



Etude de la régulation à distance des gènes *PKD1* et *PKD2* impliqués dans la polykystose rénale autosomique dominante

Unité Inserm 1078

Génétique

Génomique fonctionnelle
Biotechnologies

Encadrants : Pr Claude Férec
Stéphanie Moisan



Institut national
de la santé et de la recherche médicale

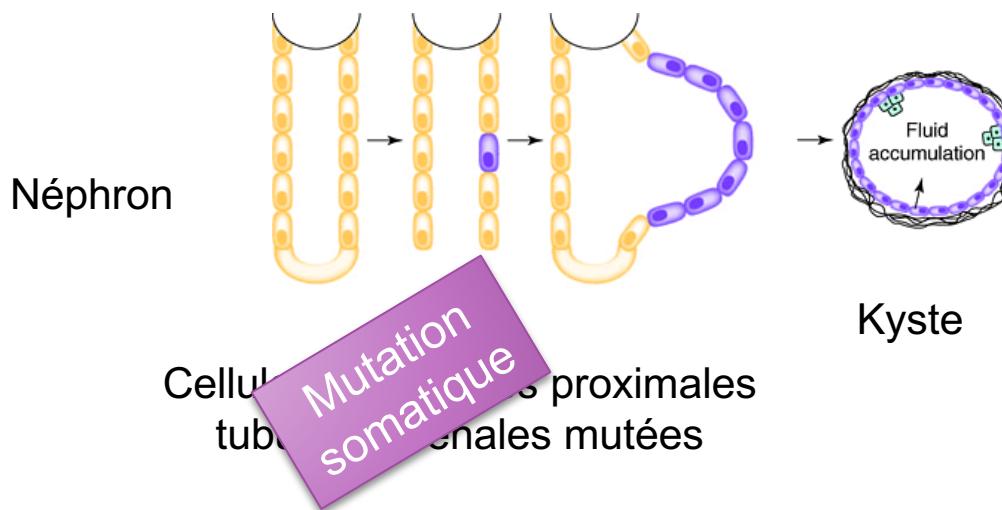
La polykystose rénale autosomique dominante (PKAD)

Généralités

- Incidence 1/500 à 1/1000
- Manifestations cliniques :
 - Insuffisance Rénale Chronique puis Terminale
 - Développement de kystes au niveau des reins



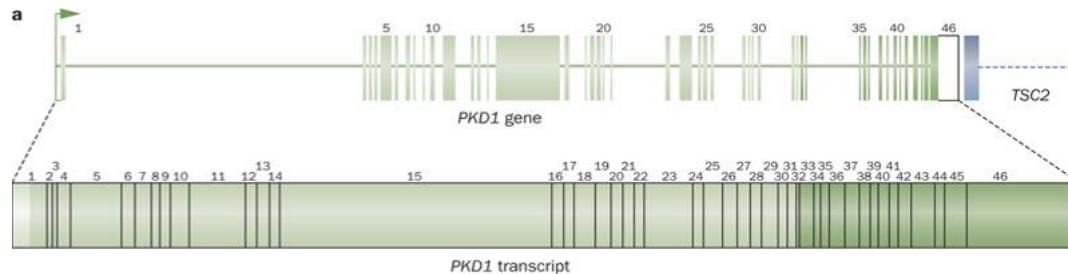
Formation de kystes



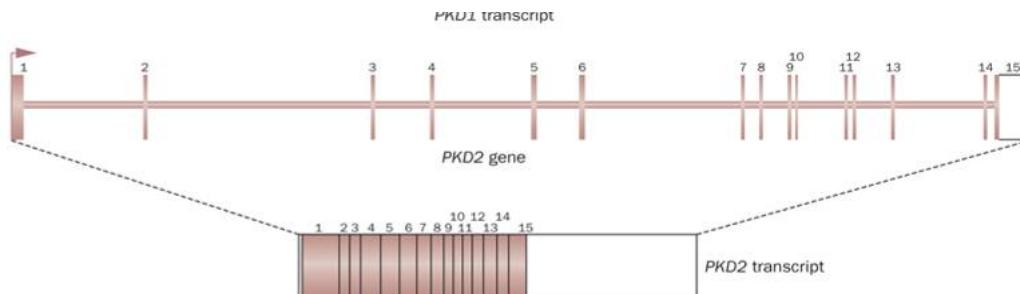
La polykystose rénale autosomique dominante (PKAD)

