



**HAL**  
open science

# Caractérisation et étude d'un élément régulateur du gène codant pour le récepteur à la vasopressine de type 2

Nicolas Debrand

## ► To cite this version:

Nicolas Debrand. Caractérisation et étude d'un élément régulateur du gène codant pour le récepteur à la vasopressine de type 2. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Montréal; Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2008. Français. NNT: . tel-00485725

**HAL Id: tel-00485725**

**<https://theses.hal.science/tel-00485725>**

Submitted on 21 May 2010

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Montréal

**Caractérisation et étude d'un élément régulateur du gène  
codant pour le récepteur à la vasopressine de type 2**

par

Nicolas DEBRAND

BIOCHIMIE

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de PhD  
en Biochimie

Décembre, 2008

© Nicolas Debrand, 2008

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Caractérisation et étude d'un élément régulateur du gène codant pour le récepteur à la  
vasopressine de type 2

présentée par :  
Nicolas DEBRAND

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Pr. P. HOUILLIER, président-rapporteur  
Pr. D. G. BICHET, directeur de recherche  
Pr. J. ROSSERT, co-directeur  
Pr. L. SCHILD, examinateur externe  
Pr. J. DROUIN, examinateur externe  
Pr. J. TEULON, membre du jury  
Pr. J. SD. CHAN, représentant de la FES

## Résumé

Le contrôle de la transcription constitue le principal niveau de la régulation de l'expression des gènes dans les cellules eucaryotes. Dans le génome de ces derniers, les éléments régulateurs peuvent être localisés à de très grandes distances du gène qu'ils régulent.

Le laboratoire a identifié 6 familles indépendantes avec un diabète insipide néphrogénique (DIN) lié à l'X portant de grandes délétions en amont du gène de l'*AVPR2*. Dans chacune de ces familles, les gènes *AVPR2* et *AQP2* ont été retrouvés intacts et les hommes sont atteints de DIN lié à l'X dans sa forme rénale « classique ». Le séquençage et l'analyse de 30 et 31 kilobases en amont et en aval de l'*AVPR2* ont permis l'identification de 6 zones délétées chez 6 familles indépendantes, dont 5 zones de taille supérieure à 7 kilo bases, et une zone, de 102 paires de bases, commune à l'ensemble des délétions. Chez le patient porteur de cette délétion, l'osmolalité urinaire ne répond pas au dDAVP. Contrairement à ce qui est observé chez les patients atteints de DIN avec mutations de l'*AVPR2*, celui-ci présente des réponses hémodynamiques et de coagulation, normales. Ceci indique que les récepteurs V2 ne sont pas exprimés dans le tubule collecteur mais le sont au niveau des cellules endothéliales.

Le but de notre travail est donc de tenter de comprendre les mécanismes régulateurs du locus de l'*AVPR2*, et plus précisément d'étudier l'expression « tissu spécifique » de ce gène.

Les études réalisées *in vivo*, dans le système *Hprt*, confirment le rôle activateur de la séquence de 102 pb : coloration intense des tubules collecteurs avec la construction comportant la zone délétée et absence avec la construction ne la contenant pas. Cependant, les expériences menées *in vitro* semblent indiquer que cet effet dépende du contexte extracellulaire, isotonique ou hypertonique, de la nature des cellules, du tubule proximal ou collecteur, ainsi que du promoteur de l'*AVPR2*. L'identification des protéines liant potentiellement l'une des extrémités de la délétion a révélé la présence, soit de protéines régulatrices, soit de séquences inconnues, toutes exprimées dans le rein.



À terme, ces études, ainsi que celles en découlant, permettront de positionner l'AVPR2 comme une cible de choix dans le traitement des diabètes insipides, centraux et néphrogéniques, par thérapie génique.

**Mots-clés** : *AQP2*, *AVPR2*, délétions, dDAVP, diabète insipide néphrogénique lié à l'X, système *Hprt*,

## Abstract

Transcriptional control is the primary means of regulating genes expression in eukaryotes cells. In the genome of the latter, regulatory elements can be localised with very long distance from the gene which they control.

The laboratory identified six independent families with X-linked nephrogenic diabete insipidus (NDI) bearing large deletions upstream of the *AVPR2* gene leaving intact *AVPR2* and *AQP2* coding sequences. Males bearing these deletions have classical renal X-linked NDI. The sequencing and analysis of 30 and 31 kilo bases upstream and downstream, respectively, encompassing the *AVPR2* gene had led to identify 6 deletions in 6 ancestrally independent families including, 5 larger than 7 kilo bases and one of 102 base paires shared by the other deletions. In male patient bearing the 102 bp upstream deletion, urinary osmolality was unresponsive to dDAVP but, unlike patients with mutations in the coding sequence, their coagulation and hemodynamic responses to dDAVP were normal. This suggests that V2 receptors are not expressed in renal collecting duct cells but normally expressed in endothelial cells.

Our goal is thus to understand the regulatory mechanism controlling the *AVPR2* locus and more precisely the tissu specific expression of this gene.

The studies carried out *in vivo*, in the *Hprt* system, confirm the enhancer role of the sequence of 102 bp: intense coloration of the collecting tubules with construction comprising the deleted zone and absence with construction not containing it. However, *in vitro* undertaken experiments seem to indicate that this effect depends on the extracellular context, isotonic or hypertonic, of the nature of the cells, of the tubule proximal or collecting duct, as well as promoter of the *AVPR2*. The identification of proteins potentially binding one of the ends of the deletion revealed the presence, either of regulating proteins, or of unknown sequences, all expressed in the kidney.

In the long term, these studies, like those while rising, will make it possible to position the *AVPR2* gene like a target of choice in the treatment of the diabetes insipidus, central and nephrogenic, by genic therapy.

**Keywords** : *AQP2*, *AVPR2*, dDAVP, Deletions, X-linked nephrogenic diabete insipidus, *Hprt* system

## Table des matières

Résumé .....	iii
Abstract .....	v
Liste des abréviations.....	xiii
Liste des tableaux .....	xxi
Liste des figures .....	xxii
Remerciements.....	xxviii

## Introduction bibliographique..... 1

<b>1. Les diabètes insipides .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1. Définitions.....</b>	<b>4</b>
<b>1.2. Les types de diabètes insipides héréditaires.....</b>	<b>6</b>
1.2.1. L'hormone antidiurétique.....	6
1.2.1.1. Structure et synthèse de l'hormone antidiurétique.....	7
1.2.1.2. Régulation et sécrétion de l'hormone antidiurétique .....	8
1.2.1.3. Fonctions de l'hormone antidiurétique .....	10
1.2.2. Le diabète central .....	12
1.2.2.1. Définition.....	12
1.2.2.2. Etiologies.....	12
1.2.3. Les diabètes insipides néphrogéniques héréditaires (DIN) .....	13
1.2.3.1. Définitions et types de DIN .....	13
1.2.3.1.1. Le DIN lié à l'X .....	15
1.2.3.1.2. Le DIN autosomique récessif et dominant .....	16
1.2.3.2. Les causes des DIN.....	17
1.2.3.2.1. Le récepteur à la vasopressine de type 2 .....	17
1.2.3.2.2. L'aquaporine-2.....	18
1.2.3.2.2.1. Propriétés générales des aquaporines.....	18
1.2.3.2.2.2. L'aquaporine-2 .....	25
1.2.3.2.2.3. L'aquaporine-2 et DIN.....	27
1.2.3.3. Signes cliniques et dépistage précoce de la maladie .....	29

