonage positionnel d'un gène.  
(adaptée de la référence 32)

Il y a alors passage d'un état cellulaire diploïde (23 paires de chromosomes) à un état haploïde (23 chromosomes). Ces recombinaisons sont aléatoires, cependant il existe certaines régions chromosomiques plus sensibles à ce genre d'événement comme les télomères. Ce phénomène de recombinaison comprend un concept majeur qui devra être considéré lors de la cartographie génétique. Il s'agit de la relation qui existe entre les chances d'observer une recombinaison entre deux loci et leur position relative sur le chromosome.

En effet, la fréquence à laquelle une recombinaison peut se produire entre deux loci est directement proportionnelle à la distance qui sépare ces deux loci. Ainsi, plus la distance sera importante, plus les chances qu'il y ait des recombinaisons sont grandes et inversement, plus la distance physique entre deux loci est minime, moins il y aura de chances d'observer le phénomène de recombinaison. Lorsque deux loci sont très proches l'un de l'autre, ils auront plus de chances d'être entraînés ensemble au cours des recombinaisons. Le pourcentage de recombinaison devient donc une mesure de la distance relative entre deux loci. La cartographie génétique repose sur ce principe et permet de disposer en ordre différents loci sur un chromosome. Le pourcentage de recombinaison est ensuite converti en centimorgan (cM) pour illustrer sur la carte génétique des distances relatives et très grossières. Dans le cas de l'ADPKD1, ces deux loci sont le gène *PKD1* et un marqueur génétique.

Au fil des années, le terme marqueur génétique a englobé plusieurs notions. Par conséquent, il est très difficile d'attribuer une définition claire et précise tenant compte de toutes les spécificités rencontrées chez les marqueurs. C'est pourquoi, notre définition n'est pas absolue mais elle est un compromis acceptable qui nous permettra de bien saisir le concept du clonage positionnel. Nous qualifierons donc le marqueur génétique comme étant un locus qui présente plusieurs versions alternatives nommées allèles et qui n'engendre pas de manifestations phénotypiques apparentes. Ces marqueurs se transmettent selon le mode mendélien.

La caractérisation des allèles des marqueurs cartographiés génétiquement favorisera l'observation de liaisons dites génétiques. C'est-à-dire qu'il sera possible de voir si dans une famille la transmission de la maladie se produit en même temps qu'un allèle particulier d'un marqueur. Cette liaison génétique entre le locus morbide et un allèle d'un marqueur laisse supposer, tel que nous l'avons expliqué au paragraphe précédent, que le locus recherché se situe non loin du marqueur génétique utilisé.

En d'autres termes, il s'agit de rechercher une co-ségrégation allélique dans chacune des familles étudiées, basée sur la proximité physique du marqueur génétique et du locus recherché. Les résultats obtenus pour les différentes familles étudiées sont ensuite cumulés. Le *lod score*  $Z(\theta)$  qui se traduit par l'expression mathématique: *lod score* ou  $Z(\theta) = \log_{10} L(\theta) / L(\theta_{0,5})$  où  $Z(\theta)$  représente le logarithme hexadécimal du rapport de la vraisemblance pour un  $\theta$  donné et la vraisemblance de l'hypothèse nulle, c'est-à-dire lorsque  $\theta$  est de 0,50. Le *lod score* maximal est atteint lorsque  $\theta$  correspond au nombre de recombinaisons observées. Un *lod score* égal ou supérieur à 3 révèle une vraisemblance de liaison significative (1000:1) entre les deux locus utilisés pour une maladie héréditaire où l'on teste qu'un modèle de transmission comme c'est le cas pour l'ADPKD. Dans ce cas-ci, cette valeur est le seuil accepté pour définir une liaison génétique. Par contre, pour des maladies complexes où il y a plusieurs modèles de transmission, des corrections doivent être apportées. C'est ce degré de liaison, mesuré par le pourcentage de recombinaison entre deux locus, qui sera exprimé en centimorgan. La cartographie génétique représente donc une localisation sommaire et approximative du locus recherché sur l'ensemble du génome. D'autres marqueurs voisins seront par la suite utilisés de la même manière dans le but d'élever le plus possible le degré de précision de la cartographie génétique. Cette méthode permet donc d'associer un locus à une région chromosomique donnée et d'ordonner les marqueurs génétiques utilisés.

À la suite de ces premières étapes, nous sommes en mesure de concentrer nos efforts sur un seul chromosome du génome, plus précisément sur l'un des bras du chromosome en question. La cartographie physique permettra alors d'établir les distances en paires de bases qui séparent les marqueurs encadrant la région soupçonnée contenir le locus morbide. La connaissance de ces distances permettra de déterminer le type de vecteur que l'on choisira pour cloner la région candidate. À partir de ces informations, des banques de YAC (*Yeast Artificial Chromosome*), de BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*), de PAC (*PI Artificial Chromosome*) ou de cosmides porteurs de bouts d'ADN correspondant à la région suspectée seront utilisés. Ces vecteurs permettront de marcher sur la séquence génomique. En effet, sachant que ces vecteurs contiennent des fragments d'ADN qui se chevauchent, une sonde synthétisée à partir de l'extrémité d'un fragment inséré dans un vecteur permettra d'identifier le suivant, contigu au précédent. De cette manière, la détermination de la séquence de la région candidate et la localisation de nouveaux marqueurs polymorphes seront possibles. Ces nouveaux marqueurs polymorphes nous indiqueront plus précisément, par *lod score*, si la région d'intérêt identifiée est la bonne. De plus, ces outils serviront à déterminer la séquence de la région et par la même occasion sa distance physique en paires de bases.

Finalement, l'analyse de la séquence délimitée par des marqueurs génétiques peut parfois révéler qu'une partie de la région suspectée correspond à un cadre de lecture. Parallèlement, l'utilisation d'enzymes de restriction qui coupent rarement l'ADN contribue aussi à l'identification de gènes potentiels. La rareté des sites de clivage de ces enzymes peut être causée par la grande taille de la séquence reconnue par l'enzyme au site de coupure et par la nature de cette séquence comme c'est le cas pour *NotI*. En effet, ces enzymes reconnaissent des séquences riches en CG (îlots CpG) qui sont souvent rencontrées à l'extrémité 5' des gènes. Bref, à partir de ces observations sur le clonage positionnel d'un gène, nous sommes maintenant en mesure d'examiner plus en détails les étapes qui ont mené à la localisation du locus *PKD1*.

### 2.1.2 La carte génétique.

Un des premiers marqueurs génétiques permettant de déterminer quelle région du génome humain pouvait contenir le locus *PKDI* est le polymorphisme 3'HVR (*HyperVariable Region*) (D16S85). Ce polymorphisme est considéré dans la documentation comme étant un RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*)<sup>44</sup>. Cependant, le terme RFLP est maintenant réservé aux polymorphismes substitutifs qui modifient directement un site enzymatique (abolir ou créer un site). Contrairement à ces RFLP, les sites de restriction à l'enzyme *PvuII* qui encadrent la séquence de 17 bases répétées (70 à 450 fois) en tandem du polymorphisme 3'HVR ne sont pas modifiés (créés ou abolis). 3'HVR est donc un polymorphisme minisatellite de la famille des VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). Le marqueur 3'HVR a été identifié pour la première fois par Higgs et al.<sup>37</sup> à ~8 kilobases (kb) au-delà de l'extrémité 3' du groupe de gènes de l' $\alpha$ -globine sur le bras court du chromosome 16 dans une région télomérique. La caractérisation des allèles de ce type de marqueur se fait par des analyses de Southern blot<sup>38</sup> sur de l'ADN qui a été coupé par l'enzyme de restriction *PvuII* pour démontrer les différentes longueurs de fragments d'ADN obtenus pour chaque individu. Ce genre de changement n'affecte en rien la phénotypie des individus. Ainsi, si l'ADN de différents sujets d'une même famille est soumis à l'enzyme *PvuII*, nous obtiendrons donc une population de fragments de différentes longueurs correspondant à de multiples versions de la séquence encadrée par les sites *PvuII*. Chacune de ces variations correspond à un allèle. Ainsi, un allèle sera considéré comme étant une version alternative d'un locus donné. Il est donc possible de déterminer la longueur de la région 3'HVR pour chacun des 2 chromosomes 16 d'un individu. La grande variabilité de la taille des répétitions rencontrées pour 3'HVR (plusieurs centaines d'allèles différents caractérisés) donne à ce marqueur génétique un caractère très polymorphe et cette particularité le rend plus informatif.

De cette façon, les chances qu'un individu soit homozygote pour ce locus sont minimes. On mesure ce caractère informatif à l'aide du PIC (*Polymorphism Information Content*). Le PIC se calcule selon l'expression mathématique  $PIC = 1 - (p^2 + q^2 + 2p^2q^2)$  où p et q représentent les fréquences de deux allèles dans un système bi-allélique. Un marqueur génétique dont le PIC est supérieur à 0,50 sera très informatif. Si le PIC se situe entre 0,50 et 0,25 il sera raisonnablement informatif et si le PIC est inférieur à 0,25 son caractère informatif demeure très faible<sup>33</sup>. Les minisatellites comme 3'HVR possèdent généralement un PIC supérieur à 0,50. Celui du 3'HVR est de 0,96.

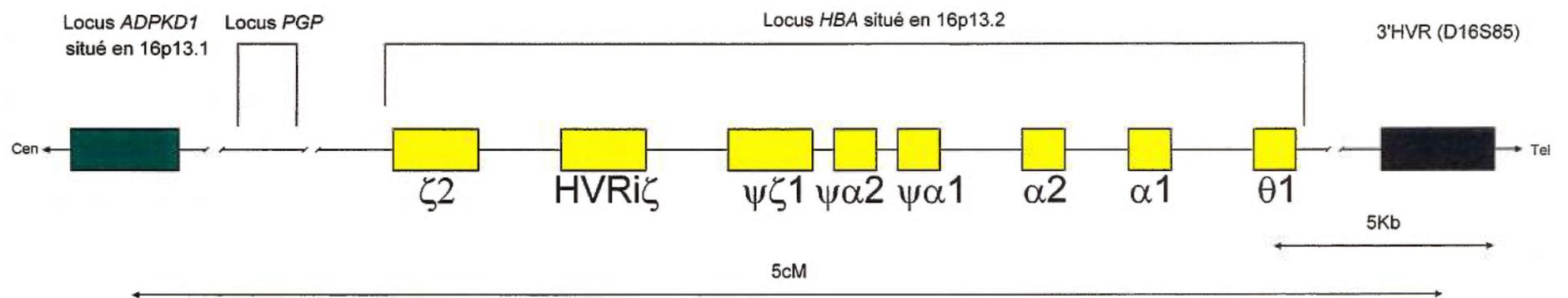
Cette particularité des gens d'une même famille à présenter des caractéristiques génotypiques facilement identifiables jointe au concept de la localisation chromosomique d'un locus par cartographie génétique énoncée par Botstein<sup>33</sup>, représentent la pierre angulaire du processus de localisation du gène PKD1. D'ailleurs, l'application de ces deux notions par Gusella et al.<sup>34</sup> a permis avec succès la localisation du locus lié à la maladie de Huntington. Reeders et al.<sup>35</sup> ont donc utilisé le minisatellite 3'HVR avec lequel une liaison génétique entre ce marqueur et le locus *PKD1* a été trouvée. Au total, 9 familles avec ADPKD (127 méioses) furent étudiées. Au cours de cette étude, les critères utilisés pour diagnostiquer les patients ADPKD furent ceux fixés par Bear et al.<sup>36</sup>. Pour savoir si il y avait effectivement liaison génétique entre les deux locus, les chercheurs ont analysé la fréquence de recombinaison ( $\Theta$ ) entre le marqueur (3'HVR) et le locus morbide (*PKD1*). Si par exemple, les haplotypes (l'assortiment des allèles portés par un individu pour un ou plusieurs locus situés sur le même chromosome) demeurent stables au cours des générations et qu'un seul allèle est lié à la maladie, nous pouvons alors suggérer que le locus *PKD1* se retrouve sur le chromosome 16, probablement sur le bras court près du 3'HVR. Grâce à un programme informatique, le LIPED3<sup>39,40</sup>, Reeders et al.<sup>35</sup> ont calculé le *lod score*; les résultats de l'équipe de Reeders<sup>35,41</sup> montrent pour une fréquence de recombinaison de 0,05 ( $\Theta = 0,05$ ) un *lod score* de 25,85.

Ceci nous permet d'affirmer que la probabilité qu'il y ait une liaison génétique entre 3'HVR et le locus *PKDI* est d'environ  $1 \times 10^{25}$  fois plus grande que la probabilité d'une non-liaison, et ce, pour les 9 familles étudiées. Selon ces résultats, la distance génétique à laquelle le locus *PKDI* pourrait se trouver en 16p13.3 est d'environ 5cM (centimorgans) par rapport au 3'HVR correspondant à une distance physique très approximative de  $5 \times 10^6$  pb pour l'ADN humain. Il faut cependant considérer que le centimorgan demeure toujours une unité de distance génétique grossière équivalente à une probabilité de recombinaison de 1% par méiose. La figure 2 illustre l'emplacement relatif de *PKDI* par rapport au groupe de gènes de l' $\alpha$ -globine et au 3'HVR.

L'étude de liaison fut ensuite reprise avec d'autres marqueurs génétiques situés sur le bras court du chromosome 16. Breuning et al.<sup>42</sup> ont d'abord réussi à localiser un second RFLP de l'autre côté du gène *PKDI*, à l'extrémité 5' de ce locus, selon la même méthode employée par Reeders. Ce nouveau marqueur, le 24-1 (D16S80), a permis d'encadrer le gène pour s'en approcher de plus en plus à l'aide de marqueurs supplémentaires. En 1988, grâce à une série de marqueurs RFLP dont le CRI-0327 (D16S63), les travaux de Reeders<sup>43</sup> ont permis la construction d'une carte génétique beaucoup plus élaborée. Le marqueur VK5B (D16S94)<sup>44</sup> situé entre 3'HVR et CRI-0327, et la cartographie de 16 locus polymorphes sur le bras court du chromosome 16 dont 26-6 (D16S125), GGG1 (D16S259) et CMM65 (D16S84) par Breuning et al.<sup>45</sup> ont contribué à un raffinement plus subtil de la carte. Ces résultats ont permis de diminuer la taille de la région suspectée pour mieux circonscrire l'endroit où se situe *PKDI*. Au cours des années qui ont suivi la découverte de ces marqueurs, ces derniers sont devenus des outils relativement puissants pour établir un diagnostic présymptomatique de l'ADPKD1 selon le principe de ségrégation et de liaison génétique expliqué précédemment.

### 2.1.3 La cartographie physique entre les RFLP GGG1 et 26-6PROX.

La cartographie génétique complétée, la prochaine étape consiste à définir les limites du locus *PKDI* à l'intérieur d'une région spécifique où les marqueurs génétiques ont été localisés et ordonnés. Les frontières et l'emplacement de cette région représentent les seules informations que l'on peut soutirer de la cartographie génétique au profit de la cartographie physique. La cartographie physique permettra donc la localisation d'autres polymorphismes à l'intérieur de la région de ~750kb délimitée par les marqueurs GGG1 et 26.6PROX<sup>46,47</sup>.



**Figure 2.** Localisation relative et grossière du gène *PKD1* sur le bras court du chromosome 16, par rapport aux loci de l' $\alpha$ -globine et du 3'HVR. (adaptée de la référence 51)

En effet, les distances génétiques ne peuvent être utilisées pour déduire les distances physiques, c'est-à-dire la distance en paires de bases. Deux raisons expliquent cette situation: d'abord il y a l'estimation des distances génétiques qui demeure très grossière par rapport aux valeurs réelles, de plus, la correspondance entre les distances physiques et génétiques varie beaucoup, non seulement entre les différentes régions du génome (télomère vs centromère), mais aussi selon le sexe des individus. Par exemple, pour la région 16p13 le taux de recombinaison méiotique chez l'homme est 7 fois supérieur à celui rencontré chez la femme<sup>46</sup>. La cartographie physique est donc essentielle et permet à la fois la localisation de nouveaux marqueurs génétiques polymorphes, la détermination des distances en paires de bases entre ces marqueurs et ultimement l'élaboration d'une collection de clones se chevauchant à partir desquels le locus recherché sera isolé et étudié. Pour en arriver là, trois méthodes furent utilisées<sup>46</sup>: l'hybridation somatique interspécifique<sup>47</sup>, la macrocartographie de restriction et la marche sur le chromosome à l'aide de clones contigus<sup>48</sup>.

Lors de la cartographie physique, l'hybridation somatique interspécifique fut utilisée par plusieurs équipes<sup>43,45,50</sup> pour s'assurer que des marqueurs génétiques déjà trouvés se situaient bel et bien dans une région voisine du locus *PKDI*. Cette technique se réalise en mettant dans un milieu de culture des cellules humaines et des cellules de rongeurs (habituellement des cellules de souris). De ce mélange, des cellules hybrides (homme/souris) vont spontanément se former pour passer d'hétérokaryon, cellule possédant au moins 2 noyaux qui partagent le même cytoplasme, à synkaryon (un seul noyau). Après plusieurs générations, les cellules hybrides se débarrassent des chromosomes humains au hasard. Aucune raison, à ce jour, n'explique le taux de réplication plus lent des chromosomes humains.

Une fois que nous nous sommes assurés que les cellules hybrides obtenues ne possédaient que le bout du chromosome 16 qui nous intéresse et qu'elles étaient bien stabilisées, il a été possible de cloner leur ADN. Ces clones, digérés par des enzymes comme *EcoRI* et *BamHI*, servent d'appât lors de Southern blot<sup>38</sup> dans le but de savoir si un nouveau marqueur comme CMM65b se retrouve bel et bien dans la région délimitée par la cartographie génétique. Cette technique n'est possible que si une sonde d'ADN recombinant correspondant au marqueur que l'on veut localiser existe. Pour le marqueur CMM65b, c'est la sonde pCMM65b qui a été utilisée. En envoyant cette sonde radioactive sur l'ADN de cellules hybrides, il a été possible de savoir si effectivement le nouveau marqueur se trouve bel et bien dans la région chromosomique spécifique. À l'aide de cette méthode, Germino et al.<sup>50</sup> ont réussi à réduire de façon significative les frontières du bout d'ADN génomique où le locus *PKDI* pouvait se situer. L'identification du locus polymorphe CMM65b ne montre pas de recombinaison avec *PKDI* pour un grand nombre de méioses faisant foi de la proximité de ces deux loci. Sa localisation a permis de concentrer les recherches sur une plus petite région du génome maintenant délimitée par les marqueurs CMM65b et 26.6PROX.

Au fur et à mesure que la région entre CMM65b et 26.6PROX fut mieux caractérisée, des marqueurs génétiques autres que les RFLP ont été identifiés. Ces marqueurs, nommés microsatellites, se caractérisent plus facilement que les RFLP. Aussi connus sous le nom de SSR (*Simple Sequence Repeat*), ils constituent une série de répétitions de mono-, di- ou de trinuécléotides distribués au hasard à l'intérieur du génome humain. Au nombre de 35 000 à 130 000 dans le génome, leur distribution est relativement uniforme. Certains marqueurs de ce genre se retrouvent même à l'intérieur des gènes. Il s'agit dans la majorité des cas du dinuécléotide CA répété  $n$  fois à l'intérieur d'un locus donné. Les bases polymorphes de ce type de marqueurs reposent sur le nombre variable de  $(CA)_n$  donnant différentes longueurs. Ce genre de marqueur devient de plus en plus populaire pour l'analyse haplotypique des familles, car ils sont généralement très polymorphes et rapidement caractérisables.

En effet, il suffit par PCR<sup>52</sup> (*Polymerase Chain Reaction*) radioactif d'amplifier la région contenant les répétitions du dinucléotide. En séparant les produits de PCR obtenus sur un gel de polyacrylamide, la taille de chacun des allèles sera déterminée selon la longueur des fragments d'ADN obtenus. Ces marqueurs de type  $(CA)_n$  sont des locus au pouvoir informatif très élevé ( $PIC > 0,60$  pour la majorité d'entre eux).

Le premier microsatellite, SM7 (D16S283), localisé près du gène *PKD1*, fut identifié par Harris et son équipe<sup>53</sup>. Plus tard, Snarey<sup>54</sup> réussit à localiser un autre microsatellite, le KG8CA, dont l'emplacement s'est avéré être dans la région 3' non-traduite du gène *PKDI*<sup>62</sup>. Un autre marqueur de type microsatellite nommé SM6 (D16S665) dont la séquence répétée consiste en  $(TG)_n C(CG)_n TGC(GT)_n$  a aussi été utilisé par Peral et al.<sup>55</sup>. Plusieurs équipes ont utilisé les marqueurs génétiques SM6 et KG8CA dont le contenu informatif (PIC) est 0.69 et 0.56 respectivement. D'ailleurs, au cours de l'utilisation de ces marqueurs, aucune recombinaison n'a été notée entre ces locus et le locus *PKDI* révélant la grande proximité de ces marqueurs par rapport au gène *PKDI*. L'utilisation de ces deux marqueurs allait élever les standards de précision des analyses de liaisons génétiques pour les diagnostics présymptomatiques. De plus, l'ensemble de ces découvertes a grandement facilité la marche sur le chromosome et l'élaboration d'une macrocartographie de restriction.

Malgré le rétrécissement de la région où le locus *PKDI* pouvait se trouver, le segment d'ADN demeurait trop long pour passer directement au séquençage. Cette portion d'ADN a donc été divisée et clonée dans un cosmide pour amorcer une marche chromosomique. L'ADN inséré dans l'un de ces clones qui correspond à la région suspectée pourra être séquencé. Un petit fragment de cette séquence, situé à l'extrémité de l'insert sera ensuite utilisé pour sélectionner un autre clone contenant un bout d'ADN qui chevauche le précédent. Ce procédé est répété successivement et permet de marcher sur le chromosome. Ainsi, nous aurons une série de clones se chevauchant qui s'étendent sur la séquence que l'on soupçonne contenir le locus morbide.

Le vecteur utilisé pour *PKDI* a été un cosmide qui peut contenir des bouts d'ADN de l'ordre de 40kb. Ainsi les clones  $\lambda$ N54,  $\lambda$ LCN1,  $\lambda$ NK92 et  $\lambda$ NK63 ont été utilisés pour entreprendre cette marche<sup>47</sup>. Ce genre de technique a contribué à connaître la séquence située entre GGG1 et 26.6PROX et à préciser les distances physiques des différents locus répertoriés à l'intérieur de cet intervalle.

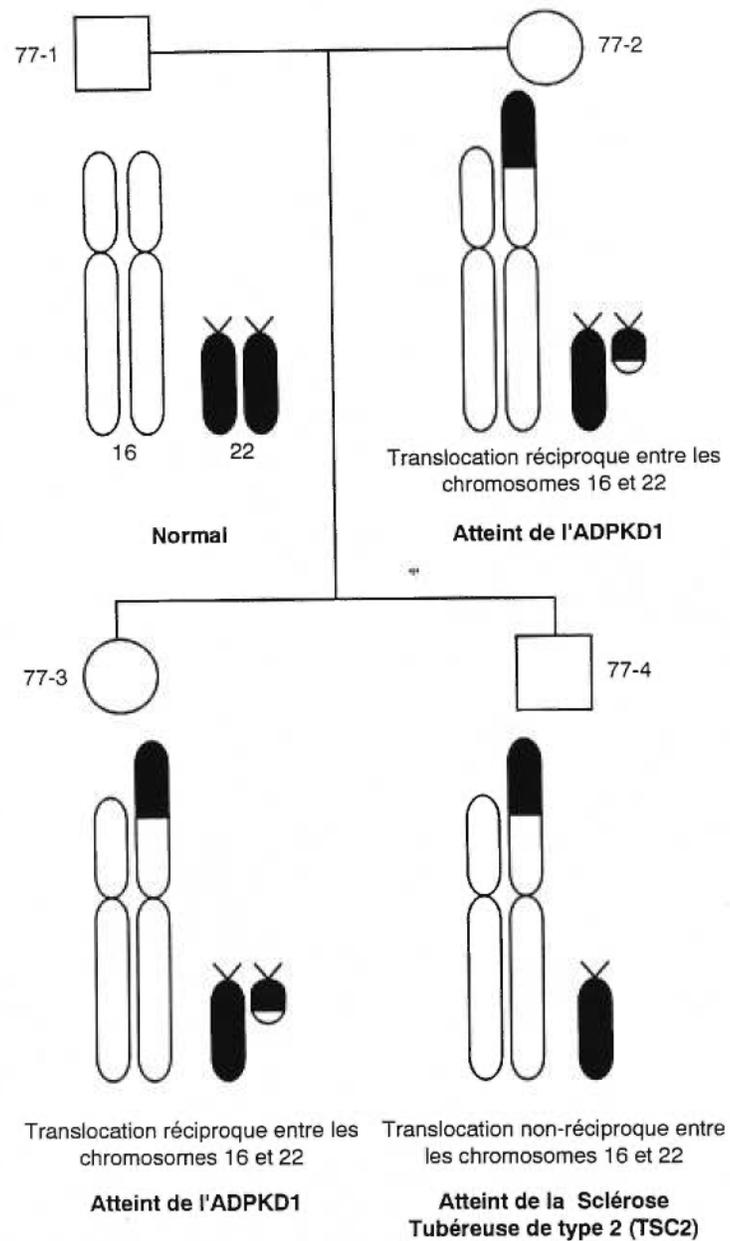
Finalement, une macrocartographie de restriction à l'aide des enzymes *MluI*, *NruI* et *NotI* a permis de prédire le nombre probable de gènes dans la région contenant le locus *PKDI*<sup>47</sup>. Les sites de restriction de ces enzymes sont rares. Ce genre d'enzyme permet d'estimer le nombre de transcrits pour une région donnée d'ADN. Ceci est possible parce que les sites de restriction de ces enzymes se retrouvent dans des îlots CpG normalement reconnus comme étant les balises de l'extrémité 5' des gènes. Vue la faible présence de transcrits à travers le génome, les sites de coupure pour ces enzymes sont aussi rares. Cette méthode a permis le recensement d'au moins 12 transcrits potentiels à l'intérieur de la région GGG1-26.6PROX<sup>47</sup>. Cependant, malgré toutes ces informations, des éléments supplémentaires seront nécessaires pour établir un lien entre un locus particulier et la polykystose rénale de type 1.

#### **2.1.4 Une translocation permet la localisation du locus *PKDI*.**

Parmi la douzaine de gènes potentiels<sup>47</sup> entre GGG1 et 26.6PROX, rien ne permettait d'associer le gène *PKDI* de manière claire et précise à un transcrit en particulier. La localisation génomique précise de la majorité des locus liés à une maladie génétique comme la fibrose kystique<sup>56</sup> a été obtenue selon le même type de méthodologie décrit à la section 2.1.1, par clonage positionnel. Une fois ces régions caractérisées où l'on avait le plus souvent localisé le gène, des indices supplémentaires obtenus à partir de mutations génomiques évidentes et facilement détectables permettaient de corroborer le locus trouvé avec la maladie.

Par exemple, pour la dystrophie musculaire<sup>57</sup>, l'atrophie spino-bulbaire musculaire<sup>58</sup> et la maladie de Huntington<sup>59</sup>, une répétition d'un trinuéotide était associée à la maladie. Ce type de mutation avait d'abord été reconnu comme étant l'élément déclencheur provoquant le syndrome du X fragile<sup>60</sup>. Pour d'autres maladies, des anomalies cytogénétiques dont les grandes délétions chez le rétinoblastome et l'APC familial (Adenomatous Polyposis Coli)<sup>61</sup> ont permis de mettre en évidence le locus morbide, d'en déterminer la séquence et d'examiner l'environnement immédiat du gène trouvé.

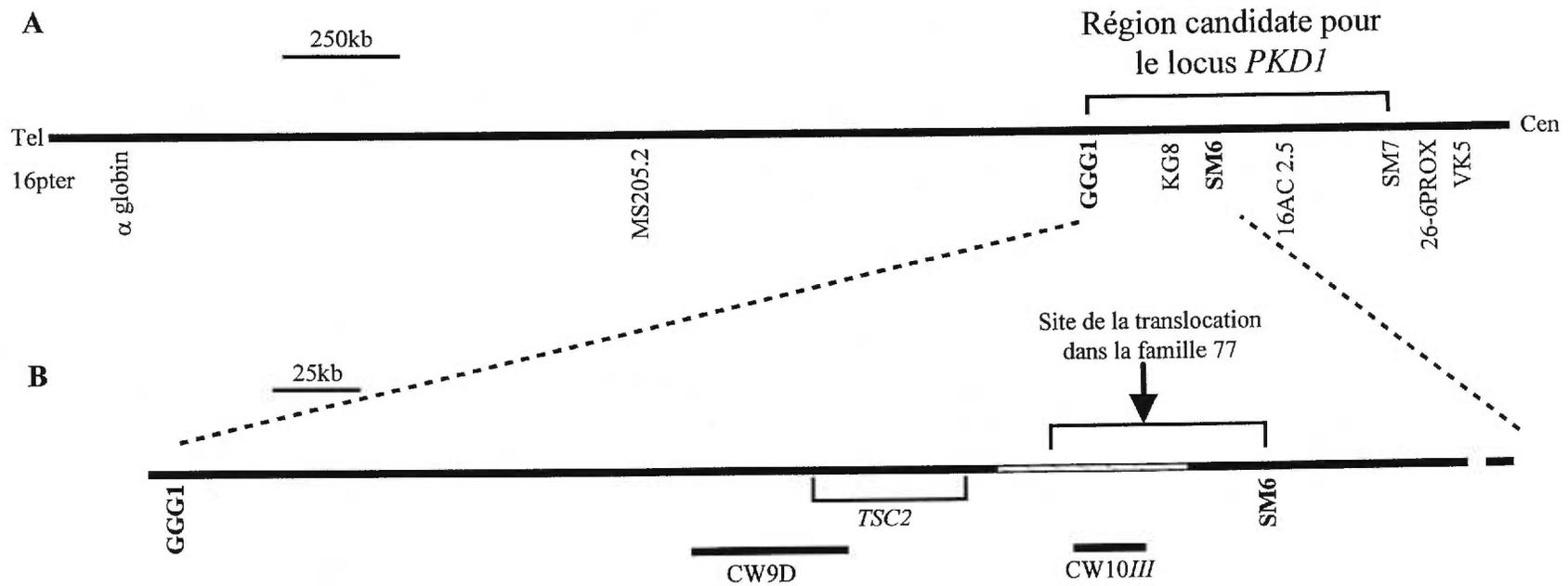
Au contraire de ces pathologies, c'est la phénotypie d'une famille portugaise (famille 77) qui a contribué à la localisation du gène *PKDI*<sup>62</sup>. En effet, les dossiers cliniques des parents et de leurs enfants (père:77-1, mère: 77-2, fille: 77-3 et le fils 77-4) ont permis de mettre en relief l'aspect singulier de cette famille (Fig. 3). Les sujets 77-2 et 77-3 montraient des reins polykystiques sans aucun autre signe clinique apparent. Cependant, 77-4 en plus de présenter des reins polykystiques montrait un certain retard mental, des macules dépigmentées et de la calcification périventriculaire. Les traits cliniques de ce dernier correspondaient plutôt à ceux rencontrés chez les patients souffrant de sclérose tubéreuse de type 2 (*TSC2*) Par contre, il était pratiquement impossible que le gène *TSC2* situé en 16p13.3<sup>63</sup> provoque uniquement des reins polykystiques, comme c'était le cas pour les sujets 77-2 et 77-3. En partant de ce doute et sachant pertinemment que le gène *PKDI* se trouvait lui aussi dans la région chromosomique 16p13.3, les recherches se sont orientées vers des analyses cytogénétiques des différents membres de la famille. Ces tests ont démontré une translocation réciproque entre les chromosomes 16 et 22 qui pourrait mener à une interruption de la séquence du gène *PKDI*. Partant de cette hypothèse, le consortium européen<sup>62</sup> a cloné la région contenant le point de cassure de la translocation chez les membres de cette famille. En vérifiant différents marqueurs à proximité de la région candidate de *PKDI* et du gène *TSC2*, les chercheurs ont voulu savoir entre quel marqueur le point de cassure de la translocation se situait. Pour ce faire, ils ont vérifié si les deux allèles de chacun des marqueurs situés à proximité du gène *TSC2* et de la région candidate pour *PKDI* étaient détectables.



**Figure 3.** *Arbre généalogique de la famille 77.* Sous chacun des sujets, les chromosomes 16 et 22 ainsi que leur phénotype sont présentés. C'est la translocation à l'intérieur de cette famille qui a permis de localiser le locus *PKD1*. (adaptée de la référence 62)

Ils se sont aperçus que 77-4 était hémizygotique pour MS205.2 et GGG1 mais hétérozygote pour SM6 (Fig. 4-A). Ces résultats signifiaient donc qu'aux locus MS205.2 et GGG1 on ne retrouvait qu'un seul allèle tandis que la région homologue située sur l'autre chromosome avait disparu. Pour SM6, les deux allèles étaient présents, signifiant la présence des deux régions homologues de la paire de chromosome 16. Par conséquent, le point de cassure de la translocation se trouvait entre GGG1 et SM6, dans la région candidate du gène *PKDI* (Fig. 4-B).

Le consortium européen a par la suite repéré la région du chromosome 16 maintenant située sur le chromosome 22 à l'aide de sondes issues du cosmide CWD9 qui couvre normalement une région à proximité du gène *TSC2* (Fig 4-B). Ceci s'est réalisé grâce à la technique FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*). Cette technique permet d'hybrider des sondes d'ADN marquées, complémentaires à une séquence sur un chromosome en métaphase durant la mitose. Les chromosomes sont ainsi immobilisés sur des plaques pour les examiner au microscope. Les sites d'hybridation permettent de localiser spécifiquement les régions que l'on recherche sur l'ensemble des chromosomes. Ces locus sont détectés par immunologie où l'anticorps, dirigé contre la sonde marquée, est couplé à un fluorochrome. Le signal fluorescent est alors détecté par microscopie de fluorescence. Les résultats ont montré que pour l'individu 77-2 la sonde CWD9 qui s'hybride normalement sur le chromosome 16 s'hybridait sur le chromosome 22 et que l'individu 77-4 (*TSC2*) était hémizygotique pour cette région. Mise à part ces résultats, la technique du FISH a en plus permis de voir que la majeure partie de la région couverte par la sonde CW10III (Fig. 4-B) dont le point de brisure de la translocation, était présente en trois copies homologues (*Homologous Gene-A*, *HG-B* et *HG-C*) dans la région 16p13.1. Ceci avait d'ailleurs été noté auparavant<sup>63</sup>.



**Figure 4.** Cartographie génétique de la région 16p13.3 du bras court du chromosome 16. **A)** Région candidate pour le locus *PKDI* définie par des analyses de liaisons. **B)** Agrandissement de la région candidate où le point de cassure de la translocation situé entre les marqueurs génétiques GGG1 et SM6 est montré à l'aide d'une flèche. La sonde CWD9 qui a permis de voir quelle région du chromosome 16 était rendue sur le chromosome 22 lors de la translocation est aussi illustrée. De plus, la zone hachurée montre la partie de la région candidate répétée en 16p13.1. Ceci a été révélé grâce à la sonde CW10III. (adaptée de la référence 62)

La localisation du point de brisure de la translocation devenait donc un indice important qui nous permettait de chercher le gène *PKD1* à un point bien précis sur le chromosome 16. Ayant à sa disposition une banque de transcrits non-associés au gène *TSC2*<sup>63</sup>, le consortium européen a voulu savoir si l'un d'entre eux pouvait correspondre à la région contenant le point de translocation et ses environs. L'un de ces transcrits d'une taille de 14kb, se situe très proche de *TSC2*. Pour savoir si ce transcrit traverse bel et bien le site de brisure de la translocation, deux sondes (JH5 et JH13) situées de part et d'autre du point de translocation ont été hybridées avec succès sur le transcrit de 14kb. Donc, le gène associé au transcrit de 14kb, dont la majorité est copiée à trois reprises en 16p13.1 et qui ne laisse qu'une petite séquence unique à son extrémité 3', sera dorénavant nommé *PBP*(*Polycystic BreakPoint*). Il représente un candidat sérieux pour le gène *PKD1*. D'autres éléments seront cependant nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

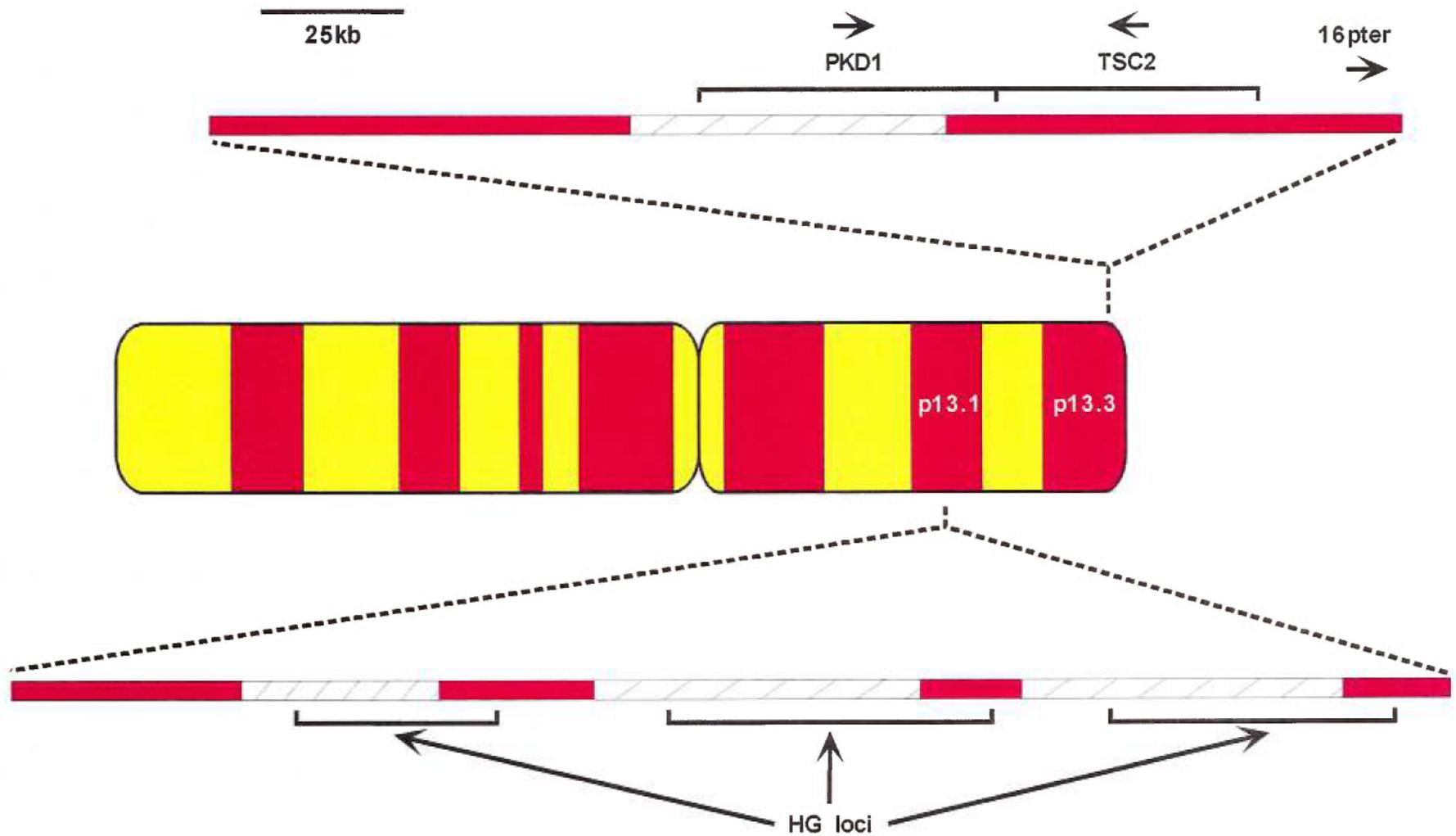
#### 2.1.5 Caractérisation du gène candidat pour l'ADPKD1.