Etiologie

- Gènes *PKD1* / *PKD2* impliqués dans PKAD + de 1 400 mutations



PKD1 : chr16
52 kb
Duplications nombreuses

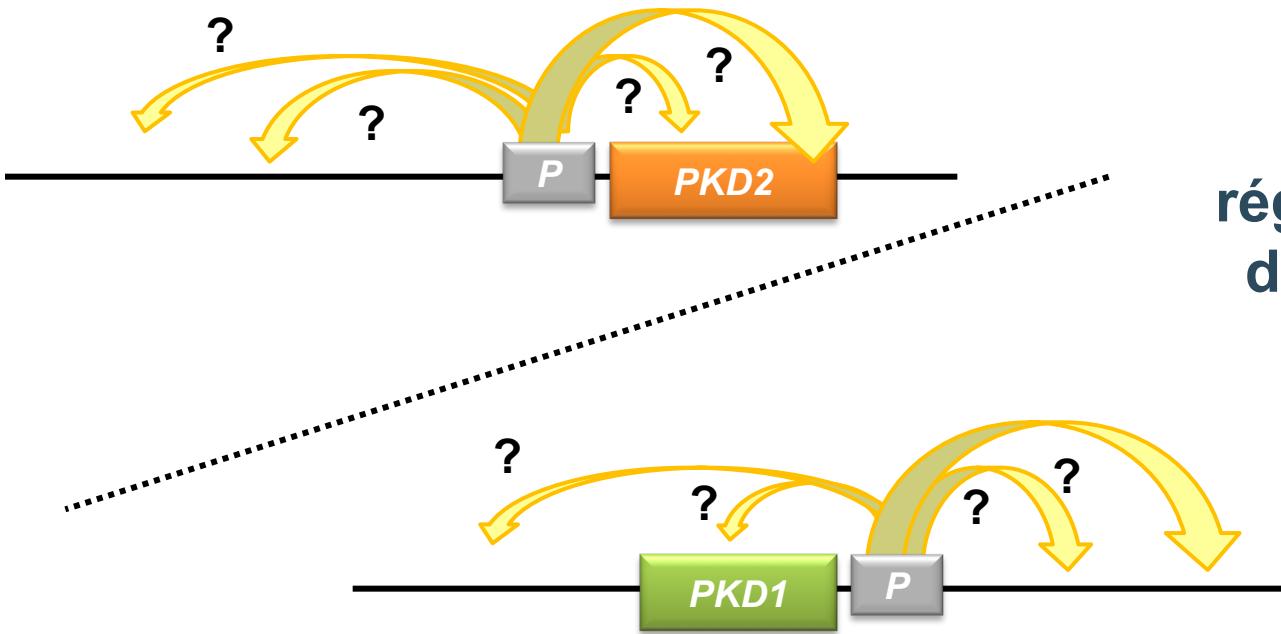


PKD2 : chr4
68 kb

Contexte de l'étude

Hypothèses

- Cas cliniques atypiques
 - Lorsque ni l'un ni l'autre des gènes ne présente de mutation
 - Lorsque l'âge d'apparition des signes cliniques ne coïncide pas avec la mutation trouvée
- Régulation des gènes *PKD1* et *PKD2* mal connue



Existe-t-il une
régulation à distance
des gènes *PKD1* et
PKD2 ?

Matériel et méthodes

Matériel biologique

→ Remise en culture de cellules primaires

- **Cellules saines contrôles**

Récolte d'urines de volontaires sains

40 prélèvements



- **Cellules pathologiques**

Pièces kystiques

issues de néphrectomies de patients PKAD

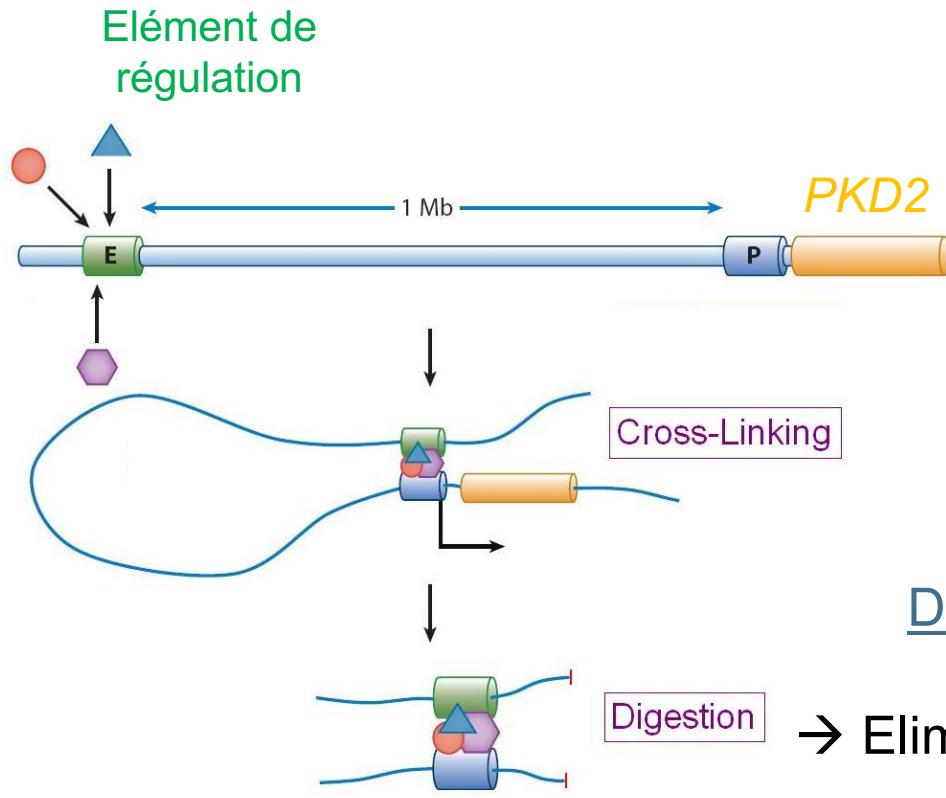
7 néphrectomies

Milieu de culture REGM (Lonza) sélectif des cellules épithéliales rénales

Matériel et méthodes

Technique utilisée : Copie Conforme de Capture de Conformation Chromatinienne (5C)

1^{ère} étape : Confection de librairie

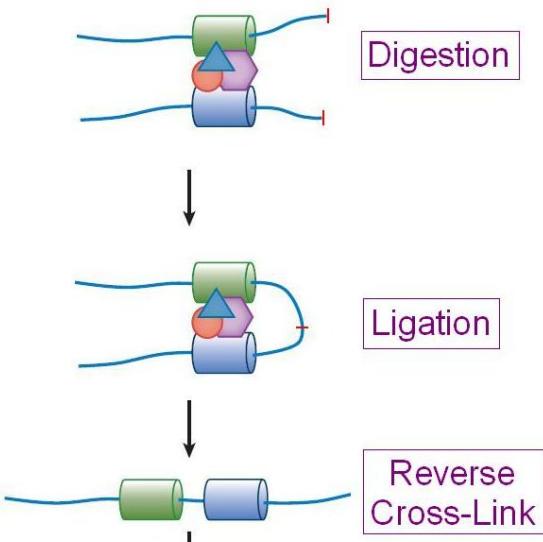


Cross-linking
Ou fixation au formaldéhyde

Digestion de l'ADN génomique par une
enzyme de restriction

→ Eliminer les séquences entre les deux loci
en interaction

Technique utilisée : Copie Conforme de Capture de Conformation Chromatinienne (5C)



Ligations des produits digérés

Bouts cohésifs des locus engagés dans une interaction ont une forte probabilité de se lier ensemble