1.2.3.3.1. Signes cliniques.....	30
1.2.3.3.2. Dépistage.....	30
<b>2. Les récepteurs à la vasopressine .....</b>	<b>32</b>
<b>2.1. Les types de récepteurs .....</b>	<b>33</b>
2.1.1. Classe de protéine : les récepteurs couplés aux protéines G .....	33
2.1.1.1. Structure des RCPG .....	35
2.1.1.2. Famille des RCPG .....	38
2.1.1.3. Transduction du signal.....	41
2.1.1.4. Désensibilisation et oligomérisation des RCPG .....	45
2.1.2. Localisations et voies de signalisation.....	47
2.1.2.1. Les récepteurs V1a.....	47
2.1.2.2. Les récepteurs V1b .....	49
2.1.2.3. Les récepteurs à l'ocytocine.....	50
<b>2.2. Les récepteurs à la vasopressine de type 2 .....</b>	<b>52</b>
2.2.1. Le gène de l' <i>AVPR2</i> .....	52
2.2.1.1. Structure.....	52
2.2.1.2. Expression spatio-temporelle.....	57
2.2.1.3. Défauts de structure de l' <i>AVPR2</i> et DIN .....	58
2.2.1.4. Gène de l' <i>AVPR2</i> normal et DIN.....	61
2.2.2. Propriétés générales des récepteurs de type 2 .....	64
2.2.2.1. Classe de protéine .....	65
2.2.2.2. Voie de signalisation.....	66
2.2.2.3. Effet moléculaire de l'activation de l' <i>AVPR2</i> .....	67
2.2.2.4. Défauts de structure de l' <i>AVPR2</i> et DIN.....	70
<b>3. Expression et régulation des gènes chez les eucaryotes .....</b>	<b>72</b>
<b>3.1. L'expression des gènes chez les eucaryotes .....</b>	<b>73</b>
3.1.1. La structure chromatinienne .....	74
3.1.1.1. L'ADN.....	74
3.1.1.2. La chromatine .....	75
3.1.2. Les différentes classes de gènes et de polymérase.....	78
3.1.2.1. Définition d'un gène .....	78
3.1.2.2. Les différents types de gènes et de polymérase.....	79

3.1.2.3. Les gènes de classe II.....	84
3.1.3. Structure et expression d'un gène de classe II.....	85
3.1.3.1. Rôle du promoteur : initier la transcription.....	86
3.1.3.1.1. Structure du promoteur.....	87
3.1.3.1.2. Formation du complexe de pré initiation (CPI).....	95
3.1.3.2. Mécanisme général de la transcription : formation des pré-ARNm.....	101
3.1.3.3. La maturation des pré-ARNm chez les eucaryotes.....	106
3.1.3.4. L'export et la traduction des messagers matures.....	109
<b>3.2. La régulation de l'expression des gènes.....</b>	<b>111</b>
3.2.1. Importance que l'expression des gènes soit régulée.....	111
3.2.2. Les différents niveaux de régulation dont la cellule dispose.....	112
3.2.2.1. Au niveau de la structure chromatinienne.....	113
3.2.2.2. Activation de la transcription des gènes.....	115
3.2.2.2.1. Les régions régulatrices.....	116
3.2.2.2.1.1. Description.....	116
3.2.2.2.1.2. Fonctions.....	116
3.2.2.2.2. Les protéines régulatrices.....	117
3.2.2.2.2.1. Structure générale.....	117
3.2.2.2.2.2. Types de protéines régulatrices.....	118
<b>Matériels et méthodes.....</b>	<b>121</b>
<b>4. Identification des zones délétées en amont du promoteur proximal de l'AVPR2.....</b>	<b>122</b>
4.1. Amplification par réaction de polymérase en chaine (PCR) de l'ADN de patient.....	122
4.2. Séquençage du produit PCR du gène de l'AVPR2.....	123
4.3. Recherche de marqueurs de la transmission liée à l'X.....	123
4.4. Délimitation des points de cassure des délétions.....	124
4.5. Test au dDAVP.....	125
<b>5. Expériences <i>in vitro</i>.....</b>	<b>126</b>
5.1. Étude visant à confirmer le rôle de l'élément distal.....	126
5.1.1. Clonage de l'élément distal en amont du gène rapporteur.....	126

5.1.2. Promoteur de la $\beta$ -globine .....	127
5.1.3. Multimérisation de l'élément distal .....	127
5.1.4. Constructions comportant une séquence similaire à TonEBP localisée en 5' de la délétion.....	128
<b>5.2. Lignées et culture cellulaires</b> .....	128
5.2.1. Cellules du tubule proximal .....	129
5.2.2. Cellules du tubule collecteur.....	129
5.2.3. Lignée témoin .....	130
5.2.4. Culture cellulaire .....	130
<b>5.3. Expériences de transfection transitoire</b> .....	131
5.3.1. Principe de la transfection transitoire .....	131
5.3.2. Technique de transfection à la lipofectamine plus® .....	132
<b>5.4. Caractérisation des protéines liant l'extrémité 5' du DE chez la levure</b> .....	133
5.4.1. Principe de la technique du simple hybride .....	133
5.4.2. Clonage de l'élément supposé régulateur .....	136
5.4.3. Fabrication et clonage de la banque d'ADNc de la médullaire rénale de rat.....	136
5.4.4. Souche de levure et milieux de croissance et de sélection utilisés .....	137
5.4.5. Transformation des levures .....	138
5.4.5.1. Par la banque d'ADNc .....	139
5.4.5.2. Par les vecteurs contenant les protéines d'intérêt .....	140
5.4.6. Extraction des plasmides d'intérêt .....	141
5.4.7. Vérification de la spécificité des protéines potentielles .....	142
5.4.7.1. Constructions utilisées .....	142
5.4.7.2. Co-transformation dans la levure et milieux de sélection .....	143
<b>6. Expériences <i>in vivo</i></b> .....	145
<b>6.1. Validation des résultats obtenus <i>in vitro</i> chez la souris</b> .....	145
6.1.1. Principe .....	145
6.1.2. Introduction de la séquence régulatrice dans le locus <i>Hprt</i> de la souris.....	147
6.1.2.1. Constructions et vecteurs utilisés.....	147
6.1.2.2. Cellules souches embryonnaires et recombinaison homologue .....	148
6.1.2.3. Obtention de lignées homozygotes .....	149

<b>Résultats</b> .....	151
<b>7. Identification des zones délétées chez les patients atteints de DIN</b> .....	152
<b>7.1. Phénotype des patients porteurs de délétions et confirmation de la transmission liée à l’X</b> .....	152
<b>7.2. Détermination des délétions et des points de cassure</b> .....	154
<b>7.3. Effet de l’administration de dDAVP aux patients porteurs de délétions</b> .....	156
<b>7.4. Récapitulatif des délétions identifiées</b> .....	160
<b>8. Confirmation du rôle « enhancer » de l’élément distal dans les cellules rénales</b> .....	162
<b>8.1. Comparaison de l’effet dans les trois lignées cellulaires</b> .....	162
<b>8.2. Effet de l’élément distal sous l’influence du promoteur de la <math>\beta</math>-globine</b> .....	166
<b>8.3. Effet de la multimérisation dans chacune des lignées cellulaires</b> .....	167
<b>8.4. Identification des zones importantes dans l’expression de l’<i>AVPR2</i> à l’intérieur de l’élément distal</b> .....	169
<b>9. Caractérisation des protéines liant l’extrémité 3’ de la délétion</b> .....	174
<b>9.1. Résultats obtenus suite au « screening » de la banque d’ADNc rénal</b> .....	174
<b>9.2. Analyse détaillée des huit protéines potentiellement positives</b> .....	175
9.2.1. Analyse bibliographique des protéines.....	176
9.2.1.1. Protéines connues .....	176
9.2.1.1.1. Cut-like 1.....	176
9.2.1.1.2. HP1-BP74 .....	180
9.2.1.1.3. Transcription elongation factor B, polypeptide 1-like.....	182
9.2.1.1.4. FLYWCH-type zinc finger 1 .....	182
9.2.1.2. Protéines « inconnues » .....	183
9.2.2. Vérification de la spécificité de chacune des protéines.....	184
<b>10. Séquence homologue à TonEBP</b> .....	188
<b>10.1. Étude de l’effet de TonEBP5’</b> .....	189
<b>10.2. Effet de la modification de la tonicité des cellules</b> .....	192
10.2.1. Effet basal de l’hypertonie.....	192



