

# Rapport intermédiaire du projet

## **Etude de l'implication de la polarité planaire dans la polykystose rénale dominante**

déposé par Evelyne Fischer

**Equipe EGDM dirigée par Marco Pontoglio**

Evelyne Fischer, M.D., Ph.D.

"Expression Génique, Développement et Maladies" (EGDM)

Equipe 26 / INSERM U1016/ CNRS UMR 8104 / Université Paris-Descartes

Institut Cochin , Dpt. Génétique et Développement

24, Rue du Faubourg Saint Jacques

75014 Paris

Tel : +33 1 53 73 27 46

Email : [evelyne.fischer@inserm.fr](mailto:evelyne.fischer@inserm.fr)

L'objectif de ce projet de recherche est d'identifier les mécanismes moléculaires qui donnent aux cellules tubulaires la possibilité de construire leur polarisation planaire/orientation de la division cellulaire et d'autre part, d'étudier l'implication de la signalisation PCP (polarité planaire de la cellule) dans la polykystose rénale.

L'ensemble de ce projet a été retardé en raison de la fermeture d'une des animaleries de l'Institut Cochin, ce qui a nécessité un transfert de nos lignées de souris par transfert d'embryons vers une nouvelle animalerie.

### **A Production de modèles animaux déficients pour la voie PCP**

Il a été démontré que des mutations des gènes PCP pouvaient modifier l'orientation de la division cellulaire (ODC). La surexpression d'un dominant négatif du gène Dishevelled, un des gènes-clés de la voie PCP, perturbe l'alignement des mitoses chez l'embryon de poisson zèbre en cours de gastrulation. Afin de tester l'implication potentielle de la voie PCP dans l'alignement des mitoses des cellules des tubules rénaux, nous avons exprimé ce même dominant négatif de Dishevelled, qui contient la partie C-terminale de la protéine (DEP+), dans des souris transgéniques.

Nous avons produit des lignées de souris transgéniques dont l'expression du dominant négatif de Dishevelled était sous le contrôle du promoteur de la KSP-cadherine. Nous avons ensuite croisé ces souris avec des animaux exprimant la KSP Cre recombinaise, afin d'exprimer de façon efficace le transgène dans les tubules rénaux dès leur période d'élongation. Une des trois lignées de souris transgéniques produit une polykystose massive dans environ 10 à 20% des animaux double transgéniques analysés (construction dominant négatif, Ksp Cre recombinaise). Les kystes rénaux affectent l'ensemble des segments tubulaires. Le phénotype présenté par les animaux (polykystose) est associé à une expression du transgène au sein des cellules rénales et suggère que les protéines Dishevelled jouent bien un rôle dans le maintien du calibre tubulaire.

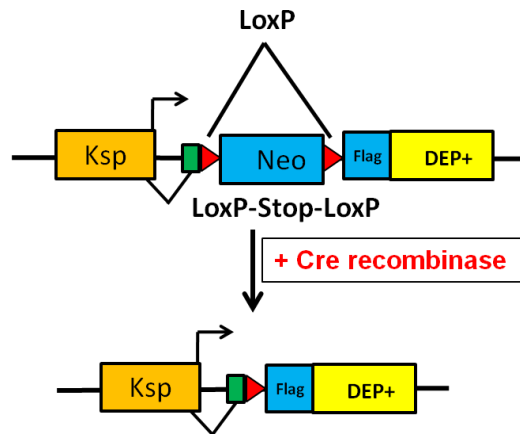


Figure 1: Expression conditionnelle du transgène DEP+ spécifiquement dans le rein, basée sur une stratégie LoxP-Stop-LoxP. L'expression du dominant négatif est efficace seulement dans les cellules où la Cre recombinaise a excisé la cassette Néomycine (Néo) qui prévient son expression (Stop).

Malheureusement, seule une faible proportion (10 à 20% des animaux double transgéniques) présente un phénotype polykystique évident. Cette faible pénétrance pourrait être due à la nature de l'insertion du transgène en multicopie. L'effet de la résolution complète opérée par la CRE recombinaise sur une