En effet, plusieurs facteurs viennent confirmer ou infirmer la possibilité qu'un transcrit soit un gène fonctionnel associé à une maladie qui produira éventuellement une protéine. Toutes les caractéristiques standard que présente un gène eucaryote doivent dans la majorité des cas être rencontrées. Par exemple, la présence d'une région promotrice, une région 5' non-traduite (séquence *leader*), une région codante, un codon stop, une région 3' non-traduite, un signal de polyadénylation et un signal de terminaison. Bien sûr, certains gènes font exception et ne rencontrent pas tous les critères normalement utilisés pour définir un gène. C'est pourquoi l'indice le plus important, qui permettra d'associer sans équivoque le locus à la maladie, sera la présence d'une ou plusieurs mutations. Ceci permettra d'associer le génotype trouvé au phénotype observé.

Avant de pouvoir établir une telle relation entre un gène muté et une maladie quelconque, des informations supplémentaires comme le lieu et le niveau d'expression du gène peuvent donner des indices avant-coureurs permettant de corroborer certains faits. Un signal important de l'ARNm du gène *PBP* a été détecté par Northern blot sur des lignées cellulaires issues du rein (G401) et du foie (Hep3B)<sup>62</sup>. De plus, d'autres types de cellules comme les fibroblastes ont révélé l'étendue du schéma d'expression de *PBP*. Ce schéma demeure fidèle aux organes où l'on a observé les principales manifestations cliniques de l'ADPKD et rend compte du caractère systémique de la maladie. Il fallait alors prouver qu'une altération de la séquence du locus *PBP* était liée à l'ADPKD. Une analyse exhaustive de la séquence unique, située à l'extrémité 3' du gène *PBP* semblait, a priori, la plus accessible. Trois mutations (41951del2kb, 44420del5,5kb et IVS44+1G→C), soit deux délétions et un épissage erroné, chacune présente dans des familles différentes, ont permis d'associer le gène *PBP* à l'ADPKD. Ce gène sera dorénavant nommé *PKDI*<sup>62</sup>.

### 2.1.6 La séquence du gène *PKDI*.

La particularité du gène *PKDI* est conférée par les 75% de sa séquence en 5' qui se répète à trois reprises dans une région plus centromérique sur le chromosome 16 (16p13.1)<sup>62</sup>. Ceci rend complexe son analyse mutationnelle. Une homologie de près de 97% existe entre ces séquences et le gène *PKDI*, indiquant que l'apparition de ces copies est récente dans le processus évolutif de l'espèce humaine. De plus, ces trois gènes homologues (*HG-A*: ~21kb, *HG-B*: ~17kb et *HG-C*: ~8,5kb)<sup>64</sup> produisent tous un ARNm<sup>62</sup> (Fig. 5). Cette particularité rend plus difficile l'analyse de la région répétée car aucun point de repère ne nous donne l'assurance d'être bel et bien à l'intérieur de *PKDI* et non pas dans l'un des gènes homologues.

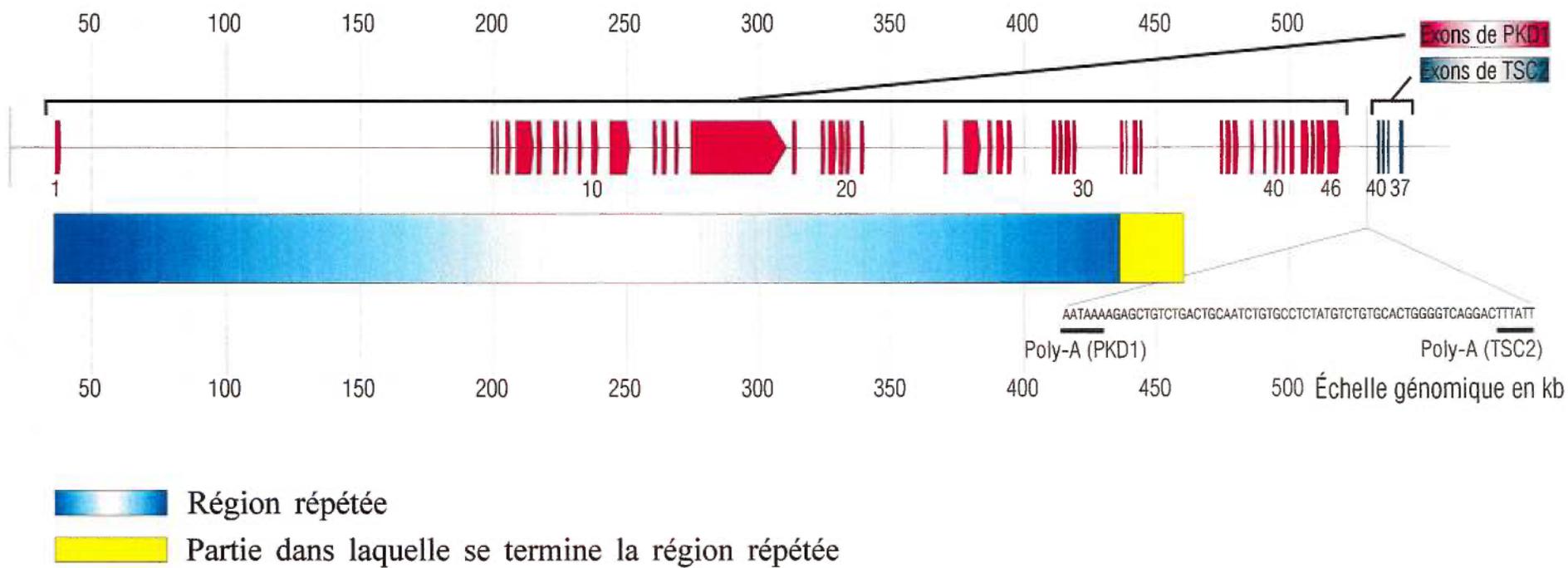


**Figure 5.** Schéma du chromosome 16 où l'on peut observer l'emplacement des HG et du locus TSC2 (sclérose tubéreuse de type 2) par rapport au locus PKD1. (adaptée de la référence 64)

Malgré ces écueils, Hughes et al.<sup>65</sup> ont réussi à obtenir la séquence génomique du locus *PKDI* à l'aide d'un cosmide qui chevauche la partie répétée et la partie unique du gène *PKDI*. Différents clones issus de ce cosmide ont été séquencés. Ces clones ont été utilisés car ils ne contenaient que le transcrit *PKDI* sans les *HG*. Le fait que ce cosmide porte la séquence de *PKDI* s'avancant dans la région unique permet d'écarter tout soupçon à savoir si ces clones correspondent véritablement au gène *PKDI* et non à ses homologues *HG-A*, *B* ou *C*. Par cette astuce, un contig de 18kb a été généré couvrant près de 95 % de la partie non-séquencée du transcrit *PKDI*. L'ADNc du gène *PKDI* ainsi cloné montre un transcrit d'environ 14kb. La structure intron/exon et la correspondance sur l'ADN génomique de ce transcrit fut possible grâce à la comparaison directe des séquences de l'ADNc avec l'ADN génomique. Cette méthode a révélé que le gène *PKDI* s'étendait sur environ 52kb. De ces observations, le consortium international<sup>66</sup> a suggéré l'existence de 46 exons (Fig. 6). Ces expériences ont aussi mis en évidence des particularités propres à *PKDI*. Il y a une forte concentration de GC dans des proportions d'au moins 62,4%<sup>79</sup>. La séquence codante contient un exon d'une taille de 3620pb (exon15) alors que la grandeur des autres exons se situe approximativement entre 100 et 1500pb<sup>65</sup>. De plus, le premier intron se distingue particulièrement avec une taille d'environ 17kb comparativement aux autres introns dont la longueur varie entre une centaine de paires de bases et 3kb<sup>65</sup>. Finalement, le gène *PKDI* contient une série de pyrimidines (C/T) couvrant 2,5kb à l'intérieur de l'intron 21<sup>79</sup>. D'autres séries du même genre, quoi que moins importantes en taille, ont aussi été trouvées dans l'intron 1 et 22<sup>75</sup>.

### 2.1.7 Identification de mutations dans le gène *PKDI*.

Ces divers renseignements allaient influencer les stratégies pour élaborer une analyse mutationnelle complète de *PKDI*. Depuis les trois premières mutations trouvées par le consortium européen<sup>62</sup>, d'autres altérations de séquence furent identifiées. La majorité de ces mutations se situent dans l'extrémité 3' du gène, à l'intérieur de la séquence unique où aucune confusion n'existe avec les gènes *HG*.



**Figure 6.** Structure intron/exon du gène *PKD1* sur l'ADN génomique et illustration de sa région répétée et unique. (adaptée de la référence 65)

La frontière exacte entre la séquence répétée et la séquence unique du gène *PKDI* n'a pas été déterminée clairement. En 1996, Peral et al.<sup>70</sup> proposaient que les 31 premiers exons faisaient partie de la séquence répétée, et en 1997, cette même équipe repoussait cette région aux 32 premiers exons<sup>73</sup>. Récemment, Watnick et al.<sup>75</sup> ont proposé que la limite de la région répétée se situait à l'intérieur de l'intron 34 non loin d'un site de restriction de l'enzyme *Bam*H1 (position 44 621, GenBank no. accession L39891). Étant donné que l'on ignore toujours de quelle façon la transition se fait entre les régions répétées et la région unique (perte d'homologie graduelle ou subite entre *PKDI* et les *HG* situés en 16p13.1), plus nous nous trouvons en 3' de la séquence de *PKDI*, plus nous augmentons nos chances d'être à l'intérieur de la séquence unique.

Par conséquent, les analyses mutationnelles se sont donc concentrées sur la séquence s'étendant entre les exons 36 à 46 (~4500pb de la séquence génomique ou ~3400pb du transcrit). Pour l'ensemble des équipes qui ont travaillé sur l'analyse mutationnelle, l'ADNc fut l'outil de travail le plus employé. Les différents laboratoires ont analysé plusieurs familles avec ADPKD1 grâce à deux méthodes en particulier, le SSCP<sup>76</sup> (*Single Strand Conformational Polymorphism*) et l'hétéroduplexe<sup>77.78</sup>. Le SSCP<sup>69.70.72</sup> consiste à amplifier par PCR une petite région (200-300pb) de l'ADN qui sera ensuite dénaturée et chargée sur un gel de polyacrylamide non-dénaturant. Se basant sur le principe que les deux brins d'ADN possèdent une conformation tridimensionnelle reposant sur leur séquence primaire, la présence d'une mutation viendra donc influencer la conformation empruntée par la molécule. La conséquence d'une altération de séquence se traduit alors par une différence de la mobilité électrophorétique pour le ou les brins d'ADN contenant la mutation par rapport à un contrôle. Il suffit ensuite de séquencer le brin en question pour connaître la nature de la mutation.

L'hétéroduplexe est aussi une technique simple qui a été appliquée par plusieurs équipes<sup>67,68,71</sup>. Lorsqu'une mutation se présente sous la forme hétérozygote, et que l'on amplifie la région où se situe cette altération, il y aura à la fois un brin d'ADN sauvage et un brin d'ADN muté dans la réaction de PCR. Des hétéroduplexes peuvent alors se former entre ces deux espèces d'ADN. Les hétéroduplexes, même avec une seule paire de bases de différence, vont montrer une mobilité électrophorétique distincte des homoduplexes. Ceci se produit car la conformation structurale de l'ADN double brin dépend de sa séquence. Sur un même gel sont chargés l'échantillon et un contrôle dans des puits voisins. Une différence de la distance parcourue par notre échantillon et le contrôle suggère l'existence probable d'une mutation dans la région que nous avons amplifiée. Il s'agit ensuite de séquencer la région pour vérifier le tout.

Récemment, des méthodes plus audacieuses à l'aide de PCR longs (*long-PCR*) permettant d'amplifier jusqu'à 10kb sur le transcrite de *PKDI* entre les exons 24 et 34, suivi d'une série de petits PCR (*nested-PCR*) pour amplifier chacun des exons, ont été mises au point par l'équipe de Watnick et al.<sup>75</sup>. Peral et al.<sup>73</sup> ont aussi utilisé une approche permettant d'aller de plus en plus vers l'extrémité 5' dans la région répétée du gène *PKDI*. Cette technique, le test de la protéine tronquée (*Protein Truncation Test: PTT*), permet, une fois qu'un segment du gène est amplifié par PCR en incorporant le promoteur T7 en amont du produit de PCR, de procéder *in vitro* à la transcription puis à la traduction de ce dernier. Si lors de l'électrophorèse, la protéine obtenue ne migre pas sur une distance estimée selon sa taille, il s'agira d'un produit tronqué. Ceci nous indique la présence d'un codon stop prématuré. La seule exigence requise lors de l'utilisation du PTT est la préservation du cadre de lecture lors de la transcription et la traduction de l'échantillon.

Une autre technique, nommée *Nonisotopic RNase Cleavage Assay* (NIRCA) a aussi été utilisée par Peral et al.<sup>73</sup>. Elle consiste à amplifier par PCR la région d'ADN intéressante. Une seconde amplification (*nested-PCR*) est réalisée sur le premier produit obtenu avec une amorce sens et anti-sens possédant le promoteur du phage T7 ou le promoteur du phage SP6. La transcription *in vitro* de ces nouveaux produits permettra d'obtenir des sondes d'ARN sens et anti-sens. Ainsi, le produit "sens" obtenu de l'ADN d'un patient ADPKD1 est hybridé avec un produit contrôle "anti-sens" et vice-versa. Lorsque le produit contrôle s'hybride avec un produit muté, il y aura une faible interaction entre les deux ARN au site muté. Ce duplexe d'ARN est ensuite soumis à trois différents types de RNase (I, II et III) qui clivent l'ARN aux points de mutation. L'interprétation du schéma de migration des différents fragments obtenus permet de déterminer la présence et le site de l'altération de séquence. Contrairement au PTT, le NIRCA facilite l'identification des mutations ponctuelles qui ne sont pas nécessairement responsables de la maladie, d'où l'utilisation complémentaire de ces deux méthodes.

Le fruit de toutes ces analyses est colligé sur le tableau III où l'on retrouve l'ensemble des mutations et des polymorphismes trouvés à ce jour. Aucun indice ne suggère qu'une région plus qu'une autre soit propice à la mutagénèse. Au contraire, il semble exister une distribution uniforme des mutations et des polymorphismes sur la séquence du gène *PKD1*. Le prochain grand défi de cette analyse mutationnelle sera non seulement de couvrir la partie répétée en entier du gène, mais d'établir une corrélation génotype/phénotype associée à chacune des manifestations cliniques observées.

**Tableau III. Répertoire des mutations et des polymorphismes identifiés dans la documentation.**

**I. Mutations:**

**a) Mutations non-sens.**

Localisation sur la séquence génomique de <i>PKDI</i> .	Nom	Changement nucléotidique	Changement en acide aminé	Carte de restriction	Références
exon 25	E3020X	39080G→T	Glu→Stop à 3020		73
exon 35	Q3513X	47424C→T	Gln→Stop à 3513		73
exon 41	Y3818X	49733C→A	Tyr→Stop à 3818	- <i>Bsa</i> AI	69
exon 41	Q3837X	49788C→T	Gln→Stop à 3837	- <i>Pvu</i> II	69, 70
exon 44	R4020X	50842C→T	Arg→Stop à 4020		71
exon 44	Q4041X	50905C→T	Gln→Stop à 4041	- <i>Msp</i> A11	67, 74
exon 45	C4086X	51125T→A	Cys→Stop à 4086	+ <i>Dde</i> I	72
exon 46	R4227X	51636C→T	Arg→Stop à 4227		70, 73

**b) Délétions/Insertions.**

exon 23	37983delC	délétion de C à 37983	décalage du cadre de lecture après 2815		73
exon 25	39100delC	délétion de C à 39100	décalage du cadre de lecture après 3029		73

Localisation sur la séquence génomique de <i>PKD1</i> .	Nom	Changement nucléotidique	Changement en acide aminé	Carte de restriction	Références
exon 31	43609del2kb	délétion de 2kb de 43609 à 45609 (intron 34)	décalage du cadre de lecture après 3350		62
exon 34	44420del5,5kb	délétion de 5,5kb à partir de 44420 jusqu'à la fin du transcrit.	délétion des a.a. 3491 à 4302		62
exon 36	47699insT	insertion de T après 47699	décalage du cadre de lecture après 3578		70
exon 39	49087del15	délétion de 49087 à 49101	délétion en phase avec le cadre de lecture des a.a. 3747-3751		70
exon 46	51485delA	délétion de A à 51485	décalage du cadre de lecture après 4176		73

**c)Épissage.**

intron 31	43726del19	délétion de 43726 à 43745	ajout de 29a.a. après 3389 amenant un décalage du cadre de lecture		73
intron 39	49115insG	délétion de 48639 à 49115	ajout de 58a.a. suite au décalage du cadre de lecture après 3717	+ <i>DdeI</i>	73

Localisation sur la séquence génomique de <i>PKD1</i> .	Nom	Changement nucléotidique	Changement en acide aminé	Carte de restriction	Références
intron 39	49406del51	délétion de 49406 à 49457	délétion de 17a.a., 3756 à 3772		70
intron 43	50714del20	pas d'épissage normal →insertion de 55pb à 51419 ou site cryptique d'épissage →délétion 66pb	épissage complexe		68
intron 43	50725del18	pas d'épissage normal →insertion de 57pb en phase ou site d'épissage cryptique révélé →délétion en phase de 66pb	épissage complexe		68
exon 44	50784del134	G →C à 50784 altérant le site d'épissage	délétion de 44a.a., 4001-4045		62

*d) Faux-sens.*

exon 25	L2993P	38990T →C	Leu →Pro à 2993		73
exon 25	Q3016R	39059A →G	Gln →Arg à 3016		73
exon 35	L3510V	47415C →G	Leu →Val à 3510		73
exon 36	E3631D	47930G →C	Glu →Asp à 3631	+ <i>AccI</i>	70

Localisation sur la séquence génomique de <i>PKDI</i> .	Nom	Changement nucléotidique	Changement en acide aminé	Carte de restriction	Références
exon 44	I4044V	50914A→G	Iso→Val à 4044		71
exon 45	A4058V	51040G→T	Ala→Val à 4058		71

## 2. Polymorphismes:

exon 25	F3066L	GT→CC	Phe→Leu à 3066		73
exon 26	P3110P	T→C	Pro→Pro à 3110		73
exon 28	T3223T	41485G→A	Thr→Thr à 3223		73
exon 35	T3509M	47413C→T	Thr→Met à 3509	+ <i>Sfa</i> NI	73
exon 35	A3511V	47419C→T	Ala→Val à 3511		73
exon 40	S3791S	49512G→C	Ser→Ser à 3791		70
exon 45	A4091A	51140A→G	Ala→Ala à 4091	+ <i>Hha</i> I	70, 72
exon 46	S4189F	51523C→T	Ser→Phe à 4189		73
exon 46	P4209P	51584T→C	Pro→Pro à 4209	- <i>Dde</i> I	67, 73
exon 46	P4254P	51719C→T	Pro→Pro à 4254		70

La grande diversité des mutations rencontrées sur l'ensemble de la région unique et répétée du gène *PKDI* suggère que plusieurs éléments peuvent influencer l'apparition d'altérations de séquence. De plus, seule une minorité des mutations recensées se retrouvent dans plus d'une famille, laissant présager un haut taux d'apparition de mutations spontanées. Ainsi, des caractéristiques intrinsèques à *PKDI* comme les petits bouts de séquences répétés plusieurs fois à l'intérieur des exons mais surtout dans les introns et les longues séries d'homopyrimidines sont peut-être à l'origine de certaines de ces mutations. En effet, une forte concentration de pyrimidines sur une séquence donnée tend à former une triple hélice dans l'ADN génomique qui peut induire des insertions, des délétions ou des mutations ponctuelles lors d'un glissement de l'appareil de réplication de l'ADN. Ceci demeure à ce jour hypothétique, mais ces caractéristiques font du gène *PKDI* un locus particulier où plusieurs facteurs doivent être pris en considération lors de l'analyse mutationnelle. D'ailleurs, le taux d'apparition des mutations spontanées estimé par Dalgaard et al.<sup>10</sup> se situe entre 6,5 et  $12 \times 10^{-5}$  mutation/locus/génération. Il reflète bien l'instabilité du locus *PKDI*. Ce taux d'apparition de mutations spontanées signifie que si l'on pouvait suivre un gène dans un gamète en particulier à travers toutes les divisions cellulaires jusqu'à la prochaine génération de gamètes, il y aura une possibilité d'apparition de 6,5 à 12 mutations par million de gamètes par génération. Lors de ses recherches en 1957, Dalgaard n'avait évidemment pas accès aux technologies modernes comme l'ultrasonographie. Ces techniques auraient discerné de manière plus subtile ses résultats considérés aujourd'hui comme légèrement grossiers. Cependant, le taux de mutation aléatoire chez l'ADPKD1 demeure l'un des plus élevés parmi les pathologies génétiques et les données de Dalgaard sont encore utilisées. Par exemple, en comparaison, le rétinoblastome a un taux d'apparition de mutations spontanées moyen de  $8 \times 10^{-6}$  mutation/locus/génération, tandis que ceux de la myopathie de Duchenne et de la neurofibromatose sont respectivement de  $67 \times 10^{-6}$  et  $73 \times 10^{-6}$  mutation/locus/génération<sup>80</sup>. À partir de toutes ces informations et sachant que la position, la séquence et l'environnement du gène *PKDI* ont bien été déterminés, il est maintenant possible d'examiner son produit: la polycystine-1<sup>66</sup>.

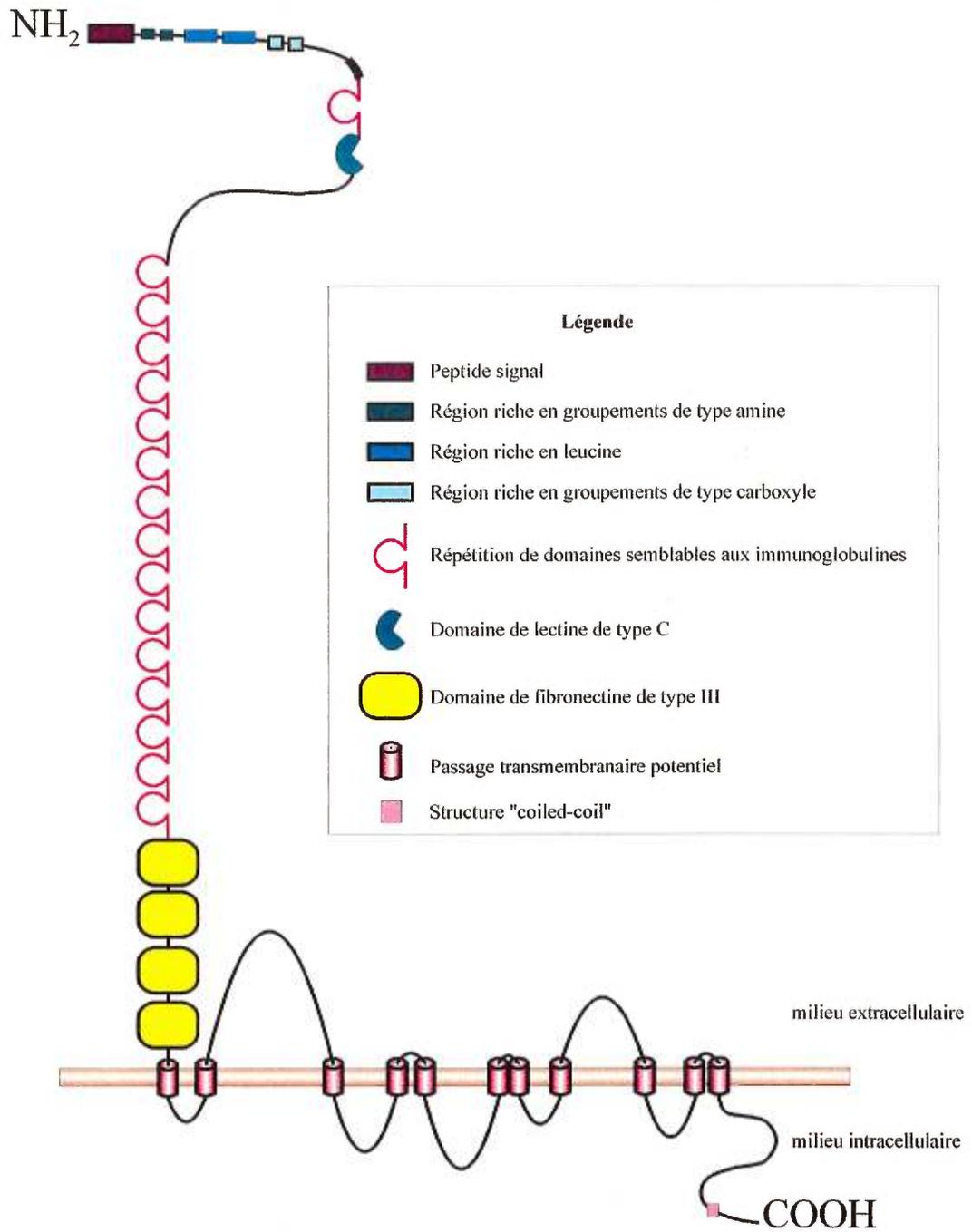
## 2.2 Le produit du gène *PKDI*: la polycystine-1.

La caractérisation de la structure des domaines fonctionnels trouvés par homologie de séquence, du niveau et du lieu d'expression de la polycystine-1 représente la prochaine étape permettant de mieux comprendre la génétique de *PKDI*. De plus, ces indices contribueront à une meilleure définition du rôle de la polycystine-1. Nous aborderons donc les fonctions possibles pouvant être remplies par la polycystine ainsi que l'étendue de son expression dans des tissus normaux et polykystiques. Il est à noter que les domaines trouvés sont, pour le moment, putatifs. Des connaissances plus poussées sur la structure de cette protéine seront nécessaires pour bien définir les fonctions et les domaines impliqués.

### 2.2.1 Structure et fonction de la polycystine-1.

C'est d'abord le consortium international<sup>66</sup> qui a procédé pour la première fois à l'analyse de la protéine de *PKDI*. Le transcrit de 14,5kb comprend 208 nucléotides dans la partie 5' non-traduite et 1019 nucléotides dans la région 3' non-traduite. Comme pour la séquence génomique, les trois équipes qui ont contribué à la caractérisation de la polycystine-1 obtiennent des résultats très semblables, où seules de légères différences existent, conséquences d'erreurs de séquençage ou de la présence de polymorphismes<sup>65,66,79</sup>. Cependant, la majorité des informations concernant la structure et la localisation des domaines fonctionnels potentiels de la polycystine-1 furent énoncées par Hughes et al.<sup>65</sup> (Fig. 7). Les domaines structuraux les plus intéressants concernant cette protéine sont au nombre de sept.

L'un de ces domaines, riche en leucine (*Leucine rich repeat*), se situe très près de l'extrémité 5' de *PKDI*. Il existe 2 répétitions de ce domaine. Dans la plupart des protéines où ce domaine est présent, ces répétitions sont situées sur la partie extracellulaire de la protéine.



**Figure 7.** *Structure hypothétique de la polycystine-1, le produit du gène PKD1.*  
 Les principaux domaines sont identifiés dans la légende.  
 (adaptée de la référence 65)

Il est responsable d'interactions protéine-protéine utiles pour la reconnaissance cellulaire, la liaison à des composants de la matrice extracellulaire ou comme récepteur impliqué dans une cascade de signaux de transduction dans plusieurs protéines connues<sup>81,82,83</sup> comme la tyrosine kinase C. Sur le transcrit *PKDI*, ce domaine débute à l'exon 1 pour se terminer à l'intérieur de l'exon 4.

Un second domaine couvre les exons 6 et 7. Il s'agit du domaine lectine de type C (*C type lectin domain*) que l'on retrouve souvent dans la partie extracellulaire de plusieurs protéines. Ce type de domaine lie habituellement des glucides spécifiques en présence d'ions  $Ca^{2+}$ . Le motif de ce domaine comporte une série de 120a.a. (acides aminés) que l'on retrouve chez les protéoglycanes<sup>84</sup> qui interagissent avec des glycoprotéines de la matrice extracellulaire comme les récepteurs endocytiques<sup>85</sup> et les sélectines<sup>86</sup>, impliqués dans la reconnaissance et l'adhésion cellulaire.

Le plus important des domaines, en terme de taille, demeure les répétitions de domaines semblables aux immunoglobulines (*Immunoglobulin-like repeat*). La localisation sur le transcrit de ces répétitions couvre une vaste partie, où une séquence principale WDFGDGS est conservée et répétée. Autour de cette séquence centrale, 85pb sont relativement bien conservées. En tout, il y a 16 répétitions, dont l'une se trouve dans l'exon 5 et les 15 autres dans les exons 11 à 15. La conservation de ces différentes structures permet de croire qu'une duplication, à partir d'un seul élément, est à l'origine de ce domaine. Ce domaine ressemble aux domaines Ig des molécules impliquées dans l'adhésion cellulaire et de ceux situés sur des récepteurs de la surface cellulaire<sup>87</sup>. La fonction de la séquence hautement conservée WDFGDGS n'est pas encore connue. Normalement, ce type de domaine concède à la molécule une fonction de liaison spécifique à un ligand quelconque, supposant que ce domaine possède un tel rôle chez la polycystine-1<sup>88</sup>. Par exemple, pour une molécule d'immunoglobuline (Ig), ce domaine rendra possible une interaction avec un antigène.

Un autre domaine potentiel sur la polycystine-1 se situe entre le domaine Ig et le début de la série des passages transmembranaires. Le domaine relié aux fibronectines de type III (*Type III fibronectin-related domains*) ressemble au domaine Ig. En tout, 4 répétitions de ce domaine existent. Ce type de domaine s'apparente au domaine Ig au niveau de sa structure secondaire. Il se retrouve principalement sur les protéines de la matrice extracellulaire<sup>89</sup>, sur les parties extracellulaires de récepteurs<sup>90</sup> et sur des molécules responsables de l'adhésion cellulaire<sup>91</sup>.

Finalement, l'analyse du niveau d'hydrophobicité de la séquence polypeptidique de la polycystine-1 suggère qu'il s'agit d'une protéine membranaire ancrée à l'aide de 11 passages transmembranaires potentiels. Ces passages transmembranaires se situent du côté C-terminal de la protéine, laissant un vaste domaine N-terminal extracellulaire et un domaine C-terminal hautement chargé. La structure proposée par Hughes et al.<sup>65</sup> et la distribution des différents domaines identifiés par cette équipe, suggèrent une implication de la polycystine-1 dans des interactions cellule/cellule et cellule/matrice extracellulaire<sup>92</sup>. De plus, Hughes et al.<sup>65</sup> ont aussi proposé que le domaine C-terminal de la polycystine-1 pourrait se lier aux protéines du cytosquelette. Cette partie de la protéine possède des sites de phosphorylation (deux sites de phosphorylation à la fois pour la tyrosine kinase et la protéine kinase C) qui pourraient jouer un rôle sur ses propriétés adhésives. Dans une prochaine section (section 4), nous verrons plus en détails que la polycystine-1 contiendrait un motif de type câble torsadé qui pourrait lier et moduler l'activité de la protéine du gène *PKD2* (la polycystine-2) et une séquence dite PEST (Pro-Glu-Ser-His) qui permet à la cellule d'éliminer les surplus de polycystine-1 et d'ajuster la concentration de ce polypeptide selon ses besoins.

### 2.2.2 Localisation cellulaire et subcellulaire de la polycystine-1.

En plus de la caractérisation des domaines structuraux de la polycystine-1, plusieurs équipes se sont intéressées à son lieu et à son niveau d'expression. Dans le but de mieux comprendre le processus de la pathogénèse de l'ADPKD1 une analyse des tissus normaux adultes et foetaux fut complétée à l'aide de différentes méthodes. De plus, des analyses comparatives ont aussi été faites sur des souris et des reins polykystiques. Ces expériences ont permis de recueillir deux types d'information: a) la localisation cellulaire et subcellulaire de la polycystine-1 et b) la distribution de cette protéine dans le temps et dans l'espace.

Diverses stratégies ont été utilisées pour bien repérer la polycystine-1. La localisation s'est faite principalement sur des cellules épithéliales<sup>93,94,95,96,97</sup>. Au niveau cytotologique, la polycystine-1 fut localisée sur la membrane cytoplasmique, supportant l'hypothèse voulant qu'elle soit impliquée dans la morphologie des cellules. Cependant, la responsabilité de cette protéine dans l'induction et/ou le maintien de la prolifération cellulaire demandera plus d'expertises. Plusieurs techniques ont été utilisées, entre autres par Geng et al.<sup>96</sup>, dont l'immunodétection à l'or et l'immunocytochimie à l'aide d'anticorps poly- et monoclonaux. Pour éviter toute confusion avec les gènes homologues *HG*, l'équipe de Ward<sup>93</sup> et de Geng<sup>96</sup> ont mis au point des anticorps monoclonaux et polyclonaux dirigés contre la région unique du gène *PKD1*.

Puisque la polycystine-1 est une protéine membranaire, les résultats concernant la localisation subcellulaire de celle-ci ont été obtenus en isolant les membranes de reins de souris<sup>98</sup> et de reins humains<sup>93,96,97</sup>. Une fois bien homogénéisés, les échantillons de protéine étaient solubilisés puis mis sur un gel SDS-PAGE pour l'électrophorèse. Un Western blot fut ensuite réalisé, c'est-à-dire que par capillarité, les protéines du gel sont transférées sur une membrane de nitrocellulose selon le même principe que le Southern blot pour l'ADN.

Cette technique a d'ailleurs permis d'estimer approximativement le poids moléculaire de la polycystine-1 à 400kD. Une fois les protéines sur la membrane de nitrocellulose, un premier anticorps est alors dirigé contre la polycystine-1. Par la suite, un second anticorps conjugué à une peroxydase est dirigé contre le premier. De cette manière, la peroxydase qui est enzymatiquement active est liée à la polycystine-1. En ajoutant le substrat à la peroxydase comme le diaminobenzidine tetrahydrochlorure, une couleur brune apparaîtra là où se trouve la polycystine-1.

Des localisations semblables à celles effectuées sur des tissus sains et d'embryons de souris ont aussi été faites sur des reins polykystiques humains. Ainsi, Geng et al.<sup>96</sup> ont examiné de manière exhaustive des reins humains ADPKD et ont démontré que 90% des kystes examinés possédaient un niveau de polycystine-1 élevé. Ils suggèrent qu'une surexpression de la polycystine-1 n'est pas la cause première de la formation de kystes, mais une conséquence. Pour Ibraghimov-Beskrovnaya et al.<sup>97</sup>, l'observation dans certains kystes d'une absence de polycystine-1 et chez d'autres d'une surexpression de la protéine fait penser qu'un défaut au niveau moléculaire serait provoqué par le modèle du second événement (*Second Hit Model*). Ainsi, certaines équipes observent une surexpression de la polycystine-1 à l'intérieur des kystes<sup>93,96</sup> tandis que d'autres comme celle d'Ibraghimov-Beskrovnaya et al.<sup>97</sup> observe une variabilité de son expression. Des études comparatives devront être complétées à l'aide d'un même protocole pour établir un consensus sur la question.