→ Ligations intra-moléculaires privilégiées

Reverse Cross-link

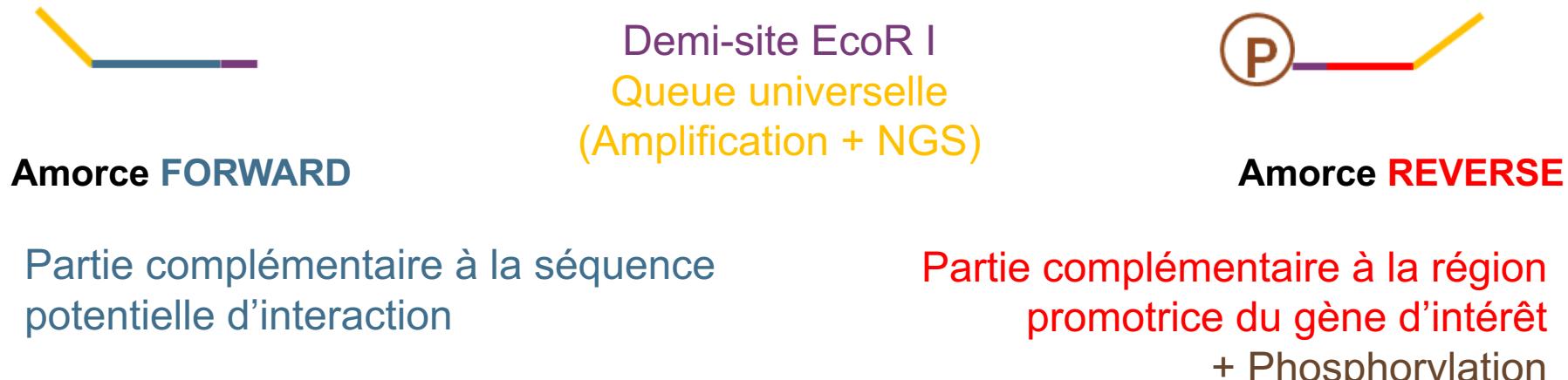
**Librairie
« 3C »**

Confection d'une librairie

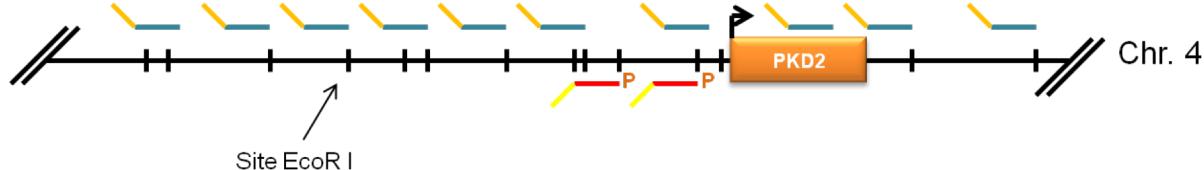
Séquences en interaction accolées

Technique utilisée : Copie Conforme de Capture de Conformation Chromatinienne (5C)

2^{ème} étape : Conception des amorces pour l'amplification



Vision linéaire



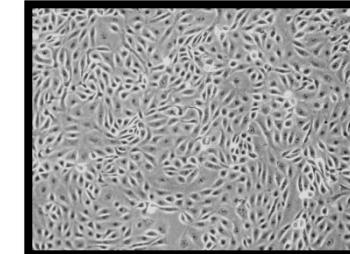
Conversion en librairie 5C

GAATTC

Résultats

Récolte des échantillons

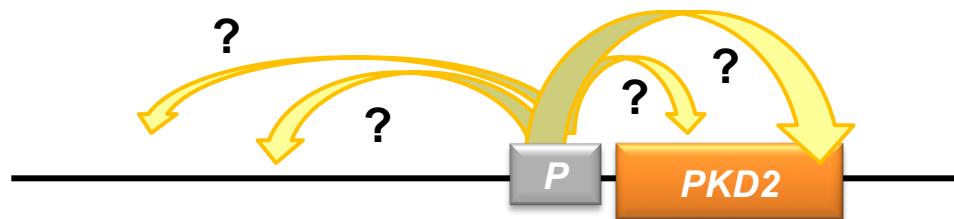
- Pièces kystiques issues de patients PKAD
→ Mutés sur le gène *PKD1*
PKD2 wild type



Cellules épithéliales proximales tubulaires rénales

Interactions entre la région promotrice de *PKD2* et les régions régulatrices hypothétiques *cis*

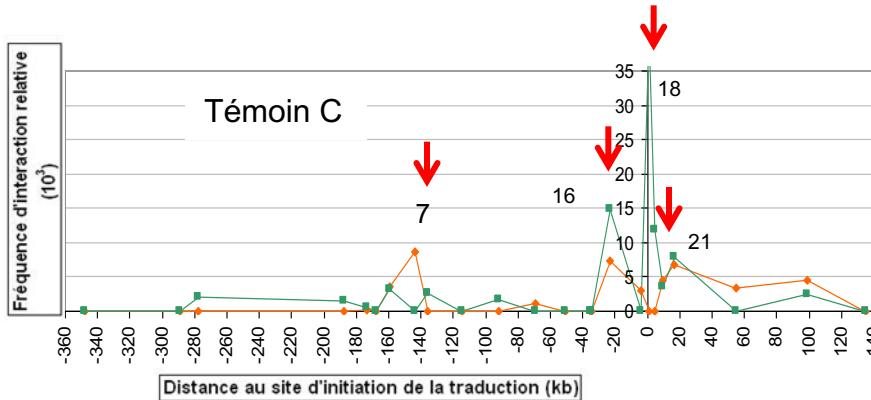
PKD2 wild type
→ Régulation basale



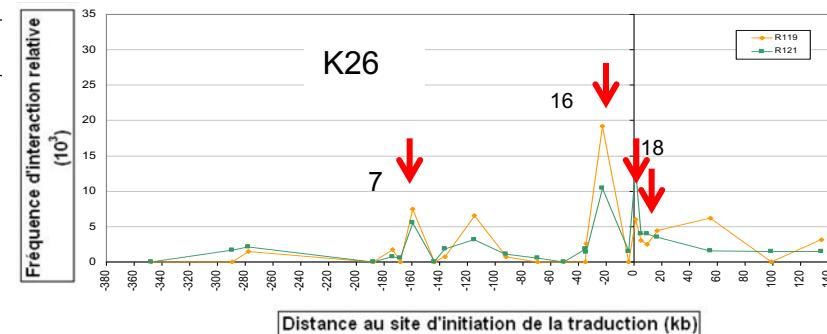
Résultats

Interactions entre la région promotrice de *PKD2* et les régions régulatrices hypothétiques *cis*

Fréquences d'interaction relatives en fonction de la distance au site d'initiation de la traduction



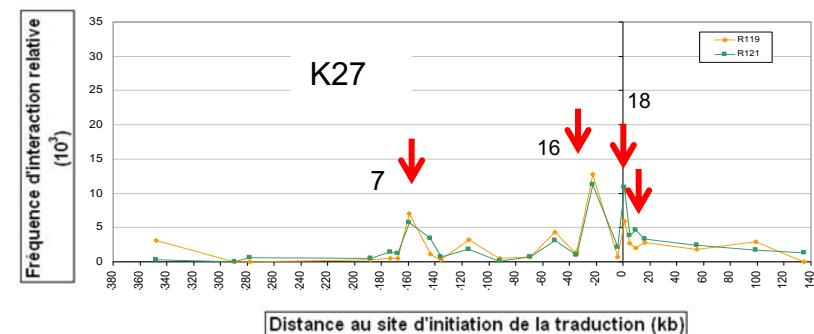
▪ Robustesse de la technique



- Quatre régions retrouvées chez l'ensemble des librairies analysées suite au NGS