10.2.2. Comparaison de l'effet de la tonicité cellulaire en fonction du promoteur.....	196
<b>11. Modèle murin</b> .....	204
11.1. Reconstitution du locus <i>Hprt</i> dans les cellules ES .....	204
11.2. Etude de l'expression du gène rapporteur sous la dépendance de l'élément distal dans différents endothéliums.....	206
11.2.1. Dans les glomérules rénaux .....	206
11.2.2. Au niveau du plexus choroïde.....	221
11.2.3. Au niveau des cellules vasculaires hépatiques .....	222
11.3. Comparaison du marquage du vecteur d'expression de l' <i>AVPR2</i> et de deux autres gènes exprimés au niveau rénal .....	223
<b>Discussion</b> .....	225
<b>Conclusions et perspectives</b> .....	233
<b>Bibliographie</b> .....	237

## Liste des abréviations

**3AT** : 3 amino-1, 2, 4 triazole

**10T1/2** : Fibroblastes de lignée C<sub>3</sub>H 10T1/2

**12q13** : Locus 13 du bras long du chromosome 12

**aa** : Acide aminé

**Å** : Angström

**ACTH** : Hormone adrénocorticotrope

**ADA** : Adenosine deaminase

**ADH** : Antidiuretic hormone (hormone antidiurétique ou **AVP**)

**AdML** : Adenovirus major late

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ADNc** : Acide désoxyribonucléique complémentaire

**ADPKD** : Autosomal dominant polycystic kidney disease

**AMPc** : Adénosine monophosphate cyclique

**AQP1** : Aquaporine-1

**AQP2** : Aquaporine-2

**AQP2** : Gène codant l'AQP2

**AQP** : Aquaporine

**AR** : Gène de l'aldolase réductase

**ARHGAP4** : Activating Rho-GTPase protein 4

**ARN** : Acide ribonucléique

**ARNm** : Acide ribonucléique messenger

**ARNr** : Acide ribonucléique ribosomal

**ARNt** : Acide ribonucléique de transfert

**ARP** : Activité de la rénine plasmatique

**ATP** : Adénosine triphosphate

**AV3V** : Région antéro-ventrale du troisième ventricule

**AVP** : L-arginine vasopressine

**AVP** : Gène codant la vasopressine, la neurophysine II et le glycopeptide

**AVPR1a** : Récepteur à la vasopressine vasculaire (**V1a**)

**AVPR1b** : Récepteur à la vasopressine pituitaire (**V1b** ou **V3**)

**AVPR2** : Récepteur à la vasopressine de type 2

**AVPR2** : Gène codant le récepteur AVPR2

**β<sub>2</sub>AR** : β<sub>2</sub>-adrenergic receptor

**bHLH** : Basic helix-loop-helix

**bZIP** : Leucine zipper

**BGT1** : Gène du co-transporteur sodium-chloride-betaine

**BRE<sup>d</sup>** : TFIIB recognition element downstream

**BRE<sup>u</sup>** : TFIIB recognition element upstream

**C2H2**: (Cytidine)<sup>2</sup>-(histidine)<sup>2</sup>

**Ca<sup>++</sup>** : Ions calcium

**CBC**: Cap-binding complex

**CBF** : CCAAT box-binding factor

**CD** : Chromodomain

**CDP** : CCAAT displacement protein

**CE**: Capping enzyme

**CET**: Complexe d'élongation ternaire

**Chd1**: Chromo-ATPase/helicase-DNA-binding domain

**ChIP** : Chromatin immunoprecipitation

**CHIP28** : Channel-forming integral membrane protein of 28 kDa

**CIE1** : Collecting duct inhibitory element 1

**CITC** : Cellules intercalaires du tubule collecteur

**CF** : Cleavage factors (I<sub>m</sub> et II<sub>m</sub>)

**CK2** : Casein-kinase-2

**CMVIE1** : Cytomégalovirus IE1

**CPI** : Complexe de pré initiation

**CPSF** : Cleavage/polyadenylation specificity factor  
**CPTC** : Cellules principales du tubule collecteur  
**CR** : Cut repeat (1, 2 et 3)  
**CRE** : cAMP response element  
**CREB** : cAMP response element-binding protein  
**CRH** : Corticotropin releasing hormone  
**Chromo** : Chromosome modifier organizer  
**CSD** : Chromo shadow domain  
**CSE1** : Collecting duct stimulatory element 1  
**CstF** : Cleavage stimulatory factor  
**CTD** : Carboxy-terminal domain  
**CTF** : CCAAT-binding transcription factor  
**CTP** : Cellules du tubule proximal  
**CUX** : Cut homeobox  
**dDAVP** : 1-desamino[8-D-arginine] vasopressine  
**DAG** : Diacylglycérol  
**DBD** : DNA-binding domain  
**DBTSS** : Database of human transcriptional start sites  
**DCE** : Downstream core element  
**DE** : Distal element (élément distal)  
**DIN** : Diabète insipide néphrogénique  
**DMEM** : Dulbecco's modified Eagle's medium  
**DMSO** : Diméthylsulfoxyde  
**DO** : Dropout  
**DPE** : Downstream promoter element  
**DRY** : Acide aspartique-arginine-tyrosine  
**DSE** : Downstream sequence element  
**DSIF** : DRB-sensitivity-inducing factor

**eIF4F** : Eukaryotic initiation factor 4F  
**ELL** : Eleven-nineteen lysine-rich leukaemia  
**ENac** : canal épithélial sodique  
**EPD** : Eucaryotic promoter database  
**ERIS** : endoplasmic reticulum intermembrane small protein  
**ERK** : extracellular signal-regulated protein kinase  
**ES** : Embryonic stem cells  
**FACT** : Facilitates chromatin transcription  
**Facteur VIIIc** : Facteur VIII de coagulation  
**FCP1** : Transcription factor IIF-associated carboxyl-terminal domain phosphatase 1  
**FGT**: Facteur général de transcription  
**G-CK** : Golgi apparatus casein kinase  
**GABA** : Gamma-amino butyric acide  
**GDP** : Guanosine diphosphate  
**GFP** : Green fluorescence protein  
**GMPc** : Guanosine monophosphate cyclique  
**GRK** : G-protein coupled receptor kinase  
**GTP** : Guanosine triphosphate  
**HAT** : Histone acetyltransférase  
**HD** : Homéodomaine  
**hHel1** : Human helicase 1  
**HiNF-D** : Histone nuclear factor D  
**His3** : Gène de l'imidazole glycérol phosphate déshydratase  
**HP1-BP74** : Heterochromatin protein 1-binding protein 74  
**Hprt** : Gène de l'hypoxanthine-guanine-phophorybosyltransférase  
**Hsp70** : Heat shock protein 70  
**HTH** : Helix-turn-helix  
**HVBX** : Hépatite B virus X gene

**Inr** : Initiator (élément initiateur)  
**IP3** : Inositol 1, 4, 5-triphosphate  
**Iswi** : Imitation switch  
**kb** : Kilobase (1000 paires de bases)  
**kDa** : Kilo Dalton  
**kg** : Kilogramme  
**KO** : Knock-out  
**L1CAM** : L1 cell adhesion molecule  
**l** : Litre  
**LCAP** : Lung carcinoma-associated protein gene  
**LCR** : Locus control region  
**LD PCR** : Long-distance PCR  
**LiAc** : Acétate de lithium  
**LM PCR** : Ligation-mediated PCR  
**MAP** : Mitogenic activated protein  
**MAPK** : Mitogenic activated protein kinase  
**Mb** : Mégabase (1 000 000 paires de bases)  
**ml** : Millilitre  
**µl** : Microlitre  
**MLCK** : Myosin light chain kinase  
**MMLV** : Moloney murine leukemia virus  
**mmol** : millimole  
**mRNP** : Messenger ribonucleoprotein particles  
**mOsm** : Milliosmole  
**m.p** : Minimal promoter  
**MTE** : Motif ten element  
**NaCl** : Chlorure de sodium  
**NELF** : Negative elongation factor