Au niveau de la distribution temporelle de la polycystine-1, des reins d'embryons de souris et d'humains ont été utilisés<sup>93,96,98</sup>. Les expériences de localisation de la polycystine-1 sur les tissus de souris ont révélé des traces de la protéine dès la 13ième semaine de gestation<sup>93</sup>. Chez l'humain, Geng et al.<sup>96</sup> ont détecté la polycystine-1 à partir de la 14ième et de la 18ième semaine de gestation. Lors de la formation du néphron à partir des cellules du mésenchyme, il y a formation d'un bourgeon urétéral par induction réciproque de ce dernier avec le mésenchyme.

Selon Geng et al.<sup>96</sup>, à ce stade, l'expression de la polycystine-1 serait minime. Ceci écarterait donc un rôle d'inducteur pour la polycystine-1 pendant la morphogénèse du rein. Une expression significative de la polycystine-1 s'en suit durant la genèse de la forme en S, juste avant la formation de la capsule de Bowman et du réseau tubulaire. La production de la polycystine-1 atteindrait donc son apogée lors de la maturation du tubule proximal et du tubule collecteur. À la suite de ces événements, la quantité de polycystine-1 revient alors à un niveau basal. Ce niveau est maintenu tout au long de la vie adulte. D'autres résultats émis par Burrow et al.<sup>99</sup> ont cependant démontré pour une néphrogénèse normale chez l'humain, que la concentration de polycystine-1 atteindrait son paroxysme plus tôt, au stade du bourgeon urétéral entre la 7<sup>ième</sup> et 14<sup>ième</sup> semaine de gestation. Ces résultats suggèrent à la fois une régulation de l'expression de la polycystine-1 au cours du développement et un rôle pour cette protéine pendant la néphrogénèse. Bref, des différences au niveau des techniques employées et de la préparation du matériel sont peut-être à l'origine des résultats contradictoires présentés ci-haut. D'autres études seront bien évidemment nécessaires avant de trancher la question.

Des recherches sur des tissus autres que les reins ont permis d'observer la polycystine-1 sur des organes dont les origines embryonnaires diffèrent. Il semble, d'après les observations de Ibraghimov-Breskovnaya et al.<sup>97</sup>, qu'il existe différentes isoformes de la polycystine-1 produites par un épissage alternatif. Ceci demeure plausible car les domaines fonctionnels de la polycystine-1 sont tous exprimés par des exons différents. Ainsi, il pourrait exister une corrélation entre la forme de la polycystine-1, sa fonction, le lieu et le moment de son expression. Si cette hypothèse s'avérait exacte, il deviendrait alors plus facile d'expliquer pourquoi, par exemple, les reins se détériorent alors que le coeur demeure fonctionnel chez les sujets atteints de l'ADPKD.

### 3. ADPKD2

Tout comme l'identification du locus *PKD1*, la localisation de *PKD2* a sensiblement passé par les mêmes étapes. L'idée qu'un second locus était responsable de l'ADPKD a vu le jour lors du clonage positionnel du gène *PKD1* où plusieurs études de liaisons génétiques ont été effectuées. Ces études ont démontré une hétérogénéité génétique pour la polykystose rénale autosomique dominante<sup>14,35,100,101</sup>. En effet, l'observation de familles où la maladie n'était pas liée aux marqueurs entourant le gène *PKD1* a suggéré l'existence d'un deuxième locus<sup>100</sup>. Outre *PKD1*, au moins deux autres gènes existent, soit *PKD2*<sup>100</sup> et *PKD3*<sup>14,101</sup>. *PKD2* a été isolé en 1996 alors que *PKD3* n'a pas encore été localisé. Environ 15% de tous les individus atteints de l'ADPKD sont ADPKD2<sup>102,103</sup>. Nous examinerons de façon sommaire l'aspect clinique, génétique et le produit issu de ce gène.

#### 3.1 Manifestations phénotypiques.

Les manifestations phénotypiques reliées au gène *PKD2* semblent très semblables à celles rencontrées pour *PKD1*. Les traits cliniques rencontrés chez les sujets ADPKD sont communs aux deux types de la maladie. Une description de ces traits est mentionnée à la section 1.3.2 concernant l'ADPKD1. La différence significative entre les deux types de la maladie se résume à sa gravité, moins importante pour l'ADPKD2 que l'ADPKD1. De plus, l'apparition des différents signes cliniques observés chez l'ADPKD1 se manifeste beaucoup plus tard chez l'ADPKD2<sup>20,21</sup>. Le tableau IV montre les caractéristiques propres à ces deux sous-types d'ADPKD.

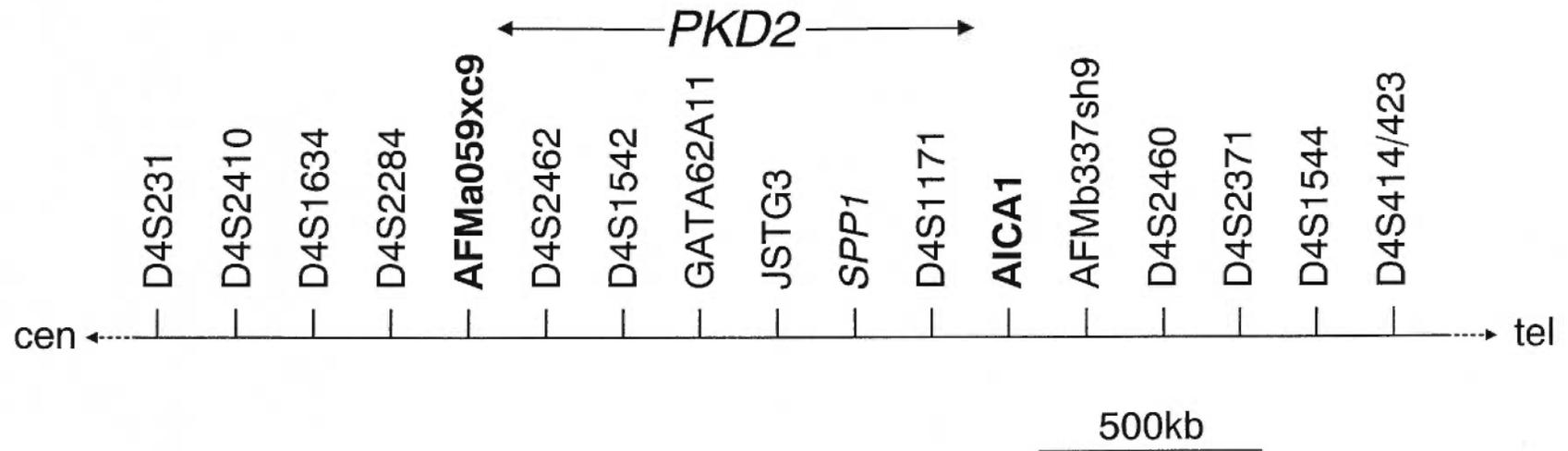
**Tableau IV** Comparaison de l'âge moyen d'apparition de différentes manifestations phénotypiques pour l'ADPKD1 et l'ADPKD2.

	Sujets à risque <30 ans avec kystes rénaux (%)	Sujets <40 ans avec hypertension (%)	Sujets avec kystes <40 ans avec insuffisance rénale (%)	Âge moyen en des gens en insuffisance rénale (années)
<i>ADPKD1</i>	46	18	9	57
<i>ADPKD2</i>	11	10	0	69

(adapté de la référence 15)

### 3.2 Génétique de l'ADPKD2.

Comme pour *PKD1*, la localisation du locus *PKD2* s'est effectuée selon les étapes suivies lors du clonage positionnel. Une cartographie génétique a été élaborée où un locus potentiel fut situé sur le bras long du chromosome 4 (4q21-23) plus précisément entre les marqueurs génétiques D4S231 et D4S414/423<sup>102,103</sup>. En délimitant de plus en plus la région où le gène candidat pouvait se situer, Mochizuki et al.<sup>104</sup> ont déterminé une partie d'ADN plus restreinte entre les marqueurs génétiques AFMa059xc9 et AICA1 (Fig. 8).

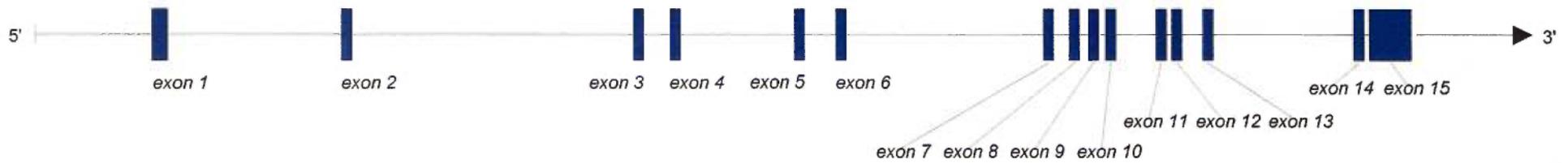


**Figure 8.** Carte génétique de la région 4q21-23 du bras long du chromosome 4. La région candidate du locus *PKD2*, déterminée par des analyses de liaisons, est située entre les marqueurs génétiques AFMa059xc9 et AICA1. (adaptée de la référence 104)

Une cartographie physique a suivi la cartographie génétique permettant de circonscrire la région *PKD2*. À la suite de ces étapes, une série de cosmides et de phages P1 ont été construits à partir d'ADN de sujets atteints de l'ADPKD2 pour former un contig couvrant une distance d'environ 680kb à partir du marqueur génétique AICA1 jusqu'à une région plus centromérique au-delà du marqueur polymorphe JSTG3. Pour une famille ADPKD2 en particulier, ce contig contenait une délétion d'un peu moins de 40kb. De l'ADNc correspondant à cette région fut cloné puis séquencé dans le but d'y trouver un cadre de lecture. À la suite de ces analyses, un ensemble de clones d'ADNc collectivement nommé c-TM-4 a été isolé à partir du cosmide c44a-9 issu d'une librairie de cosmides spécifiques au chromosome 4. Après l'isolement d'ARNm dans des tissus foetaux et adultes, un Northern (ARN) blot avec une sonde d'ADNc, nommée c-TM-4B3-3, faisant partie de l'ensemble c-TM-4, a révélé un transcrit de 5,4kb exprimé dans la plupart des tissus foetaux et adultes comme les ovaires, les reins, les testicules et les intestins. L'insert du clone cTM-4B3-3 contient une séquence potentiellement codante de 5057 paires de bases (pb) dont 2086pb se retrouvent dans la partie 3' non-codante du gène où il y a un signal consensus de polyadénylation. Ce gène candidat ne possède aucune homologie au niveau nucléotidique avec un gène déjà connu.

Comme pour le gène *PKD1*, seule une mutation présente dans le gène candidat *PKD2* permettra d'établir un lien entre ce locus et la maladie. Une analyse de la séquence de l'insert du clone cTM-4B3-3, chez des patients issus de trois familles bien caractérisées ADPKD2, montre la présence de mutations de type non-sens menant à la production d'une protéine tronquée. L'une de ces familles porte au codon 380 (Trp) un changement G→A, chez les autres familles, il s'agit d'un C→T au codon 742 (Arg) et 405 (Gln)<sup>104</sup>. Depuis ces premières mutations, une autre fut localisée<sup>105</sup> où l'insertion d'un C après le codon 231 entraîne un décalage du cadre de lecture produisant une protéine tronquée d'une longueur de 268a.a. Hayashi et al.<sup>106</sup> ont déterminé la structure intron/exon du gène *PKD2* (Fig. 9).

## Structure intron/exon du gène *PKD2*



**Figure 9.** *Structure intron/exon du gène PKD2 situé sur le bras long du chromosome 4 dans la partie 4q21-q23.*

Le dernier exon comprend la partie 3' non-traduite.

(adaptée de la référence 106)

Le gène contiendrait au moins 15 exons dont la taille varie entre 99pb (exon 10) et 2322pb (exon 15, incluant la région 3' non-traduite). Il semble que ce soit l'exon 12 qui coderait le domaine hélice-boucle-hélice connu sous le nom de la main EF (*EF-hand*) et identifié précédemment par Mochizuki et al.<sup>104</sup>. En plus de cette caractérisation de la séquence génomique du gène *PKD2* et de la protéine, la même équipe<sup>107</sup> a réussi à cloner le gène *Pkd2* de la souris sur le chromosome 5. Plusieurs similitudes existent entre le gène humain et murin dont la taille de la séquence codante et la conservation de la main EF. Tous ces éléments contribueront donc à une meilleure compréhension de la pathogénèse de l'ADPKD2.

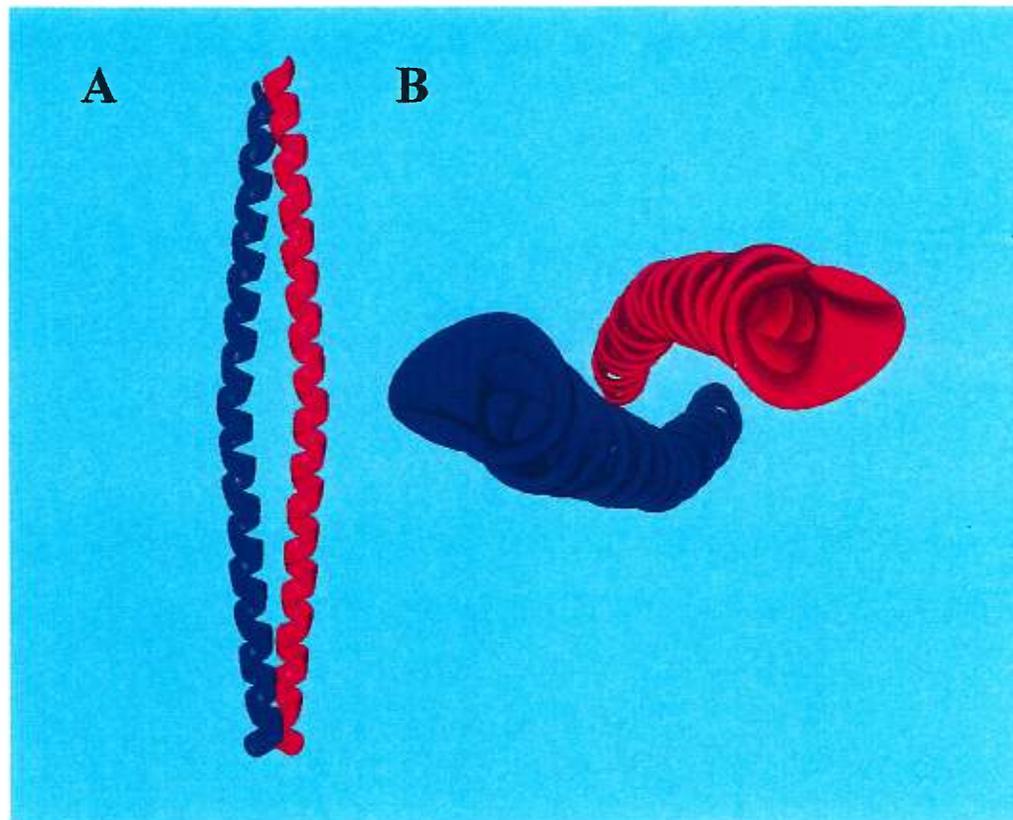
### 3.3 La protéine du gène *PKD2*: la polycystine-2.

La polycystine-2 est composée de 968a.a. avec une masse moléculaire apparente de 110kD. Les analyses d'hydrophobicité suggèrent que c'est un polypeptide comportant de 5 à 8 passages transmembranaires. Le produit du gène *PKD2* est à 25% identique avec ~450 acides aminés compris entre le codon 3655 et 4139 de la polycystine-1, et la similarité entre les deux produits est de 50% pour les régions comprenant les passages transmembranaires. Toujours par comparaison de séquence, on a remarqué une similitude très forte entre la polycystine-2 et le canal calcique voltage-dépendant  $VACC\alpha_{1E}$  présent dans le système nerveux central des souris et des humains<sup>108</sup>. Le rôle de ce canal serait de contrôler l'excitabilité neuronale et la relâche de neurotransmetteurs au niveau des synapses<sup>108</sup>. D'ailleurs, le domaine de la main EF (*EF hand*) proposé sur la polycystine-2 est une structure reconnue dans la plupart des protéines qui sont sensibles à la présence d'ions  $Ca^{2+}$ . Toutes ces informations suggèrent qu'une interaction entre la polycystine-1 et la polycystine-2 pourrait exister. D'ailleurs, les manifestations phénotypiques semblables observées chez les deux types d'ADPKD viennent renforcer cette hypothèse.

#### 4. Interactions possibles entre la polycystine-1 et la polycystine-2.

La caractérisation de la polycystine-1 et -2 ainsi que les hypothèses proposées à l'effet qu'elles soient en relation étroite au niveau cellulaire ont poussé plusieurs équipes à déterminer les domaines responsables d'une telle interaction. En effet, la principale hypothèse à ce sujet évoque la formation d'hétérodimères entre les deux protéines. La polycystine-1, par un signal extracellulaire quelconque, s'associerait avec la polycystine-2 au niveau de la membrane cytoplasmique. Ceci aurait comme conséquence l'induction de l'ouverture d'un canal ou d'un pore laissant entrer des ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule. Ces événements déclencheraient une cascade de signalisation intracellulaire dont le rôle demeure inconnu. Nous aborderons donc l'examen topologique des deux protéines et les techniques ayant permis d'avancer de telles hypothèses.

Les premières études topologiques, menées par Qian et al.<sup>109</sup> ont porté sur les domaines intracellulaires de la polycystine-1 et -2. Le domaine C-terminal intracellulaire de la polycystine-1 semble présenter une structure permettant une interaction avec une autre protéine. Cette structure se situe entre les acides aminés 4214 et 4228. Cette partie de la séquence polypeptidique comprend 5 répétitions d'un heptamère dont les caractéristiques topologiques montrent la présence d'une hélice  $\alpha$  de type câble torsadé<sup>109</sup> (*coiled-coil*) (Fig. 10). *In vivo*, des complexes d'hétérodimères entre le domaine câble torsadé de la polycystine-1 et les 97 derniers acides aminés de la polycystine-2 ont été observés<sup>109,110</sup>. De plus, d'autres tests *in vivo*<sup>109</sup> ont montré que des complexes d'homodimères polycystine-2/polycystine-2 pouvaient être formés via le domaine du câble torsadé situé dans la partie C-terminale de cette protéine entre les acides aminés 616 et 871. La formation de ces homodimères entre les polycystines-2 se fait donc par un domaine autre que celui impliqué lors de l'interaction polycystine-1/polycystine-2. Pour arriver à de tels résultats, Qian et al.<sup>109</sup> et Tsiokas et al.<sup>110</sup> ont mis sur pied un système de deux hybrides<sup>111,112</sup> (*Two-hybrid system*) permettant de déterminer si une interaction polycystine-1/polycystine-2 et polycystine-2/polycystine-2 était possible.



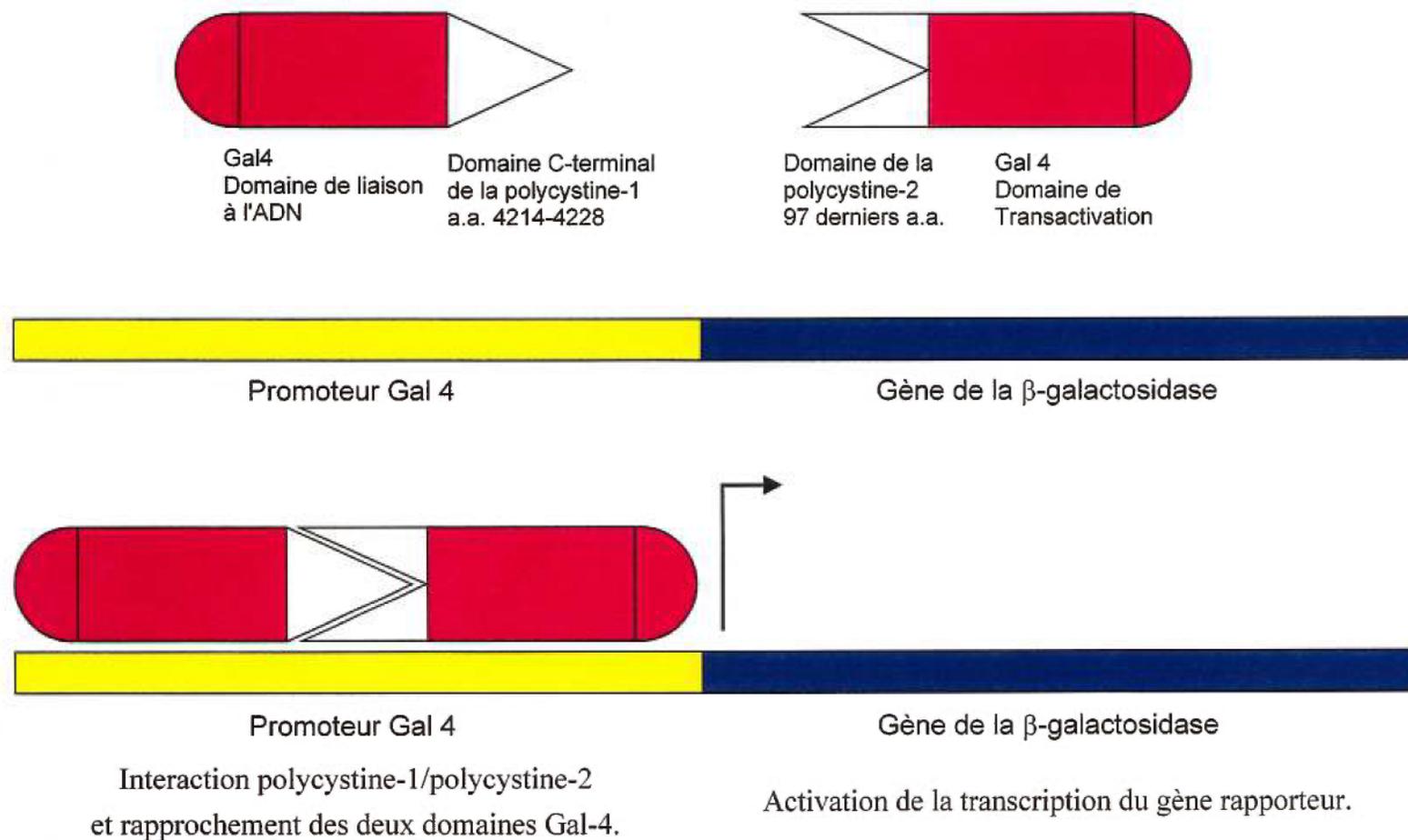
**Figure 10.** *Schéma illustrant une structure câble torsadé. C'est un domaine semblable à celui-ci qui serait situé dans la région C-terminale intracellulaire de la polycystine-1.*

**A)**Vue de la structure câble torsadé de côté. **B)**Vue aérienne de la structure câble torsadé.

(Protein Data Bank, I.D. code:1MLP; adaptée de la référence 113)

Ce système permet de savoir si un domaine particulier d'une protéine peut interagir avec celui d'une autre protéine. La première étape consiste en l'élaboration d'une protéine de fusion comprenant par exemple le domaine de liaison à l'ADN de la protéine GAL4 et la partie C-terminale de la polycystine-1 (acides aminés 4088-4302). La seconde protéine contiendra le domaine C-terminal de la polycystine-2 (acides aminés 687-968) fusionné au domaine de transactivation de la protéine GAL4. Le site de liaison à l'ADN de GAL4 va fixer le promoteur du gène rapporteur  $\beta$ -galactosidase. Ainsi, s'il y a interaction entre les domaines de la polycystine-1 et -2, les deux domaines de GAL4 seront suffisamment rapprochés pour que la transcription du gène de la  $\beta$ -galactosidase devienne importante (Fig. 11). C'est aussi de cette manière que l'équipe de Qian et celle de Tsiokas ont observé une interaction entre deux domaines C-terminaux de la polycystine-2. Une hypothèse avancée par Tsiokas et al.<sup>110</sup> propose que le domaine responsable de l'homodimérisation de la polycystine-2 pourrait contribuer à la formation d'un canal à ion complexe et homomultimérique.

Ces observations permettent de croire que l'une des principales fonctions de la polycystine-1 serait de réguler l'activité de la polycystine-2. Pour mieux comprendre les bases moléculaires qui régissent l'interaction et les effets entre ces deux protéines, Qian et al.<sup>109</sup> s'inspirent d'un modèle énoncé par Moy et al.<sup>14</sup>. Ce modèle concerne la fertilisation de l'oursin de mer. Durant la fertilisation entre l'oeuf et le spermatozoïde de l'oursin de mer, une glycoprotéine située sur l'oeuf se lie à un récepteur (*REJ: Receptor Egg Jelly*) du spermatozoïde provoquant la régulation d'un canal à calcium. La ressemblance du récepteur REJ avec une partie de la région extracellulaire de la polycystine-1 nous permet de croire que cette dernière pourrait réguler une telle activité sur un canal à ion comme la polycystine-2.



**Figure 11.** Schéma explicatif du système deux-hybrides (two hybrid system) utilisé entre autres pour déterminer une interaction possible entre la polycystine-1 et la polycystine-2.

Toujours au niveau de la régulation, Tsiokas et al.<sup>110</sup> ont observé une séquence potentielle PEST (Pro-Glu-Ser-His) à l'extrémité C-terminale de la polycystine-1 qui faciliterait une dégradation rapide de la protéine pour ajuster le niveau d'expression de celle-ci selon les besoins de la cellule. Des expériences sur des mutants PEST ont permis d'observer une augmentation du niveau d'expression de la polycystine-1<sup>110</sup>. Il se peut que la polycystine-2 soit responsable du contrôle de la régulation de la polycystine-1. Cette régulation pourrait se réaliser à l'image du duo catenin-cadherin, important pour l'adhésion cellulaire, la traduction du signal, le début et le maintien de l'organisation structurale et fonctionnelle des cellules et des tissus. En effet, la régulation de l' $\alpha$ - et de la  $\beta$ -catenin se fait à partir de son association catenin-cadherin permettant de prévenir la dégradation de la  $\beta$ -catenin<sup>115,116</sup>. De cette manière, seule la catenin libre sera supprimée, éliminant du même coup un surplus en concentration de ce polypeptide.

Bref, plusieurs éléments confirment l'existence d'une relation étroite entre la polycystine-1 et -2 par l'entremise d'une interaction de type câble torsadé. De plus, selon les dernières indications, il semble que la polycystine-1 serait un "capteur" de signal d'origine extracellulaire transmis via la polycystine-2 au noyau provoquant une cascade de signalisation. D'autres études seront cependant nécessaires pour établir de façon définitive la relation polycystine-1/polycystine-2, leur rôle respectif et sans doute pour identifier d'autres protéines impliquées dans ce complexe. De plus, ces récentes découvertes permettront de mieux comprendre la pathogénèse de l'ADPKD et la formation des kystes d'un point de vue moléculaire et cellulaire.

## 5. Phénomène de kystogénèse dans l'ADPKD1.

Les notions concernant les bases moléculaires et cellulaires du phénomène de kystogénèse demeurent a priori complexes et encore méconnues. Pour bien saisir les notions qui seront traitées dans la prochaine section, il est donc important, à ce stade, de bien discerner un kyste d'une tumeur. Le premier est formé d'une monocouche cellulaire donnant naissance à une cavité remplie d'une substance liquide ou semi-liquide, tandis que la tumeur se manifeste par une croissance cellulaire non-contrôlée menant à la formation d'une masse tissulaire. Plusieurs éléments peuvent contribuer à la formation d'un kyste, surtout sur le rein. Ceci a une influence directe sur le processus de kystogénèse et sur le moment d'apparition des premiers signes cliniques. Ainsi, certains présenteront des kystes plus tôt que d'autres au cours de leur vie. Vue la grande diversité de kystes, plusieurs classifications ont été établies. Nous retiendrons la plus utile et la plus simple, soit la répartition des kystes selon leur origine génétique ou non-génétique<sup>20</sup>. Ceux de l'ADPKD sont évidemment d'origine génétique.

Au commencement, la communauté scientifique pensait que l'ADPKD1 était congénitale et que l'apparition de kystes se manifestait dès la différenciation des cellules mésodermiques en cellules rénales, à la suite d'un défaut lors du développement embryonnaire. Des expériences menées sur des animaux adultes normaux ont démontré que l'ADPKD1 pouvait se développer à l'âge adulte. En injectant du diphénylamine<sup>117-121</sup> et d'autres agents antioxydants comme l'acide nordihydroguaiarétique<sup>122</sup>, des lésions semblables à celles que l'on retrouve chez l'ADPKD1 ont été notées. De plus, il existe une continuité structurale entre les cellules épithéliales différenciées et les cellules kystiques. Ces résultats remettaient donc en question les origines embryonnaires de l'ADPKD1. Depuis, plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer la kystogénèse. Nous aborderons dans un premier temps celles concernant les bases cellulaires des kystes, puis nous nous concentrerons sur un aspect beaucoup moins connu soit les bases moléculaires de la kystogénèse.

## **5.1 Bases cellulaires de la kystogénèse.**

En effet, au niveau cellulaire et physiologique, les connaissances acquises sur la kystogénèse facilitent sa compréhension. Une théorie fait maintenant consensus chez la majorité des chercheurs pour définir ce phénomène. Elle repose sur la prémisse suivante: les cellules épithéliales, composantes des parois des kystes, sont immatures comparativement aux autres cellules épithéliales de l'anse de Henlé, du tubule proximal, du tubule distal et du tubule collecteur<sup>123-125</sup>. D'un point de vue cellulaire, trois conséquences émergent d'un tel concept: a) un potentiel mitotique plus élevé des cellules non-différenciées, provoque leur prolifération de façon anormale, b) une accumulation à l'intérieur de la cavité kystique, de filtrat glomérulaire ou de liquide trans-épithélial, assurerait l'expansion des kystes et c) finalement, il y aurait altération du métabolisme et de la synthèse des composants de la matrice extracellulaire autour des cellules kystiques.

### **5.1.1 Prolifération cellulaire anormale**

Les biologistes et les physiologistes se sont attardés à différents aspects de la kystogénèse, dont la prolifération cellulaire. En général, les cellules rénales ne se divisent pas ou très peu. La division cellulaire est cantonnée au développement embryonnaire ou en réponse à des lésions internes<sup>126</sup>. Étant donné l'état dédifférencié des cellules épithéliales qui forment les kystes et de leur potentiel mitotique élevé, plusieurs indices dont les marqueurs morphologiques mettent en évidence la forte activité proliférative des cellules kystiques, soit la perte de la bordure en brosse du côté apical des cellules, un rapport élevé noyau/cytoplasme et une altération de la forme cellulaire.

Des fonctions biochimiques importantes illustrent aussi la différenciation anormale des cellules épithéliales kystiques. Il y a perte de la sensibilité cellulaire à l'arginine vasopressine et une conversion marquée du rôle de l'épithélium, passant d'une activité d'absorption à celle de sécrétion.

Les signes les plus éloquents concernant la différenciation anormale des cellules épithéliales se situent au niveau des protéines qui régissent le développement, la croissance et la division cellulaire. En effet, une forte activité de ces gènes, normalement muets chez les cellules matures, est détecté en quantité significative à l'intérieur des cellules kystiques. L'expression d'antigènes nucléaires (PCNA)<sup>127</sup>, l'augmentation importante du nombre de cellules<sup>128</sup> et le niveau d'expression élevé de gènes impliqués dans la différenciation cellulaire (*c-myc*, *c-fos*, *c-jun*, *c-Ha-ras*)<sup>129-131</sup> ont été observés chez des cellules de reins kystiques de modèles animaux et plus récemment chez l'humain. L'expression de ces proto-oncogènes illustre une activité de prolifération cellulaire élevée. Ceci supporte l'idée que les cellules kystiques ont un phénotype cellulaire immature dont le haut niveau de prolifération représente un facteur important dans la formation de kystes rénaux.

Suite à ces observations et ayant écarté tout événement d'origine embryonnaire comme cause de la formation des kystes rénaux pour l'ADPKD, Rankin et al.<sup>123</sup> ont proposé le modèle "maturation-arrest" (arrêt de la maturation). Ce concept repose sur le fait qu'au départ toutes les cellules épithéliales rénales sont matures. Un événement quelconque (hypoxie, mutation somatique, stress métabolique ou contact avec des toxines) vient endommager certaines des cellules épithéliales. Ceci force les cellules affectées à se différencier pour en régénérer de nouvelles. Cependant, au lieu de se développer normalement, les cellules sont bloquées au stade immature de leur développement.

Des éléments nouveaux permettant d'expliquer le blocage de la différenciation ont récemment été suggérés. Ces études réalisées avec des modèles *in vitro* et *in vivo* (souris transgéniques), ont proposé comme facteur pathogénique responsable des kystes humains, un déséquilibre entre la prolifération cellulaire et l'apoptose au niveau de l'épithélium tubulaire. Ces deux mécanismes sont inactifs pour les cellules matures. L'équipe de Marie Trudel<sup>132</sup> a démontré une altération possible de l'expression des protéines régulatrices c-Myc et de son antagoniste Bcl-2 dont la cible pourrait être le produit du gène *PKDI* humain.

Selon certaines données, il semble que la protéine c-Myc provoque l'apoptose cellulaire<sup>133</sup> tandis que Bcl-2 annule l'effet inducteur de c-Myc sur l'apoptose<sup>134</sup>. En fait, Bcl-2 arrête l'activité apoptotique de c-Myc sans altérer son activité de prolifération cellulaire. L'altération de la relation intime qui existe entre la prolifération et l'apoptose cellulaire pourrait donc contribuer au développement et à la croissance des kystes. D'autres études doivent être menées pour bien cerner le rôle des différents acteurs mentionnés dans cette section.

### 5.1.2 Accumulation de liquide transépithélial.

L'accumulation de liquide à l'intérieur de la cavité formée par les cellules épithéliales immatures est un facteur rencontré dans la kystogénèse. Comme la composition du filtrat glomérulaire, le liquide kystique va varier selon sa position le long des différents tubules rénaux. La quantité de liquide transépithélial ainsi accumulée sera de trois types selon sa concentration en électrolytes et sa position. Ainsi, les kystes proximaux contiendront un liquide isotonique qui ressemble à celui du liquide extracellulaire. Les kystes situés dans l'anse de Henlé seront hypotoniques vue leur faible concentration en NaCl, tandis que les kystes hypertoniques dont la concentration en  $K^+$  et en  $H^+$  est supérieure à celle de  $Na^+$  se trouveront au niveau du tubule collecteur. Malgré les variations de concentrations entre l'intérieur et l'extérieur des kystes, la présence d'un canal à l'eau dans les cellules épithéliales du rein empêche l'établissement d'un gradient osmotique significatif<sup>135</sup>.

Plusieurs voies mènent à l'accumulation de liquide à l'intérieur de la cavité kystique. Dans près de 85% des kystes ADPKD1, il ne semble pas y avoir d'affluents principaux permettant d'alimenter le kyste en liquide<sup>128</sup>. Dans la majorité des cas, le seul moyen favorisant l'accumulation de fluide demeure donc les voies de sécrétion des cellules épithéliales qui forment les parois kystiques<sup>128</sup>. Ceci a d'ailleurs été démontré sur des kystes ADPKD1 intacts et *in vitro* sur des cellules épithéliales kystiques<sup>136,137</sup>. Deux possibilités permettraient d'expliquer l'approvisionnement des kystes.

La première implique la voie de sécrétion des chlorures où contrairement à la fibrose kystique, les régulateurs de la conductance transmembranaire de la fibrose kystique (CFTR: *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) sont très actifs. La seconde, énoncée par Wilson et al.<sup>138</sup> propose l'existence d'une forte activité de sécrétion de sodium du côté apical de la membrane cellulaire conséquence du ciblage erroné de la pompe Na,K-ATPase vers le côté apical.

Depuis les deux dernières années, plusieurs études ont montré une forte concentration de CFTR du côté apical des cellules épithéliales<sup>136,137</sup>. Cette disposition provoque un courant vectoriel des anions Cl<sup>-</sup> partant de la membrane basolatérale à la membrane apicale. Un gradient électrochimique est alors créé qui favorise la sécrétion de liquide dans la cavité kystique<sup>139,140</sup>. D'ailleurs, cette abondance de CFTR chez les cellules immatures du rein est connue chez d'autres types d'épithélium ayant une activité de sécrétion comme les cryptes intestinales et les alvéoles pulmonaires foetales. L'activité de sécrétion des cellules épithéliales prend donc le dessus sur son activité d'absorption. Des techniques d'immunofluorescence, d'immunocytochimie, d'électrophysiologie et d'imagerie cofocale ont confirmé cette première hypothèse<sup>139</sup>. De plus, des expériences sur le métabolisme biochimique influençant les voies d'absorption et de sécrétion des cellules épithéliales ont montré qu'une élévation de la concentration intracellulaire d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) se traduisait par une augmentation de la quantité de CFTR sur la membrane apicale. Lors de ces expériences, la présence de la pompe Na,K-ATPase sur la membrane apicale des cellules examinées n'a pas été détectée.

En effet, les observations concernant la localisation de la pompe Na,K-ATPase se contredisent souvent selon les techniques et les modèles cellulaires employés. Dans les cellules épithéliales humaines ADPKD1, la présence de la pompe varie d'une forte concentration<sup>138</sup> à une absence totale<sup>139</sup> du côté apical. Sur des souris *cpk*, qui servent de modèle pour l'ARPKD, Avner et al.<sup>141</sup> ont trouvé autant de pompes Na,K-ATPase du côté apical que basolatéral.

La différence entre ces résultats est probablement causée par les tissus utilisés, les techniques de préparation tissulaire employées, les conditions physiques et les propriétés des différents anticorps utilisés. L'identification des principaux facteurs cytologiques et biochimiques pouvant être responsables de l'accumulation de fluide demeurent donc inconnus. Il se peut que le niveau d'expression de la pompe chez les cellules ADPKD soit altéré<sup>143</sup>.