En amont du gène
A l'intérieur du gène

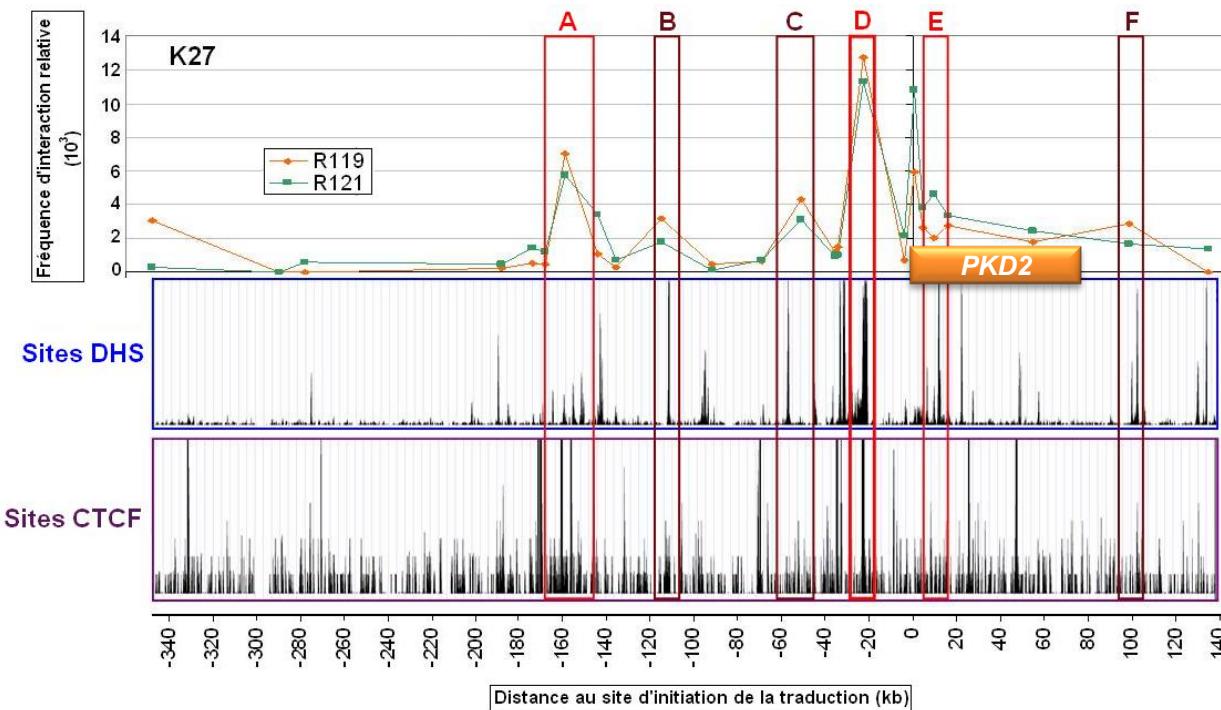
{ -150 kb
- 20 kb
+ 0,8 kb
+ 16 kb



Résultats

Interactions entre la région promotrice de *PKD2* et les régions régulatrices hypothétiques *cis*

Comparaison avec des profils DHS et CTCF



- A chaque région d'intérêt mise en évidence avec la technique 5C
→ pic DHS et/ou CTCF élevé

Discussion

Caractérisation des cellules urinaires

Cellules épithéliales rénales

Confirmation grâce aux marqueurs Zonula Occludens 1 (ZO-1) ou CD31



Génotypage des témoins contrôles

- Deux contrôles de sexes différents
- Profils d'interactions similaires

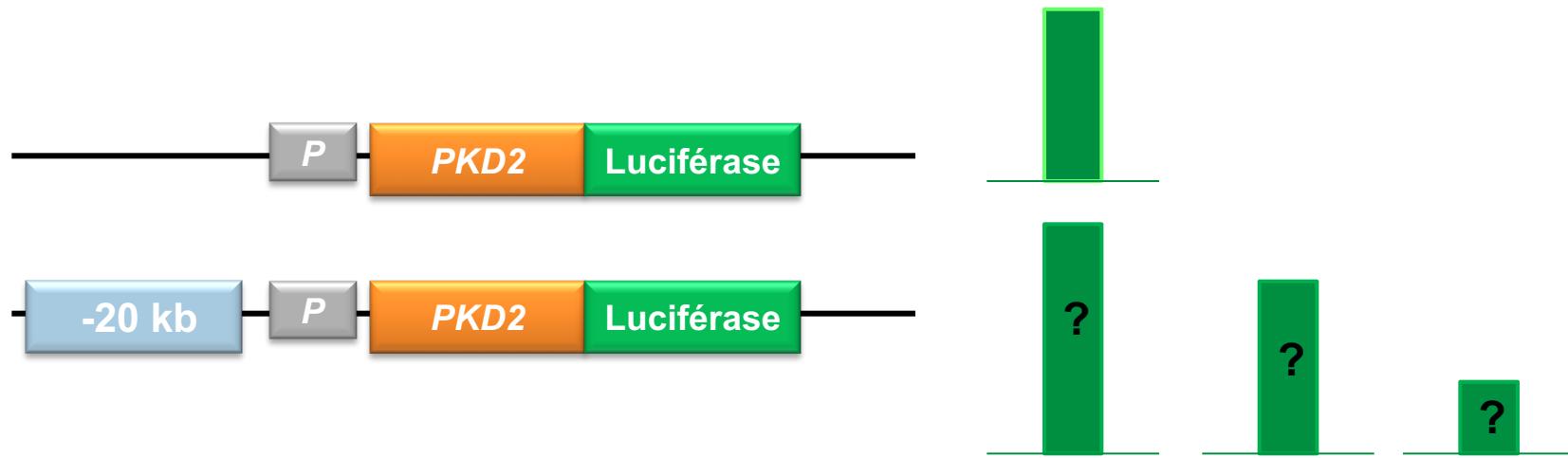
Perspectives

Tests fonctionnels de l'impact des régions potentiellement impliquées dans la régulation du gène *PKD2*

Tests de gène rapporteur

Clonage des régions en amont de la région promotrice de *PKD2*

→ Impact sur l'expression du gène ?