**ng** : Nanogramme  
**NKCC2** : Co-transporteur sodium/potassium/chlore de type 2  
**nm** : Nanomètre  
**NPII** : Neurophysine II  
**NPA** : Asparagine-proline-alanine  
**NPC** : Nuclear pore complexes  
**OCP2** : Organ of Corti protein 2  
**ORF** : Open reading frame  
**OVLТ** : Organum vasculosum lamina terminalis  
**PABPII** : Poly(A)-binding protein II  
**PAP** : Poly(A) polymérase  
**pb** : Paire de bases  
**PBS** : Phosphate buffer solution  
**PC4** : Positive co-factor 4  
**PCR** : Polymerase chain reaction  
**PEG** : Polyéthylène glycol  
**PIP2** : Phosphoinositol 4,5 bisphosphate  
**PKA** : Protéine kinase A  
**PKC** : Protéine kinase C  
**PLA2** : Phospholipase A2  
**PLC** : Phospholipase C  
**pol IIA** : ARN polymérase II dans sa forme hypophosphorylée  
**pol IIO** : ARN polymérase II dans sa forme hyperphosphorylée  
**pol X** : ARN polymérase X (I, II et III)  
**pré ARNm** : Précurseur de l'acide ribonucléique messenger ou ARNm primaire  
**Protéine G** : Protéine régulatrice de guanine  
**PSA** : Pression sanguine artérielle  
**P-TEFb** : Positive transcription elongation factor b

**PTH** : Parathyroid hormone  
**RCPG** : Récepteur couplé aux protéines G  
**RC.SV1** : Cellules rénales à caractéristiques du tubule proximal (ou **V11**)  
**RC.SVtsA58** : Cellules rénales à caractéristiques du tubule collecteur (ou **V47**)  
**RE** : Réticulum endoplasmique  
**ROT** : Récepteur à l'ocytocine  
**rpm** : Rotation par minute  
**RRQS** : Arginine-arginine-glutamine-sérine  
**RRQSVEL** : Arginine-arginine-glutamine-sérine-valine-glutamate-leucine  
**SAGA** : Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase  
**SCP1** : Super core promoter 1  
**siRNA** : Small interfering ribonucleic acid  
**SIT** : Site d'initiation de la transcription  
**SKP1** : S-phase kinase-associated protein 1  
**SLIC** : Single strand ligation to ss-cDNA  
**SMARCAD1** : SWI/SNF-related, matrix-associated actin-dependant regulator of chromatin, subfamily a, containing DEAD/H box1  
**SMIT** : Sodium-myo-inositol transporter gene  
**snoRNA** : Small nucleolar ribonucleic acid  
**snRNA** : Small nuclear ribonucleic acid  
**spnRNA-IV** : Single-polypeptide nuclear RNA polymerase  
**Spt6** : Suppressor of Ty 6  
**SRB** : Suppressors of RNA polymerase B mutations  
**SV 40** : Virus simien 40  
**SVF** : Sérum de veau fœtal  
**TAD** : Trans-activation domain  
**TAF** : TBP-associated factor  
**Taq** : Thermophilus aquaticus



**TBP** : TATA box-binding protein

**TF1** : Transcriptional intermediary factor 1

**TFIIS** : Transcription factor IIS

**TFIIX** : Transcription factor X for polymerase II (A, B, D, E, F et H)

**TFTC** : TBP-free TAF-containing complex

**TonEBP** : Tonicity-responsive enhancer binding protein

**TREX** : Transcription/export

**Trpv** : Transient receptor potential vanilloid

**TSH** : Thyroid stimulating hormone

**TTF2** : Transcription termination factor 2

**UT1** : Transporteur d'urée 1

**UT-A** : Gène du transporteur de l'urée régulé par la vasopressine

**UTR** : Untranslated region (5' et 3')

**vWF** : Facteur de von Willebrand

**XCPE1** : X gene core promoter element 1

**Xq28** : Locus 28 du bras long du chromosome X

## Liste des tableaux

**Tableau 1** : Étiologies des diabètes insipides néphrogéniques

**Tableau 2** : Distribution et rôles des aquaporines dans l'organisme

**Tableau 3** : Composition et propriétés des sous-unités de l'ARN polymérase II

**Tableau 4** : Composition et propriétés des facteurs généraux de transcription

**Tableau 5** : Récapitulatif des résultats précédents

**Tableau 6** : Séquences d'ADNc isolées suite au screening simple hybride avec la zone  
DE15

## Liste des figures

- Figure 1** : Représentation schématique des différents segments d'un néphron
- Figure 2** : Structure de la vasopressine
- Figure 3** : Synthèse de la vasopressine à partir du gène de l'*AVP*
- Figure 4** : Représentation d'un monomère d'AQP1
- Figure 5** : Représentation schématique d'une molécule d'AQP1
- Figure 6** : Représentation schématique de la répartition des différentes molécules d'aquaporine dans le rein
- Figure 7** : Représentation schématique de l'AQP2 et localisation des mutations
- Figure 8** : Les récepteurs couplés aux protéines G
- Figure 9** : Structure tridimensionnelle de la rhodopsine
- Figure 10** : Représentation schématique du RCPG de la rhodopsine
- Figure 11** : Structure du récepteur  $\beta$ 2-adrénergique humain
- Figure 12** : Comparaison des faces extracellulaires des récepteurs  $\beta$ 2-adrénergique et rhodopsine
- Figure 13** : Comparaison structurale du  $\beta$ 2-AR avec les formes inactives et activées de la rhodopsine
- Figure 14** : Classification des RCPG
- Figure 15** : Les récepteurs couplés aux protéines G : le modèle à trois partenaires
- Figure 16** : Diversité des voies d'activation et effets physiologiques
- Figure 17** : Voies d'activation des RCPG et transduction du signal en fonction des sous-unités
- Figure 18** : Organisation et topographie de la rhodopsine à la surface cellulaire
- Figure 19** : Localisation et orientation du gène de l'*AVPR2* dans la partie distale du chromosome X
- Figure 20** : Structure du gène de l'*AVPR2*
- Figure 21** : Séquence du gène de l'*AVPR2*

- Figure 22** : Représentation schématique de l'expression de l'*AVPR2* dans les cellules du tubule collecteur
- Figure 23** : Représentation schématique de l'*AVPR2* et des 108 mutations non-sens
- Figure 24** : Représentation schématique des délétions identifiées dans six familles avec DIN
- Figure 25** : Alignement de séquence inter espèces de la zone délétée de 102 pb
- Figure 26** : Représentation schématique d'une cellule principale du tubule collecteur et des mécanismes conduisant à l'expression des molécules d'AQP2 à la membrane luminale, régulation à court terme, ainsi qu'à l'activation du gène de l'*AQP2*, mécanisme à long terme
- Figure 27** : Les différentes formes d'ADN dans le vivant
- Figure 28** : Niveaux d'empaquetage de l'ADN
- Figure 29** : Structure cristallographique de l'ARN polymérase II eucaryote (*S. cerevisiae* à 2.8 Å)
- Figure 30** : Structure d'une unité de transcription (gène)
- Figure 31** : Structure du promoteur d'un gène de classe II
- Figure 32** : Modèles d'assemblage du complexe de pré initiation (CPI)
- Figure 33** : Représentation schématique de la construction utilisée pour déterminer le rôle de l'élément distal *in vitro*
- Figure 34** : Principe de la technique du simple hybride dans la levure
- Figure 35** : Principe du « screening » de la banque d'ADNc rénale dans la levure
- Figure 36** : Principe du « targeting gene » par recombinaison homologue dans les cellules ES
- Figure 37** : Représentation schématique des constructions utilisées pour étudier le rôle de l'élément activateur dans les souris transgéniques
- Figure 38** : Reconstitution du locus *Hprt*
- Figure 39a** : Arbres généalogiques des familles 1 et 2 porteuses de délétions en amont de l'*AVPR2*