Des arguments énoncés par Wilson<sup>143</sup> et Robinson<sup>144</sup> pourraient expliquer la disparité des résultats concernant la localisation de la pompe Na,K-ATPase. En effet, ceux-ci proposent que les cellules ADPKD1 présentent deux types d'isoformes pour la sous-unité  $\beta$  de la protéine Na,K-ATPase. Ainsi, pour les cellules épithéliales polarisées, ce changement d'isoforme induirait un ciblage de la pompe vers la région apicale ou basolatérale selon l'isoforme de la sous-unité  $\beta$ . Cependant, la phénotypie immature des cellules épithéliales impliquées demeure jusqu'à présent l'explication la plus raisonnable. La collaboration des principaux chercheurs impliqués dans le processus de la kystogénèse contribuera sans doute à clarifier ces hypothèses et ainsi déterminer les facteurs premiers pouvant amener les patients à développer cette myriade de kystes.

### 5.1.3 La matrice extracellulaire (MEC).

La formation des kystes change non seulement la morphologie de la cellule impliquée, mais aussi celle de son environnement immédiat (membrane basale, cellules interstitielles, fibroblastes et monocytes). Une réciprocity complexe existe entre les cellules épithéliales tubulaires et la matrice extracellulaire (MEC). Les premières contrôlent l'équilibre synthèse/dégradation et la composition biochimique de la seconde. En retour, la MEC sert de régulateur pour la mobilité et la forme cellulaire, pour le processus de différenciation, de croissance et de l'expression de certains gènes<sup>145-149</sup>. Le rôle de la matrice extracellulaire est primordial: elle assure l'intégrité et l'activité de base des cellules et par sa membrane basale, elle sert de support à l'épithélium du réseau tubulaire rénal.

L'utilisation de la microscopie électronique a permis de mettre en évidence une altération de la membrane basale très tôt lors de la formation des kystes<sup>150,151</sup>. Les cellules kystiques en culture sécrètent une quantité anormale de protéines destinées à la matrice extracellulaire. Des études, par immunocytochimie, montrent des concentrations variables de collagène de type IV et de laminine et une forte quantité de fibronectine<sup>152</sup>. De plus, la mobilité électrophorétique et les caractéristiques chimiques de ces protéines diffèrent de celles rencontrées normalement. Il y a aussi une baisse de la quantité d'héparine sulfate-protéoglycan, impliquée dans la régulation de la croissance et de la différenciation des cellules épithéliales. La cause de cette détérioration générale de la matrice extracellulaire serait la présence de mutations à l'intérieur du vaste domaine extracellulaire de la polycystine-1. Cette différence impliquerait donc l'altération de la matrice extracellulaire comme l'une des premières étapes de la kystogénèse<sup>153,154</sup>. Par contre, une autre théorie prône plutôt le déclenchement d'une cascade pathogénique par le gène *PKDI*. Un défaut génétique, entraînant une prolifération cellulaire et une expansion des kystes, provoquerait comme effet secondaire une modification de la matrice extracellulaire<sup>155</sup>. Cette dualité à savoir si la modification de la matrice extracellulaire est une cause ou un effet pathogénique demeure entière. Des investigations au niveau des fonctions possibles de la polycystine-1 pourront peut-être répondre à ces interrogations.

## 5.2 Bases moléculaires de la kystogénèse.

Concernant les bases moléculaires de la kystogénèse, il existe au moins trois mécanismes génétiques qui peuvent expliquer la formation des kystes<sup>156</sup>: 1) l'haploinsuffisance où la synthèse de la polycystine-1 est interrompue par l'inactivation d'un gène de la paire de gènes *PKDI*, menant à un niveau inadéquat de polycystine-1; 2) la mutation dominante et négative, c'est-à-dire que la forme mutante de la polycystine-1 inactive la polycystine-1 normale synthétisée par l'allèle sauvage et 3) la théorie du deuxième événement (*second hit model*)<sup>157</sup> qui suggère qu'une mutation germinale sur l'un des allèles du gène *PKDI* n'est pas suffisante pour développer la maladie.

Il faudrait une seconde mutation au niveau somatique sur l'allèle sauvage pour que la maladie apparaisse. Au cours des prochains paragraphes, nous examinerons sur le plan théorique et expérimental les éléments qui permettent maintenant de croire que la théorie du deuxième événement semble être la meilleure hypothèse.

En examinant attentivement le modèle de l'haploinsuffisance, nous nous rendons compte que deux points importants ne sont pas expliqués, soit l'apparition des kystes rénaux sur une minorité de tubules et la forte proportion de polycystine-1 dans les kystes issus des tubules rénaux comparativement au réseau tubulaire normal. De la même façon, une mutation dominante négative conduirait à une anomalie tissulaire généralisée, ce qui va aussi à l'encontre d'un développement kystique limité cliniquement à une petite fraction des néphrons. En revanche, la théorie du deuxième événement demeure en accord avec l'altération tissulaire observée chez les individus atteints de l'ADPKD1. Ainsi, les sujets porteurs d'une mutation de type germinale, possèdent cette mutation dans toutes les cellules du rein. Ayant une copie du gène *PKD1* sur chacun des chromosomes 16, seule l'une des deux copies du gène *PKD1* sera altérée. Dans une telle situation, la production de polycystine-1 normale sera grandement diminuée. Toutefois, des facteurs secondaires comme des hormones de croissance, des cytokines ou des facteurs métaboliques pourraient remplir un rôle d'élément compensatoire empêchant une baisse de production de la polycystine-1 dite normale.

Il est aussi convenable de croire que le second événement, une mutation somatique, se manifeste de manière sporadique dans une cellule et non pas chez sa voisine. Ainsi, la théorie du deuxième événement semble en accord avec le développement local des kystes rénaux. Ce deuxième événement se produira sur l'allèle encore sauvage du gène *PKD1* qui ne porte pas la mutation germinale. Il y aura alors diminution significative du niveau de polycystine fonctionnelle dont les conséquences peuvent mener à la kystogénèse. Tout comme le rétinoblastome, l'ADPKD1 se transmettrait de façon dominante.

Il serait cependant nécessaire que les deux copies du gène soient mutées au niveau moléculaire pour observer l'apparition de kystes.

Avant d'aborder les résultats expérimentaux concernant cette hypothèse, deux notions doivent être clarifiées: la perte d'hétérozygotie et la clonalité des kystes. La perte d'hétérozygotie constitue tout simplement la perte de l'un des deux allèles causée dans la majorité des cas par des délétions de segments chromosomiques. Il s'agit en fait de la perte de l'allèle sauvage, l'autre allèle ayant été muté germinalement. Nous passons donc d'une paire d'allèles où l'un est sauvage et l'autre est muté (hétérozygotie) à une paire d'allèles où les deux sont mutés (perte de l'hétérozygotie). Au niveau moléculaire, nous sommes donc en présence d'un mécanisme récessif. En ce qui concerne la clonalité, la définition que nous évoquons dans ce présent mémoire demeure uniquement un élément de référence qui s'applique à ce cas bien précis où l'on fait intervenir le phénomène du second événement. Ainsi, cette définition permettra de mieux comprendre les expériences que nous examinerons dans les prochains paragraphes. La clonalité concerne donc, la nature du kyste où un kyste dit monoclonal se constitue d'un ensemble de cellules toutes issues d'une même cellule-mère. De cette manière, chacun des kystes aura une "clonalité particulière" dans la mesure où le second événement responsable de la perte d'hétérozygotie sera différent dans chacun des cas. Ce qui cause la perte de l'hétérozygotie influencera donc la clonalité des kystes. Ainsi, une cellule portant sur l'un de ses allèles une mutation germinale subira un second événement qui viendra modifier la copie du gène *PKD1* sauvage. Ceci engendrera un kyste dont les cellules qui composent sa paroi posséderont tous les mêmes caractéristiques génétiques de la cellule-mère.

Des résultats expérimentaux récents<sup>158,159</sup> permettent d'expliquer sur une base moléculaire cette théorie des deux événements. Qian et al.<sup>158</sup> ont étudié la clonalité des kystes. Sur 76 kystes analysés, 82% ont été identifiés comme étant monoclonaux<sup>158</sup>. Pour vérifier la clonalité des kystes, Qian et al.<sup>158</sup> ont utilisé des kystes provenant de reins de femmes atteintes de l'ADPKD1.

Ils ont analysé la sensibilité à la méthylation de sites de restriction (*HpaII* et *HhaI*) près du marqueur hautement polymorphe (CAG)<sub>n</sub> situé à l'intérieur du gène du chromosome X codant pour le récepteur à l'androgène. Les chromosomes X inactifs seront hyperméthylés alors que les chromosomes X actifs seront hypométhylés. La stratégie de cette technique, déjà utilisée par Willman et al.<sup>160</sup> pour déterminer la nature monoclonale de l'histiocytose X, se base sur le fait que les tissus dits polyclonaux dérivent d'une population de cellules où environ la moitié sont porteurs d'un chromosome X paternel inactivé (le chromosome X maternel est actif) tandis que l'autre moitié des cellules aura plutôt le chromosome X maternel inactivé (le chromosome X paternel est actif). Au contraire, dans une population monoclonale de cellules, toutes les cellules auront le même chromosome X inactivé soit le paternel ou le maternel.

Pour l'étude de la perte d'hétérozygotie, des cellules épithéliales formant les kystes ont été récupérées à l'aide d'une lame de rasoir, par injection de EDTA directement dans les kystes ou en faisant de la culture cellulaire à partir de prélèvements cytologiques. Le cas du sujet 168 rapporté par Brasier et al.<sup>159</sup> permet de bien comprendre la méthodologie employée pour examiner la perte d'hétérozygotie. La première étape a été de déterminer les différents allèles de trois marqueurs microsatellites D16S283, D16S525 et KG8CA portés par chacun des membres de la famille. Ces allèles sont déterminés par des PCR radioactifs comme nous l'avons exposé à la section 2.1.3. Les produits de PCR sont ensuite mis sur un gel de polyacrylamide où ils migreront selon leur taille. Pour simplifier l'explication, prenons les résultats obtenus pour un seul marqueur soit le KG8CA et supposons que seuls les patients atteints de l'ADPKD1 dont le sujet 168 portent un allèle correspondant à une bande de 100pb sur le gel de polyacrylamide. Ceci suggère que cet allèle du marqueur KG8CA se retrouve sur le même chromosome que la copie du gène *PKDI* qui porte la mutation germinale. Le second allèle, dont la taille varie pour chacun des individus de la famille se retrouve donc sur le même chromosome que la copie sauvage du gène *PKDI*. À la suite de ces résultats, Brasier et al.<sup>159</sup> ont récupéré l'ADN des cellules épithéliales des kystes du patient 168.

Les mêmes expériences faites sur l'ADN des cellules sanguines de tous les membres de la famille y compris le 168 ont été répétées sur les cellules épithéliales des kystes du sujet 168. Lorsque l'on examine les allèles du marqueur KG8CA sur l'ADN des cellules épithéliales de chacun des kystes du 168, Brasier et al.<sup>159</sup> remarquent que la bande de 100pb associée à la copie du gène *PKDI* contenant la mutation germinale et l'autre allèle KG8CA associé à la copie sauvage de *PKDI* sont présents dans la majorité des cas. Par contre, pour certains kystes, le second allèle associé à la copie normale du gène *PKDI* n'apparaît pas. Sachant que le KG8CA se retrouve à 805pb en aval du codon stop du gène *PKDI*, il semble qu'il y ait eu une délétion importante sur la copie sauvage de *PKDI*. Ceci signifie donc qu'au lieu d'avoir une hétérogénéité, c'est-à-dire une copie du gène *PKDI* sauvage et une copie mutée, nous sommes en présence d'une perte d'hétérozygotie suite au phénomène du second événement (*second hit model*). Il y a alors deux copies du gène *PKDI* mutées. Sur 46 kystes analysés de cette façon, 17% furent trouvés hémizygotés pour le marqueur KG8CA<sup>159</sup>, c'est-à-dire que l'allèle sauvage avait été délété. Ces expériences ont permis de détecter une perte d'hétérozygotie chez seulement 24% des 21 kystes étudiés et ce pour l'un ou l'autre des trois marqueurs utilisés.

Ces résultats obtenus par Qian<sup>158</sup> et Brasier<sup>159</sup> ne sont pas absolus, tant au niveau de la clonalité qu'au niveau de la perte d'hétérozygotie. Qian explique que les 18% de kystes restants, répertoriés polyclonaux, viennent probablement de kystes voisins, a priori monoclonaux qui se sont par la suite fusionnés ensemble. Quant à Brasier et al.<sup>159</sup>, trois points sont soulevés pour expliquer la faible fréquence concernant la perte d'hétérozygotie. Les techniques utilisées lors de leurs expérimentations permettent de détecter le second événement qui amène une perte d'hétérozygotie à condition que de larges délétions de séquence d'ADN en soient responsables. Ainsi, un second événement comme les mutations somatiques ponctuelles (insertions, délétions) peuvent aussi causer une perte d'hétérozygotie, mais elle ne peuvent être reconnues. Le second point concerne les cellules épithéliales des kystes. Les préparations cellulaires auraient pu contenir des cellules autres que les cellules épithéliales comme des fibroblastes.

Ceci serait surtout plausible pour les échantillons cellulaires récupérés par une lame de rasoir. Par contre, tout récemment, Lu et al.<sup>161</sup> ont montré que des souris *Pkd1*<sup>-/+</sup> ne présentent aucun kyste tandis que les souris *Pkd1*<sup>-/-</sup> possèdent des reins polykystiques. Ceci amène donc des arguments en faveur du modèle du second événement, car seule la délétion des deux allèles du gène *Pkd1* chez la souris amène le phénotype rencontré dans l'ADPKD. De manière très subjective, ces résultats permettent de croire que le phénomène de perte de fonction chez l'humain amènerait l'apparition de l'ADPKD. De plus, le fait que les souris *Pkd1*<sup>-/+</sup> ne présentent pas de kystes pourraient nous indiquer que des éléments compensatoires existeraient pour atténuer l'impact de la perte d'un allèle ou que des voies métaboliques spécifiques à l'espèce seraient peut-être utilisées. Ceci n'est que spéculations car des études supplémentaires devront être complétées avant de pouvoir expliquer ces différences entre les souris et les humains. Finalement, il se pourrait que l'inactivation du gène *PKDI* démasque un gain de fonction de l'allèle portant la mutation germinale. Dans ce cas, une haploinsuffisance existerait a priori et la perte de l'allèle sauvage ne serait qu'un élément supplémentaire accélérant la croissance de kystes. De son côté, Ward et al.<sup>93</sup> ont trouvé que le gène *PKDI* ne contenant pas la mutation germinale était surexprimé suggérant que le deuxième événement ne serait pas l'élément déclencheur de la kystogénèse.

Selon la théorie du deuxième événement et la forte proportion de kystes chez un patient ADPKD1, il faut que le rythme d'apparition de mutations somatiques soit très élevé. Jusqu'à présent, aucun élément dynamique n'est connu permettant d'expliquer ce phénomène. Qian et al.<sup>158</sup> ont proposé que la longue série de pyrimidines s'étendant sur 2,5kb dans l'intron 21 du gène *PKDI* pourrait être responsable du potentiel mutationnel élevé<sup>80</sup>. Ce genre de séquence pourrait former une triple hélice représentant une source endogène d'instabilité génétique qui compromettrait l'efficacité de l'appareil de transcription. Les effets néfastes d'une telle structure sur le rendement et la fiabilité de l'appareil de transcription ont été démontrés *in vitro* et *in vivo*<sup>162,163,164</sup>. Ces travaux ouvrent la voie à plusieurs explications concernant les bases moléculaires de la kystogénèse.

Par contre, il faudra encore plusieurs expériences avant d'en arriver à un niveau de connaissance comparable à celui des bases cellulaires de la kystogénèse.

Bref, plusieurs points restent en litige concernant les processus moléculaires, biochimiques et cytologiques par lequel il y a une augmentation de la prolifération de cellules, la mise en place d'un gradient basolatéral→apical où l'activité sécrétrice des cellules domine et une altération de la matrice extracellulaire. Malgré les résultats et les hypothèses contradictoires avancées, des évidences unissent la communauté scientifique. Il est certain que les différents segments tubulaires rénaux constituent l'origine tissulaire des kystes. De plus, la prolifération cellulaire forme à moyen terme une cavité qui pourra éventuellement contenir un liquide. Ce liquide semble dériver du filtrat glomérulaire et au fur et à mesure que le kyste grossit et se détache du tubule, la sécrétion de fluide transépithélial devient la principale source de liquide. Finalement, il semble exister une corrélation directe entre la prolifération cellulaire et l'accumulation de liquide transépithélial. La connaissance du mode de fonctionnement de la polycystine-1 pourra sûrement contribuer à la compréhension des bases moléculaires et cellulaires du processus de kystogénèse.

## 6. Projet de recherche.

Notre projet de recherche s'inscrit dans une démarche analytique qui permettra peut-être de mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui régissent la mutagenèse chez l'ADPKD1. Il s'agit de réaliser une analyse mutationnelle de près de 80% de la séquence codante de la région unique du gène *PKDI*. Notre **but** est donc de réaliser, dans la population québécoise, une analyse mutationnelle du gène *PKDI* sur des patients atteints de l'ADPKD. De plus, par l'identification de mutations et de polymorphismes, nous voulons voir si la population québécoise présente une diversité mutationnelle semblable à celles de certaines populations européennes ou d'origine européenne déjà étudiées<sup>62,67,68,69,70,71,72,73,74</sup>, et ce malgré ses particularités quant à son caractère très stable. Les altérations de séquences pourront être utilisées, en complémentarité avec des tests cliniques et des études de liaison, comme des marqueurs intrafamiliaux permettant d'élever la précision du diagnostic présymptomatique de l'ADPKD1.

Les travaux qui ont précédé le nôtre nous ont fourni des renseignements utiles qui ont été pris en considération tout au long de nos recherches. Ces **prémises** au nombre de trois, définissent le contexte scientifique dans lequel nous avons complété notre étude. Nous avons tenu compte des bouts de séquences qui se répètent à plusieurs reprises dans les exons et les introns situés dans la région unique du gène *PKDI*. Deuxièmement, le contexte chromosomique du gène *PKDI*, par la présence de locus homologues (*HG-A, B* et *C*), sous-entend une instabilité de l'ADN génomique dans la région 16p13. Finalement, le taux d'apparition de mutations spontanées est l'un des plus élevés jamais enregistré pour une maladie génétique ( $6,5-12 \times 10^{-5}$  mutation/locus/génération)<sup>10</sup>. À partir de ces divers éléments, nous nous sommes fixés comme **objectif** d'identifier des mutations et des polymorphismes dans la séquence unique située en 3' du gène *PKDI*, soit entre les exons 37 à 46 inclusivement et ce, pour 29 familles originaires des régions de Chicoutimi (Saguenay-Lac St-Jean), l'Estrie, Montréal, l'Outaouais et Québec dont 25 sont ADPKD1 et 4 ne sont pas liées aux marqueurs du chromosome 16.

# **CHAPITRE II**

## **Matériels et Méthodes**

## **1. Recrutement de familles avec ADPKD.**

Tout au long des expérimentations, nous avons travaillé avec 29 familles issues de différentes régions de la province de Québec: Chicoutimi (Saguenay-Lac St-Jean), Estrie, Montréal, Outaouais et Québec. Pour préserver l'anonymat de ces familles et pour éviter toutes ambiguïtés, nous avons nommé chacune de ces familles selon la région d'où elles venaient. Ainsi, les familles de la région de Chicoutimi portent un C suivi d'un nombre correspondant à l'ordre dans lequel nous les avons recrutées (E pour l'Estrie, Q pour Québec, etc...); par exemple M18 correspond à la dix-huitième famille recrutée dans la région de Montréal. De ces 29 familles, 25 ont, préalablement à cette étude, été diagnostiquées ADPKD1 par des tests cliniques et des analyses de liaisons génétiques à l'aide des marqueurs polymorphes SM6 et KG8CA. Les quatre autres familles présentent une phénotypie généralement rencontrée dans l'ADPKD, mais ces dernières ne sont pas associées aux marqueurs génétiques situés sur le chromosome 16. Le recrutement de ces familles s'est réalisé grâce à la collaboration de médecins traitants des différents centres hospitaliers à travers la province. Avec leur consentement, nous sommes entrés en contact avec des familles dont les manifestations phénotypiques permettaient de discriminer les patients atteints ou non de la polykystose rénale. La présence de kystes sur les deux reins avec ou sans hypertrophie rénale a été l'élément discriminatoire permettant de diagnostiquer un patient. Toujours avec l'autorisation du patient et du médecin traitant, nous avons consulté les dossiers médicaux pour colliger les échographies rénales et hépatiques, les mesures précises de la fonction rénale, la dialyse, la transplantation et les manifestations extrarénales, en particulier la présence ou non d'anévrismes cérébro-vasculaires et d'hypertension artérielle. Ces informations cliniques ont été obtenues pour quelques individus cibles à partir desquels nous avons complété une analyse génotypique de leur famille. Grâce à la collaboration des membres de chacune des familles, l'élaboration des arbres généalogiques et l'histoire familiale furent déterminées. Toutes ces données ont ensuite été complétées à l'aide de documents d'archives de la Bibliothèque nationale du Québec et ceux de la Société canadienne-française de généalogie.

## 2. Extraction de l'ADN génomique.

Une fois les patients recrutés, 10mL de sang leur étaient prélevés pour isoler leur ADN à partir des cellules mononuclées périphériques grâce à la technique d'extraction de Sambrook et al.<sup>165</sup>. Sur ce volume de 10mL, on ajoutait 40 à 45mL d'un tampon de lyse cellulaire (tampon de sucrose 0,32M; Tris-HCl 10mM pH 7,5; MgCl<sub>2</sub> 5mM et Triton 1%). Cette solution a été mélangée puis mise sur la glace pendant 10 à 15 minutes. Une centrifugation à 2800rpm à 4°C pendant 40 minutes fut complétée. Après avoir enlevé le surnageant, nous avons resolubilisé le culot avec 4,5mL de NaCl-EDTA (tampon NaCl 0,075M; EDTA 0,024M à pH 8). Ensuite, nous avons transféré le tout dans un nouveau tube conique de 15mL. Cette fois, 0,5mL d'une solution SDS-protéinase K (solution de SDS 5%-protéinase K 2mg/mL) (Boehringer Mannheim, Laval) a été ajouté et mélangé. Ce mélange fut incubé dans un bain-marie à 37°C pendant toute une nuit. Un volume de 5mL de phénol fut utilisé pour l'extraction protéique. Après avoir agité vigoureusement, nous avons centrifugé le mélange à 2800rpm pendant 10 minutes à 4°C. De là, nous avons récupéré et transféré la phase supérieure de cette centrifugation (phase inférieure étant le phénol) dans un nouveau tube conique de 15mL. Sur cette phase supérieure, trois extractions à l'aide de 5mL de chloroforme-isoamyle alcool (24:1) ont été complétées. L'extraction se fait en mélangeant vigoureusement la phase supérieure à la solution de chloroforme-isoamyle alcool (24:1) pour ensuite centrifuger le tout à 2800rpm pendant 10 minutes à 4°C.

Finalement, la précipitation de l'ADN a été amorcée par l'ajout de 0,5mL d'acétate de sodium 3M (NaOAc) et de 2 volumes d'éthanol froid 95% (EtOH). L'ADN recueilli a été remis dans 0,5mL de tampon Tris-EDTA (tampon Tris-HCl 10mM pH 7,5 et EDTA 1mM). À partir de là, l'ADN fut incubé à 4°C pendant 2 ou 3 jours pour le dissoudre. On a ensuite déterminé la concentration en ADN pour chacun des échantillons extraits. Nous avons récupéré 10µL par tube d'ADN que l'on a ajouté à 990µL d'eau pure stérile. À partir de cette dilution, la quantité d'ADN a été déterminée en sachant que 50µg/mL d'ADN correspond à une densité optique (D.O.) de 1 à une longueur d'onde de 260nm.

Pour s'assurer de la pureté des échantillons, la D.O. a aussi été mesurée à 270 et 280nm. Selon Sambrook et al.<sup>165</sup>, une bonne préparation d'ADN correspond à un rapport de D.O.<sub>260</sub>/D.O.<sub>280</sub> (acides nucléiques/protéines) supérieur à 1,6. De plus, pour vérifier qu'il n'y avait pas eu de contamination au phénol, nous nous sommes assurés que la D.O.<sub>270</sub> était inférieure à la D.O.<sub>260</sub>.

### 3. Caractérisation des familles avec ADPKD.

La caractérisation haplotypique des familles avec polykystose rénale sur une centaine d'individus a été complétée précédemment à cette étude selon le protocole établi par Martin Daoust<sup>166</sup>, puis adapté par l'équipe du Dr. Daniel G. Bichet. Par cette caractérisation, il leur a été possible d'associer la majorité des familles investiguées à l'ADPKD de type 1 (ADPKD1). Pour ce faire, ils se sont basés sur deux marqueurs génétiques microsatellites. Le premier se nomme SM6 (D16S665), un marqueur génétique situé près de l'extrémité 5' du gène *PKDI*; le second, KG8CA est un autre marqueur (CA)<sub>n</sub> situé à 805pb en aval du codon stop du gène *PKDI*, dans la région 3' non-traduite. Il était donc possible, grâce à ces marqueurs, de suivre la transmission des différents allèles et d'identifier, à l'intérieur de chaque famille l'haplotype lié à la maladie. En plus de ces informations, nous avons choisi, pour notre analyse mutationnelle, des familles qui présentaient soit plus d'un individu atteint pour une même génération ou plus d'un individu atteint sur plusieurs générations successives. Le tableau V montre l'ensemble de tous les haplotypes des 29 familles choisies pour notre étude. Il est donc à noter que certains haplotypes sont représentés plus d'une fois (par exemple, le même haplotype peut se retrouver dans deux familles différentes). Par conséquent le nombre d'haplotype représenté dans ce tableau dépasse le nombre des 119 haplotypes différents recensés au cours de notre analyse. De plus, dans ce même tableau, C3 et C4 représentent une seule et même famille.

Tableau V

Variabilité haplotypique des 29 familles québécoises ADPKD choisies pour l'analyse mutationnelle.									
Haplotype SM6/KG8	Chromosomes PKD1	Chromosomes normaux					TOTAL		
		Chicoutimi	Montréal	Outaouais	Estrie	Québec			
a7	M5		1				1		
b5			1				1		
b7	M15		1				1		
d7			1				1		
e5		1					1		
g2		1					1		
g5		1	1				2		
h2	C6,M4			1			1		
h3			1				1		
h4			1				1		
h5	M2,M18	1	4	2	3		10		
h8	Q1	2	2	2			6		
h'5	C1, C2	1	1	1			3		
h'8			2			1	3		
i1	O3	1	1	1			3		
i2		2	1		1		4		
i3				1			1		
i4		1	2	3			6		
i5	M6,M16, O1,E2,E5, E6,E7	4	6	3	6	3	22		
i8		1	1		1		3		
i'5	C3-C4						0		
i'7	M9						0		
j5	O2,E4			1	1		2		
j8			1				1		
k5			1				1		
l1			1				1		
l5			2				2		
m5	M19	4		3	1	1	9		
m8					1		1		
n5	C9				2		2		
n7			1				1		
n8			1				1		
o2	E1		1		1		2		
o5		1		1			2		
q8			1				1		
s5	O5			3			3		
t5				1			1		
x5			1				1		
z5				1			1		
TOTAL	25	21	37	24	17	4	104		
D16S665 SM6 (pb)	a =139	b =137	c =135	d =133	e =131	g' =128	g =127	h' =126	h =125
	i' =124	i =123	j' =122	j =121	k =119	l =117	m =115	n =113	o =111
	p =109	s =107	t =105	u =103	w =101	x =99	y =97	z =95	
KG8 (pb)	1=118	2=116	3=114	4=112	5=110	6'=109	6=108	7=106	8=104

La détermination des allèles de SM6 et KG8CA pour chacun des membres des familles fut réalisée grâce à deux paires d'amorces qui permettent d'amplifier des unités répétées de différentes longueurs comme les  $(CA)_n$  directement sur l'ADN génomique par PCR radioactif. Ces répétitions représentent une version du locus SM6 ou KG8CA (un allèle) permettant de suivre la maladie à l'intérieur d'une famille et d'identifier, dans la majorité des cas, les gens qui en sont atteints. Normalement, un certain nombre de répétitions de CA, par exemple un allèle correspondant à  $(CA)_{100}$  va co-ségréguer avec le locus morbide lors d'une analyse haplotypique. Si dans la famille, il n'y a pas de déséquilibre de liaison ou de ségrégation de la maladie avec les marqueurs, on ne pourra pas associer la famille à la polykystose rénale de type 1.

Pour l'ensemble des six familles liées au locus *PKD1* que nous présentons dans ce mémoire (C1, M18, E6, M19, M5, O3), le *lod score*  $Z(\theta)$  a été calculé à l'aide du programme informatique Linkage 5.1<sup>167</sup>. En assumant que l'ADPKD1 est une maladie autosomique dominante dont l'incidence est de 1 individu atteint pour 1000 avec une pénétrance de 100%, les *lod scores* ont été calculés pour les marqueurs SM6 et KG8CA. Ces marqueurs sont séparés l'un de l'autre sur une distance d'environ 55kb. Aucune recombinaison n'a été observée concernant ces marqueurs. Le *lod score* maximum obtenu pour SM6 est de 4,53 à une fréquence de recombinaison ( $\theta$ ) égale à zéro. Le *lod score* maximum obtenu pour KG8CA est de 2,51. Ce dernier a aussi été obtenu à une fréquence de recombinaison ( $\theta$ ) égale à zéro. Le tableau VI montre les valeurs des *lod scores* obtenues pour chacun des marqueurs à différentes fréquences de recombinaison.

**Tableau VI** *Lod scores calculés à différentes fréquences de recombinaison ( $\theta$ ) pour les marqueurs SM6 et KG8CA avec les familles C1, M18, E6, M19, M5 et O3.*

Locus	Fréquences de recombinaison ( $\theta$ )					
	0,00	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50
SM6 (D16S665)	4,53	4,10	3,07	1,83	0,63	0,00
KG8CA	2,51	2,29	1,70	1,00	0,39	0,00

#### 4. Amplification de la région 3' unique du gène *PKDI*.

Pour l'amplification de chacun des échantillons, environ 100ng d'ADN génomique ont été utilisés. La technique employée fut le PCR (*Polymerase Chain Reaction*)<sup>52</sup>. Les tubes réactionnels contenaient 0,1 $\mu$ M de chacune des amorces, 200 $\mu$ M de chaque dNTP (désoxynucléoside triphosphate) (Perkin Elmer), 5 $\mu$ L de tampon PCR 10X(pour 100mL: 100mM de Tris-HCl pH 8,3 , 500mM de KCl, 15mM de MgCl<sub>2</sub> et 0,01% de gelatin), 5 $\mu$ L de DMSO (diméthyle sulfoxyde) et 1 unité de TAQ polymérase (Perkin Elmer, Toronto) pour un volume total de 50 $\mu$ L qui était ensuite séparé en 3x16 $\mu$ L pour 3 échantillons. Si un deuxième PCR était nécessaire à la suite du premier pour obtenir plus de produit (*nested-PCR*) ou si une seule amplification pouvait être complétée, les mêmes composants réactionnels étaient utilisés. Toutefois, dans ces cas bien précis, le volume total de 50 $\mu$ L ne sert que pour un seul échantillon.

Les différents PCR ont tous été réalisés sur un appareil d'amplification Perkin Elmer 9600 selon le protocole habituel qui comporte trois températures: la température de dénaturation, d'hybridation et d'élongation. Les caractéristiques complètes des différentes amorces utilisées pour les PCR et les *nested*-PCR sont présentées sur le tableau VII, tandis que la description des amorces dites de séquençage se retrouve sur le tableau VIII.

**Tableau VII** Caractéristiques des amorces utilisées pour les PCR et les nested-PCR.

Nom	Séquence (5'→3')	Conditions de PCR	Produit (pb)	Positions des produits	Exons
F9v	ctgccggcctgggtgcctcc	94°C; 1min 30	2173	47610-49783	37-40
41A-R	aagcgagccggtcgggct	72°C; 2min cycles			
R9S	cagcctgctcctgggtgctgt	94°C; 45sec			
41B-R	cacaggagccccaggaccatg	65°C; 1min 30cycles 72°C; 2min	2065	47645-49710	37-40
40i-F	acgccaaaggacaagggagtagt	94°C; 1min			
42A-R	ccgagtgagcagagggcag	61°C; 1min 30cycles 72°C; 2min	596	49576-50172	41
43A-F	agggccgtacttggcaca	94°C; 10sec			
46i-R	ttagacagggcagaaaagtaat	60°C; 1min 30cycles 72°C; 2min	1480	50459-51939	43-46
43A-F	agggccgtacttggcaca	94°C; 10sec			
43A-R	acgagaaatctgtctgct	55°C; 1min 30cycles 72°C; 2min	319	50459-50778	43
44A-F	agcagacagatttctcgt	94°C; 10sec			
46i-R	ttagacgggcagaaaagtaat	55°C; 1min 30cycles 72°C; 2min	1178	50761-51939	44-46

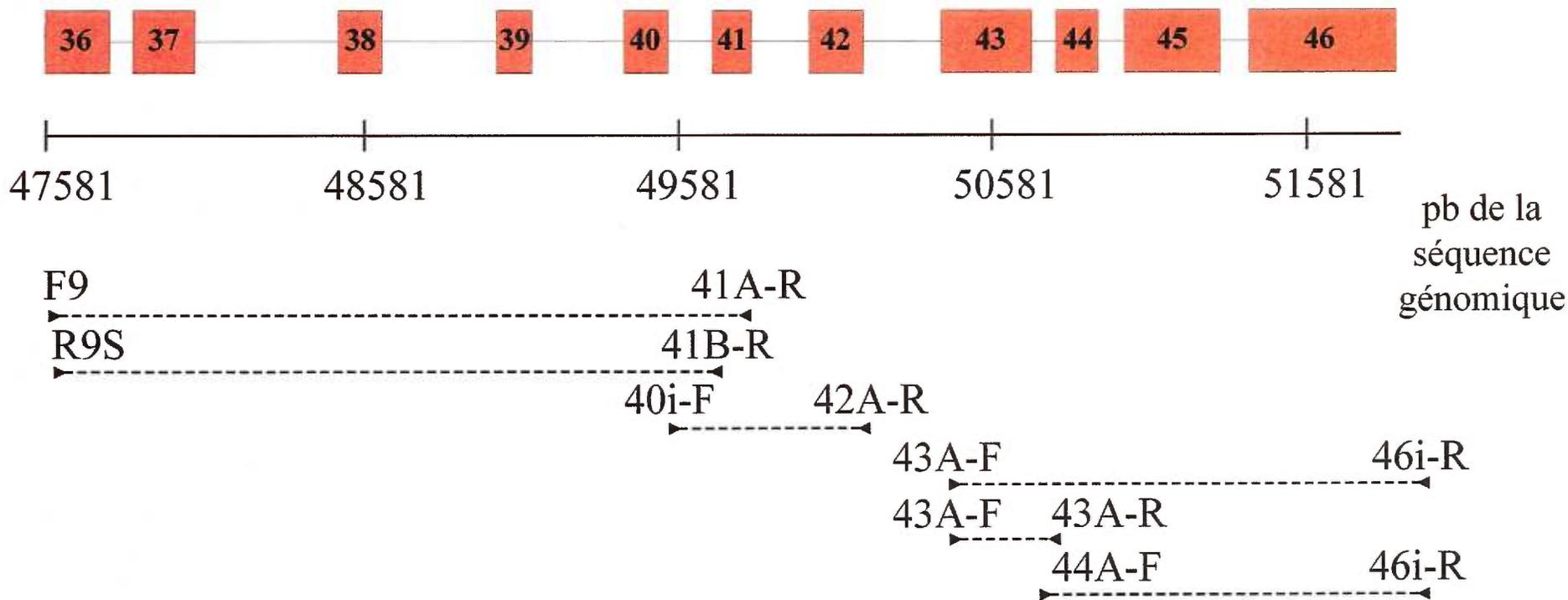
**Tableau VIII** *Caractéristiques des amorces utilisées pour le séquençage.*

<b>Nom</b>	<b>Orientation</b>	<b>Séquence (5' → 3')</b>	<b>Exons</b>
F5	sens	gtcttgctggaagccctg	37
37A-R	anti-sens	agcatgccatgtagcctc	37
38A-F	sens	agcctcctgggtgtacatgctt	38
38B-R	anti-sens	ctacacatgtccacatgt	38
39A-F	sens	gctctggccatgga	39
39A-R	anti-sens	taagtcttggggcacgccct	39
40A-F	sens	cactctaccagaccctc	40
41B-R	anti-sens	cacaggagccccaggaccatg	41
43A-F	sens	aggcccgacttggcaca	43
43A-R	anti-sens	acgagaaatctgtctgct	43
44A-F	sens	agcagacagatttctcgt	44
44A-R	anti-sens	aggaacaactccacatctctgtag	44
F3n	sens	gtgtggactccctctggag	46
JJF	sens	tccgcttgaaggatggag	46
46i-R	anti-sens	ttgacagcggcagaaagtaat	45-46

Les exons 36 à 40 inclusivement ont d'abord été amplifiés grâce à la paire d'amorces F9v:41A-R, puis le produit obtenu a été réamplifié à l'aide de la paire d'amorces R9S:41B-R. L'exon 41 n'a été amplifié qu'une seule fois grâce aux amorces 40i-F:42A-R. Pour la séquence plus en 3', nous avons amplifié la partie comprenant les exons 43, 44, 45 et 46 avec le couple d'amorces 43A-F:46i-R. Deux *nested*-PCR ont ensuite été faits, d'abord pour l'exon 43 (43A-F:43A-R) puis pour les exons 44, 45 et 46 (44A-F:46i-R). Tous les PCR et les *nested*-PCR ci-haut mentionnés ont été effectués en présence de DMSO à l'exception du PCR et du *nested*-PCR englobant les exons 36 à 40 inclusivement. La figure 12 montre la disposition des amorces sur la séquence unique de *PKD1* qui ont permis d'amplifier les régions séquencées.