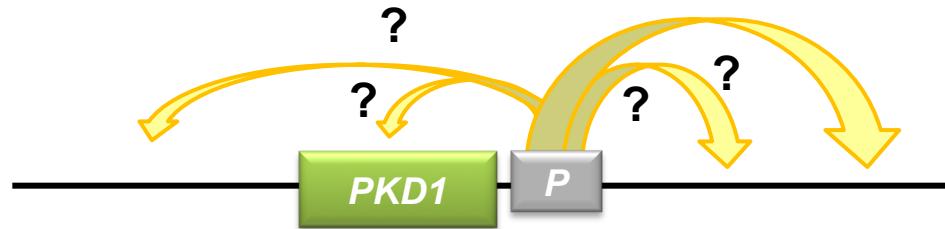
Identification de la/les protéine(s) mise(s) en jeu dans l'interaction

ChIP

Perspectives

Etude du gène *PKD1*

→ 85 % des mutations



Etude avec patients mutés sur *PKD2*

Différence des profils d'interaction

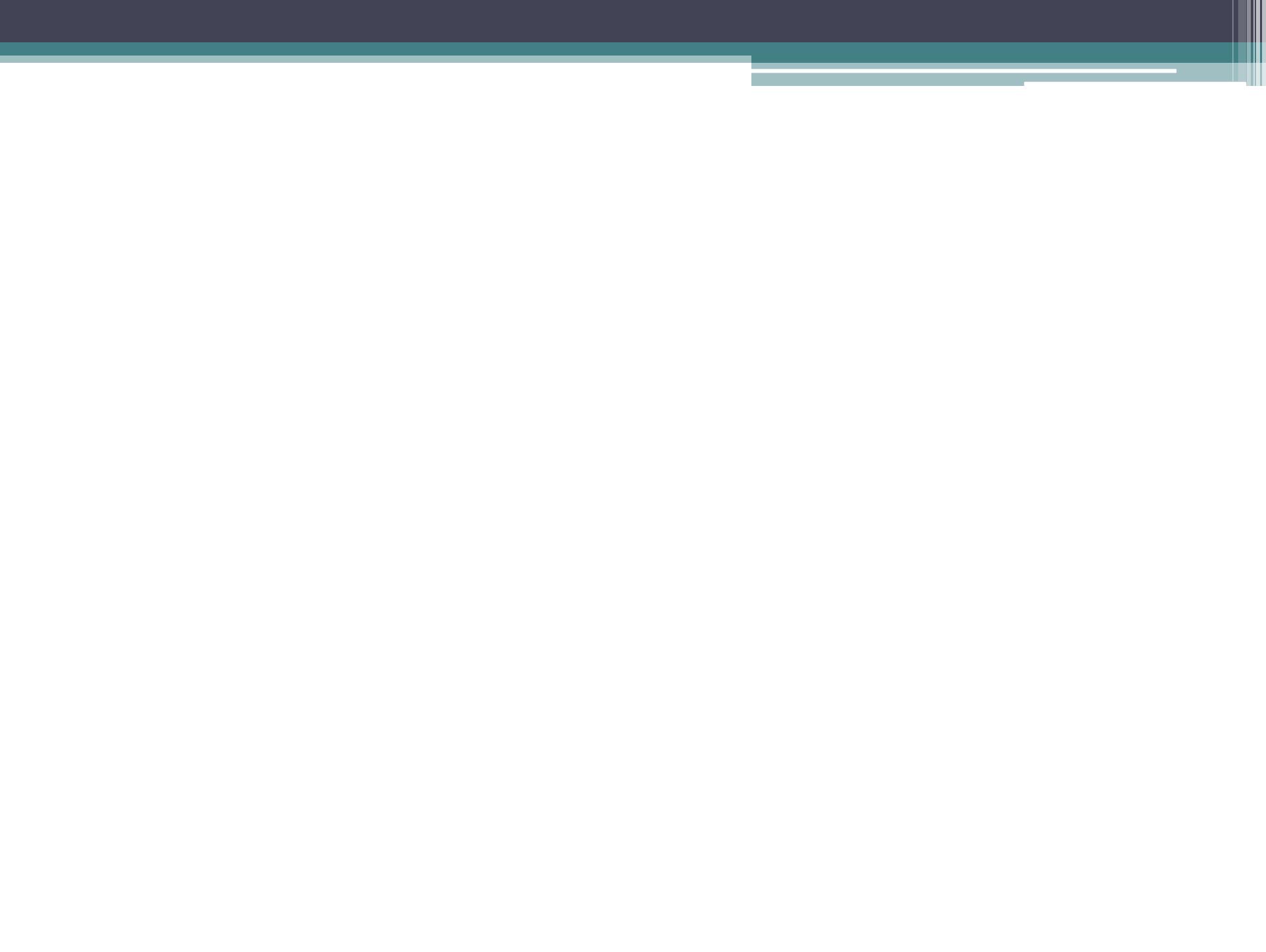
Profils sains vs profils mutés

Construction d'amorces au niveau de la mutation

→ Interactions conservées ?