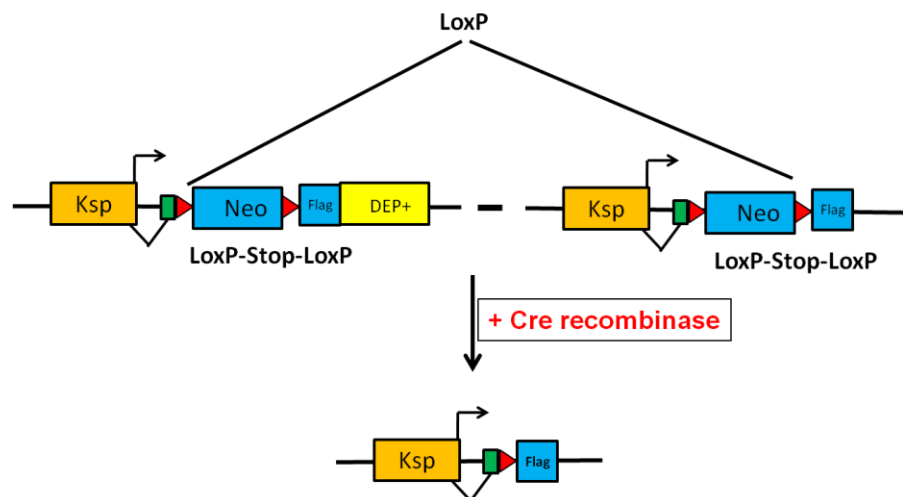


Figure 2: Représentation schématique d'une insertion en multicopie du transgène dont la dernière copie est tronquée. La Cre recombinaise a excisé la cassette Néomycine (Néo) dans toutes les copies du transgène, aboutissant à une construction finale dépourvue du dominant négatif.

insertion qui comporterait des copies tronquées à l'une ou l'autre des deux extrémités du transgène peut aboutir à une insertion finale qui pourrait être tronquée de l'effecteur (le dominant négatif) (voir Figure 2 comme exemple). Afin de tester cette hypothèse, et d'obtenir une expression fiable et soutenue du dominant négatif de Dishevelled, nous avons utilisé une Cre recombinaise faiblement active, permettant une excision d'un nombre restreint des sites LoxP. Pour ceci, nous avons croisé nos animaux transgéniques « dominant négatif de Dishevelled » avec une lignée de souris exprimant la Cre recombinaise de façon inducible dans l'ensemble des cellules de l'embryon (Rosa Cre ERT2). Nous avons administré des doses suboptimales de tamoxifène (1/10 de la dose utilisée habituellement pour les expériences de recombinaison), à différents temps au cours de l'embryogenèse (E18.5 et E19.5), ainsi qu'en post natal précoce (entre 1 et 3 jours de vie). Certains des animaux

double transgéniques ainsi obtenus présentait des dilatations tubulaires, dans les segments tubulaires exprimant le dominant négatif quelques jours après activation de la Cre recombinase. Malheureusement, cette stratégie n'a pas permis d'augmenter le pourcentage d'animaux double transgénique présentant des lésions rénales. Ces résultats confirment le rôle de Dishevelled dans le maintien du calibre tubulaire.

En parallèle, afin de s'affranchir de l'insertion multicopie du transgène dans le modèle précédemment décrit, une stratégie de « knock in » au locus rosa 26 avait été initiée. Cette stratégie, a donné lieu à une série de lignée de souris transgéniques qui n'ont été favorables sur le plan soit de l'expression soit de la transmission du transgène. Deux de ces lignées n'ont pas transmis le transgène à leur descendance, et la troisième lignée a transmis le transgène mais n'a donné lieu à une expression significative du transgène après activation. Dans cette dernière lignée, nous n'avons pas observé de phénotype. Nous faisons l'hypothèse que l'absence d'expression du transgène était en partie liée au caractère « sans promoteur » de la construction. En effet, l'expression du dominant négatif était sous le contrôle des éléments régulateurs du locus Rosa26.

Une nouvelle stratégie de knock in est en cours de production. Cette stratégie sera basée sur une construction LoxP, Stop LoxP/ dominant négatif qui sera couplé à une molécule fluorescente, sous le contrôle du promoteur CAG au locus Rosa 26. Cette stratégie devrait permettre d'une part l'insertion monocopie de la construction et d'autre part l'expression conséquent du dominant négatif après excision des sites LoxP par l'action de la Cre recombinase.

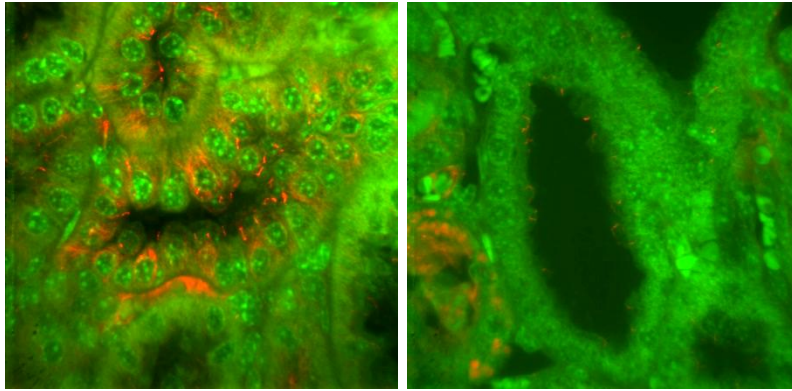
## **B Caractérisation phénotypique des animaux transgéniques**

### 1) Ciliogenèse et dominant négatif de Dishevelled dans les cellules tubulaires rénales.

Il a été montré par l'équipe de Wallingford que la surexpression d'un court fragment C-terminal de Dishevelled (entièrement compris dans notre construction) dans des larves de *Xénope* empêchait l'accrochage des corps basaux à la membrane cellulaire de l'épiderme cilié, compromettant la ciliogenèse.