## 5. Purification des produits de PCR.

Avant d'effectuer le séquençage, nous avons purifié les produits de PCR obtenus pour chacun des échantillons à l'aide du GeneClean II Kit (Bio 101 pour Bio/CAN Scientific, Mississauga, Ont.). Le produit de PCR était d'abord mélangé à 3 volumes de NaI. Si lors de l'électrophorèse de vérification qui permettait de voir si le PCR était spécifique (présence de la seule bande désirée), celle-ci s'avérait non-spécifique (amplification de plusieurs régions de l'ADN qui se traduit sur le gel par la présence de plusieurs bandes), la bande qui nous intéressait était alors récupérée directement sur le gel d'agarose. À ce moment là, nous calculions le poids du morceau de gel d'agarose que nous avons découpé et qui contenait la bande où se trouvait notre produit. Le volume de NaI rajouté était calculé à partir du poids du morceau de gel découpé en considérant que 1mg équivaut à 1 $\mu$ L (par exemple: 200mg=200 $\mu$ L x 3 = 600 $\mu$ L de NaI). Les petits bouts d'agarose immergés dans le NaI étaient ensuite mis dans des tubes de 1,5 $\mu$ L pour les laisser fondre à 55°C pendant 5 minutes. Puis dans les deux cas, c'est-à-dire pour le produit de PCR récupéré directement ou à partir d'un gel d'agarose, 8 $\mu$ L de GlassMilk, une solution contenant des milliers de billes microscopiques qui emprisonnent l'ADN (chromatographie à l'hydroxylapatite), ont été ajoutés et mélangés à notre produit de PCR pendant 5 minutes.



**Figure 12.** Schéma illustrant la disposition des amorces utilisées pour amplifier les régions de la partie unique du gène *PKD1* que l'on a séquencée.

Les exons 36 à 46 y sont représentés ainsi qu'une échelle en paire de bases de la séquence génomique.

Après une centrifugation de quelques secondes à 13 000rpm, nous conservions le culot pour le laver à 3 reprises avec 400µL de la solution NewWash (une solution de NaCl, Tris et de EDTA ajouté à 280mL d'eau distillée et à 310mL d'éthanol 100%). Entre chaque lavage, il y avait une mini-centrifugation et élimination du surnageant obtenu. À la fin de ces lavages, 5µL d'une solution de TE (pH 7,4: 10mM de Tris·Cl ; pH 7,4 avec 1mM de EDTA ; pH 8,0) furent ajoutés pour récupérer le culot. Une incubation de 3 minutes dans un bain-marie à 55°C a suivi. Puis, nous avons centrifugé nos échantillons pour récupérer le surnageant. Le surnageant contient notre produit de PCR purifié. Ces dernières étapes, à partir de l'ajout de 5µL de la solution de TE, furent répétées une autre fois. Les solutions de 10µL de TE contenant l'ADN purifié pour chacun des échantillons étaient ensuite entreposées à -20°C jusqu'à ce qu'elles soient utilisées pour le séquençage.

## 6. Séquençage.

Le séquençage s'est fait grâce au "70770 Sequanase version 2.0 DNA Sequencing Kit" (USB, Cleveland, OH) sur de l'ADN génomique selon la méthode de Sanger<sup>168</sup>. Pour chaque produit de PCR obtenu, environ 1µg a été utilisé pour un volume total de 8µL. À cette quantité, nous avons ajouté 10ng d'amorce (10ng/µL). Ces mélanges (mélanges A) ont été incubés pendant 5 minutes dans de l'eau bouillante pour dénaturer l'ADN double-brin, puis ils furent transférés dans la glace. La chute soudaine de la température permet l'hybridation rapide de l'amorce utilisée sur l'ADN amplifié. Les tubes demeureront, après avoir ajouté 2,2µL de tampon de séquanase 5X, à 4°C pendant 5 minutes. À ce premier mélange (mélange A), nous avons ajouté 5µL d'un second mélange (mélange B: quantité utilisée pour séquencer un tube de mélange A; 2µL de tampon Tris [0,12g de Tris dans 25mL d'eau à pH 8], 1µL de DTT 0,1M, 0,800µL du mélange de 7-deaza-dGTP 5X, 0,250µL de l'enzyme Séquanase [3,25 unités], 0,125µL de l'enzyme Pyrrophosphatase [0,50 unité] et 1µL de soufre ( $\alpha$  <sup>35</sup>S)dATP (solution mère: 10mCi/mL)). Le mélange de 7-deaza-dGTP 5X est en fait un analogue du dGTP. Il permet de déstabiliser les structures secondaires formées dans l'ADN.

Ceci facilite le passage de la polymérase et évite l'apparition de compressions lors de la lecture de la séquence sur l'autoradiogramme. Après une incubation de 5 minutes à température de la pièce du mélange A+B, ce dernier a été distribué en 4x 3,5µL dans une série de 4 tubes. Ces 4 tubes (nommés A, C, G et T), incubés à 37°C depuis le début des manipulations, contenaient déjà 2,5µL d'une solution de terminaison à une adénine (ddATP), cytosine (ddCTP), guanine (ddGTP) et thymine (ddTTP). À la suite de la distribution du mélange A+B dans les tubes A, C, G et T, ceux-ci furent incubés à 37°C pendant 5 minutes. Il y a alors polymérisation d'un nouveau brin d'ADN à partir du produit de PCR jusqu'à ce qu'un nucléotide avec une structure altérée s'incorpore (ddNTP). Finalement, pour s'assurer qu'une inactivation complète des réactions s'est produite, 4µL d'une solution dénaturante furent ajoutés (95% de formamide, 20mM de EDTA, 0,05% de bromophénol bleu et 0,05% de xylène cyanol). Les séries de 4 tubes par échantillon ont ensuite été entreposées à -20°C jusqu'à leur chargement sur un gel de polyacrylamide pour l'électrophorèse.

## 7. Électrophorèses et Autoradiographies.

Des électrophorèses de contrôle ont permis de vérifier après chacun des PCR si la bande correspondant à la taille du produit estimé était bel et bien présente. Un volume de 5µL de chaque échantillon a été ajouté à 1µL de tampon de chargement (0,25% de bromophénol bleu dans 40% de sucrose mélangé à du TAE 1X). Chaque échantillon a ensuite été chargé sur un gel d'agarose 1% (pour un volume de 200mL: 190mL de H<sub>2</sub>O, 2g. d'agarose, 10mL de TAE 20X et 20µL de bromure d'éthidium). La migration s'est faite à 130Volts. En ce qui concerne la visualisation des produits de séquençage, des électrophorèses sur un gel de polyacrylamide 6%-8% dénaturant (36g. d'urée, 30mL d'eau, 11,25mL de polyacrylamide et 7,5mL de tampon TBE 10X) ont été réalisées. Les échantillons étaient d'abord préchauffés à 80°C pendant 5 minutes avant d'être déposés dans les puits. Environ 3,5 à 4µL de chaque échantillon furent chargés sur le gel. Le gel était préalablement chauffé à 50°C, température qui sera d'ailleurs maintenue tout au long de la migration des échantillons.

Le voltage est réglé à 2000Volts pour toute la durée de l'électrophorèse, soit pour une période de 2 à 4 heures. L'appareil électrophorétique utilisé a été le "DNA sequencing system" de FisherBiotech (Montréal, PQ). À la fin de l'électrophorèse, le gel fut transféré, par capillarité, sur un filtre Whatmann 3M, puis recouvert de papier saran. Le tout était ensuite séché pendant 1 heure 30 minutes à 80°C dans un appareil "Gel Dryer 583" (BioRad, Mississauga, ON) et exposé avec un film Kodak X-OMAT AR pour une période de 24 à 48 heures.

Une fois les résultats obtenus, les séquences utilisées pour vérifier nos données ont été pour les exons, les séquences de GenBank dont le numéro d'accèsion est le L43618 et L43619. Les séquences introniques ainsi que la numérotation nucléotidique de l'ensemble de la séquence proviennent aussi de GenBank (numéro d'accèsion L39891). La nomenclature suivie pour nommer les mutations faux sens et non-sens et les polymorphismes iso-sémantiques situés dans la séquence codante du gène *PKDI* est la même que celle proposée par Beaudet et al.<sup>169</sup>. Nous désignons d'abord la lettre de l'acide aminé de la séquence polypeptidique sauvage, puis le codon dans lequel se trouve la mutation et finalement la lettre désignant le nouvel acide aminé engendré par l'altération de séquence. Par exemple, R4135T signifie qu'une arginine (R) est remplacée par une thréonine (T) au codon 4135. Si la lettre X est employée comme dans W3935X, c'est qu'un tryptophane (W) est remplacé par un codon stop (X) à la 3935ième acide aminé de la séquence protéique. Les délétions seront désignées par l'abréviation "del" et nous situerons la mutation par rapport à la séquence nucléotidique. Par exemple, 51048delCT signifie qu'à partir du nucléotide 51048 de la séquence génomique du gène *PKDI*, une cytosine et une thymine sont déléetées. Les mutations situées dans les introns seront aussi nommées à partir de la séquence nucléotidique. Ainsi, g49688a signifie que le nucléotide guanine est remplacé par une adénine à la position 49688 de la séquence génomique du gène *PKDI*.

# **CHAPITRE III**

## **Résultats**

Au cours de notre analyse, nous avons séquencé l'ADN de différents sujets distribués sur 29 familles, soit près d'une centaine d'individus. Selon les résultats obtenus précédemment à cette étude, 25 familles furent associées au locus *PKD1* tandis que les 4 autres ne le sont pas. Les haplotypes différents, formés par ces marqueurs, sont au nombre de 119 dont 25 portent l'haplotype *PKD1* et 94 sont normaux. La partie séquencée couvre 2942 paires de bases génomiques de la séquence codante. Ceci signifie que nous avons examiné 80% de la séquence unique du transcrit *PKD1*, soit 21% de la séquence totale de ce dernier. Le tableau IX montre tous les détails des mutations et des polymorphismes identifiés au cours de notre étude.

### **1. Les mutations.**

Les mutations que nous avons trouvées se retrouvent entre les exons 40 et 46 à l'intérieur du gène *PKD1*. Transposées sur la séquence protéique de la polycystine-1, ces mutations se situent après le huitième passage transmembranaire. Pour chaque mutation trouvée, la région où l'on a localisé celle-ci a été séquencée sur près de cent chromosomes normaux qui n'avaient pas de liens familiaux avec les sujets porteurs de ces mutations. Ceci permet de diminuer nos doutes au sujet d'altérations qui pourraient être des polymorphismes rares plutôt que des mutations. Au cours de nos travaux, nous avons considéré qu'une mutation était une altération simultanée de la séquence génomique et de la séquence polypeptidique qui est liée aux sujets atteints de la maladie de l'ADPKD1 à l'intérieur d'une famille donnée. Plusieurs types de mutations ont été rencontrés. Au cours de nos recherches, nous avons identifié trois mutations dites faux sens, c'est-à-dire qu'une altération dans la séquence génomique a changé complètement la signification d'un codon (Y3796C, R4135T et P4211A). Un non-sens, c'est-à-dire un signal de terminaison prématuré, a aussi été répertorié (W3935X), ainsi qu'un décalage de lecture à la suite d'une délétion à partir du nucléotide 51048 (a.a. 4061) menant à une séquence inexacte pour les 94 prochains acides aminés (a.a. 4061-4154) avant d'être amputée des 147 derniers acides aminés (a.a 4155-4302) à partir du nucléotide 51417.

**Tableau IX** Répertoire des mutations et des polymorphismes identifiés.

**A) Mutations ségréguant avec PKDI.**

Localisation dans la structure de la polycystine	Nom	Type de mutation	Changement nucléotidique	Changement de l'acide aminé	Analyse par enzyme de restriction	Famille	Associées à PKDI
entre TM8 et TM9	Y3796C	faux sens	A→G à 49526 exon 40	Tyr→Cys à 3796		E6	E6
entre TM9 et TM10	W3935X	non-sens	G→A à 50514 exon 43	Trp→Stop à 3935	+ SryI	C1	C1
TM11	51048delCT	décalage du cadre de lecture	délétion de CT à 51048-51049 exon 45	décalage du cadre de lecture en 3' au codon 4060	- Eco 01091	M18	M18
après TM11	R4135T	faux sens	G→C à 51271 exon 45	Arg→Thr à 3935		M19	M19
après TM11	P4211P	faux sens	C→G à 51588 exon 46	Arg→Ala à 4211		M5	M5

**B) Polymorphismes potentiels.**

	g48653t	substitution	G→T à 48653 intron 38			C2, C10, C13, O3, M12	O3
entre TM9 et TM10	c50622t	iso-sémantique	C→T à 50622 exon 43	Arg→Arg à 3971	+ HgaI	Q2, M19	
TM10	I4044V	faux sens	A→G à 50914 exon 44	Iso→Val à 4044		M4,M5,M9,M12, M15,O2,O3,C2,C10,C13,E4	M5, M9, M15

Localisation dans la structure de la polycystine	Nom	Type de mutation	Changement nucléotidique	Changement de l'acide aminé	Analyse par enzyme de restriction	Familles	Associées à <i>PKDI</i>
	50938delg	délétion	intron 44			Q2, C13, M19	
TM11	A4058V	faux sens	C→T à 51040 exon 45	Ala→Val à 4058		M5, M9, M15	M5, M9, M15
après TM11	L4084L	iso-sémantique	C→T à 5117 exon 45	Leu→Leu à 4084		M12	
après TM11	a51140g	iso-sémantique	A→G à 51140 exon 45	Ala→Ala à 4091		M4, M5, M9, M12, M15, O2, O3, C2, C10, C13, E4	M5, M9, M15
après TM11	L4136L	iso-sémantique	C→T à 51273 exon 45	Leu→Leu à 4136	+ <i>BspM1</i>	M9, M15	M9
	51325delg	délétion	intron 45			Q2	
après TM11	P4209P	iso-sémantique	T→C à 51584 exon 46	Pro→Pro à 4209		M4, M5, M9, M12, M15, O2, O3, C2, C10, C13, E4	M5, M9, M15

*Légende:* TM; passage trans-membranaire, C; Chicoutimi, E; Estrie, M; Montréal, O; Outaouais et Q; Québec

D'après nos informations, toutes ces mutations ont été observées chez des familles associées au locus *PKD1*. La figure 13 montre les photos des gels de quatre des cinq mutations trouvées.

## 2. Les polymorphismes.

Parallèlement aux mutations, les polymorphismes se retrouvent en plus grand nombre encore. On entend ici par polymorphisme une altération de la séquence génomique qui ne change en rien la séquence polypeptidique de la protéine ou qui, malgré un changement en acide aminé, se retrouve aussi bien sur un allèle morbide que normal. Ces changements à l'intérieur de la séquence génomique du gène *PKD1* n'affectent en rien la fonction de ce gène. Nous avons déterminé le PIC (*Polymorphism Information Content*) de ces polymorphismes à partir des différents haplotypes dans lesquels nous les retrouvions. Selon les critères de Botstein et al.<sup>33</sup>, ces polymorphismes dits bialléliques ne possèdent pas un caractère hautement informatif ( $PIC > 0,50$ ) ou même raisonnablement informatif ( $0,50 > PIC > 0,25$ ). Tous, sans exception, possèdent un PIC inférieur à 0,25, ce qui signifie que le pouvoir informatif de ces polymorphismes demeure négligeable pour l'ensemble des familles étudiées. Par contre, comme les travaux de Kruglyak<sup>33-A</sup> le démontrent, ces polymorphismes bialléliques peuvent être associés ensemble pour élaborer par exemple une carte génétique. Selon ces résultats, la différence des fréquences des deux allèles qui peut exister pour ce type de polymorphisme ne constitue pas un facteur limitatif lors d'une cartographie génétique. Le facteur important lors de l'utilisation en association de polymorphismes bialléliques est la densité de ceux-ci sur un bout de séquence d'ADN donné. En effet, les cartographies génétiques établies à partir de polymorphismes bialléliques présentent un pouvoir informatif comparable aux cartographies génétiques élaborées à partir de microsatellites si la densité de polymorphismes bialléliques est de 2,25 à 2,50 fois plus élevée que la densité de microsatellites et ce, pour une même distance donnée. Cependant, concernant notre projet de recherche, ces polymorphismes seront utilisés à d'autres fins.

Nous exploiterons donc uniquement le pouvoir informatif de ces polymorphismes bialléliques de façon restrictive à la famille dans laquelle ceux-ci auront été identifiés. Ainsi, ces polymorphismes ne représentent pas des marqueurs génétiques utilisés normalement pour l'analyse haplotypique de larges populations et ne seront pas mis en association pour l'élaboration d'une carte génétique. En d'autres termes, ils seront considérés ici, chez les familles dont l'haplotype SM6/KG8CA est associé à *PKDI*, comme des marqueurs intrafamiliaux spécifiques à chacune des familles dans lesquelles ils se trouvent. Ils incarneront des informations supplémentaires qui permettront de mieux discriminer les haplotypes morbides et normaux à l'intérieur d'une famille.

En tout, dix polymorphismes furent identifiés dont trois ont été localisés dans des introns: g48653t (intron 38), 50938delg (intron 44) et 51325delg (intron 45). Les sept autres polymorphismes se retrouvent dans la séquence codante de *PKDI*, après le neuvième passage transmembranaire. Cinq polymorphismes sont de type iso-sémantique, étant donné la dégénérescence du code génétique, ce genre de variation au niveau de la séquence génomique ne changera en rien la signification des codons (R3971R, L4084L, A4091A, L4136L et P4209P). Les deux derniers polymorphismes sont, au sens théorique, des mutations faux sens (I4044V et A4058V). Cependant, ils sont parfois associés à l'haplotype morbide dans une famille et à un haplotype normal dans une autre. De plus, A4058V a été retrouvé chez des patients où l'on n'a pas identifié de liaisons génétiques avec le locus *PKDI*. De plus, pour les familles M5, M9 et M15, A4058V se retrouve à la fois sur l'haplotype morbide et sur un haplotype qui n'est pas associé à l'ADPKD1.

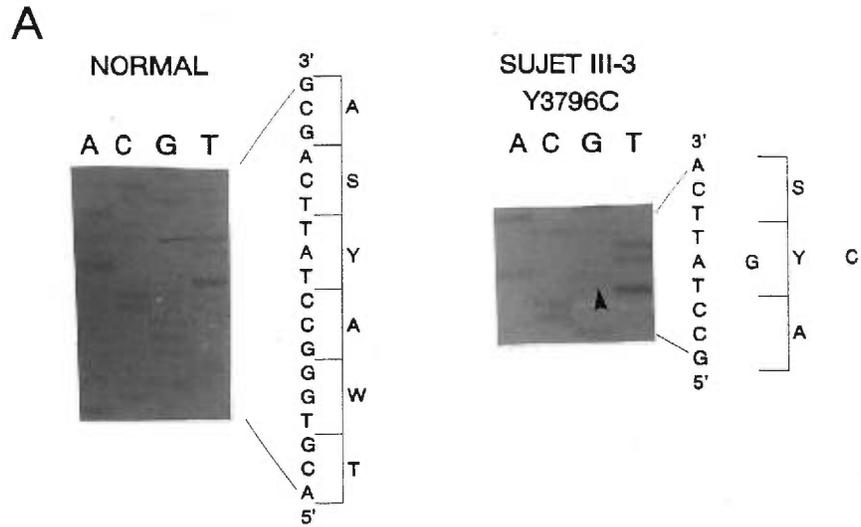
### **3. Le trio I4044V/A4091A/P4209P.**

Lors de l'identification des polymorphismes, nous avons remarqué chez des familles associées ou non à l'ADPKD1 que trois d'entre eux: I4044V, A4091A et P4209P étaient toujours associés ensemble sur le même haplotype. En accord avec notre définition du terme polymorphisme, nous avons qualifié cet ensemble de trio-polymorphisme.

Ce trio peut à la fois se retrouver sur un haplotype morbide (famille O3) ou un haplotype normal (familles M18, M19). Certains sujets vont même porter les deux types d'haplotype en même temps (famille M9). Une autre particularité de ce trio est le polymorphisme I4044V qui représente au sens théorique du terme une mutation faux sens où une isoleucine est remplacé par une valine au codon 4044. Ce polymorphisme se situe à l'intérieur du dixième passage transmembranaire. Quant à A4091A et P4209P, ils sont tous les deux des polymorphismes iso-sémantiques situés dans le domaine C-terminal intra-cellulaire de la polycystine-1. À ce trio viennent s'ajouter, dans certains cas, des polymorphismes supplémentaires.

Ces polymorphismes, g48653t et A4058A situés respectivement dans l'intron 38 et dans l'exon 45 (onzième passage transmembranaire), ne sont jamais détectés sur une copie du chromosome 16 sans la présence du trio-polymorphisme. De plus, une situation encore plus rare concernant ces associations est la présence conditionnelle d'un second polymorphisme uniquement si l'haplotype porte déjà le premier polymorphisme associé au trio. Par exemple, le polymorphisme L4084L situé dans l'exon 45 après le onzième passage transmembranaire se retrouve uniquement sur l'haplotype g48653t/**I4044V/A4091A/P4209P** où g48653t n'est présent que sur un haplotype portant le trio-polymorphisme **I4044V/A4091A/P4209P**. De la même manière, le polymorphisme L4136L ne se retrouve que sur un haplotype où il y a **I4044V/A4058V/A4091A/P4209P** dont A4058A n'est présent que si le trio-polymorphisme l'est aussi. Ce genre d'association suggère un certain ordre chronologique de l'apparition de certains polymorphismes identifiés. Il existerait donc, pour une majorité de familles séquencées, un tronc commun **I4044V/A4091A/P4209P** auquel viennent s'ajouter d'autres altérations de séquence. La figure 13 montre aussi les photos des trois polymorphismes qui composent le trio et la figure 14 résume bien nos observations au sujet de la chronologie d'apparition de certains polymorphismes.

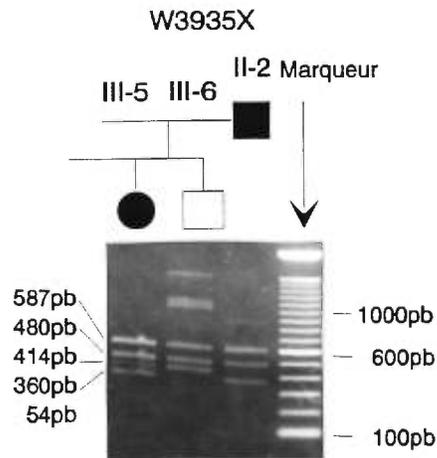
**Figure 13.** *Photos de gels de séquençage ou de tests enzymatiques montrant quelques mutations identifiées et les trois polymorphismes qui forment le trio-polymorphisme.* **a)** Pour la mutation Y3796C, c'est le codon TAT qui est remplacé par le codon TGT changeant une tyrosine pour une cystéine. **b)** Test enzymatique qui permet de voir la présence du non-sens W3935X, car ce dernier a créé un site *StyI*. Le sujet II-2 montre bel et bien la bande correspondant à 414pb, mais celle-ci demeure faible. Il semble que l'allèle sauvage soit préférentiellement amplifié lors des PCR réalisés sur l'ADN de l'individu II-2. La qualité de l'ADN et la conformation empruntée par l'ADN lors de nos essais sont peut-être à l'origine de ces résultats. **c)** La mutation R4135T découle du changement du codon AGG (arginine) pour le codon ACG (thréonine). **d)** Ces photos montrent la mutation P4211A causé par le changement du codon CCC (proline) pour GCC (alanine) et l'un des membres du trio-polymorphisme, soit P4209P où le troisième nucléotide du codon est altéré (CCT→CCC). **e)** Illustration du second membre du trio-polymorphisme I4044V où le codon CTA (isoleucine) est remplacé par le codon CTG (valine). **f)** A4091A, le troisième élément du trio-polymorphisme voit le codon de l'alanine ACG devenir GCG.



Mutation Y3796C trouvée dans la famille E6. Il s'agit ici du sujets III-3.

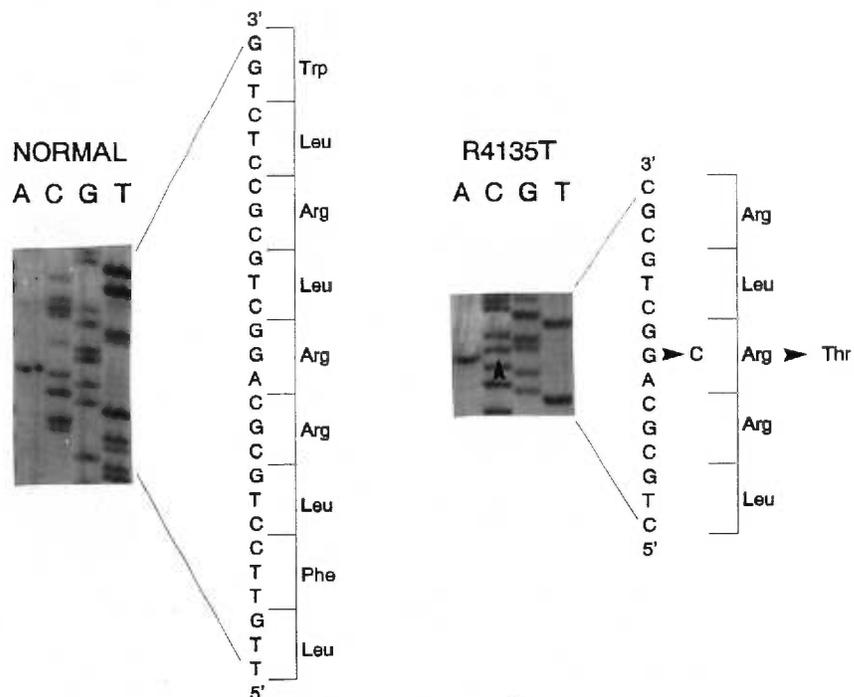
**B**

Sujets normaux	Sujets atteints	Sujets hétérozygotes
587pb	587pb	587pb
480pb	480pb	480pb
414pb	360pb	414pb
	54pb (n'est pas visible)	360pb
		54pb (n'est pas visible)



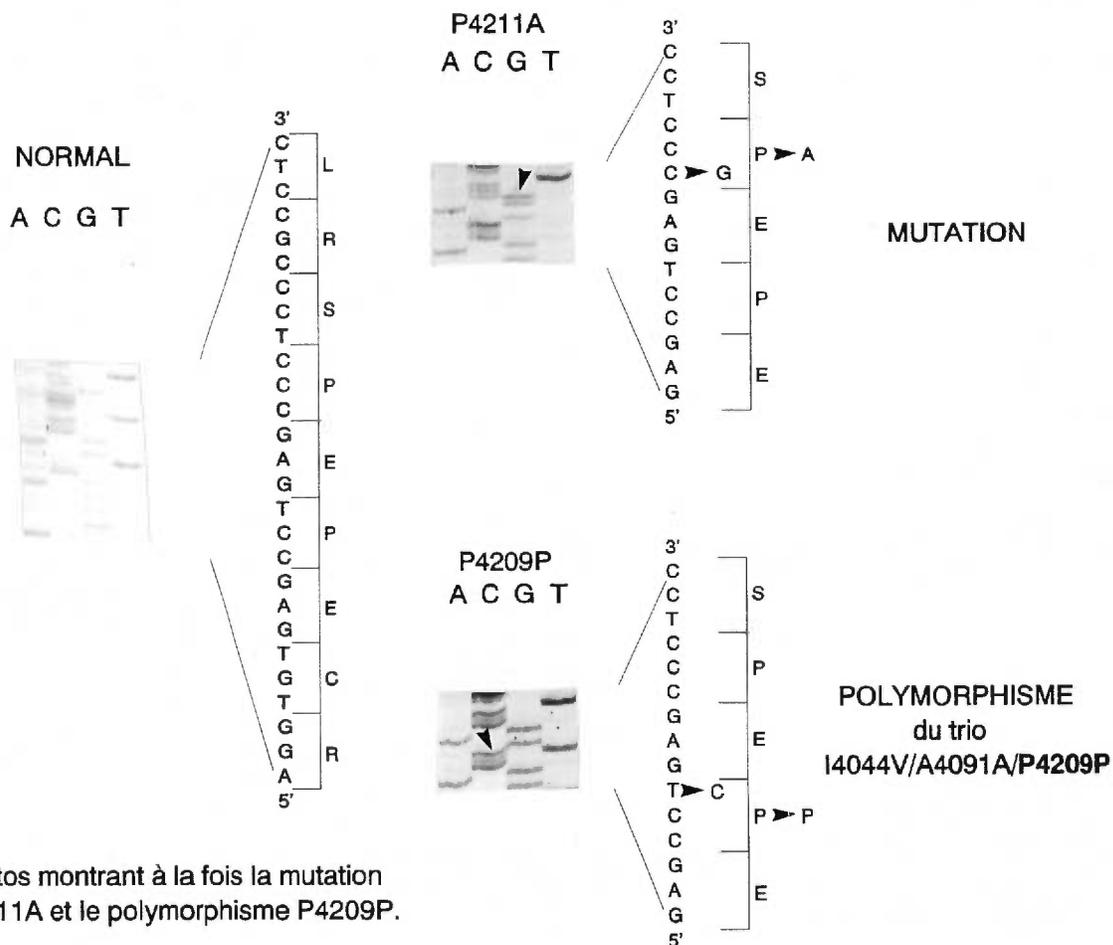
Test enzymatique avec l'enzyme de restriction *StyI* sur les sujets II-2, III-5 et III-6 de la famille C1.

C



La séquence normale et la séquence mutée d'un individu hétérozygote pour la mutation R41357 de la famille M19.

D



Photos montrant à la fois la mutation P4211A et le polymorphisme P4209P.

E

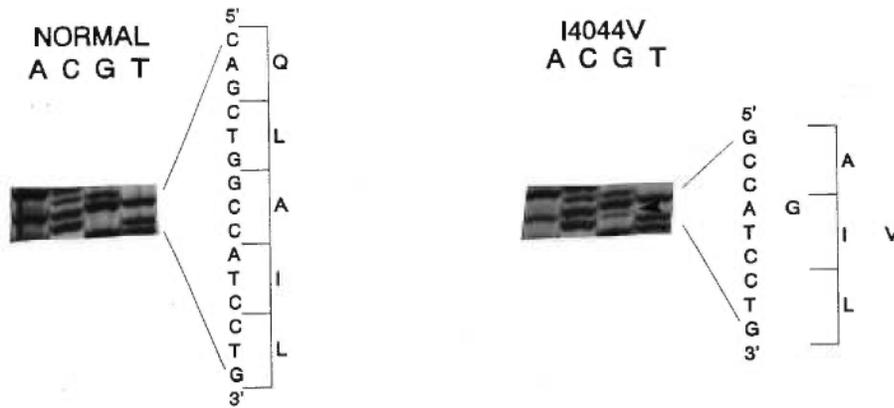
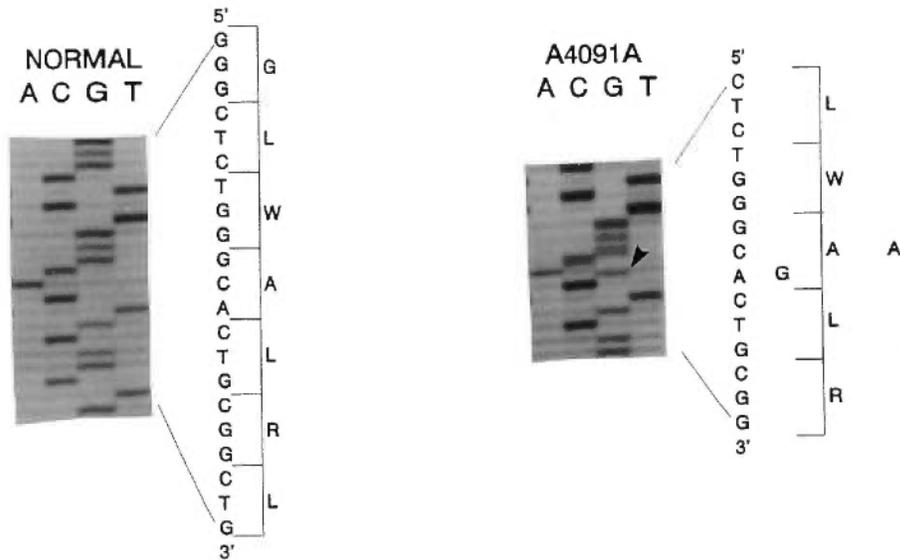
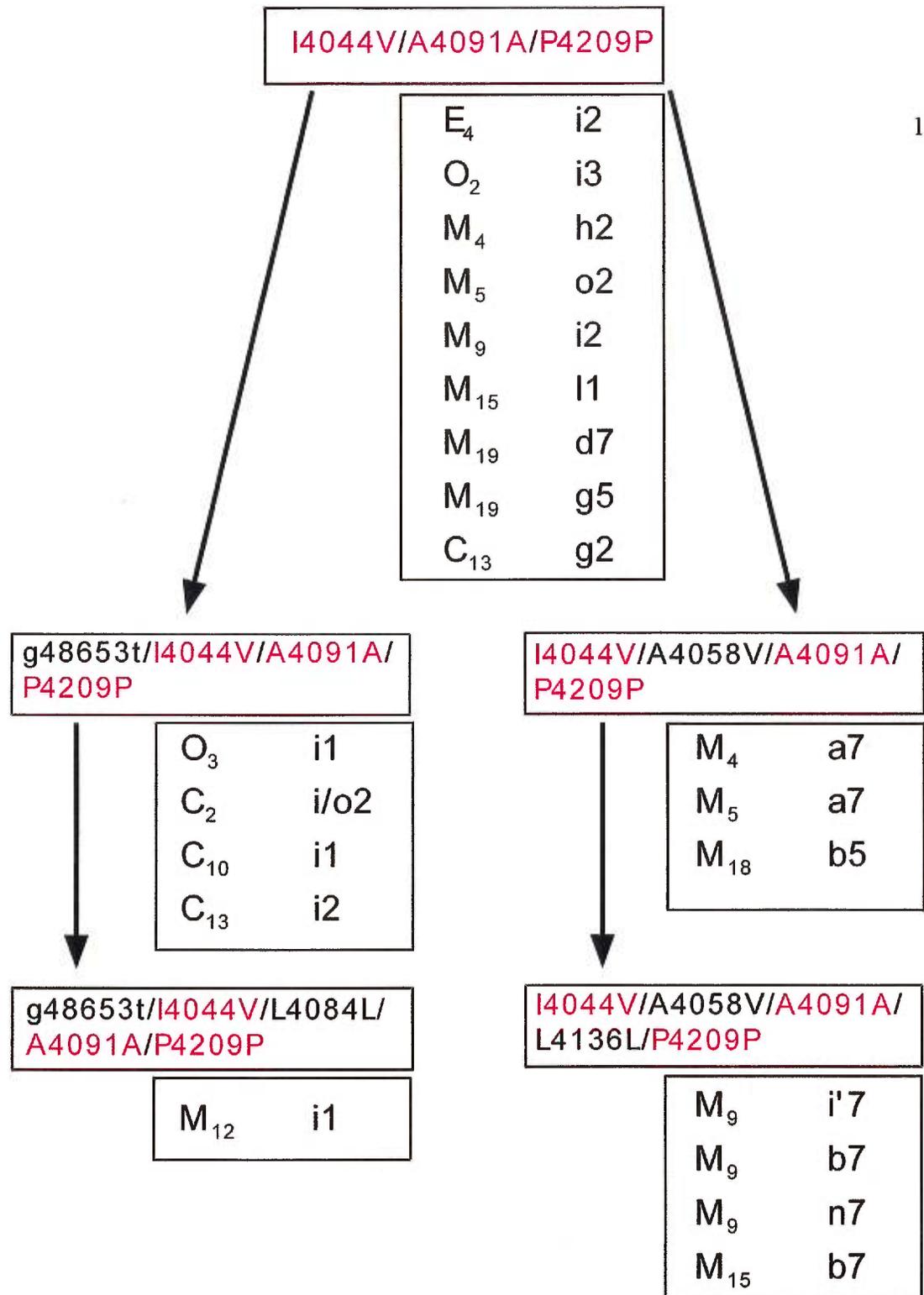


Illustration du polymorphisme I4044V faisant partie du trio I4044V/A4091A/P4209P.