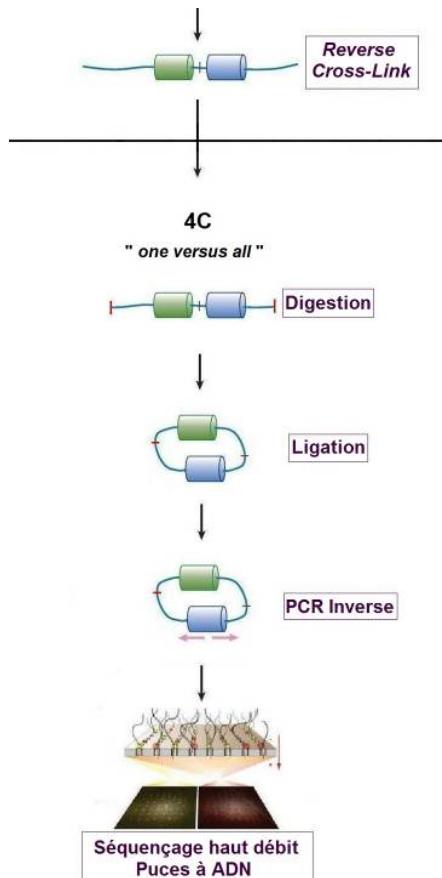
Merci de votre attention





Technique 4C

Circular Chromosome Conformation Capture

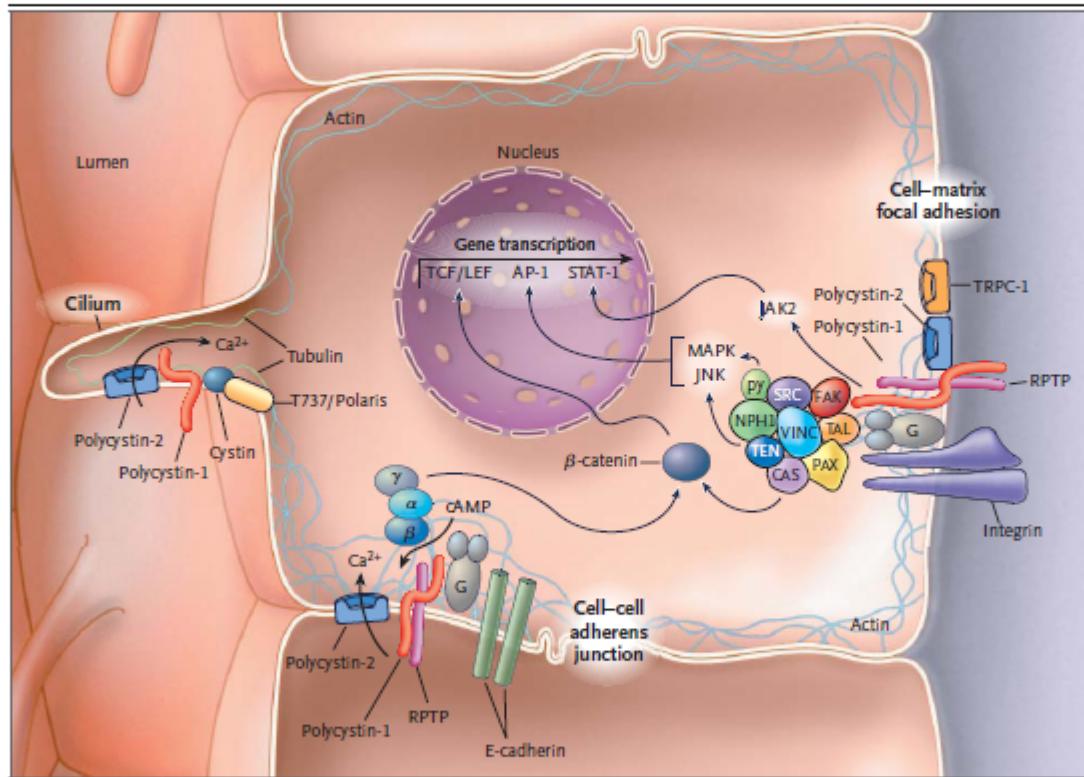


Point de vue : région promotrice de *PKD2*

Amorces : un seul couple à dessiner

4C : Etude des interactions partagés avec la région promotrice de *PKD2*
Etude avec le génome entier du point de vue de la séquence promotrice de *PKD2*

Rôle des polycystines 1 et 2



Wilson, P.D., 2004

PKD1 – Polycystine 1

- Nombreux sites de phosphorylation
- Réponse à des régulateurs de transduction de signal
→ Récepteur membranaire

PKD2 – Polycystine 2

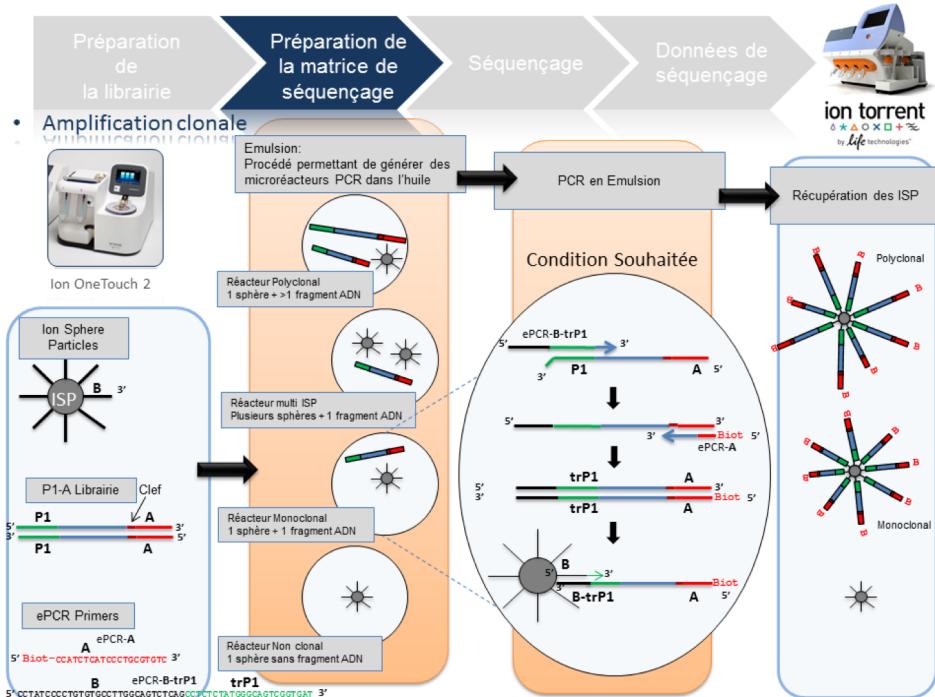
- Canal cationique non sélectif
- **Perméable aux ions Ca²⁺**
- **Canal calcique**

Polycystines 1 et 2

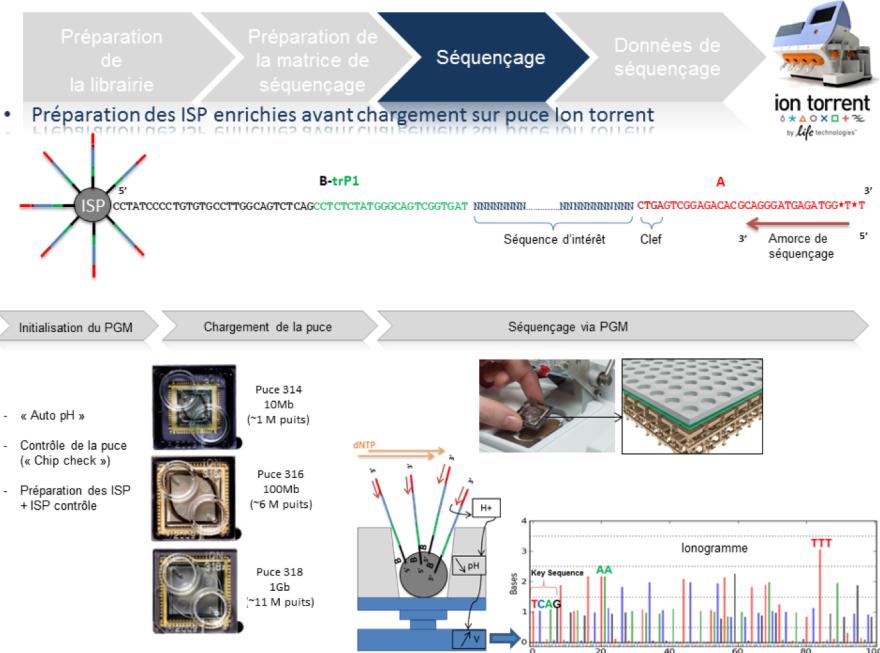
Récepteurs → Transformation en réponses cellulaires