- Figure 39b** : Arbres généalogiques des familles 3 à 6 porteuses de délétions en amont de l'*AVPR2*
- Figure 40** : Détermination de la délétion de 11 kb et des points de cassure
- Figure 41** : Délimitation des points de cassure de la délétion de 11039 pb
- Figure 42** : Comparaison de l'effet du dDAVP sur les pulsations et la pression sanguine artérielle
- Figure 43** : Comparaison de l'effet du dDAVP sur l'activité de la rénine plasmatique
- Figure 44** : Comparaison de l'effet du dDAVP sur la sécrétion du facteur de von Willebrand
- Figure 45** : Schéma récapitulatif des délétions identifiées dans les six familles avec DIN
- Figure 46** : Comparaison de l'effet du DE dans trois lignées cellulaires
- Figure 47** : Effet du DE dans les trois lignées cellulaires par rapport aux contrôles
- Figure 48** : Effet du DE sur le gène rapporteur sous la dépendance d'un promoteur hétérologue
- Figure 49** : Effet de la multimérisation du DE dans chacune des lignées cellulaires
- Figure 50** : Récapitulatif des résultats des expériences de mutations en série dans les cellules du tubule collecteur
- Figure 51** : Récapitulatif des résultats des expériences de mutations en série dans les cellules du tubule proximal
- Figure 52** : Récapitulatif des résultats des expériences de mutations en série dans les fibroblastes
- Figure 53** : Séquence du promoteur et du gène de l'*AQP2*
- Figure 54** : Effet de la séquence TonEBP5' sur le gène rapporteur de la luciférase
- Figure 55** : Comparaison de l'effet de la séquence TonEBP5' seule
- Figure 56** : Effet de la modification de la tonicité sur l'expression du gène rapporteur
- Figure 57** : Localisation de la séquence TonEBP potentielle dans le promoteur de l'*AVPR2*
- Figure 58** : Effet de la modification de la tonicité extracellulaire dans les cellules du tubule collecteur

- Figure 59** : Effet de la modification de la tonicité extracellulaire dans les cellules du tubule proximal
- Figure 60** : Effet de la modification de la tonicité extracellulaire dans les fibroblastes
- Figure 61** : Reconstitution du locus *Hprt* dans les cellules ES
- Figure 62** : Marquage des reins de souris transgéniques avec et sans DE+polymorphisme
- Figure 63** : Etude de la sensibilité au marquage par la  $\beta$ -galactosidase
- Figure 64** : Effet du seul polymorphisme sur l'expression du gène rapporteur
- Figure 65** : Coupes histologiques des segments médullaires, papillaires et corticaux de reins de souris transgéniques
- Figure 66** : Expression d'un marqueur non spécifique au tissu rénal
- Figure 67** : Dosage protéique de la  $\beta$ -galactosidase
- Figure 68** : Marquage à la GFP d'une coupe longitudinale de la médullaire rénale avec la construction *cis-AVPR2*<sup>eGFPLacZ</sup>
- Figure 69** : Marquage à la GFP d'une coupe longitudinale de la papille rénale avec la construction *cis-AVPR2*<sup>eGFPLacZ</sup>
- Figure 70** : Marquage à la GFP d'une coupe transversale de la papille rénale avec la construction *cis-AVPR2*<sup>2eGFPLacZ</sup>
- Figure 71** : Marquage à la GFP d'une coupe longitudinale de la médullaire rénale avec la construction *del-cis-AVPR2*<sup>eGFPLacZ</sup>
- Figure 72** : Marquage à la GFP d'une coupe longitudinale de la papille rénale avec la construction *poly-cis-AVPR2*<sup>eGFPLacZ</sup>
- Figure 73** : Coupe transversale de la papille rénale avec la construction *cis-AVPR2*<sup>eGFPLacZ</sup>
- Figure 74** : Coupes histologiques de cerveaux de souris porteuses des constructions *cis-AVPR2*<sup>eGFPLacZ</sup> et *del-cis-AVPR2*<sup>eGFPLacZ</sup>
- Figure 75** : Coupes histologiques de foie de souris porteuses des constructions *cis-AVPR2*<sup>eGFPLacZ</sup> et *del-cis-AVPR2*<sup>eGFPLacZ</sup>

**Figure 76** : Comparaison de l'expression du gène rapporteur sous la dépendance de l'élément activateur de l'*AVPR2*, d'un marqueur spécifique des tubules collecteurs ainsi que d'un transporteur spécifique de la médullaire interne

*À mon Père*



## Remerciements

Tout d'abord je voudrais remercier les membres du jury d'avoir bien voulu accepter d'évaluer ce travail de thèse et l'enrichir de leurs critiques et commentaires. Je tiens particulièrement à exprimer ma gratitude au Pr. Houillier qui a accepté de présider le jury ainsi qu'aux Professeurs Drouin et Schild d'avoir accepté la tâche exigeante de rapporteur.

Je tiens à exprimer ma plus grande reconnaissance au Professeur Bichet qui m'a à la fois, accueilli au sein de son laboratoire, soutenu lors de longues périodes de doutes, encadré et aiguillé avec sa gentillesse et sa légendaire bonne humeur. Qu'il trouve ici l'expression de mon incommensurable gratitude de m'avoir donné la chance, que bon nombre m'auraient refusée, de m'initier à la recherche et de m'avoir fait part de son immense expertise et expérience de chercheur reconnu.

Merci également au Professeur Rossert d'avoir accepté la direction de ma cotutelle de thèse ainsi que de m'avoir permis de débiter ce projet. Je remercie vivement le Professeur Houillier de m'avoir accueilli quelques mois dans son laboratoire; le Docteur Laghmani de m'avoir inculqué la dure réalité de la manipulation de nos amies les levures.

Je ne saurais oublier ici l'ensemble des membres du laboratoire du Professeur Bichet, Ivana, Nicole, Marie-Françoise et Michelle que ce soit pour des conseils scientifiques ou techniques, informatiques ou de secrétariat ou tout simplement pour discuter lorsque la science devenait trop envahissante.

Merci à l'ensemble des membres de l'Unité 656 qui m'ont accueilli et permis de passer un moment inoubliable en leur compagnie. Je pense en particulier, et dans le désordre, à Nadia, Boubacar, Isabelle, Touria, Véronique, Sylvie. Merci à tous de m'avoir fait comprendre que j'étais « chez moi » à l'Unité 656. Merci d'avoir rendu mon séjour plus agréable.

Les mots ne reflètent pas toujours ce que l'on pense mais j'adresse mille mercis

à Magali, pour sa présence, son soutien, son aide et le bonheur incommensurable qu'elle me procure malgré l'éloignement et mon caractère si particulier,

à ma mère pour m'avoir permis de poursuivre mes, si longues, études sans jamais désespérer ainsi que pour son aide et son soutien sans faille,

à mes frères, Emmanuel et Thomas, pour tous ces moments vécus, bons ou mauvais, qui ont fait ce que nous sommes aujourd'hui,

à ma grand-mère pour son soutien et sa compréhension, à Jean-Louis et Ludovique pour leur motivation et leurs encouragements incessants,

à Paul pour sa gentillesse, sa sympathie et son flegme « so british », à Laurie ainsi qu'à Camille, ma petite nièce préférée,

à mes amis, anciens ou plus récents, si importants pour moi pour ces nombreux moments partagés.

Enfin, j'ai une pensée particulière pour toutes ces personnes, absentes aujourd'hui, mais qui ont suscité en moi l'envie de faire de la science.

Que chacun voie ici le témoignage de ma reconnaissance.

**Introduction**

**bibliographique**

La régulation ainsi que le maintien des volumes circulants sont deux éléments essentiels de la vie de tout organisme mammifère. Le principal acteur de cette régulation est le rein, qui, de par son anatomie et sa physiologie complexes, est en charge de jauger, en fonction des conditions environnantes, ce qui doit être éliminé ou au contraire conservé.

Le néphron, unité fonctionnelle du rein, est constitué d'une composante de filtration, le glomérule, et d'un tubule issu de ce glomérule. Ce tubule se compose par la suite de plusieurs segments tubulaires contigus: le tubule proximal fait suite au glomérule, l'anse de Henle relie la fin du tubule contourné proximal au tubule contourné distal et le tubule contourné distal se poursuit par le tubule connecteur qui débouche dans les canaux collecteurs (**Figure 1**, page 3).