F

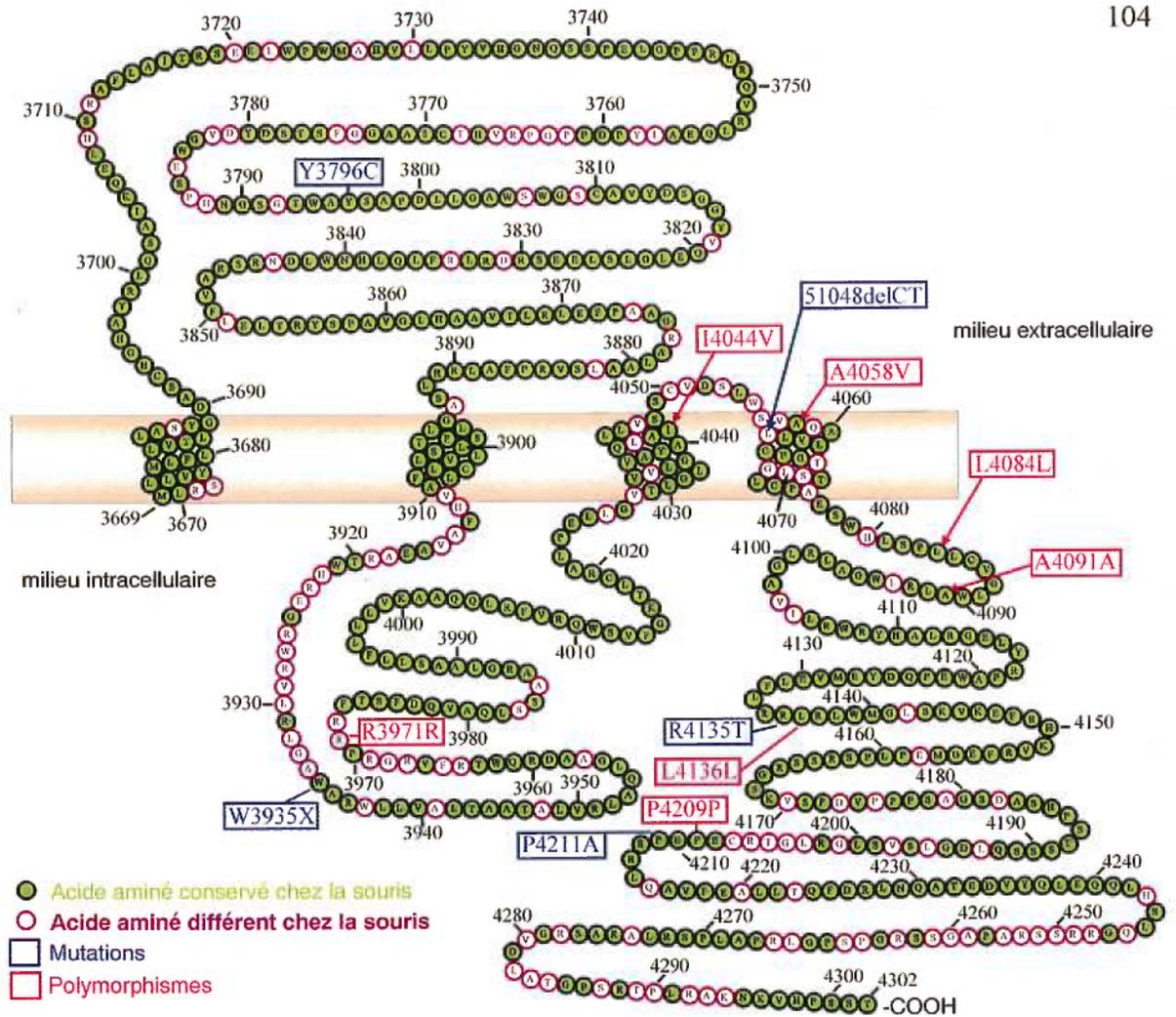


Polymorphisme A4091A faisant partie du trio-polymorphisme I4044V/A4091A/P4209P.



**Figure 14.** Chronologie d'apparition hypothétique de certains polymorphismes du gène *PKD1* à partir du tronc commun I4044V/A4091A/P4209P. À chaque palier, la famille et l'haplotype SM6/KG8CA porteur des polymorphismes sont mentionnés.

Une fois toutes ces altérations de séquence répertoriées, nous les avons transposées sur la séquence protéique de la polycystine-1 (Fig.15). La région séquencée au cours de notre étude ne correspond qu'aux quatre derniers passages transmembranaires et à la partie C-terminale intra-cellulaire de la protéine PKD1: la figure 15 illustre uniquement cette région de la polycystine-1. La distribution des 12 altérations de la séquence génomique du gène *PKDI* que nous avons trouvées y est représentée. La couleur bleue est utilisée pour désigner les mutations qui ségrèguent avec la maladie et la couleur rouge est utilisée pour les polymorphismes. Les trois polymorphismes localisés à l'intérieur des introns ne sont évidemment pas représentés sur ce schéma. Cette séquence analysée chez l'humain a été comparée à la séquence du gène *PKDI* chez la souris. Les acides aminés qui se retrouvent à l'intérieur des cercles verts représentent les acides aminés conservés d'une espèce à l'autre et les acides aminés à l'intérieur des cercles blancs ne se retrouvent que sur la séquence polypeptidique de la polycystine-1 humaine. La séquence de la polycystine-1 et de la protéine du gène homologue à *PKDI* sont identiques à 79% et ce, même pour la région que nous avons séquencée (GenBank #L33243; *PKDI* chez l'homme et #U70209; *Pkd1* chez la souris)<sup>170</sup>. Pour les exons séquencés lors de notre étude, la similarité de la séquence est en moyenne de 82%. En tout, c'est dix des quinze altérations de séquence répertoriées qui se situent dans la séquence polypeptidique conservée entre la souris et l'humain dont quatre des cinq mutations et six des dix polymorphismes. Cette séquence conservée pourrait être un noyau d'acides aminés responsable de la préservation, d'espèce en espèce, de la structure tridimensionnelle de base de la polycystine-1.



**Figure 15.** Illustration des 4 derniers passages transmembranaires de la polycystine-1, correspondant à la région séquencée au cours de notre analyse. Les mutations et les polymorphismes identifiés dans la partie codante s'y trouvent. De plus, les acides aminés conservés entre la souris et l'humain pour cette région de la protéine sont aussi montrés.

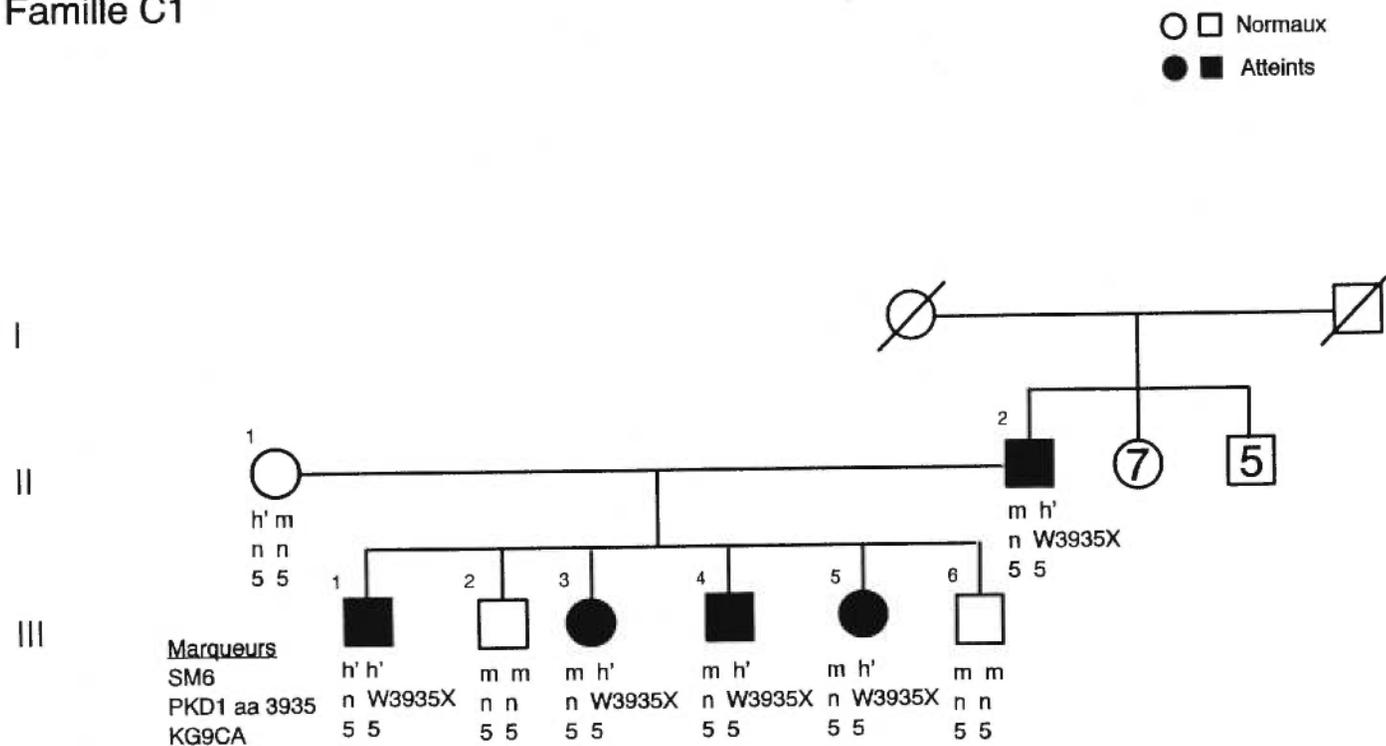
#### 4. Analyse mutationnelle des familles avec ADPKD.

L'ensemble de ces résultats présenté à la section précédente proviennent en autres de sept familles qui nous ont révélé beaucoup d'informations au sujet des mutations et des polymorphismes trouvés. En effet, les résultats obtenus lors de l'analyse de ces familles (C1, M18, E6, M19, M5, O3 et M12) nous révèlent des renseignements importants qui nous ont permis d'élaborer de façon claire et précise notre démarche d'analyse et qui ont contribué de manière significative à l'interprétation de nos résultats.

##### 4.1 Famille C1.

La famille C1, associée au locus *PKD1*, porte un codon stop prématuré à la place d'un tryptophane à la position 3935 de la séquence polypeptidique de la polycystine-1 (W3935X). Selon l'histoire familiale, il s'agirait d'une mutation *de novo* apparue chez le sujet II-2. Ceci engendre une protéine tronquée de 367 acides aminés supprimant le dixième et le onzième passage transmembranaire en plus du domaine intracellulaire C-terminal. La mutation identifiée à l'intérieur de cette famille se lie parfaitement avec l'allèle morbide h'/5 (marqueurs SM6, KG8CA). Comme le montre la figure 16 où tous les membres de la famille séquencés sont présents, le sujet II-2 a transmis la mutation faux sens à ses descendants III-1, 3, 4 et 5. L'haplotype h/W3925X/5 est morbide pour la famille C1. Les échographies rénales effectuées sur l'ensemble des membres de cette famille corroborent la génotypie des individus. De plus, il semble que les répercussions de cette mutation soient assez importantes car le sujet II-2 a subi une greffe rénale en 1990 à l'âge de 60 ans et la moyenne d'âge des enfants atteints et présentant des kystes à l'échographie est de 36 ans.

# Famille C1



**Figure 16.** *Arbre généalogique de la famille C1.* L'ADPKD1 est associée à l'haplotype h'/W3935X/5 et la mutation identifiée est le non-sens W3935X.

#### 4.2 Famille M18.

Cette famille de Montréal porte la délétion 51048delCT située à l'intérieur de l'exon 45 dans la séquence du gène *PKD1*. Elle fut diagnostiquée ADPKD1. Ce type de mutation donne une séquence erronée de 94 acides aminés à partir du codon 4061 pour finalement se terminer prématurément au codon 4154. La polycystine-1 est ainsi amputée de ses 147 derniers acides aminés. L'allèle porteur du gène *PKD1* est h/n/n/51048delct/n/n/5. Encore une fois, cette mutation dite *de novo* a été transmise aux individus testés positifs lors des examens cliniques. L'analyse séquentielle a confirmé ces observations car la présence de la mutation est uniquement détectée chez les individus déclarés porteurs de l'ADPKD1. De plus, les sujets dits normaux par séquençage corroborent les résultats des examens cliniques où l'on a noté une absence totale de kystes aux reins. Le maintien de la fonction d'une protéine tronquée se trouve normalement compromis, laissant présager l'apparition d'un phénotype grave associé à une telle mutation. En effet, les individus porteurs de la mutation présentent des signes cliniques relativement tôt dans le processus pathogénique de la maladie. Le sujet III-1, âgé de 52 ans, a subi une greffe rénale en 1992 vu la détérioration importante de sa fonction rénale. L'individu III-2, 50 ans, dont sa concentration urinaire en créatinine frôle le  $136\mu\text{mol/L}$  (normale:  $60\text{-}105\mu\text{mol/L}$ ), présente une myriade de kystes corticaux et sinusaux d'aspect liquide sur les deux reins. Le sujet IV-1, qui n'est âgé que de 26 ans, montre déjà un rein gauche d'une hauteur de 24cm et un rein droit d'au moins 20cm, tous deux parsemés de kystes de grosseurs variables (la hauteur d'un rein varie normalement entre 9 et 11cm). Il souffre aussi d'hypertension artérielle. En plus de se trouver uniquement sur l'haplotype morbide, les répercussions d'une telle mutation au niveau moléculaire semble se refléter au niveau phénotypique à l'intérieur de cette famille (voir Fig. 17).

# Famille M18

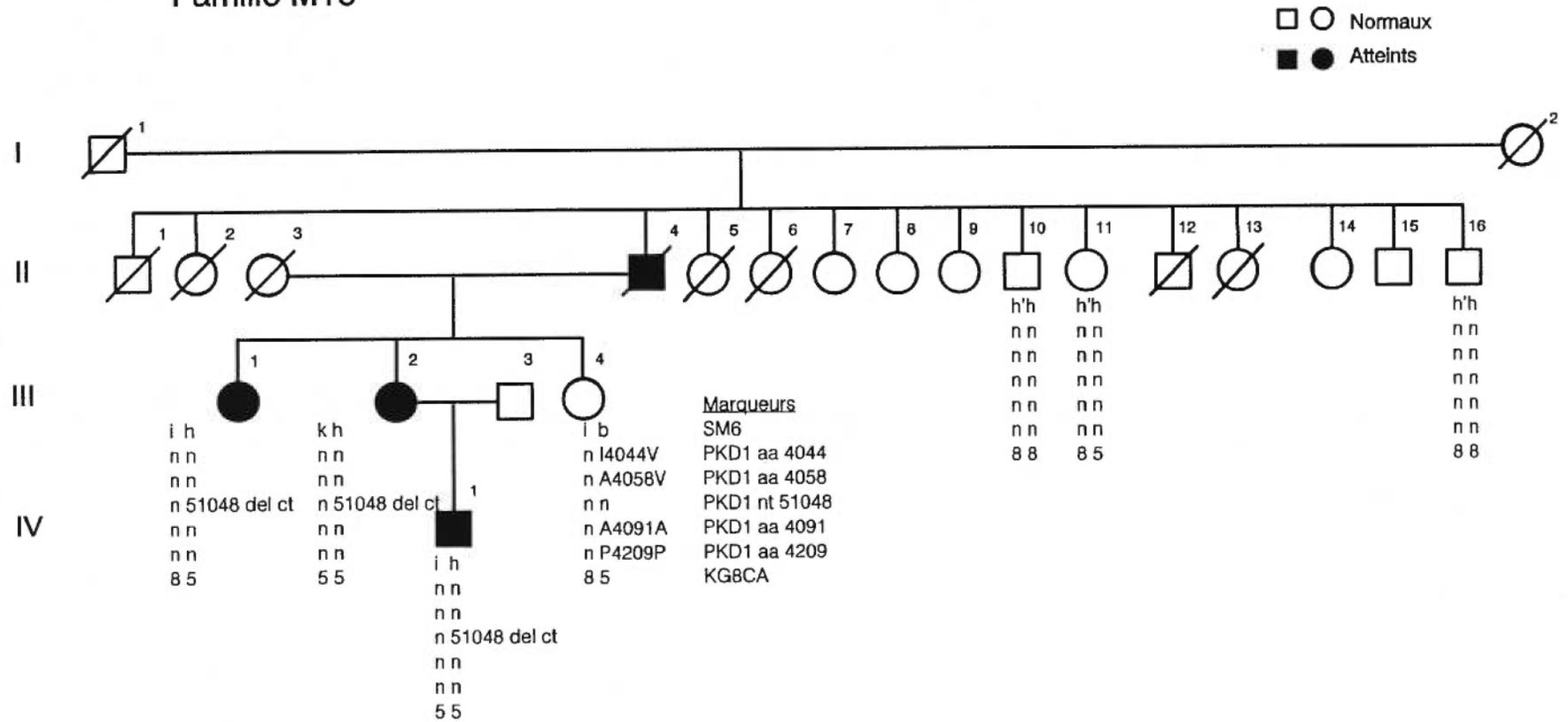


Figure 17. Arbre généalogique de la famille M18. Famille associée à l'ADPKD1 dont l'haplotype morbide est h/n/n/51048delct/n/n/5. La délétion du dinucléotide CT provoque un décalage du cadre de lecture menant à une protéine tronquée de ses 147 derniers acides aminés.

### 4.3 Famille E6.

La famille E6 est porteuse de la mutation Y3746C. Cette dernière, située dans l'exon 40, est la plus en 5' de toutes les mutations que nous avons trouvées dans la séquence du gène *PKD1*. L'haplotype i/Y3796C/5 est morbide à l'intérieur de cette famille. Les examens cliniques confirment les informations au niveau génétique et ce, pour chacun des individus étudiés. Ainsi, le sujet III-3, dont la créatinine est à  $110\mu\text{mol/L}$  (la normale se situant entre  $60$  et  $105\mu\text{mol/L}$ ), montre plusieurs kystes au foie. De plus, des kystes de grosseurs variables ont aussi été identifiés sur les deux reins. Le rein droit mesure  $12\text{cm}$  de hauteur tandis que le rein gauche mesure  $14\text{cm}$ . Ce dernier possède en plus un grand kyste de  $3,5\text{cm}$  de diamètre. Le sujet III-4 qui porte aussi la mutation possède plusieurs kystes aux deux reins. L'échographie montre plus particulièrement deux kystes de fortes dimensions sur le rein droit dont l'un atteint  $2,8\text{cm}$  de diamètre. Le foie est aussi touché. Le lobe droit hépatique montre un kyste d'un diamètre de  $4,5\text{cm}$  tandis que le lobe gauche présente un kyste de  $2,7\text{cm}$ . Quant au sujet III-7, il présente aussi une phénotypie semblable aux autres membres atteints de la famille. D'après nos observations, le foie et le rein sont touchés de manière importante dans cette famille (voir Fig. 18).

Famille E6

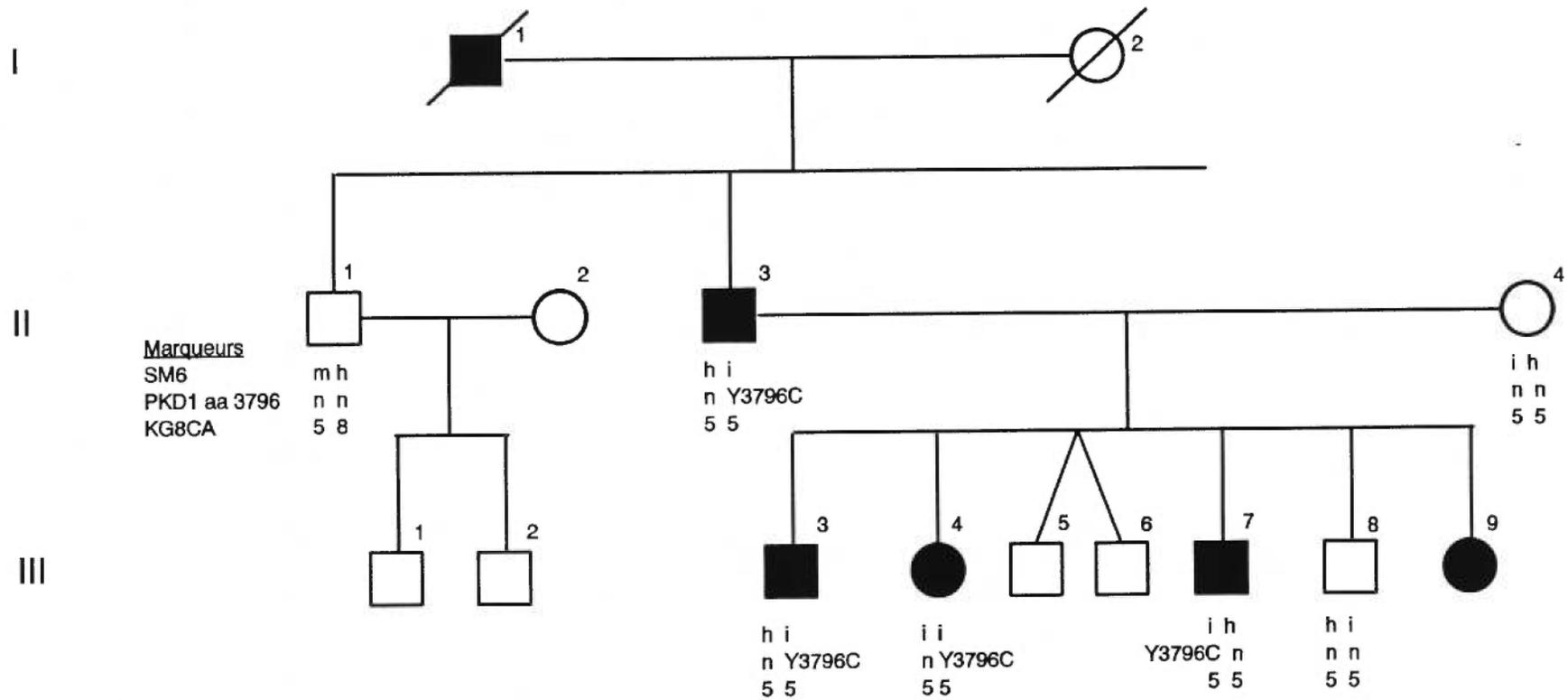
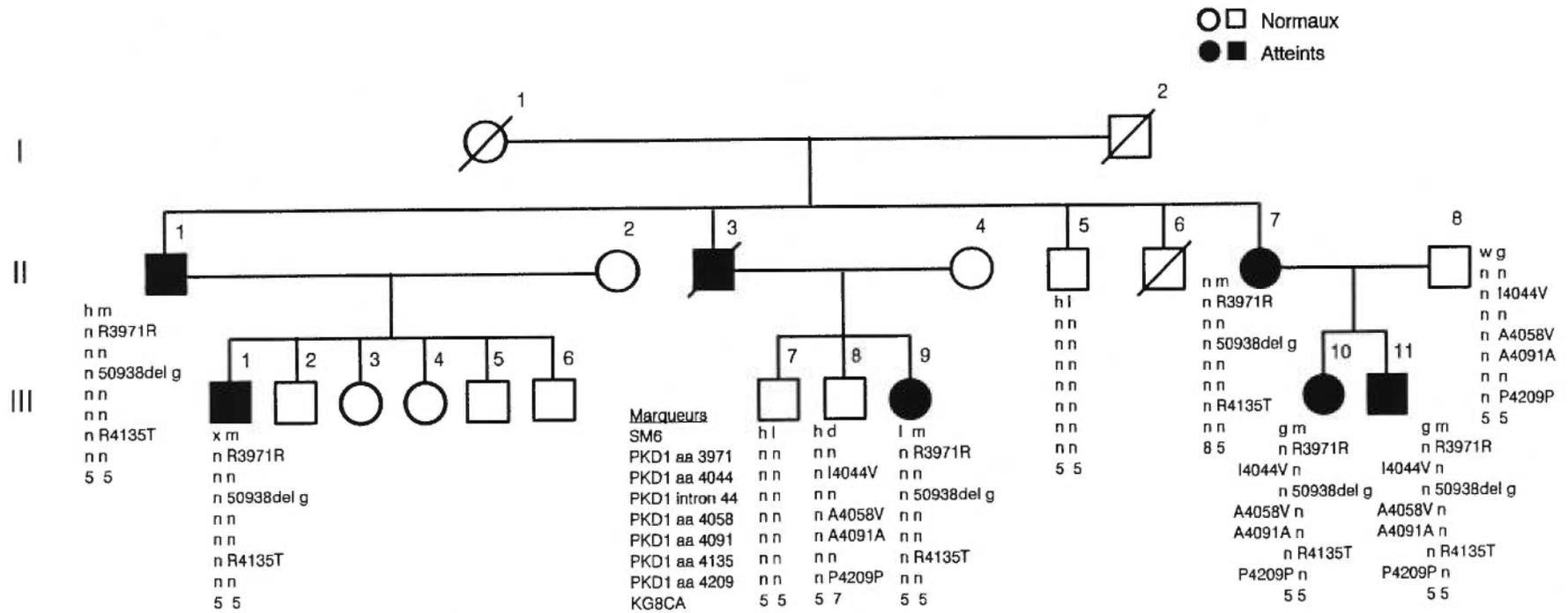


Figure 18. *Arbre généalogique de la famille E6.* La famille E6 est associée à l'ADPKD1 et l'haplotype morbide lié à la maladie est i/Y3796C/5.

#### 4.4 Famille M19.

Dans cette famille associée à l'ADPKD1, l'haplotype morbide est le m/R3971R/N/50938delg/n/n/R4135T/n/5. La mutation R4135T associée à la maladie provoque le changement d'un acide aminé avec chaîne latérale polaire chargée pour un autre acide aminé dont la chaîne latérale est polaire non-chargée. Ainsi, une arginine correspondant au codon 4135 est remplacée par une thréonine (R4135T). Des kystes ont été détectés seulement chez les sujets porteurs de la mutation. Le sujet II-1 a montré à l'échographie plusieurs kystes aux reins dont le diamètre variait entre 0,6 et 5,6cm. L'individu III-1 possède des reins polykystiques dont la taille est de 15cm de hauteur. Les kystes varient de quelques centimètres à 3cm de diamètre. Depuis 10 ans, III-1 est traité pour de l'hypertension artérielle. Le sujet III-9, âgé de 20 ans et dont le père est décédé d'un anévrisme cérébro-vasculaire présente des reins polykystiques dont un de 2,3cm à la jonction cortico-médullaire du rein gauche. La figure 19 montre l'arbre généalogique de cette famille.

## Famille M19

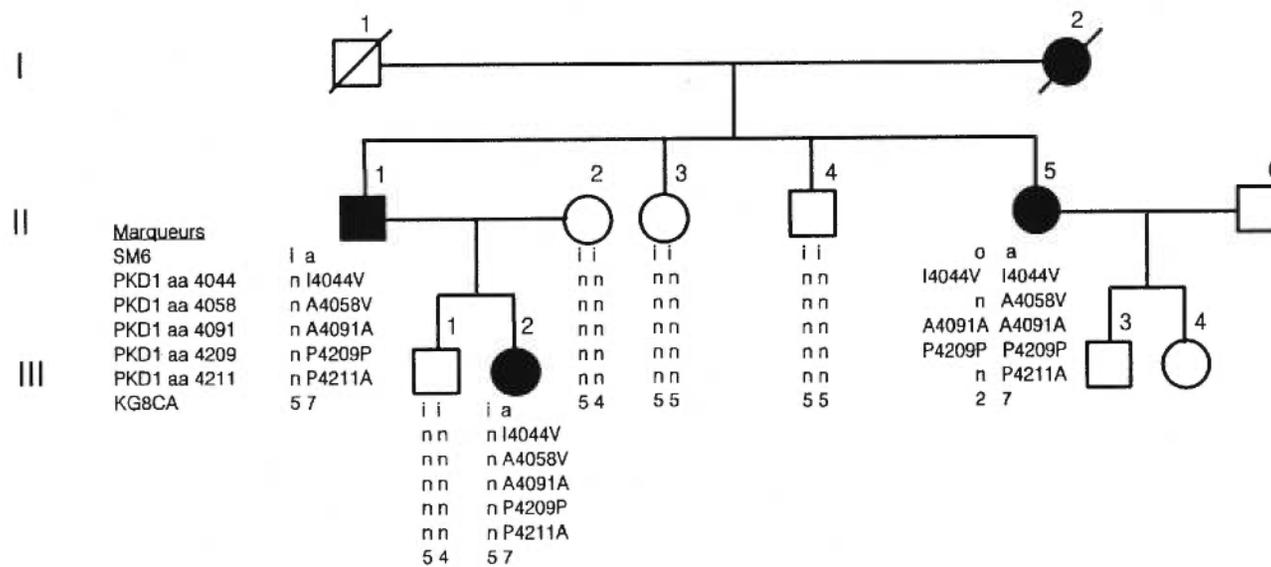


**Figure 19.** *Arbre généalogique de la famille M19.* Une autre famille ADPKD1 où l'haplotype associé à la maladie est m/R3971R/N/50938delg/n/n/R4135T/n/5. Dans cette famille, le trio-polymorphisme se retrouve uniquement sur des haplotypes normaux et la mutation qui se lie à la maladie est R3135T. 50938delg se trouve dans l'intron 44.

#### 4.5 Famille M5

Cette famille associée au locus *PKD1* porte la mutation faux sens P4211A sur l'haplotype morbide a/I4044V/A4058V/A4091A/P4209P/P4211A/7. Un fait remarquable au sujet de cette famille est la présence du trio-polymorphisme **I4044V/A4091A/P4209P** qui se trouve à la fois sur un haplotype morbide et un haplotype normal. Encore une fois, tous les résultats cliniques obtenus pour chacun des membres de la famille étudiée corroborent nos informations génétiques. Par exemple, le sujet II-1, âgé de 60 ans, montre des reins polykystiques dont l'un sur le rein droit atteint un diamètre de 4,5cm. D'ailleurs, il y a néphromégalie. La hauteur bipolaire du rein gauche et droit est respectivement de 18 et 17cm. Des kystes hépatiques ont aussi été observés. Le plus grand kyste hépatique mesure 3cm de diamètre. De plus, le pancréas du sujet II-1 est aussi atteint. Des kystes variant de 4 à 10mm couvrent une vaste superficie de cet organe. Le sujet II-5 présente aussi des reins polykystiques. Finalement, l'individu III-1, âgé de 36 ans, ne montre aucun signe clinique de l'ADPKD1 ce qui demeure en accord avec nos résultats (voir Fig. 20).

## Famille M5



**Figure 20.** *Arbre généalogique de la famille M5.* La famille M5 est ADPKD1 et l'haplotype associé à la maladie se présente sous la forme a/I4044V/A4058V/A4091A/P4209P/P4211A/7.

#### 4.6 Famille O3.

La figure 21 montre la famille O3 qui représente un modèle intéressant pour le genre d'analyse que nous avons effectuée. L'haplotype morbide qui est associé au locus *PKD1* est le i/g48653t/I4044V/A4091A/P4209P/1. Aucune mutation, selon la définition énoncée précédemment n'a été identifiée. Par contre, l'analyse séquentielle et les haplotypes obtenus corroborent les résultats des tests cliniques des membres de la famille. Ainsi, le sujet III-11 ne porte pas l'haplotype morbide et ne présente aucun signe clinique permettant de croire en l'apparition prochaine de la polykystose rénale. Cependant, le sujet III-15, dans la quarantaine, est porteur de l'haplotype morbide et souffre d'hypertension. Son niveau de créatinine est légèrement élevé. Aussi porteurs de l'haplotype morbide, les sujets IV-4 et IV-5 montrent des signes évidents de l'ADPKD1. Les reins du premier, dont la hauteur atteint près de 22cm, présentent au moins 3 kystes de 2cm, détectés lors de l'échographie. La créatinine est anormalement élevée à  $164\mu\text{mol/L}$  (la normale se situant entre 60 et  $105\mu\text{mol/L}$ ). Quant au second sujet, il possède un rein droit de 14,7cm de diamètre bipolaire et un rein gauche de 16,5cm. De plus, il y a multiplicité kystique où certains atteignent un diamètre de 4cm. Une néphromégalie modérée a aussi été notée (dépliez la page suivante pour voir la figure 21).

Famille O3

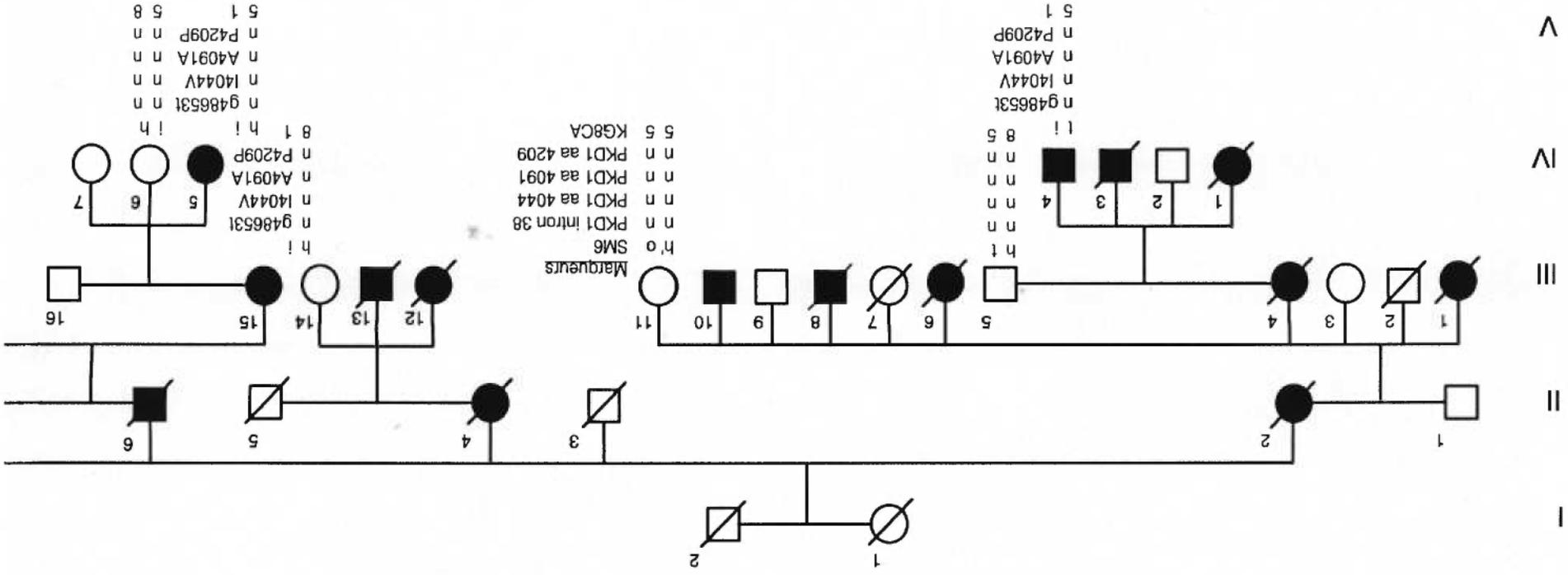
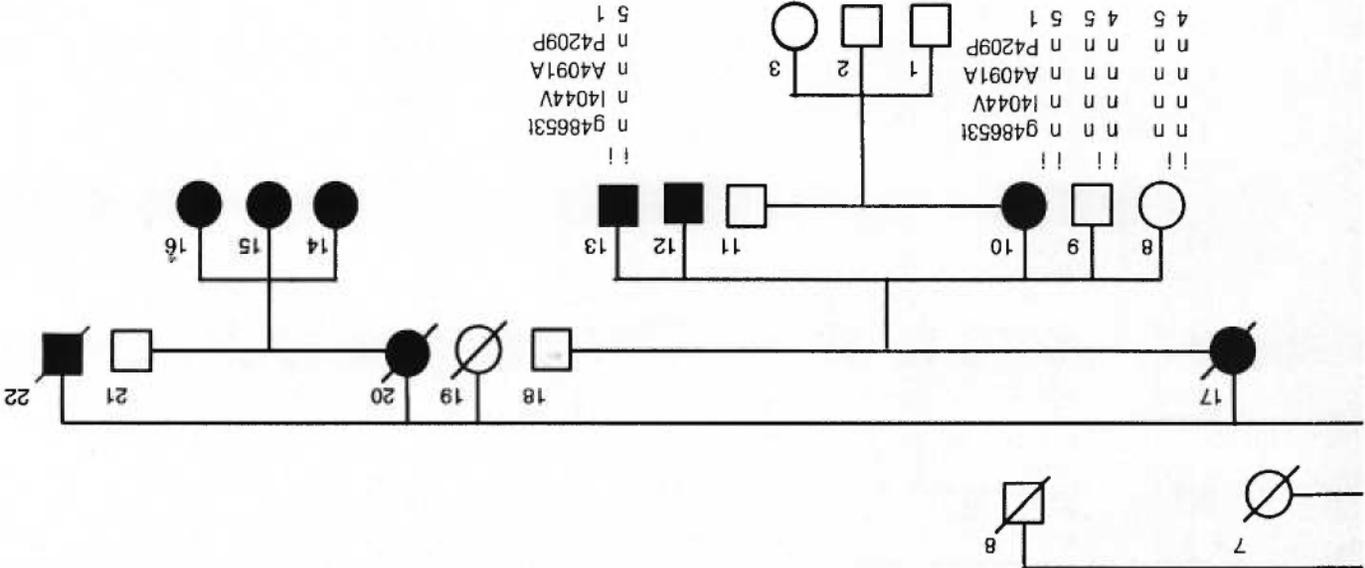


Figure 21. Arbre généalogique de la famille O3. La maladie de l'ADPKD1 est liée à l'haplotype /g48653V/I4044V/A4091A/P4209P/1. Dans cette famille, le trio-polymorphisme est à la fois sur des sujets atteints et normaux.