Prolifération, adhésion, différenciation, maturation cellules rénales

Séquençage nouvelle génération



Etape de pré-séquençage PCR émulsion



Séquençage
Sphères chargées
séquencées en simultanée

Technique utilisée : Copie Conforme de Capture de Conformation Chromatinienne (5C)

3ème étape : Séquençage et traitement des données



Apport progressif de
nucléotide



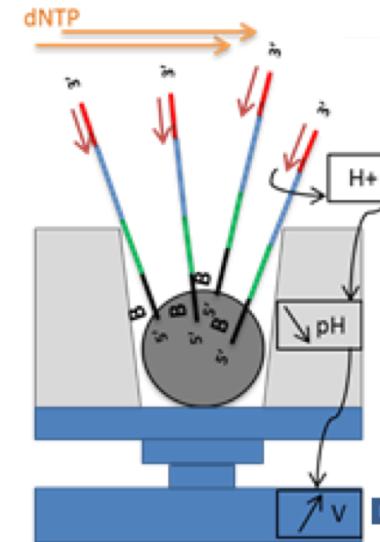
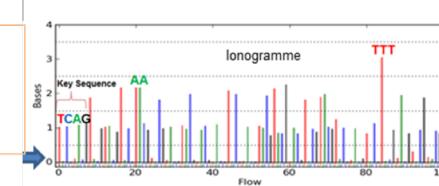
Incorporation



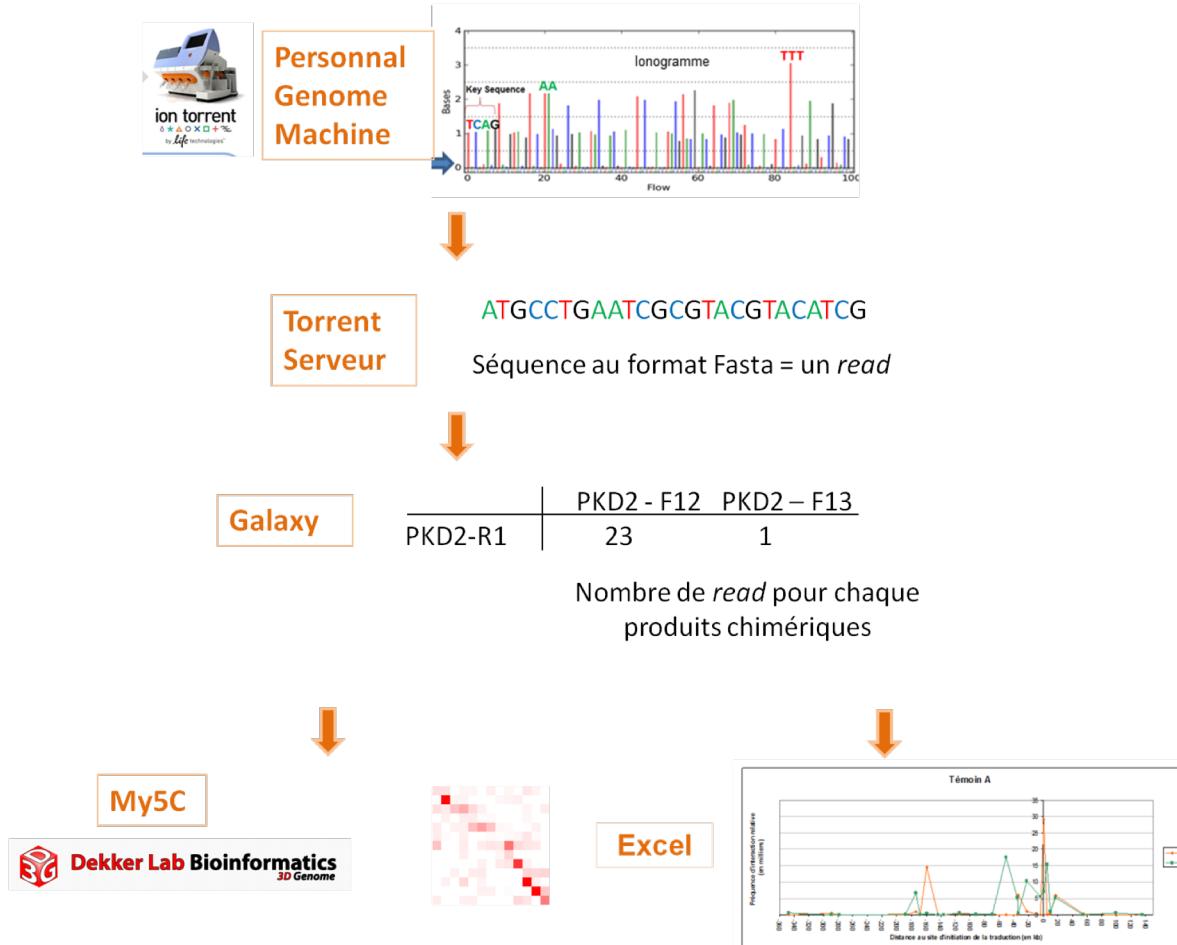
Libération d'un
proton H⁺
Variation du pH