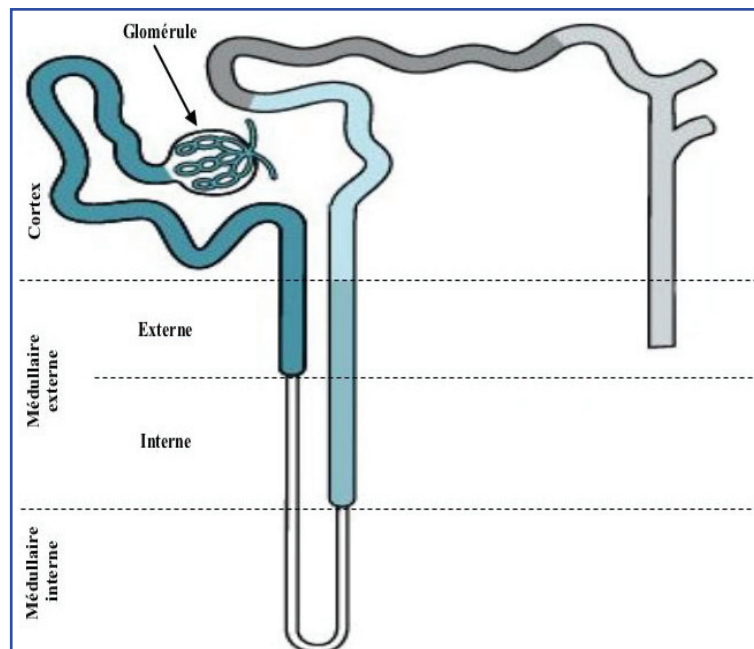
Une des principales fonctions de cet organe est la réabsorption/élimination de l'eau suite à l'action d'une hormone spécifique, l'hormone antidiurétique, sécrétée uniquement lorsque les conditions physiologiques le nécessitent et n'agissant qu'au niveau des cellules principales d'un segment particulier du rein, le tubule collecteur. Ce lieu d'action est déterminé par la présence de récepteurs spécifiques à l'hormone, les récepteurs à la vasopressine de type 2 (« **arginine vasopressin receptor 2** » ou **AVPR2**) à la surface des cellules principales de ce tubule.

Une pathologie rare, le **Diabète Insipide Néphrogénique (DIN)**, est causée par des pertes de fonction, soit des récepteurs V2 de la vasopressine, soit de l'**aquaporine-2 (AQP2)** (vide infra). Ces anomalies de structure et de fonction sont en fait causées par des altérations des séquences codantes pour l'**AVPR2** ou l'**AQP2**. Récemment, il a été identifié chez des familles ancestrales indépendantes atteintes de cette pathologie, des individus présentant toutes les caractéristiques phénotypiques de la maladie mais comportant des séquences **AVPR2** et **AQP2** tout à fait normales. Les seules anomalies mises en évidence chez ces individus furent des délétions localisées très en amont du gène **AVPR2**.



L'hypothèse de départ de notre travail a été d'imaginer que les délétions identifiées pouvaient être importantes pour réguler l'expression du gène de l'*AVPR2*. Et plus particulièrement que ces délétions pouvaient contenir des régions régulatrices permettant d'expliquer l'expression spécifique de ces récepteurs au niveau des cellules du tubule collecteur.

Le but de cette thèse a donc été, d'une part, de confirmer que l'une des délétions identifiées participait effectivement à l'expression « rénale-spécifique » de l'*AVPR2*, et d'autre part, d'identifier les protéines liant cette zone.

L'introduction de cette thèse comporte trois parties consacrées successivement à des généralités concernant les diabètes insipides, aux récepteurs de la vasopressine, et plus particulièrement à l'*AVPR2* ainsi qu'à l'expression génique et sa régulation chez les eucaryotes.



**Figure 1. Représentation schématique des différents segments d'un néphron.**

- |   |  |
|---|--|
|  Tubule contourné et droit proximal  |  Branche fine descendante et ascendante |
|  Branche large ascendante médullaire |  Branche large ascendante corticale     |
|  Tubule contourné distal             |  Tubule connecteur et canal collecteur  |

# **1. Les diabètes insipides**

Au XVII<sup>ème</sup> siècle, après avoir fuit l'Ecosse où ils étaient victimes de persécutions religieuses les Ulsterscots s'installèrent dans la province irlandaise de l'Ulster. Certains en repartirent au XVIII<sup>ème</sup> siècle à bord de l'« Hopewell » pour s'installer en Nouvelle Ecosse. La légende qui suit se raconte toujours chez leurs descendants pour expliquer qu'un grand nombre d'entre eux étaient touchés d'une soif insatiable:

*« Une bohémienne marchait le long des routes avec son fils, lorsqu'ils eurent soif; ils s'arrêtèrent à la première maison, la mère demanda un peu d'eau pour son enfant, mais l'hôtesse la lui refusa; alors la bohémienne lui jeta un sort. Ainsi, d'après la légende, les fils de cette mauvaise femme furent frappés d'une soif éternelle et ses filles la transmirent à leurs fils pour des générations ».*

Bode, rapporta ces faits en 1969 et constata que les descendants des Ulsterscots étaient atteints de DIN avec une grande fréquence. Cette affection représente un trouble curieux du métabolisme de l'eau (Debrand 1974; Bode and Crawford 1969).

## **1.1. Définitions**

L'étymologie grecque du mot diabète permet de mieux comprendre sa signification, puisque la traduction littérale de « διαβήτης » est « passer à travers ». D'un point de vue historique, dès l'antiquité, l'existence d'individus présentant une abondance excessive d'urine et une augmentation de la soif est connue. Cependant, ce n'est qu'en 1674 que T. Willis oppose les diabétiques dont les urines ont la saveur de miel, « diabètes mellitus », et ceux dont les urines sont sans saveur, les « diabètes insipides » (Willis 1674). Par la suite, Lacombe et Weil, démontrent l'existence des diabètes insipides familiaux (Lacombe 1841; Weil 1884; Weil 1908) qui, par la suite, s'avèreront être des diabètes insipides centraux.

La littérature actuelle permet de définir les diabètes insipides comme étant des désordres métaboliques caractérisés par l'excrétion de quantités anormalement élevées (supérieure à 30ml/kg/ jour de poids corporel) d'une urine de faible osmolalité (inférieure à 250 mmol/kg) (Bichet 2006).

Cependant, différentes pathologies entrent dans cette définition; nous pouvons distinguer quatre types de diabètes insipides parmi lesquels:

- Le diabète insipide neurogénique, également appelé central, neurogène hypothalamique ou neurohypophysaire. Cette forme est due à un défaut de production de l'hormone antidiurétique par les noyaux supra-optiques et paraventriculaires hypothalamiques;
- Le diabète insipide néphrogénique qui est dû à une insensibilité totale ou partielle des cellules rénales aux effets antidiurétiques de l'hormone antidiurétique;
- La polydipsie primaire: dans ce cas, le diabète est secondaire à une prise d'eau excessive qui est normalement éliminée par le rein;
- Le diabète insipide gestationnel qui est la conséquence d'une augmentation du catabolisme de la vasopressine à la fin de la grossesse. Cette forme de diabète est, contrairement aux trois précédentes, temporaire (Berl and Robertson 2000).

Les diabètes insipides centraux et néphrogéniques peuvent être soit de forme héréditaire, soit de forme acquise.

## 1.2. Les types de diabètes héréditaires

Dans cette partie nous traiterons exclusivement des formes héréditaires des diabètes insipides centraux et néphrogéniques qui ne représentent qu'une infime partie des diabètes insipides vus en clinique (moins de 10%) (Bichet 2006).

Dans le cas des diabètes centraux, le défaut se situe au niveau du gène codant pour la vasopressine, l'*AVP* (anciennement appelé *AVP-NPII* (« arginine vasopressine-neurophysine II »)). En effet, ce dernier est le siège de mutations autosomiques dominantes ou récessives (Rittig, Robertson et al. 1996).