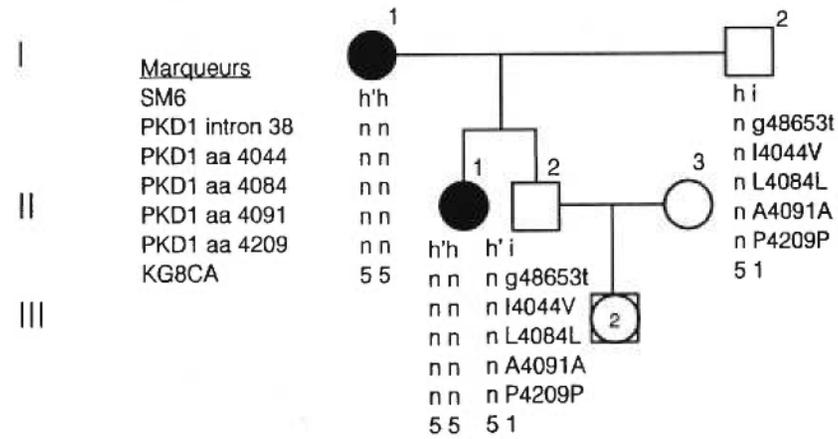
● ■ Atteints  
 ○ □ Normaux



#### 4.7 Famille M12.

Contrairement aux autres familles mentionnées précédemment, la famille M12 n'est évidemment pas liée au locus *PKDI*. La figure 22 témoigne de ces observations. De plus, les résultats obtenus à l'intérieur de cette famille supportent notre concept de trio-polymorphisme. En effet, les membres de cette famille qui sont normaux comme I-2 et II-2 portent le trio-polymorphisme **I4044V/A4091/P4209P**. Ceci implique que des familles qui ne sont pas associées au locus *PKDI* peuvent porter le trio-polymorphisme. D'ailleurs, une autre famille (C10) qui n'est pas associée à l'ADPKD1 montre à la fois des gens normaux et atteints de l'ADPKD avec un haplotype contenant le trio. Concernant la famille M12, les tests cliniques montrent que le sujet I-1, âgé de 68 ans, possède plusieurs kystes de faibles tailles aux deux reins. L'individu II-2 présente des signes plus sévères de l'ADPKD. Maintenant âgé de 44 ans, le sujet II-2 a subi une greffe rénale à l'âge de 29 ans et est présentement en attente d'une seconde greffe. D'après nos informations, il y a hétérogénéité phénotypique à l'intérieur de cette famille.

## Famille M12



**Figure 22.** *Arbre généalogique de la famille M12. Famille associée à l'ADPKD mais non à l'ADPKD1.*

# **CHAPITRE IV**

## **Discussion**

Au cours de notre analyse mutationnelle de familles québécoises avec polykystose rénale autosomique dominante, nous avons recensé cinq nouvelles mutations n'ayant jamais été décrites auparavant dans la documentation (Y3796C, W3935X, 51048delCT, R4135T et P4211A). De plus, quatre nouveaux polymorphismes ont aussi été trouvés. Toutes ces altérations de séquence furent localisées entre les exons 37 et 46 inclusivement de la séquence unique située à l'extrémité 3' du gène *PKDI*. Malgré le fait que la population québécoise soit reconnue comme étant une population stable au niveau génétique vu le nombre restreint d'échanges avec d'autres populations au cours de son histoire, ces résultats confirment la diversité des altérations de séquence et la possibilité de les utiliser comme marqueurs intrafamiliaux spécifiques en complément avec des études de liaison et des tests cliniques pour rendre un diagnostic présymptomatique plus précis. Lors de cette analyse mutationnelle, un second élément, dont nous ignorions l'existence a été observé. Trois polymorphismes **I4044V/A4091A/P4209P** ont toujours été localisés ensemble sur le même allèle. De plus, d'autres polymorphismes étaient présents uniquement si ce trio de base s'y trouvait. À un second niveau, nous avons remarqué que certaines altérations de séquence étaient détectées sur un allèle *PKDI* à la condition que cet allèle présente le trio en plus d'un polymorphisme supplémentaire. De ces observations, il nous a été possible d'établir une certaine chronologie concernant l'ordre d'apparition des altérations de séquence à partir d'un noyau de base constitué de **I4044V/A4091A/P4209P**. Ce noyau pourrait peut-être nous indiquer la présence d'allèles ancestraux. Tous les polymorphismes et les mutations recensés au cours de cette étude furent identifiés par un séquençage direct de l'ADN génomique selon la méthode élaborée par Sanger<sup>168</sup> (aussi appelé séquençage enzymatique).

L'utilisation de cette technique a été favorisée, car la région étudiée ne comprenait que ~4500pb sur la séquence génomique dont ~3400pb faisaient partie de la séquence codante. Dans des conditions idéales, nous pouvons lire à l'aide de cette technique de 300 à 600pb à la fois.

De plus, étant donné l'expérience de notre laboratoire depuis près de 10 ans avec le séquençage enzymatique, il s'avérait tout à fait normal d'aborder notre étude à l'aide de cette méthode. Malgré un protocole plus laborieux que celui des techniques qui ont été le plus utilisées lors de l'analyse mutationnelle de la séquence unique du gène *PKDI* comme l'hétéroduplexe et le SSCP, nous nous assurons ainsi de passer la séquence base par base. En analysant scrupuleusement la séquence du gène *PKDI*, nous augmentions donc nos chances de repérer la majorité des mutations et des polymorphismes. De plus, tous les types d'altération de séquence pouvaient être interprétés facilement à l'aide de cette technique. Toutefois, étant donné que le séquençage enzymatique et le PCR se font sur un simple brin d'ADN, il est possible, lorsque la séquence comporte beaucoup de CG, comme c'est le cas pour la séquence de *PKDI*, qu'il se forme des structures secondaires de type épingle à cheveux (*hairpin*) entre des séquences complémentaires. Lorsque ces structures contiennent beaucoup de GC, l'énergie de liaison est telle que la polymérase ne peut les traverser. C'est pourquoi, nous n'avons pu amplifier l'exon 42 lors de notre étude. La région qui entoure cet exon est très particulière<sup>71</sup>, elle révèle une structure complexe avec plusieurs répétitions de séquence, en particulier une séquence de 34 nucléotides présente à 5 reprises. De plus, sur les 175pb qui composent cet exon, 77% sont des guanines ou des cytosines. Cette particularité rend plus difficile la progression de la TAQ polymérase, car des structures secondaires peuvent se former à cet endroit. Étant donné que les liaisons G-C comportent trois ponts d'hydrogène, l'énergie requise pour les défaire demeure considérable comparativement au lien A-T qui ne comporte que deux ponts H. Cependant, tout dernièrement, l'équipe de Watnick et al.<sup>75</sup> a réussi, grâce à la *rTh* DNA polymérase, à amplifier des régions présentant normalement des structures secondaires.

Malgré ces particularités, notre approche a permis de couvrir 80% de la séquence codante de la partie unique du gène *PKDI*, soit 20% de la séquence du transcrit total et d'identifier cinq mutations dont deux mènent à un produit tronqué, soit W3935X et 51048delCT.

La mutation non-sens W3935X prive la protéine de ses deux derniers passages transmembranaires et de son domaine C-terminal complet. Ceci suggère que l'activité de la protéine tronquée sera grandement altérée par la disparition des deux sites de phosphorylation qui peuvent à la fois servir pour la tyrosine kinase et la protéine kinase C. Tel que proposé par Hughes et al.<sup>65</sup>, ces sites influenceraient les propriétés adhésives de la polycystine-1 lors de contact cellule/cellule ou cellule/matrice extracellulaire. De plus, la séquence PEST (Pro-Glu-Ser-His) qui permet selon Tsiokas et al.<sup>107</sup> la dégradation rapide de la polycystine-1 pour en contrôler le niveau en réponse aux besoins cellulaires ne serait plus possible. Un des éléments importants de ce codon stop prématuré est l'impossibilité pour la polycystine-1 d'établir une interaction avec la polycystine-2 grâce à son domaine câble torsadé, car les acides aminés 4214 à 4228 sont maintenant délétés. D'ailleurs les signes cliniques observés dans la famille C1 à la section 4.1 sont importants. Il pourrait donc y avoir une certaine corrélation entre l'impact de cette mutation et la phénotypie.

La seconde mutation qui possède un niveau pathogène probable est la délétion 51048delCT identifiée chez la famille M18. Elle provoque à partir du codon 4060 un décalage du cadre de lecture menant à une protéine tronquée comprenant 4153 acides aminés dont les 94 derniers sont erronés. Encore une fois, dans ce cas-ci, les sites de phosphorylation, la séquence PEST et le domaine câble torsadé de la polycystine-1 seront absents de la protéine, laissant présager une fonction hautement diminuée pour la polycystine-1. L'impact d'une telle mutation se fait sentir au niveau phénotypique. En effet, la famille M18 semble montrer des signes cliniques plus graves comparativement à l'ensemble des familles associées à l'ADPKD1 étudiées. Par exemple, le sujet IV-1 âgé à peine de 26 ans montre un rein gauche et droit d'une hauteur supérieure à 20cm et l'un de ses kystes possède un diamètre de 5cm. Les autres sujets atteints possèdent aussi plusieurs kystes de dimensions respectables. Bref, ces deux mutations, W3935X et 51048delCT qui provoquent l'apparition de codons stop prématurés pourraient aussi influencer la stabilité de l'ARNm de *PKD1*.

Ce genre d'événement peu connu et peu étudié a cependant été observé chez d'autres maladies génétiques (maladie de Sandhoff et celle du *CYP21*) par l'équipe de Zhang et al.<sup>171</sup> et White et al.<sup>172</sup>. Par contre, ceci ne demeure pour l'instant que spéculations.

Contrairement à ces deux mutations, il est plus difficile d'établir une corrélation directe entre le phénotype et le génotype des trois autres mutations dites faux sens (Y3796C, R4135T et P4211A). Malgré le fait que les mutations identifiées furent confirmées en examinant la ségrégation de l'altération de séquence avec la maladie, et que ces altérations aient toujours été identifiées sur l'allèle morbide, il n'est pas impossible qu'il s'agisse de polymorphismes très rares. C'est peut-être le cas pour la mutation Y3796C où à la suite de ce changement, la polarité de la chaîne latérale demeure la même, soit une chaîne polaire non-chargée. Cependant, en plus de la liaison de cette mutation avec le phénotype ADPKD1, la chaîne latérale de la tyrosine comprend un groupement phénol dont le nuage électronique occupe une place beaucoup plus grande que le groupement thiol. De plus, la cystéine, par son groupement thiol, a la capacité de former des ponts disulfures avec une autre cystéine de la polycystine-1 ou d'une autre protéine. Il est donc possible que ce genre de mutation induise des conformations différentes au niveau de la structure de la polycystine-1 où certains domaines fonctionnels seraient plus près l'un de l'autre comparativement à la forme sauvage. Nous avons aussi remarqué, par comparaison de séquence, que la tyrosine 3796 était un résidu conservé entre l'homme et la souris suggérant un rôle potentiellement important pour celle-ci dans le maintien de la structure tridimensionnelle de la polycystine-1. D'un point de vue clinique, nous avons remarqué que les sujets atteints de la famille E6 présentaient tous des kystes rénaux de forte taille variant entre 2,8 et 3,5cm. De plus, comme la description de la famille le mentionne à la section 4.3, le foie peut être touché.

La seconde mutation faux sens, R4135T, ne conserve pas la polarité de la chaîne latérale. Ainsi, nous passons d'une arginine dont la longue chaîne latérale est chargée positivement à pH physiologique à une thréonine dont la chaîne latérale est beaucoup plus courte et non-chargée. Ce genre de changement entre un résidu chargé et non chargé pourrait engendrer une variation de conformation induisant une modification de la structure protéique empruntée par la polycystine-1. Ce changement est difficile à prévoir, car a priori, nous ne connaissons pas la structure empruntée par le domaine C-terminal de la polycystine-1 normale. De plus, le résidu R4135 est conservé chez l'homme et la souris. Comme nous l'avons vu précédemment, cette particularité confère peut-être un rôle important à ce résidu quant à la préservation de la structure native de la polycystine-1. La phénotypie de la famille M19 où nous avons identifié la mutation semble quelque peu variable. Le sujet II-1 montre plusieurs kystes aux deux reins où leur diamètre varie entre 0,6 et 5,6cm tandis que le sujet III-9 qui possède le même allèle morbide que II-1 ne présente que quelques kystes dont un seul grand kyste de 2,3cm de diamètre à la jonction cortico-médullaire. Malgré la variabilité phénotypique observée, cette mutation n'a jamais été associée à un haplotype normal lors de notre étude.

La troisième mutation faux sens P4211A est aussi associée à la maladie. Ce changement est de nature plus conservatrice, car les deux résidus présentent des chaînes latérales non-polaires. La proline 4211 est conservée à la fois chez la souris et chez l'humain. En général, le résidu proline soumet la protéine à une contrainte conformationnelle significative. Cette contrainte est imposée par la structure cyclique particulière de la chaîne latérale de la proline, un groupement pyrrolidine. Nous pouvons donc supposer que le changement d'une proline pour une alanine donnera plus de liberté à la polycystine-1, lui laissant le choix d'emprunter plusieurs conformations. La chaîne principale d'acides aminés pourrait alors se replier sous une forme intermédiaire qui ne serait pas native.

Les membres de la famille M5 porteurs de l'ADPKD1 et suffisamment âgés pour que l'on détecte des signes cliniques de la maladie, montrent plusieurs kystes aux reins, au foie et au pancréas variant de quelques millimètres à 4,5cm. Il y a une hétérogénéité phénotypique évidente à l'intérieur de cette famille.

L'identification de ces mutations révèle certains éléments intéressants. Ainsi, aucune région de la partie séquencée ne semble plus sujette qu'une autre à l'apparition de mutations. D'ailleurs, la proportion des familles associées à l'ADPKD1 où l'on a identifié une mutation est de 5/25 (20%) ce qui corrobore l'hypothèse qui veut que pour une population donnée, la proportion de mutations dans la partie unique du gène *PKDI* soit directement reliée à l'étendue que cette région couvre sur le transcrit, soit 20%. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Peral et al.<sup>71</sup> qui proposaient une telle relation dans la population de Oxford au Royaume-Uni. De plus, aucune des mutations trouvées lors de notre analyse ne se retrouvent dans plus d'une famille. D'ailleurs, seules les mutations R4227X<sup>71.73</sup>, Q4041X<sup>68.73.74</sup>, M2760T<sup>75</sup>, R2761P<sup>75</sup> et M2764T<sup>75</sup> (c'est-à-dire 5 sur les 32 mutations répertoriées incluant les nôtres, soit 15%) se sont retrouvées dans plus d'une famille. Ceci suggère qu'il existe en plus de l'hétérogénéité haplotypique chez l'ADPKD1, une variabilité mutationnelle. Cette variabilité ne nous permet pas d'observer d'effets fondateurs dans la population québécoise; au contraire, il semble que nous sommes en présence de mutations spontanées. En effet, pour toutes les analyses mutationnelles qui ont été réalisées à ce jour, la variabilité des mutations observée révèle une propension qui veut que le taux d'apparition des mutations sur le gène *PKDI* soit l'un des plus élevés<sup>10</sup>. Malgré ces observations, ni notre étude, ni les derniers travaux réalisés à ce sujet ne permettent d'établir clairement et hors de tout doute si les mutations influencent la fonction et la structure de la polycystine-1 par un effet dominant négatif ou par gain de fonction. Certes, il y a une incidence sur cette fonction; d'ailleurs, la quantité de plus en plus importante de codons stop et d'altérations de séquence provoquant un décalage du cadre de lecture en 5' du gène *PKDI* suggèrent pour une majorité des mutations un rôle inactivant.

De plus, les récentes allégations sur la perte d'hétérozygotie dans les cellules épithéliales des kystes par le modèle du second événement (*Second Hit Model*) renforcent la pertinence de ces arguments.

Bien sûr, ces allégations demeurent toujours hypothétiques, mais selon les outils génétiques et moléculaires qui nous sont disponibles pour l'instant et qui ont contribué à la découverte de nos cinq mutations sur l'ADN de cellules sanguines périphériques, les mutations localisées au cours de notre étude se sont retrouvées uniquement sur l'haplotype morbide et elles pourraient jouer un certain rôle sur la phénotypie des sujets porteurs de ces altérations de séquence. Cependant, tant qu'il ne sera pas possible d'analyser aisément la séquence du gène *PKDI* au complet pour chacune des familles étudiées, nous devons être prudents sur le degré de pathogénie que nous attribuons aux mutations identifiées et ce, plus particulièrement aux mutations de type faux sens. Par ailleurs, il faudra attendre que des études de fonction soient possibles pour voir les effets réels des mutations trouvées à ce jour.

En plus de ces mutations, dix polymorphismes dont quatre n'ayant jamais été rapportés dans la documentation ont été identifiés lors de notre analyse mutationnelle. La définition accordée au terme polymorphisme au cours de notre étude est celle de Vogel et Motulsky<sup>173</sup>. Elle englobe plusieurs notions, mais tient compte des particularités que nous avons rencontrées au cours de notre analyse mutationnelle. Le polymorphisme est donc un génotype se transmettant selon les principes mendéliens et qui est associé dans la population à au moins deux phénotypes différents (par exemple: sujets normaux et sujets atteints de l'ADPKD) et ce, peu importe sa fréquence d'apparition. À partir de ces éléments, certaines particularités, en plus du trio-polymorphisme (I4044V/A4091A/P4209P) ont été observées. Ainsi, nous avons classé deux altérations de séquence (I4044V et A4058V) dites faux sens sous le vocable polymorphisme.

Étant donné que ces altérations de séquence se trouvaient à la fois sur des haplotypes sauvages et des haplotypes liés à la maladie, il n'y avait pas de ségrégation spécifique avec l'ADPKD.

Ce premier faux sens, I4044V qui fait partie du trio-polymorphisme montre un changement en acide aminé très conservateur. En effet, malgré une légère diminution de l'encombrement stérique parce que la chaîne latérale de la valine est plus petite que celle de l'isoleucine, nous conservons une polarité nulle. De la même façon, A4058V ne change en rien la polarité de la chaîne latérale. La seule différence demeure la taille des chaînes latérales impliquées. Ceci n'a a priori aucun impact majeur sur l'intégrité structurale de la polycystine-1. Étant donné que ces deux polymorphismes se retrouvent respectivement à l'intérieur des hélices  $\alpha$  du 10ième et du 11ième passage transmembranaire, il aurait été raisonnable de croire que le changement en acide aminé aurait eu des répercussions sur le maintien de la structure de ces domaines protéiques. Cependant, des études de probabilité et de physico-chimie nous indiquent le contraire. Les études de probabilité ne sont basées que sur des statistiques comparatives concernant les chances qu'un acide aminé par rapport à un autre se retrouve dans une hélice  $\alpha$ . En revanche, les études physico-chimiques reposent uniquement sur la structure des chaînes latérales des résidus et leur implication dans l'architecture protéique. L'ensemble de ces études émises entre autres par les équipes de Blout et al.<sup>174</sup>, Chou et Fasman<sup>175</sup>, Robson et Pain<sup>176</sup>, Kotelchuk et Scheraga<sup>177</sup>, Lewis et al.<sup>178</sup> et finalement Finkelstein et Ptitsyn<sup>179</sup> proposent toutes que l'isoleucine, l'alanine et la valine sont favorables à la formation d'une hélice  $\alpha$ . I4044V et A4058V n'altéreraient donc pas les domaines transmembranaires. De plus, I4044V fut aussi identifié à l'intérieur du trio chez trois des quatre familles qui ne sont pas associées à l'ADPKD1, à la fois sur des individus atteints de l'ADPKD et des normaux. Toutes ces données sur I4044V et A4058V suggèrent qu'ils sont bel et bien des polymorphismes. D'ailleurs, il existe d'autres faux sens qui ont été désignés polymorphismes par Peral et al.<sup>73</sup>, soit F3066L (exon 25), T3509M (exon 35), A3511V (exon 35) et S4189F (exon 46).

Ces renseignements permettent donc d'établir que le groupe I4044V/A4091A/P4209P représente un trio-polymorphisme à part entière. C'est la première fois que nous remarquons une telle association de polymorphismes sur la séquence du gène *PKDI*. Pourtant, d'autres équipes ont déjà observé les polymorphismes I4044V<sup>72</sup>, A4091A<sup>71,73</sup> et P4209P<sup>67</sup>, mais aucune d'entre elles n'a relaté la présence simultanée de deux ou même des trois polymorphismes sur un même haplotype. Plusieurs raisons peuvent expliquer cette situation. L'analyse mutationnelle de ces équipes s'est basée sur de l'ADN complémentaire synthétisé à partir de l'ARNm. Ceci augmente bien sûr les étapes de manipulation et par conséquent les risques d'erreur. De plus, contrairement à notre laboratoire, la détection des mutations s'est faite avec le SSCP (*Single Strand Conformational Polymorphisms*) et l'hétéroduplexe. La sensibilité de détection d'une altération de séquence pour chacune de ces techniques est de 80 à 90% comparativement au séquençage direct dont la sensibilité atteint presque 100%<sup>180</sup>. Certaines difficultés d'interprétation des résultats peuvent aussi survenir avec le SSCP. Basée sur la variabilité de la conformation de l'ADN double-brin selon sa séquence nucléotidique, il se peut qu'une même séquence emprunte plusieurs conformations. Un grand nombre de bandes apparaîtront alors sur le gel, laissant place à beaucoup d'ambiguïté sur l'interprétation de ces résultats<sup>181</sup>. Parfois, l'ADN peut aussi se présenter sous une traînée sur le gel si celui-ci n'a pas encore atteint sa conformation finale<sup>181</sup>. De la même façon, des bandes obtenues par hétéroduplexe peuvent être difficilement distinguables si l'ADN emprunte une conformation instable ou intermédiaire lors de la migration sur le gel. Tous ces facteurs représentent des sources d'erreur irréfutables qui ont peut-être contribué au fait que seule notre équipe, à l'aide du séquençage direct, a réussi à identifier le trio-polymorphisme. De plus, il se peut que ce trio soit spécifique à la population québécoise, cependant, tant qu'aucun séquençage systématique des familles européennes et américaines possédant l'un des membres de ce trio ne sera complété, ceci demeurera hypothétique.

Il est difficile de définir les éléments qui permettent d'observer une telle association entre trois polymorphismes dont les plus proches sont séparés par 49 acides aminés dans lesquels se trouve un passage transmembranaire. Il se peut que l'allèle du gène *PKDI* qui possède ce trio soit a priori un vieil allèle normal. Vue l'homogénéité d'une grande portion de la population québécoise, la distribution à grande échelle de ce trio-polymorphisme n'est pas surprenante. En effet, selon les historiens, la majorité de la population francophone au Québec est issue d'un noyau de 10 000 colons français venus en Amérique entre 1609 et 1681<sup>182</sup>. Au cours des générations qui ont suivi, cet allèle aurait acquis d'autres polymorphismes et des mutations. De plus, cet allèle se serait introduit dans quelques familles qui ont immigré au cours des siècles suivants à la suite de leur assimilation à la population initiale. Ces observations pourraient nous indiquer la présence d'allèles ancestraux dans la population québécoise, liés non pas à un groupe très restreint d'individus mais plutôt à un noyau de 10 000 personnes. Ce trio semble s'associer plus particulièrement à l'allèle i (i=123pb) du marqueur SM6 et aux allèles 1, 2 et 7 pour le marqueur KG8CA (1=118pb; 2=116pb; 7=106pb). Au total, notre étude dénombre 21 haplotypes SM6/KG8CA associés au trio-polymorphisme dont 13 sont différents. Certains sont liés à l'ADPKD1 tandis que d'autres sont des haplotypes normaux ou associés à une autre forme de l'ADPKD. Les marqueurs SM6 et KG8CA ne se retrouvent pas dans une région codante à l'intérieur du gène et leur séquence répétée est promue à un changement plus rapide au cours de l'évolution de l'espèce humaine. Ceci pourrait expliquer en partie le nombre différent d'haplotype SM6/KG8CA associé au trio-polymorphisme. Cependant, le gène *PKDI* est aussi voué à changer et certaines altérations de séquence comme g48653t, A4058V, L4084L et L4136L se seraient ajoutés au trio-polymorphisme au cours des siècles. De là, nous avons établi une chronologie d'apparition hypothétique de certains polymorphismes associés au trio de base tel que proposée au chapitre III (voir Fig. 14, chapitre III).

Tous ces polymorphismes et ces mutations démontrent une variabilité mutationnelle et une grande diversité des polymorphismes recensés. Ceci témoigne du contexte chromosomique dans lequel le gène *PKDI* se trouve. En effet, par les propriétés intrinsèques de la séquence génomique de *PKDI* comme la forte proportion du dinucléotide CG, les bouts de séquences répétés à plusieurs reprises, comme c'est le cas dans l'intron 42 et les longues séries de pyrimidines de l'intron 21 et 22, il existe un potentiel d'apparition de changements nucléotidiques. Par exemple, les séries de CpG peuvent induire des changements de bases individuels spontanés. En effet, lorsque méthylée, la cytosine devient une 5-méthylcytosine puis une thymine à la suite d'une déamination spontanée<sup>183,184</sup>. Les répétitions d'un bout de séquence peuvent provoquer des glissements de l'appareil de réplication causés par la formation d'une structure secondaire du brin d'ADN qui sert de matrice à la réplication. Ceci engendre l'apparition de délétions dans la séquence du brin d'ADN fille pouvant provoquer un décalage du cadre de lecture<sup>185</sup>. Finalement, les séries de pyrimidines situées dans l'intron 1, 21 et 22<sup>76</sup> ont la capacité de former sous certaines conditions des triples hélices<sup>130</sup> qui favorisent une mutagenèse localisée. Dans des modèles cellulaires, Wang et al.<sup>131</sup> ont enregistré, en présence d'une telle structure de l'ADN, une fréquence d'apparition de mutations (faux sens, non-sens...) de 10 fois supérieure à la normale. Cependant, la distance qui séparait les mutations de la triple hélice dans les expériences de Wang et al. était largement inférieure à la distance qui sépare la série de pyrimidines de l'intron 21 et 22 à la séquence unique de *PKDI*. Toutes ces possibilités demeurent hypothétiques pour l'instant.

D'autres facteurs peuvent cependant influencer la mutagenèse de *PKDI*. L'un de ces facteurs est l'environnement immédiat du locus *PKDI*. La présence de trois copies homologues (*HG-A*, *B* et *C*) dont la similarité de séquence est très élevée (~97%) pourrait induire le phénomène de conversion génique (*gene-conversion event*). Souvent confondue avec la recombinaison non-réciproque, la conversion génique implique le transfert d'une information génétique d'un brin d'ADN donneur à un brin receveur.

Le génotype de la molécule donatrice demeure inchangé tout au long de ce processus tandis que celle qui reçoit l'information acquiert le génotype du donneur. Un tel phénomène a été observé pour la thalassémie<sup>186</sup> et récemment proposé comme l'une des causes possibles de la mutagenèse du syndrome de Bartter de type III<sup>187</sup>. La conversion génique a aussi été examinée pour un gène dont l'environnement chromosomique possède quelques similarités avec *PKDI*. Sur l'ADN de gens souffrant d'une déficience de la 21-hydroxylase encodée par le gène *CYP21* qui mène à une incapacité de synthétiser du cortisol, un glucocorticoïde dont l'un des rôles importants est lié à la résistance au stress<sup>172</sup>, il y a eu conversion génique entre le locus *CYP21* et un pseudogène similaire à 98% au gène *CYP21*<sup>172</sup> situé à 30kb de l'autre. Concernant l'ADPKD1, il est donc possible que certaines altérations de séquence contenues dans les régions homologues se soient retrouvées à l'intérieur du gène *PKDI* par une conversion génique. Cependant, la distance qui sépare le pseudogène du *CYP21* (30kb) est nettement inférieure au ~15Mb comprises entre les *HG* et *PKDI*. De plus, dans le cas de *PKDI*, il y a trois copies homologues au lieu d'une seule. D'après les analyses de Southern blot<sup>70</sup>, les larges réarrangements de séquence, comme c'est le cas pour la conversion génique, ne se feraient que très rarement. Par conséquent, la majorité des mutations et des polymorphismes à l'intérieur de la séquence *PKDI* serait ponctuelle.

Bien sûr, des éléments complètement extérieurs à la séquence du gène *PKDI* et à son environnement peuvent être des sources d'erreurs. L'appareil de réplication ( $10^{-9}$  à  $10^{-10}$  erreur par nucléotide incorporé)<sup>188,189,190</sup> et un niveau de dNTP débalancé en sont des exemples. Bien que beaucoup plus rares, ces événements peuvent atténuer le degré de fidélité de l'appareil de réplication<sup>191</sup> et ainsi provoquer des changements nucléotidiques ponctuels. En plus de ces altérations de séquence, il se peut, tout comme chez le modèle murin *jck* de l'ARPKD obtenu par Iakoubova et al.<sup>192</sup> que certains locus, nommés gènes modificateurs, affectent le degré de gravité de la maladie. Le mécanisme d'action de ces gènes n'est cependant pas bien connu.

La variété des sources mutagènes potentiellement réelles, de nature intragénique ou liées de près ou de loin à *PKD1* en plus des différents locus impliqués dans l'ADPKD (*PKD1*, *PKD2* et *PKD3*) pourraient expliquer non seulement la grande diversité des mutations et des polymorphismes, mais aussi la grande hétérogénéité phénotypique inter- et intrafamiliale rencontrée à l'intérieur de l'un des trois types de polykystose rénale.

Malgré toutes ces hypothèses qui tentent d'expliquer la mécanique qui régit la mutagénèse et qui engendre les divers phénotypes de l'ADPKD, ce phénomène demeure toujours aussi obscur. Notre analyse mutationnelle a donc permis, jusqu'à un certain niveau, d'élaborer une étude génétique de la population québécoise. L'existence d'un triopolymorphisme, à ce jour unique à notre population, rejoint les écrits des historiens sur les mouvements démographiques et nos échanges avec des populations situées à l'extérieur de la province de Québec depuis le début du XVIII<sup>ème</sup> jusqu'à la moitié du XXI<sup>ème</sup> siècle. Ces éléments caractérisent la stabilité et l'homogénéité de la population québécoise. De manière plus pratique, les mutations et les polymorphismes recensés au cours de notre étude mutationnelle seront des marqueurs intrafamiliaux qui nous permettront d'identifier plus facilement l'haplotype morbide et ceux qui en sont porteurs pour les prochaines générations. Avec les études de liaisons génétiques et les tests cliniques en milieu hospitalier, nous apportons un élément nouveau qui pourra, dans certains cas, discriminer plus précisément les gens atteints ou non de l'ADPKD pour une famille donnée. Par ces moyens, nous serons en mesure de mieux appréhender les sujets qui pourraient développer l'ADPKD. Ceci permettra d'avoir un contrôle plus rigoureux sur le développement de l'hypertension artérielle chez les sujets soupçonnés être plus à risque, et ainsi repousser la moyenne d'âge des sujets ADPKD1 en insuffisance rénale.

Dans un proche avenir, des essais permettant d'étudier plus facilement une plus grande partie du gène *PKD1* à l'aide du Multiplex-PCR devraient être envisagés<sup>193</sup>. Cette technique permet d'amplifier dans une même réaction de PCR plusieurs régions différentes d'un gène. D'ailleurs, le Multiplex-PCR a déjà été utilisé pour des analyses mutationnelles du gène du rétinoblastome<sup>194</sup> et de dystrophie musculaire de Duchenne<sup>195</sup>. De plus, le suivi des 29 familles qui ont participé à cette étude permettra peut-être de récupérer éventuellement un rein polykystique ADPKD1 et un autre associé à l'une des deux autres formes de la maladie. De cette manière nous pourrions comparer la clonalité et la perte d'hétérozygotie entre les reins polykystiques associés à l'ADPKD1 et ceux qui sont ADPKD, mais non-associés à l'ADPKD1. Ceci permettrait de vérifier si le modèle du second événement proposé par Qian et al.<sup>125</sup> est observé sur l'ADPKD1 et les autres types d'ADPKD dans la population québécoise.

# **CHAPITRE V**

## **Conclusion**

Notre analyse mutationnelle sur la séquence unique du gène *PKD1* complétée sur 29 familles québécoises avec ADPKD a permis d'identifier 5 nouvelles mutations et 10 polymorphismes différents. Ce projet incarne la complémentarité possible qui peut exister entre la recherche fondamentale et la recherche clinique. Les altérations de séquence identifiées serviront de marqueurs spécifiques aux familles dans lesquelles elles se trouvent pour mieux discriminer les porteurs d'un allèle morbide. Il s'agit de mettre au service des cliniciens des informations recueillies par la biologie moléculaire. Ceci permettra entre autres d'amener un élément informatif supplémentaire aux analyses de liaisons génétiques et aux différents tests cliniques dans le but d'établir un diagnostic pré-symptomatique plus précis. De cette façon, des manifestations extra-rénales comme l'hypertension artérielle pourraient être contrôlées plus tôt dans le développement de l'ADPKD. Par contre, étant donnée la grande difficulté à émettre une corrélation claire entre le génotype et le phénotype de la maladie, l'analyse mutationnelle ne peut être utilisée seule pour diagnostiquer l'ADPKD1. Dans un avenir proche, la mise au point d'une technique simple permettant de séquencer systématiquement l'ensemble du gène *PKD1* permettra d'établir le degré de pathogénéicité réelle des mutations recensées. Il sera aussi intéressant d'établir dans les prochaines années un système d'expression du gène *PKD1* pour vérifier les répercussions des mutations répertoriées sur la structure tridimensionnelle native de la polycystine-1. L'isolement, la purification et la cristallisation de cette protéine seront des objectifs à long terme qui fourniront plusieurs réponses concernant son rôle et sa structure. Ces différentes informations nous permettront sans doute de mieux comprendre l'hétérogénéité phénotypique de la polykystose rénale autosomique dominante.