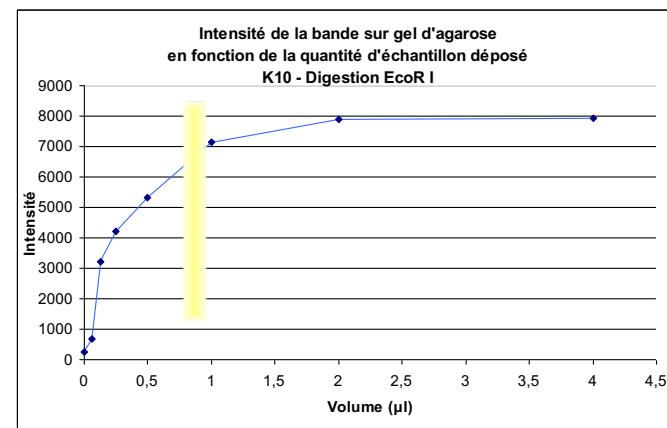
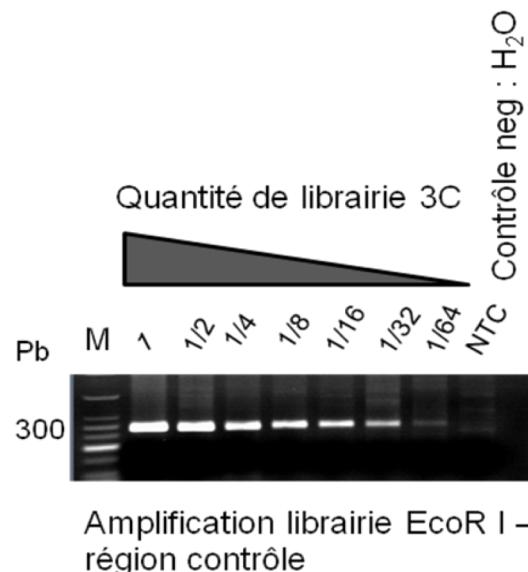
Personal
Genome
Machine



Traitement des données



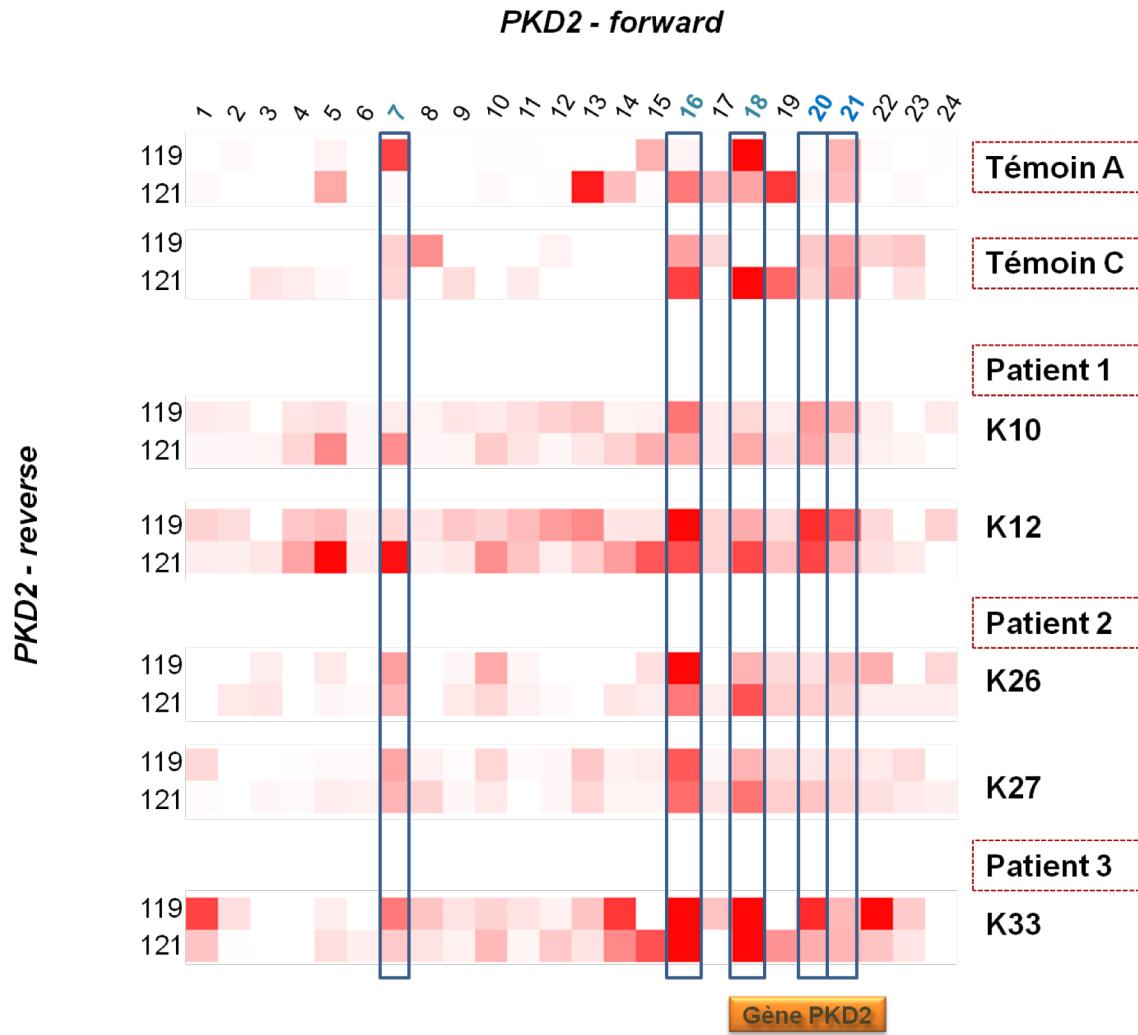
Contrôle qualité des librairies



BAC : pas d'interactions préférentielles
Toutes les combinaisons d'interaction
possible en quantité équimolaire

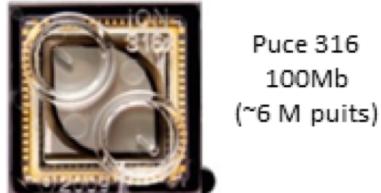
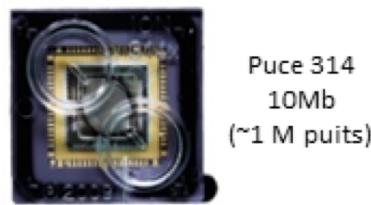
Résultats

Interactions entre la région promotrice de *PKD2* et les régions régulatrices hypothétiques *cis* – Profil My5C

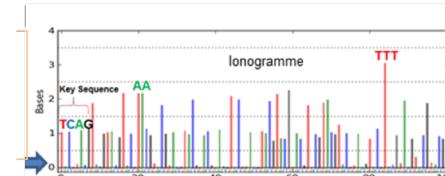


Technique utilisée : Copie Conforme de Capture de Conformation Chromatinienne (5C)

3ème étape : Séquençage et traitement des données



Personal
Genome
Machine



Ionogramme