Afin d'évaluer un effet possible de l'expression de DEP+ sur la ciliogenèse des cellules tubulaires rénales, nous avons analysé la présence de cils primaires dans les cellules tubulaires des animaux double transgéniques. Nous avons pu montrer que les cellules tubulaires étaient ciliées dans les segments tubulaires exprimant le transgène mais n'étant pas encore dilatés. Les structures tubulaires dilatées, exprimant DEP+, étaient également ciliées (voir Figure 3 comme exemple). Cependant la présence de cil primaire est perdue dans les kystes de très grande taille.

Nos résultats suggèrent que l'expression du dominant négatif Dishevelled DEP+ provoque la formation de kystes sans empêcher la formation de cil primaire.



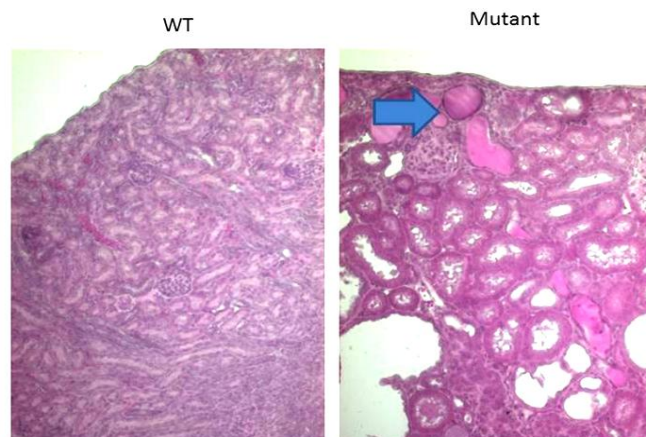
**Figure 3 : Les cils primaires des cellules rénales tubulaires ne sont pas affectés par la surexpression d'un dominant négatif de Dishevelled (DEP+).** Les cils primaires sont marqués en rouge par un anticorps anti-tubuline acétylée sont identifiés chez le mutant (panel de droite comparé au panel de gauche, animal contrôle de la même portée).

2) Analyse de l'activation de la voie beta-caténine dans les animaux double transgéniques.

Il a été décrit par plusieurs équipes que la surexpression du dominant négatif de Dishevelled chez le Xenope interfère avec la voie Wnt non canonique/PCP mais n'affecte pas l'activation de la voie Wnt canonique (beta caténine).

Nous avons analysé le rôle de l'expression du dominant négatif sur l'activation de la voie Wnt canonique (beta caténine) dans les cellules tubulaires rénales. En effet, une hyperactivation de la voie Wnt canonique par elle-même pourrait être responsable de la formation de kystes. Nos résultats ont montré que chez les animaux surexprimant le dominant négatif de Dishevelled, l'activation de la voie beta caténine était observée seulement dans les kystes volumineux (localisation de la beta caténine dans le noyau des cellules tubulaires rénales) mais n'était pas détecté dans des tubules pré-kystiques ou en cours de dilatation. Ce résultat indique que la surexpression du dominant négatif de Dishevelled n'est responsable d'une activation de la voie Wnt canonique.

**Figure 4: Surexpression du dominant négatif de dishevelled (DEP+) et signalisation Wnt canonique.** Immunofluorescence d'une section de rein embryonnaire mutant E18.5 (panel droit) versus control (panel gauche). Les coupes ont été marquées par un anticorps anti-beta caténine et contre colorées par de l'hématoxyline-éosine. La flèche indique l'accumulation locale de la beta caténine nucléaire dans un tubule



En conclusion, l'analyse des animaux exprimant le dominant négatif Dishevelled dans les cellules tubulaires a montré le rôle clé de l'un des gènes « core » de la voie PCP dans le maintien du calibre tubulaire au cours de l'élongation. Nos résultats ont montré que la formation de dilatations tubulaires/kystes était due à une anomalie de la signalisation Wnt non canonique/PCP et que la surexpression du dominant négatif dans les cellules épithéliales rénales n'affectait pas la Wnt canonique. Enfin, nous avons montré que la surexpression du dominant Dishevelled n'affectait pas la ciliogenèse dans les tubules rénaux.

Ce projet sera poursuivi par la production d'un modèle murin permettant une surexpression efficace et fiable du dominant négatif de Dishevelled, ce qui devrait permettre d'identifier les mécanismes moléculaires de polarisation planaire des cellules tubulaires, dont les perturbations sont à l'origine de la formation de kystes.