Le diabète insipide néphrogénique dans sa forme héréditaire est le plus souvent causé par des mutations touchant les gènes codant pour le récepteur à la vasopressine de type 2, ou *AVPR2*, ainsi que pour le canal hydrique dépendant de la vasopressine, l'aquaporine 2, ou *AQP2* (Bichet and Fujiwara 2001).

Dans les deux types de diabète, l'élément central est l'hormone antidiurétique. Par conséquent, nous allons tout d'abord rappeler quelques généralités concernant ce composé.

### 1.2.1. L'hormone antidiurétique

L'hormone antidiurétique (« antidiuretic hormone » ou ADH) est un peptide cyclique de neuf acides aminés (aa) (**Figure 2**, page 7). Elle est appelée également vasopressine ou arginine vasopressine (AVP) en référence au résidu arginine situé en position 8 chez l'homme et les rongeurs; résidu remplacé chez le porc par une lysine (Bankir 2001). De plus, cette AVP est retrouvée chez les invertébrés, ce qui pousse à croire que le gène ancestral de cette protéine est apparu avant la séparation phylogénique des vertébrés et des invertébrés, il y a plus de 700 millions d'années (Acher, Chauvet et al. 1995).

Ce nonapeptide est synthétisé au niveau de l'hypothalamus, transporté puis stocké dans des vésicules sécrétoires au niveau de la post-hypophyse qui le libère dans la circulation

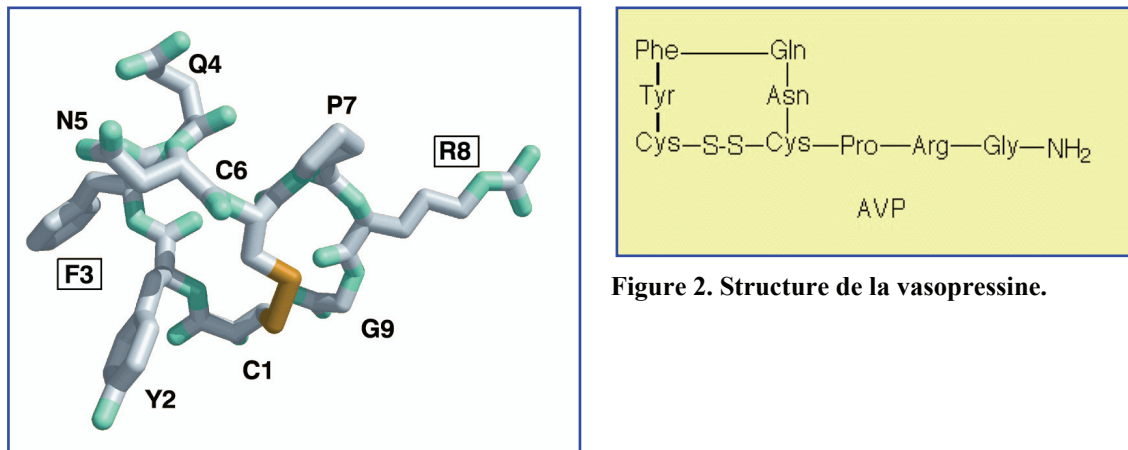


sanguine (Brownstein, Russell et al. 1980; Russell, Ito et al. 2003). Cette hormone présente deux actions principales, l'une vasopressive, et la seconde antidiurétique.

### 1.2.1.1. Structure et synthèse de l'hormone antidiurétique

L'AVP est synthétisée au niveau des neurones magnocellulaires du noyau supra-optique et paraventriculaire de l'hypothalamus à partir d'une pré-hormone de 164 aa. À ce stade de la production, l'AVP est liée à son transporteur, la **neurophysine II** (NPII) et cet ensemble va être véhiculé jusqu'à la post-hypophyse où il sera stocké (Richter 1988; Guyton and Hall 2000).

Cette pré-hormone ou prépro-vasopressine est codée par le gène *AVP* (anciennement, *prepro-AVP-NPII*) localisé sur le bras court du chromosome 20 au locus 13 (Rao, Loffler et al. 1992). Ce gène comporte trois exons dont le premier code pour le peptide signal, l'AVP ainsi que pour la partie amino-terminale de la neurophysine; le second code pour la région centrale de la NPII et le dernier pour l'extrémité carboxy-terminale de la NPII et le glycopeptide (Willcutts, Felner et al. 1999; Berl and Robertson 2000).



Cette prépro-vasopressine va, suite au clivage du peptide signal, être emmagasinée dans des granules de sécrétion au niveau de la neurohypophyse. Par la suite, elle va subir différentes modifications: ajout de chaînes glycosylées, clivage protéolytique entre autres, pour aboutir à la formation de trois produits finaux: l'AVP, la NPII et le glycopeptide, dont le rôle est inconnu à l'heure actuelle (Willcutts, Felner et al. 1999; Berl and Robertson 2000) (**Figure 3**). La vasopressine va ensuite être sécrétée dans le sang par les axones hypothalamiques pour être acheminée jusqu'à ses récepteurs cibles, les récepteurs de la vasopressine V1a, V1b, V2 (Lolait, O'Carroll et al. 1992; Morel, O'Carroll et al. 1992; Saito, Sugimoto et al. 1995).

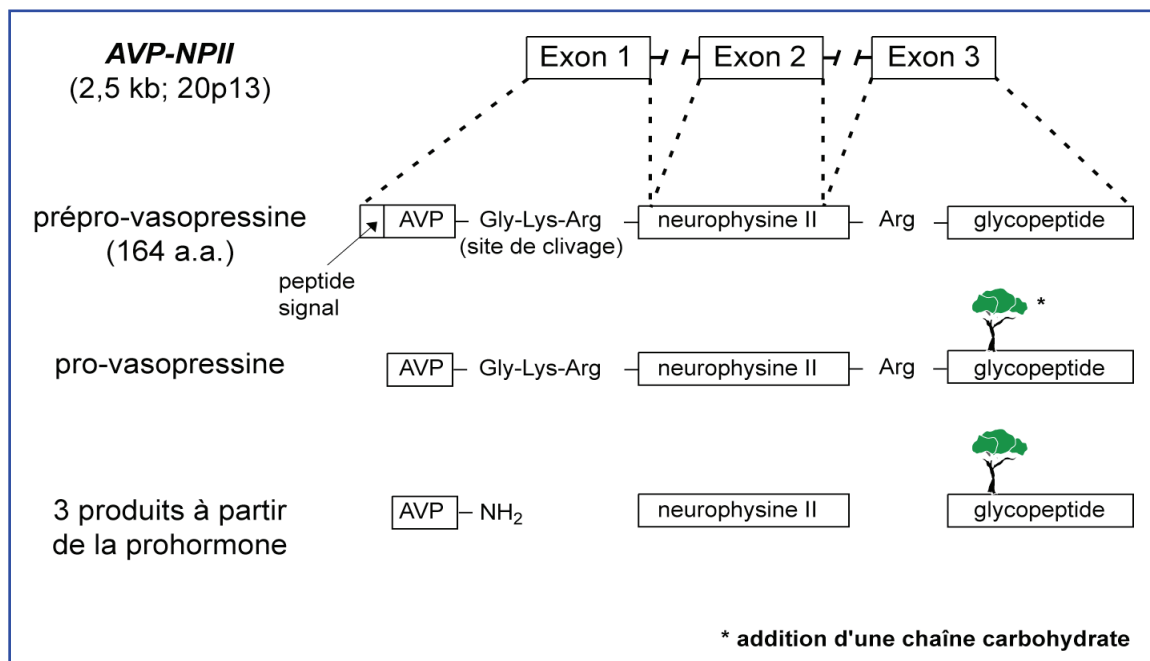


Figure 3. Synthèse de la vasopressine à partir du gène de l'AVP.

### 1.2.1.2. Régulation de la sécrétion de l'hormone antidiurétique

L'AVP étant un élément essentiel de l'économie de l'eau pour l'organisme, sa sécrétion doit être fortement régulée et contrôlée. Cette régulation fait appel à deux mécanismes

distincts, l'un est osmo-dépendant et le second, osmo-indépendant (Schrier, Berl et al. 1979).