# **BIBLIOGRAPHIE**

1. Gabow P.A. et Grantham J.J., (1996). Polycystic kidney disease. Schrier R.W. et Gottschalk C.W. éditeurs, 6ième édition, vol I. *Diseases of the kidney*. Little Brown and Company.
2. Zerres K., Muchner G., Bachner L., Deschenes G., Eggermann T., Kaariainen H., Knapp M., Lennert T., Misselwitz J., von Mühlendahl K.E., Neumann H.P.H., Pirson Y., Rudnik-Schöneborn S., Steinbicker V., Wirth B. et Schärer K., (1994). Mapping of the gene for autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD) to chromosome 6p21-cen. *Nature Genet.* 7:429-432
3. Cole B.R., (1990) Autosomal recessive polycystic kidney disease. Gardner K.D. Jr et Berstein J. éditeurs, *The Cystic Kidney*, Landcaster: Kluver.
4. Kaplan B.S., Fay J., Shah V., Dillon M.J. et Barratt T.M., (1989). Autosomal recessive polycystic kidney disease. *Pediatr. Nephrol.* 3:43-49
5. Blyth H. et Ockenden B.G., (1971). Polycystic disease of kidney and liver presenting in childhood. *J. Med. Genet.* 8:257-284
6. Simon J., (1847). On sub-acute inflammation of the kidney. *Med. Chirurg. Trans. Soc. Med. Lond.* 30:141-151
7. Dunnill M.S., (1985). Acquired cystic disease of the kidney: Discussion. Grantham J.J. and Gardner K.D. Jr. éditeurs, *Problems in Diagnosis and Management of Polycystic Kidney Disease*. Kansas City: PKR Foundation.
8. Matson M.A. et Cohen E.P., (1990). Acquired cystic kidney disease: Occurrence, prevalence, and renal cancers. *Medicine* 69:217-226
9. Grantham J.J., (1991). Acquired cystic kidney disease. *Kidney* 40:143-152
10. Dalgaard O.Z., (1957). Bilateral polycystic disease of the kidneys: A follow-up of two hundred and eighty-four patients and their families. *Acta Med. Scand. Suppl.* 328:1-251
11. Danovitch G.M., (1976). Clinical features and pathophysiology of polycystic kidney disease in man. Gardner K.D. Jr. éditeur, *Cystic Disease of the Kidney*. Wiley.
12. Higgins C.C., (1952). Bilateral polycystic kidney disease: Review of ninety-four cases. *Arch. Surg.* 65:318-329

13. Iglesias C.G., Torres V.E., Offord K.P., Holley K.E., Beard C.M. et Kurland L.T., (1983). Epidemiology of adult polycystic kidney disease, Olmstead County, Minnesota: 1935-1980. *Am. J. Kidney Dis.* **2**:630-639
14. Daoust M.C., Reynolds D.M., Bichet D.G. et Somlo S. (1995). Evidence for a third genetic locus for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Genomics* **25**:733-736
15. Parfrey P.S., Bear J.C., Morgan J., Cramer B.C., McManamon P.J., Gault M.H., Churchill D.N., Sigh M., Hewitt R., Somlo S. et Reeders S.T., (1990). The diagnosis and prognosis of autosomal dominant polycystic kidney disease. *N. Engl. J. Med.* **323**:1085-1090
16. Florijn K.W., Van Saase J.L., Breuning M.H. et Chang P.C., (1992). Autosomal dominant polycystic kidney disease and hypertension: a review. *Contrib. Nephrol.* **97**:71-92
17. Gabow P.A., (1993). Autosomal dominant polycystic kidney disease. *New Engl. J. Med.* **329**:332-342
18. Grantham J.J., (1994). Pathogenesis of renal cyst expansion: opportunities for therapy. *Am. J. Kidney Dis.* **23**:210-218
19. Grantham J.J., (1993). Polycystic kidney disease: hereditary and acquired. *Adv. Intern. Med.* **38**:409-420
20. Fick G.M. et Gabow P.A., (1994). Hereditary and acquired cystic disease of the kidney. *Kidney Int.* **46**:951-964
21. Eckardt K.-U., Mollmann M. et Neumann R., (1989). Erythropoietin in polycystic kidneys. *J. Clin. Invest.* **84**:1160-1166
22. Torres V.E., Wiebers D.O. et Forbes G.S., (1990). Cranial computed tomography and magnetic resonance imaging in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **1**:84-90
23. Grünfeld J.-P., Albouze G., Jungers P., Landais P., Dana A., Droz D., Moynot A., Lafforgue B., Boursztyl E. et Franco D., (1985). Liver changes and complications in adult polycystic kidney disease. *Adv. Nephrol.* **14**:1-20
24. Hossack K.-F., Leddy C.L., Jonhson A.M., Schrier R.W. et Gabow P.A., (1988). Ecocardiographic findings in autosomal dominant polycystic kidney disease. *N. Engl. J. Med.* **319**:907-912

25. Bigelow N.H., (1953). The association of polycystic kidneys with intracranial aneurysms and other related disorders. *Am. J. Med. Sci.* **225**:485-494
26. Chapman A.B., Rubinstein D., Hughes R., Stears J.C., Earnest M.P., Johnson A.M., Gabow P.A. et Kaehny W.D., (1992). Intracranial aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease. *N. Engl. J. Med.* **327**:916-920
27. Huston J., Torres V.E. et Wiebers D.O., (1993). Value of magnetic resonance angiography for detection of intracranial aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **3**:1871-1877
28. Ruggieri P.M., Poulos N., Masaryk T.J., Ross J.S., Obuchowski N.A., Award I.A., Braun W.E., Nally J., Lewin J.S. et Modic M.T., (1994). Occult intracranial aneurysms in polycystic kidney disease: Screening with MR angiography. *Radiology.* **191**:33-39
29. Fick G.M. et Gabow P.A., (1994). Natural history of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Ann. Rev. Med.* **45**:23-29
30. Grantham J.J. et Gardner K.D. Jr, (1985). Diagnosis of autosomal dominant polycystic kidney disease: Discussion. Grantham J.J. et Gardner K.D. Jr. éditeurs. *Problems in diagnosis and management of polycystic kidney disease*. Kansas City: PKR Foundation.
31. Leung A. W.-L., Byddley G.M., Steiner R.E., Bryant D.J. et Young I.R., (1984). Magnetic resonance imaging of the kidneys. *Am. J. Roentgenol.* **143**:1215-1227
32. Collins F.S., (1992). Positional cloning: Let's not call it reverse anymore. *Nature Genet.* **1**:3-6
33. Botstein D., White R.L., Skolnick M. et Davis R.W., (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* **32**:314-331
- 33-A. Kruglyak L., (1997). The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies. *Nature Genet.* **17**:21-24
34. Gusella J.F., Wexler N.S., Conneally P.M., Naylor S.L., Anderson M.A., Tanzi R.E., Watkins P.C., Ottima K., Wallace M.R. et Sakaguchi A.Y., (1977). A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature* **306**:205-218

35. Reeders S.T., Breuning M.H., Davies K.E., Nicholls R.D., Jarman A.P., Higgs D.R., Pearson P.L. et Weatherall D.J., (1985). A highly polymorphic DNA marker linked to adult polycystic kidney disease on chromosome 16. *Nature* **317**:542-544
36. Bear J.C., McManomon P., Morgan J., Payne R.H., Lewis H., Gault M.H. et Churchill D.N., (1984). Age at clinical onset and at ultrasonographic detection of adult polycystic kidney disease: data for genetic counselling. *Am. J. Med. Genet.* **18**:45-53
37. Higgs D.R., Goodbourn S.E.Y., Wainscoat J.S., Clegg J.B. et Weatherall D.J., (1981). Highly variable regions of DNA flank the human alpha globin genes. *Nucleic Acids Res.* **9**:4213-4224
38. Southern E.M., (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:503-517
39. Ott J., (1974). Estimation of the recombination fraction in human pedigrees: efficient computation of the likelihood for human linkage studies. *Am. J. Hum. Genet.* **26**:588-597
40. Suarez B.K. et Hodge S.E., (1979). A simple method to detect linkage for a rare recessive diseases: an application to juvenile diabetes. *Clin. Genet.* **15**:126-136
41. Reeders S.T., (1987). A "reverse genetic" approach to autosomal dominant polycystic kidney disease. *Pediatr. Nephrol.* **1**:405-410
42. Breuning M.H., Brunner H., Saris J.J., van Omman G.J.B., Reeders S.T., Ijdo J.W., Verwest A. et Pearson P.L., (1987). Improved early diagnosis of adult polycystic kidney disease with flanking DNA markers. *The Lancet* **2**:1359-1361
43. Reeders S.T., Keith T., Green P., Germino G.G., Barton N.J., Lehmann O.J., Brown V.A., Phipps P., Morgan J., Bear J.C. et Parfrey P., (1988). Regional localization of the autosomal dominant polycystic kidney disease locus. *Genomics* **3**:150-155
44. Hyland V.J., Suthers G.K., Friend K., MacKinnon R.N., Callen D.F., Breuning M.H., Keith T., Brown V.A., Phipps P. et Sutherland G.R., (1990). Probe, VK5B, is located in the same interval as the autosomal dominant polycystic kidney disease locus, PKD1. *Hum. Genet.* **84**:286-288

45. Breuning M.H., Snijdwint F.G.M., Brunner H., Verwest A., Ijdo J.W., Saris J.J., Dauwerse J.G., Blonden L., Keith T., Callen D.F., Hyland V.J., Xiao G.H., Scherer G., van Ommen G.J.B., (1990). Map of 16 polymorphic loci on the short arm of chromosome 16 close to the polycystic kidney disease gene (PKD1). *J. Med. Genet.* **27**:603-613
46. Somlo S., Wirth B., Germino G.G., Weinstat-Saslow D., Gillespie G.A., Himmelbauer H., Steevens L., Couke P., Willens P., Bachner L., Coto E., Lopez-Larrea C., Peral B., San Millan J.L., Saris J.J., Breuning M.H., Frischauf A.-M. et Reeders S.T., (1992). Fine genetic localization of the gene for autosomal dominant polycystic kidney disease (PKD1) with respect to physically mapped markers. *Genomics* **13**:152-158
47. Germino G.G., Weinstat-Saslow D., Himmerbauer H., Gillespie G.A.J., Somlo S., Wirth B., Barton N., Harris K.L., Frischauf A.-M. et Reeders S.T., (1992). The gene for autosomal dominant polycystic kidney disease lies in a 750-kb C<sub>p</sub>G-rich region. *Genomics* **13**:144-151
48. Zeitlin H.C. et Weatherall D.J., (1983). Selective expression with the human  $\alpha$  globin gene complex following chromosome-dependant transfer into diploid mouse erythroleukaemia cells. *Mol. Biol. Med.* **1**:489-500
49. Shutler G., Korneluk R.G., Tsilfidis C., Mahadevan M., Bailly J., Smeets H., Jansen G., Wieringa B., Lohman F., Aslanidis C. et al., (1992). Physical mapping and cloning of the proximal segment of the myotonic dystrophy gene region. *Genomics* **13**:518-525
50. Germino G.G., Barton N.J., Lamb J., Higgs D.R., Harris P., Xiao G.H., Scherer G., Nakamura Y. et Reedes S.T., (1990). Identification of a locus which shows no genetic recombination with the autosomal dominant polycystic kidney disease gene on chromosome 16. *Am. J. Hum. Genet.* **46**:925-933
51. Kaplan J.-C. et Delpech M., (1993). *Biologie moléculaire et médecine*. 2ième édition, Flammarion Médecine-Sciences.
52. Mullis K.B. et Faloona F.A., (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**:335-350
53. Harris P.C., Thomas S., Ratcliffe P.J., Breuning M.H., Coto E. et Lopez-Larrea C., (1991). Rapid genetic analysis of families with polycystic kidney disease 1 by means of a microsatellite marker. *The Lancet* **338**:1484-1487

54. Snarey A., Thomas S., Schneider M.C., Pound S.E., Borton N., Wright A.F., Harris P.C., Reeders S.T. et Frischauf A.-M., (1994). Linkage disequilibrium in the region of the autosomal dominant polycystic kidney disease gene (PKD1). *Am. J. Hum. Genet.* **55**:365-371
55. Peral B., Ward C.J., San Millan J.L., Thomas S., Stalling R.L., Moreno F. et Harris P.C., (1994). Evidence of linkage disequilibrium in the Spanish polycystic kidney disease 1 population. *Am. J. Hum. Genet.* **54**:899-908.
56. Kerem B.-S., Rommens J.M., Buchanan J.A., Markiewicz D., Cox T.K., Chakravarti A., Buchwals M. et Tsui L.-C., (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: Genetic analysis. *Science* **245**:1073-1079
57. Brook J.D., McCurrach M.E., Harley H.G., Buckler A.J., Church D., Aburatani H., Hunter K., Stanton V.P., Thirion J.-P., Hudson T., Sohn R., Zelmelman B., Snell R.G., Rundle S.A., Crow S., Davies J., Shelbourne P., Buxton J., Jones C., Juvoven V., Johnson K., Harper P.S., Shaw D.J. et Housman D.E., (1992). Molecular basis of myotonic dystrophy: Expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* **68**:799-808
58. La Spada A.R., Wilson E.M., Lubahn D.B., Harding A.E. et Fischbeck K.H., (1991). Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* **352**:77-79
59. Huntington's Disease Collaborative Research Group, (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's Disease chromosomes. *Cell* **72**:971-983
60. Kremer E.J., Pritchard M., Lynch M., Yu S., Holman K., Baker E., Warren S.T., Schlessinger D., Sutherland G.R. et Richards R.I., (1991). Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)<sub>n</sub>. *Science* **252**:1711-1714
61. Herrera L., Kakati S., Gibas L., Pietrzak E. et Sandberg A., (1986). Brief clinical report: Gardner syndrome in a man with an intestinal deletion of 5q. *Am. J. Med. Genet.* **25**:473-476
62. The European Polycystic Kidney Disease Consortium, (1994). The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. *Cell* **77**:881-894

63. European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium, (1993). Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16. *Cell* **75**:1305-1315
64. Harris P.C., Ward C.J., Peral B. et Hughes J., (1995). Autosomal dominant polycystic kidney disease: molecular analysis. *Hum. Mol. Genet.* **4**:1745-1749
65. Hughes J., Ward C.J., Peral B., Aspinwall R., Clark K., San Millan J.L., Gamble V. et Harris P.C., (1995). The polycystic kidney disease 1 (*PKDI*) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nature Genet.* **10**:151-160
66. The International Polycystic Kidney Disease Consortium, (1995). Polycystic kidney disease: The complete structure of the *PKDI* gene and its protein. *Cell* **81**:289-298
67. Turco A.E., Rossetti S., Bresin E., Corra S., Gammaro L., Maschio G. et Pignatti P.F., (1995). A novel nonsense mutation in the *PKDI* gene (C3817T) is associated with autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) in a large three-generation Italian family. *Hum. Mol. Genet.* **4**:1331-1335
68. Peral B., Gamble V., San Millan J.L., Strong C., Sloane-Stanley J., Moreno F. et Harris P.C., (1995). Splicing mutations of the polycystic kidney disease 1 (*PKDI*) gene induced by intronic deletion. *Hum. Mol. Genet.* **4**:569-574
69. Peral B., Ong A.C.M., San Millan J.L., Gamble V., Rees L. et Harris P.C., (1996). A stable, nonsense mutation associated with a case of infantile onset polycystic kidney disease 1 (*PKDI*). *Hum. Mol. Genet.* **4**:539-542
70. Peral B., San Millan J.L., Ong A.C.M., Gamble V., Ward C.J., Strong C. et Harris P.C., (1996). Screening the 3' region of the polycystic kidney disease 1 (*PKDI*) gene reveals six novel mutations. *Am. J. Hum. Genet.* **58**:86-96
71. Rossetti S., Bresin E., Restagno G., Carbonara A., Corra S., De Prisco O., Pignatti P.F., et Turco A.E., (1996). Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) in an Italian family carrying a novel nonsense mutation and two missense changes in exon 44 and 45 of the *PKDI* gene. *Am. J. Med. Genet.* **65**:155-159
72. Neophytou P., Constantinides R., Lazarou A., Pierides A. et Deltas C.C., (1996). Detection of a novel nonsense mutation and an intragenic polymorphism in the *PKDI* gene of a Cypriot family with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hum. Genet.* **98**:437-442

73. Peral B., Gamble V., Strong C., Ong A.C.M., Sloane-Stanley J., Zerres K., Winearls C.G. et Harris P.C., (1997). Identification of mutations in the duplicated region of the polycystic kidney disease 1 gene (*PKDI*) by a novel approach. *Am. J. Hum. Genet.* **60**:1399-1410
74. Torra R., Badenas C., Peral B., Darnell A., Gamble V., Turco A. et Harris P.C., (1997). Recurrence of the PKD1 nonsense mutation Q4041X in Spanish, Italian and British families. *Hum. Mutat.* (sous presse).
75. Watnick T.J., Piontek K.B., Cordal T.M., Weber H., Gandolph M.A., Qian F., Lens X.M., Neumann H.P.H. et Germino G.G., (1997). An unusual pattern of mutation in the duplicated portion of *PKDI* is revealed by use of a novel strategy for mutation detection. *Hum. Mol. Genet.* **6**:1473-1481
76. Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayakis K. et Sekiya T., (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:2766-2770
77. Nagamine C.M., Chan K. et Lau Y.F.C., (1989). A PCR artifact: Generation of heteroduplexes. *Am. J. Hum. Genet.* **45**:337-339
78. Perry D.J. et Carrell R.W., (1992). Hydrolink gels: A rapid and simple approach to the detection of DNA mutations in thromboembolic disease. *J. Clin. Pathol.* **45**:158-160
79. The American PKD1 Consortium (ADPKD1 Consortium), (1995). Analysis of the genomic sequence for the autosomal dominant polycystic kidney disease (*PKDI*) gene predicts the presence of a leucine-rich repeat. *Hum. Mol. Genet.* **4**:575-582
80. Mange A.P. et Mange E.J., (1990). *Genetics: human aspects*, 2ième édition, Sinauer associates inc.
81. Rothberg J.M., Jacobs J.R., Goodman C.S. et Artavanis-Tsakonas S., (1990). *slit*: an extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains. *Genes Dev.* **4**:2169-2187
82. Oldberg A., Antonsson P., Lindblom K. et Heinegard D., (1989). A collagen-binding 59kD protein (fibromodulin) is structurally related to the small interstitial proteoglycans PG-S1 and PG-S2 (decorin). *EMBO J.* **8**:2601-2604

83. Lamballe F., Klein R. et Barbacid M., (1991). *trkc*, a new member of the *trk* family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* **66**:967-979
84. Oldberg A., Antonsson P. et Heinegard D., (1987). The partial amino acid sequence of bovine cartilage proteoglycan, deduced from a cDNA clone, contains numerous Ser-Gly sequences arranged in homologous repeats. *Biochem J.* **243**:255-259
85. Taylor M.E., Conary J.T., Lennartz M.R., Stahl P.D. et Drickamer K., (1990). Primary structure of the mannose receptor contains multiple motif resembling carbohydrate-recognition domain. *J. Biol. Chem.* **265**:12156-12162
86. Bevilacqua M.P., Stengelin S., Gimbrone M.A. Jr et Seed B., (1989). Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: An inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* **243**:1160-1165
87. Harpaz Y. et Chothia C., (1994). Many of the immunoglobulin superfamily domains in cell adhesion molecules and surface receptors belong to a new structural set which is close to that containing variable domains. *J. Mol. Biol.* **238**:528-539
88. Jones E.Y., Harlos K., Bottomley M.J., Robinson R.C., Driscoll P.C., Edwards R.M., Clements J.M., Dudgeon T.J. et Stuart D.I., (1995). Crystal structure of an integrin-binding fragment of vascular cell adhesion molecule-1 at 1,8Å resolution. *Nature* **373**:539-544
89. Kornblihtt A.R., Umezawa K., Vibe-Pederson K. et Baralle F.E., (1985). Primary structure of human fibronectin: differential splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene. *EMBO J.* **4**:1755-1759
90. Streuli M., Krueger N.X., Hall L.R., Schlossman S.F. et Saito H., (1988). A new member of the immunoglobulin superfamily that has a cytoplasmic region homologous to the leucocyte common antigen. *J. Exp. Med.* **168**:1523-1530
91. Volkmer H., Hassel B., Wolff J.M., Frank R. et Rathjen F.G., (1992). Structure of the axonal surface recognition molecule neurofascin and its relationship to a neural subgroup of the immunoglobulin superfamily. *J. Cell. Biol.* **118**:149-161
92. McFarland K.C., Sprengel R., Phillips H.S., Kohler M., Rosemblyt N., Nikolics K., Segaloff D.L. et Seeburg P.H., (1989). Luteinizing hormone-releasing hormone receptor: an unusual member of the G protein-coupled receptor family. *Science* **245**:494-499

93. Ward C.J., Turley H., Ong A.C.M., Comley M., Biddolph S., Chetty R., Ratcliffe P.J., Gatter K. et 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. USA* **93**:1524-1528
94. Griffin M.D., Torres V.E., Grande J.P. et Kumar R., (1996). Immunolocalization of polycystin in human tissues and cultured cells. *Proc. Assoc. Am. Physicians* **108**:185-197
95. Palsson R., Sharma C.P., Kim K., McLaughlin M., Brown D. et Arnaout M.A., (1996). Characterization and cell distribution of polycystin, the product of autosomal dominant polycystic kidney disease gene 1. *Molecular Medecine* **2**:702-711
96. Geng L., Segad Y., Peissel B., Deng N., Pei Y., Carone F., Rennke H.G., Glücksmann-Kuis A.M., Schneider M.C., Ericsson M., Reeders S.T. et Zhou J., (1996). Identification and localization of polycystin, the *PKD1* gene product. *J. Clin. Invest.* **98**:2674-2682
97. Ibraghimov-Breskrovnaya O., Dackowski W.R., Foggensteiner L., Coleman N., Thirus S., Petry L.R., Burn T.C., Connors T.D., Van Raay T., Bradley J., Qian F., Onuchic L.F., Watnick T.J., Piontek K., Hakin R.M., Landers G.M., Germino G.G., Sandford R. et Klinger K.W., (1997). Polycystin: *In vitro* synthesis, *in vivo* tissue expression, and subcellular localization identifies a large membrane-associated protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:6397-6402
98. Geng L., Segal Y., Pavlova A., Barros E.J.G., Löhning C., Lu W., Nigam S.K., Frischauf A.-M., Reeders S.T. et Zhou J., (1997). Distribution and developmentally regulated expression of murine polycystin. *Am. J. of Physiol.* **272**:F451-F459
99. Burrow C.R., Thorton K., Hyink D. et Wilson P.D., (1997). Developmentally regulated, early expression of the *PKD1*-encoded gene product "polycystin-1" in normal human kidneys. *J. Am. Soc. Nephrol.* **8**:370A (abrégé)
100. Kimberling W.J., Fain P.R., Kenyon J.B., Goldgar D., Sujansky E. et Gabow P.A., (1988). Linkage heterogeneity of autosomal dominant polycystic kidney disease. *New Eng. J. Med.* **319**:913-918

101. de Almeida S., de Almeida E., Peters D., Pinto J.R., Tavora I., Lavinha J., Breuning M. et Prata M.M., (1995). Autosomal dominant polycystic kidney disease evidence for the existence of a third locus in a Portuguese family. *Hum. Genet.* **96**:83-88
102. Kimberling W.J., Kumar S., Gabow P.A., Kenyon J.B., Connolly C.J. et Somlo S., (1993). Autosomal dominant polycystic kidney disease: localization of the second gene to chromosome 4q13-q23. *Genomics* **18**:467-472
103. Peters D.J., Spruit L., Saris J.J., Ravine D., Sandkuijl L.A., Fossdal R., Boersma J., van Eijk R., Norby S., Constantinou-Deltas C.D., Pierides A., Brissenden J.E., Frants R.R., van Ommen G.-J.-B. et Breuning M.H., (1993). Chromosome 4 localization of a second gene for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nature Genet.* **5**:359-362
104. Mochizuki T., Wu G., Hayashi T., Xenophontos S.L., Veldhuisen B., Saris J.J., Reynolds D.M., Cai Y., Gabow P.A., Pierides A., Kimberling W.J., Breuning M.H., Deltas C.C., Peters D.J.M. et Somlo S., (1996). *PKD2*, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* **272**:1339-1342
105. Xenophontos S., Constantinides R., Hayashi T., Mochizuki T., Somlo S., Pierides A. et Deltas C.C., (1997). A translational frameshift mutation included by a cytosine insertion in the polycystic kidney disease 2 gene (*PKD2*). *Hum. Mol. Genet.* **6**:949-952
106. Hayashi T., Mochizuki T., Reynolds D.M., Wu G., Cai Y. et Somlo S., (1997). Characterization of the exon structure of the polycystic kidney disease 2 gene (*PKD2*). *Genomics* **44**:131-136
107. Wu G., Mochizuki T., Le T.C., Cai Y., Hayashi T., Reynolds D.M. et Somlo S., (1997). Molecular cloning, cDNA sequence analysis, and chromosomal localization of mouse *Pkd2*. *Genomics* **45**:220-223
108. Williams M.E., Marubio L.M., Deal C.R., Hans M., Brust P.F., Philipson L.H., Miller R.J., Johnson E.C., Harpold M.M. et Ellis S.B., (1994). Structure and functional characterization of neuronal alpha 1E calcium channel subtypes. *J. Biol. Chem.* **269**:22347-22357
109. Qian F., Germino F.J., Cai Y., Zhang X., Somlo S. et Germino G.G., (1997). PKD1 interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain. *Nature Genet.* **16**:179-183

110. Tsiokas L., Kim E., Arnould T., Sukhatme V.P. et Walz G., (1997). Homo- and heterodimeric interactions between the gene products of *PKD1* and *PKD2*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:6965-6970
111. Fields S. et Song O., (1992). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**:245-246
112. Chevray P.M. et Nathans D., (1992). Protein interaction cloning in yeast: identification of mammalian proteins that interact with the leucine zipper of *Jun*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:5789-5793
113. McLachlan A.D., (1978). The double helix coiled-coil structure of murein lipoprotein from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **121**:493-506
114. Moy G.W., Mendoza L.M., Schulz J.R., Swanson W.J., Glabe C.G. et Vacquier V.D., (1996). The sea urchin sperm receptor for egg jelly is a modular protein with extensive homology to the human polycystic kidney disease protein, PKD1. *J. Cell. Biol.* **133**:809-817
115. Hinck L., Nathke I.S., Papkoff J. et Nelson W.J., (1994). Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J. Cell. Biol.* **125**:1327-1340
116. Nakagawa S. et Takeichi M., (1995). Neural crest cell-cell adhesion controlled by sequential and subpopulation-specific expression of novel cadherins. *Development* **121**:1321-1332
117. Evan A.P. et Gardner K.D. Jr., (1976). Comparaison of human polycystic and medullary cystic kidney disease with diphenylamine-induced cystic disease. *Lab. Invest.* **35**:93-101
118. Croker J.F.S., Brown D.M., Borch R.F. et Vernier R.L., (1972). Renal cystic disease induced in newborn rats by diphenylamine derivates. *Am. J. Pathol.* **66**:343-350
119. Evan A.P., Hong S.K., Gardner K.D. Jr., Park Y.S. et Itagaki R., (1978). Evolution of the collecting tubular lesion in diphenylamine-induced renal disease. *Lab. Invest.* **38**:242-252
120. Perey D.Y.E., Herdman R.C. et Good R.A., (1967). Polycystic renal disease: A new experimental model. *Science.* **158**:494-496

121. Thomas J.O., Cox A.J. Jr. et Deeds F., (1957). Kidney cysts produced by diphenylamine. *Stanford Med. Bull.* **15**:90-93
122. Evan A.P. et Gardner K.D. Jr., (1979). Nephron obstruction in nordihydroguaiaretic acid induced renal cystic disease. *Kidney Int.* **15**:7-19
123. Rankin C.A., Grantham J.J. et Calvet J.P. (1992). c-fos expression is hypersensitive to serum-stimulation in cultured cystic kidney cells from the C57BI/6J-cpk mouse. *J. Cell Physiol.* **152**:578-586
124. Grantham J.J., (1993). Fluid secretion, cellular proliferation, and the pathogenesis of renal epithelial cysts. *J. Am. Soc. Nephrol.* **3**:1841-1857
125. Calvet J.P., (1994). Injury and development in polycystic kidney disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hyperten.* **3**:340-348
126. Carpenter G. et Cohen S., (1990). Epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* **265**:7709-7712
127. Nadasdy T., Lasizik Z., Lajoie G., Blick K.E., Wheeler D.E. et Silva F.G., (1995). Proliferative activity of cyst epithelium in human renal cystic diseases. *J. Am. Soc. Nephrol.* **5**:1462-1468
128. Grantham J.J., Geiser J.L. et Evan A.P., (1987). Cyst formation and growth in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int.* **31**:1145-1152
129. Cowley B.D., Chadwick L.F., Grantham J.J. et Calvet J.P., (1991). Elevated proto-oncogene expression in polycystic kidneys of the C57BL/6J (cpk) mouse. *J. Am. Soc. Nephrol.* **1**:1048-1053
130. Wilson P.D., (1996). Pathogenesis of polycystic kidney disease: Altered cellular function. Watson M.L. et Torres V.E. éditeurs, *Polycystic kidney disease*. Oxford U.K., Oxford University Press.
131. Klingel R., Dippold W., Stoorkel S., Meyer K. et Kohler H., (1992). Expression of differentiation antigens and growth-related genes in normal kidney, autosomal dominant polycystic kidney disease and renal cell carcinoma. *Am. J. Kidney Dis.* **19**:22-30
132. Lanoix J., D'Agati V., Szabolcs M. et Trudel M., (1996). Dysregulation of cellular proliferation and apoptosis mediates human autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). *Oncogène* **13**:1153-1160

133. Shi Y., Glynn J.M., Guilbert L.J., Cotter T.G., Bissonnette R.P. et Green D.R., (1992). Role for *c-myc* in activation-induced apoptotic cell death in T cell hybridomas. *Science* **257**:212-214.
134. Fanidi A., Harrington E.A. et Evan G.I., (1992). Cooperative interaction between *c-myc* and *bcl-2* proto-oncogenes. *Nature* **359**:554-556
135. Bachinsky D.R., Sabolic I., Emmanouel D.S., Jefferson D.M., Carone F.A., Brown D. et Perrone R.D., (1995). Water channel expression in human ADPKD kidneys. *Am. J. Physiol.* **268**:F398-F403
136. Grantham J.J., Ye M., Gattone V.H. II et Sullivan L.P., (1995). In vitro fluid secretion by epithelium from polycystic kidneys. *J. Clin. Invest.* **95**:195-202
137. Ye M. et Grantham J.J., (1993). The secretion of fluid by renal cysts from patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *N. Engl. J. Med.* **329**:310-313
138. Wilson P.D., Sherwood A.C., Palla K., Du J., Watson R. et Norman J.T., (1991). Reversed polarity of Na<sup>+</sup>K, ATPase: mislocation to apical plasma membranes in polycystic kidney disease epithelia. *Am. J. Physiol.* **260**:F420-F430
139. Brill S.R., Ross K.E., Davidow C.J., Ye M., Grantham J.J. et Caplan M.J., (1996). Immunolocalization of ion transport proteins in human autosomal dominant polycystic kidney epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:10 206-10 211
140. Hanaoka K., Devuyst O., Schwiebert E.M., Wilson P.D. et Guggino W.B., (1996). A role for CFTR in human autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am. J. Physiol.* **270**:C189-C399
141. Avner E.D., Sweeney W.E. Jr. et Nelson W.J., (1992). Abnormal sodium pump distribution during renal tubulogenesis in congenital murine polycystic kidney disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:7447-7451
142. Kawa G., Nagao S., Yamamoto A., Omori K. et Komatz Y., (1994). Sodium pump distribution is not reversed in the DBA/2FG-*pcy*, polycystic kidney disease model mouse. *J. Am. Soc. Nephrol.* **4**:2040-2049
143. Wilson P.D., Fulkenstein L., Gatti L., Racusen L. et Burrow C.R., (1994). NAK-ATPase isoform expression patterns provide a mechanism for apical membrane localization in human fetal kidneys and in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). *J. Am. Soc. Nephrol.* **5**:640 (abrégé).

144. Robinson S.W., Wilson P.D. et Fambrough D.M., (1995). The beta-2 subunit of the Na, K-ATPase is apically targeted in MDCK cells. *Mol. Biol. Cell.* **6**:70 (abrégé).
145. Martinez-Hernandez A. et Amenta P.S., (1983). The basement membrane in pathology. *Lab Invest.* **48**:656-677
146. Bernfeld M.R. et Banerjee S.D., (1978). The basal lamina in epithelial mesenchymal morphogenetic interactions. Hay E.D. éditeur. *Biology and chemistry of basement membranes*. New-York, Academic Press.
147. Kleinman H.K., Klebe R.J. et Martin G.R., (1981). Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. *J. Cell Biol.* **88**:473-485
148. Hay E.D., (1984). Cell-matrix interaction in the embryo: cell shape, cell surface, cell skeletons and their role in differentiation. Liss A.R. Inc. éditeur, *The role of extracellular matrix in development*. New-York.
149. Frjita M., Spray D.C., Choi H., Saez J., Jefferson D.M. et Hertzberg E., (1986). Extracellular matrix regulation of cell-cell communication and tissue-specific gene expression in primary liver cultures. Liss A.R. Inc. éditeur, *Cellular endocrinology: hormonal control of embryonic and cellular differentiation*. New-York.
150. Cuppage F.E., Huseman R.A., Chapman A. et Grantham J.J., (1980). Ultrastructure and function of cysts from human adult polycystic kidneys. *Kidney Int.* **17**:372-381
151. Katz S.K., Hakki A., Miller A.S. et Finkelstein S., (1989). Ultrastructural tubular basement membrane lesions in adult polycystic kidney disease. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **19**:352-359
152. Wilson P.D., (1996). Pathogenesis of polycystic kidney disease: Altered cellular function. Watson M.L. et Torres V.E. éditeurs, *Polycystic kidney disease*. Oxford U.K., Oxford University Press.
153. Granot Y., Van Putten V., Przekwas J., Gabow P.A. et Schrier R.W., (1990). Intra- and extracellular proteins in human normal and polycystic kidney epithelial cells. *Kidney Int.* **37**:1301-1309

154. Candiano G., Gusmano R., Altieri P., Bertelli R., Ginevri F., Coviello D.A., Sessa A., Caridi G. et Ghiggeri G.M., (1992). Extracellular matrix formation by epithelial cells from human polycystic kidney cysts in culture. *Virchows Arch B cell Pathol.* **63**:1-9
155. Calvet J.P., (1993). Polycystic kidney disease: Primary extracellular matrix abnormality or defective cellular differentiation? *Kidney Int.* **43**:101-108
156. Fine L., (1996). Gene transfer into the kidney: Promise for unravelling disease mechanisms, limitations for human gene therapy. *Kidney Int.* **49**:612-619
157. Reeders S.T., (1992). Multilocus polycystic disease. *Nature Genet.* **1**:235-237
158. Qian F., Watnick T.J., Onuchic L.F. et Germino G.G., (1996). The molecular basis of focal cyst formation in human autosomal dominant polycystic kidney disease type 1. *Cell* **87**:979-987
159. Brasier J.L. et Henske E.P., (1997). Loss of the polycystic kidney disease (PKD1) region of chromosome 16p13 in renal cyst cells supports a loss-of-function model for cyst pathogenesis. *J. Clin. Invest.* **99**:194-199
160. William C.L., Busque L., Griffith B.B., Favara B.E., McClain K.L., Duncan M.H. et Gilliland D.G., (1994). Langerhans'-cell histiocytosis (histiocytosis X): a clonal proliferative disease. *New Engl. J. Med.* **331**:154-160
161. Lu W., Peissel B., Babakhanlou H., Pavlova A., Geng L., Fan X., Larson C., Brent G. et Zhou J., (1997). Perinatal lethality with kidney and pancreas defects in mice with a targeted *Pkd1* mutation. *Nature Genet.* **17**:179-181
162. Young S.D., Krawczyk S.H., Matteucci M.D. et Toole J.J., (1991). Triple helix formation inhibits transcription elongation *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 10023-10026
163. Rao B.S., Manor H. et Martin R.G., (1988). Pausing in simian virus 40 DNA replication by a sequence containing (dG-dA)<sub>27</sub>·(dT-dC)<sub>27</sub>. *Nucleic Acids Res.* **16**:8077-8094
164. Wang G., Seidman M.M. et Glazer P.M., (1996). Mutagenesis in mammalian cells induced by triple helix formation and transcription-coupled repair. *Science* **271**:802-805
165. Sambrook J., Fritsch E.F. et Maniatis T., (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2ième édition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New-York.

166. Daoust M.C., (1993). *Étude génétique de familles québécoises avec polykystose rénale autosomale dominante (ADPKD)*. Mémoire de Maîtrise, Grade Maître ès sciences en biochimie, Université de Montréal.
167. Terwilliger J.D. et Ott J., (1994). *Handbook of human genetic linkage*. John Hopkins University Press.
168. Sanger F., Nicklen S. et Coulson A., (1977). DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463-5467
169. Beaudet A.L. et Tsui L.C., (1993). Special feature: a suggested nomenclature for designating mutations. *Hum. Mutat.* **2**:245-248
170. Lohning C., Nowicka U. et Frischauf A.M., (1997). The mouse homology of *PKDI*: sequence analysis and alternative splicing. *Mamm. Genome* **8**:307-311
171. Zhang Z.X., Wakamatsu N., Mules E.H., Thomas G.H. et Gravel R.A., (1994). Impact of premature stop codons on mRNA levels in infantile Sandhoff disease. *Hum. Mol. Genet.* **3**:139-145
172. White P.C., Tusie-Luna M.T., New M.I. et Speiser P.W., (1994). Mutations in steroid 21 hydroxylase (CYP21). *Hum. Mut.* **3**:373-378
173. Vogel F. et Motulsky A.G., (1986). *Human genetics-problems and approaches*. 2ième édition, Springer Berlin.
174. Blout E.R., de Lozé C., Bloom S.M. et Fasman G.D., (1960). The dependence of the conformations of synthetic polypeptides on amino acid composition. *J. Amer. Chem. Soc.* **82**:3787-3789
175. Chou P.Y. et Fasman G.D., (1974). Prediction of protein conformation. *Biochemistry* **13**:222-244
176. Robson B. et Pain R.H., (1971). Analysis of the code relating sequence to conformation in proteins: Possible implications for the mechanism of formation of helical region. *J. Mol. Biol.* **58**:237-259
177. Kotelchuk D. et Scheraga H.A., (1968). The influence of short-range interactions on protein conformation. I. Side chain-backbone interactions within a single peptide unit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **61**:1163-1170
178. Lewis P.N., Gō N., Gō M., Kotelchuck D. et Scheraga H.A., (1970). Helix probability profiles of denatured proteins and their correlation with native structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **65**:810-815

179. Finkelstein A.V. et Ptitsyn O.B., (1976). A theory of protein molecule self-organization. IV. Helical and irregular local structures of unfolded protein chains. *J. Mol. Biol.* **103**:15-24
180. Grompe M., (1993). The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nature Genet.* **5**:111-117
181. Hayashi K., (1991). PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in genomic DNA. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* **1**:34-38
182. Linteau P.A. et Brown C., (1990). *Histoire générale du Canada*, éditions Boréal compact, Montréal, Québec.
183. Vogel F. et Röhrborn G., (1965). Mutationsvorgänge bei der Entstehung von Hämoglobinvarianten. *Humangenetik* **1**:635-650
184. Vogel F. et Kopun M., (1977). Higher frequencies of transitions among point mutations. *J. Mol. Evol.* **9**:159-180
185. Streisinger G., Okada Y., Emrich J., Newton J., Tsugita A., Terzaghi E. et Inouye M., (1966). Frameshift mutations and the genetic code. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **31**:77-84
186. Lauer J., Shen C.K. et Maniatis T., (1980). The chromosomal arrangement of human alpha like globin genes: sequence homology and alpha-globin gene deletions. *Cell* **20**:119-130
187. Simon D.B., Bindra R.S., Mansfield T.A., Nelson-Williams C., Mendoca R.S., Schurman S., Nayir A., Alpay H., Bakkalogu A., Rodriguez-Soriano J., Morales J.M., Sanjad S.A., Taylor C.M., Pilz D., Brem A., Trachtman H., Griswold W., Richard G.A., John E. et Lifton R.P., (1997). Mutations in the chloride channel gene, *CLCNKB*, cause Bartter's syndrome type III. *Nature Genet.* **17**:171-178
188. Drake J.W., (1970). *The molecular basis of mutation*. Holden day éditeur, San Francisco, California.
189. Nalbantoglu J., Goncalves O. et Meuth M., (1983). Structure of mutant alleles of the *aprt* locus in Chinese hamster ovary cells. *J. Mol. Biol.* **167**:575-594
190. Thacker J., (1985). The molecular nature of mutations in cultured mammalian cells: a review. *Mutation Res.* **150**:431-442
191. Mathews C.K. et Ji J., (1992). DNA precursor asymmetries, replication fidelity and variable genome evolution. *Bioessays* **14**:295-301

192. Iakoubova O.A., Dushkin H. et Beier D.R., (1995). Localization of a murine recessive polykystic kidney disease mutation and modifying loci that affect disease severity. *Genomics* **26**:107-114
193. Henegariu O., Heerema N.A., Dlouhy S.R., Vance G.H. et Vogt P.H., (1997). Multiplex-PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques* **23**:504-511
194. Lohmann D., Horsthemke B., Gillessen-Kaesbach G., Stefani F.H. et Höfler H., (1992). Detection of small *RBI* gene deletions in retinoblastoma by multiplex-PCR and high-resolution gel electrophoresis. *Hum. Genet.* **89**:49-53
195. Kilimann M.W., Pizzuti A., Grompe M. et Caskey C.T., (1992). Point mutations and polymorphisms in the human dystrophin gene identified in genomic DNA sequence amplified by multiplex-PCR. *Hum. Genet.* **89**:253-258