Le premier mécanisme, comme son nom l'indique, fait appel aux osmorécepteurs qui sont des neurones dont l'excitabilité est extrêmement sensible à l'osmolalité de leur environnement (Yanovski, Friedman et al. 1997). En effet, ces neurones, localisés entre le noyau supra-optique et le AV3V dans la région antéro-ventrale du troisième ventricule, présentent la particularité de déceler des variations de l'osmolalité sanguine de l'ordre de 2 mOsm/kg soit moins de 1% de l'osmolalité plasmatique normale (Schrier, Berl et al. 1979). De plus, ces osmorécepteurs, localisés au niveau des neurones de l'*organum vasculosum lamina terminalis* (OVLT), étant en communication directe avec les neurones du noyau supra-optique sécrétant l'AVP, peuvent ainsi réguler constamment la synthèse et la sécrétion d'AVP (Bourque, Oliet et al. 1994; Bourque and Oliet 1997). Une étude récente a démontré qu'une famille de canaux ioniques, les récepteurs Trpv (« transient receptor potential vanilloid »), et plus particulièrement Trpv1, situés à la surface des neurones de l'OVLT et du noyau supra-optique, étaient requis pour la détection des signaux osmotiques et, par voie de conséquence, pour la sécrétion d'AVP osmo-dépendante (Ciura and Bourque 2006; Sharif Naeini, Witty et al. 2006). En effet, l'invalidation génique chez la souris du gène codant le récepteur Trpv de type 1, Trpv1 également connu sous le nom de récepteur capsaicin, entraînait, en cas d'hyperosmolalité, une diminution drastique de la sécrétion d'AVP.

Le second mécanisme est, quant à lui, osmo-indépendant dans la mesure où il repose sur des réflexes barométriques et pulmonaires suite à de grands changements de volume sanguin et de pression artérielle (Chowdrey and Lightman 1993). En effet, la réduction du volume des liquides extracellulaires et de la pression artérielle diminue la stimulation des barorécepteurs localisés au niveau des oreillettes, du sinus carotidien et de l'aorte, représentant des zones de haute pression, et des veines pulmonaires, représentant des zones de basse pression. La conséquence directe de ces changements de pression est une

augmentation, ou une diminution, de la sécrétion d'AVP. Cependant, ce mécanisme est beaucoup moins sensible que le mécanisme osmo-dépendant: les variations de sécrétion d'AVP ne s'observent qu'après un changement de 10% du volume sanguin et de la pression artérielle (Bankir 2001).

Cette différence de sensibilité reflète, en fait, le rôle de chacun des deux mécanismes. En effet, le mécanisme osmo-dépendant est le processus mis quotidiennement en jeu par l'organisme afin de réguler la réabsorption hydrique, alors que le mécanisme osmo-indépendant n'est déclenché qu'en cas de stress (Guyton and Hall 2000). D'autres facteurs peuvent également intervenir dans la synthèse et la sécrétion d'AVP comme, par exemple, des variations de l'osmolalité du liquide cérébro-spinal ou encore certains stimuli comme la nicotine, la morphine ou l'alcool (Schrier, Berl et al. 1979; Rowe, Kilgore et al. 1980; Thrasher, Brown et al. 1980; Robertson and Berl 1996; Guyton and Hall 2000).

### **1.2.1.3. Fonctions de l'hormone antidiurétique**

Comme il a été mentionné auparavant, l'hormone antidiurétique est principalement synthétisée et sécrétée par les neurones de l'hypothalamus. Cependant, elle peut également être produite et libérée au niveau périphérique, par la glande surrénale et l'endomètre utérin, entre autres (Jard, Elands et al. 1988).

De nombreuses études ont permis de révéler que l'AVP avait plusieurs rôles physiologiques. Parmi ceux-ci, l'un est particulièrement important: éviter les pertes hydriques à l'organisme. L'hormone antidiurétique agit principalement au niveau du segment distal du néphron où elle va, comme son nom l'indique, augmenter la réabsorption de l'eau libre en situation de déshydratation (Berl and Robertson 2000). Cependant, cette fonction ne vaut que lorsque l'AVP est libérée dans la circulation sanguine. Ce rôle dans la réabsorption hydrique a lieu au niveau des récepteurs à cette hormone localisés au niveau des cellules principales du tubule collecteur. Toujours au niveau de ces cellules, l'AVP va également réguler deux autres types de transporteurs, l'un à l'urée (« **urea transporter 1** »),

ou UT1), et le second au sodium (Dieci, Hermann-Le Denmat et al.). Dans ces deux cas, l'AVP va moduler l'expression du canal épithélial sodique ENac et du transporteur à l'urée à la membrane en réponse à l'activation de la **protéine kinase A (PKA)** (Shayakul, Steel et al. 1996; Ward, Hammond et al. 1999).

Dans une moindre mesure, la vasopressine possède une fonction vasoconstrictrice puissante. De plus, lorsque celle-ci est libérée au niveau synaptique du système nerveux central et périphérique, son rôle est d'agir comme un neuromédiateur dans la régulation de fonctions telles que la pression artérielle et la thermorégulation (Guyton and Hall 2000).

Enfin, ce composé exerce d'autres rôles. Parmi ceux-ci, nous pouvons noter son implication dans l'hémostase, en agissant sur l'agrégation plaquettaire; dans la régulation de sécrétions hypophysaires, comme par exemple pour l'hormone adrénocorticotrope; dans la régulation de la sécrétion de stéroïdes surrénaliens; dans la libération de certains facteurs de coagulation et enfin sa fonction dans la glycogénolyse hépatique.

Cette grande diversité d'actions de cette hormone est étroitement liée à la stimulation de ses récepteurs spécifiques. Suivant des critères pharmacologiques et fonctionnels, ces récepteurs sont subdivisés en quatre classes en fonction de leurs localisations tissulaires: les récepteurs vasculaires V1, ou V1a; les récepteurs V1 pituitaires, ou V1b ou V3; les récepteurs V2 rénaux, ou V2R; et enfin les récepteurs à l'ocytocine ou ROT (Jard, Elands et al. 1988; Guyton and Hall 2000; Thibonnier, Coles et al. 2001). Il faut toutefois noter que l'ocytocine, et son récepteur ROT, bien que présentant de très fortes homologues avec l'AVP et ses récepteurs, respectivement, ne leur sont pas structurellement identiques. En effet, les résidus Phénylalanine en position 3 et Arginine en position 8 (résidu basique) de la vasopressine, sont remplacés par deux résidus au caractère neutre, soit une Isoleucine et une Leucine dans l'ocytocine (Gimpl and Fahrenholz 2001). Cette différence de polarité entre ces deux résidus serait responsable de l'interaction de chacune de ces deux hormones avec leurs récepteurs spécifiques (Barberis, Mouillac et al. 1998). De plus, les récepteurs V2 et V1 ne présentent que 40 et 50% d'homologie avec le ROT (Gimpl and Fahrenholz

2001). Les parties des récepteurs présentant les plus fortes homologies sont les boucles extracellulaires ainsi que les sept segments transmembranaires. À l'inverse, les extrémités C et N-terminales ainsi que les boucles intracellulaires sont moins conservées d'un récepteur à l'autre (Gimpl and Fahrenholz 2001).

## **1.2.2. Le diabète central**

### **1.2.2.1. Définition**

Ce type de diabète héréditaire tire son nom du fait que l'origine de la maladie réside au point de départ de la production de l'AVP. Par conséquent, le taux plasmatique de l'hormone sera très faible, voire quasi nul, donc les cellules rénales resteront insensibles à son action et il n'y aura aucun mécanisme de concentration de l'urine mis en jeu. La conséquence ultime sera une réabsorption hydrique très limitée au niveau du rein, ce qui entraînera une diurèse très importante avec une très faible osmolalité (Zerbe and Robertson 1984).

### **1.2.2.2. Etiologies**

Les étiologies du diabète insipide central sont variables: elles sont de nature acquise ou héréditaire.

La forme acquise survient lorsque les noyaux supra-optiques et paraventriculaires subissent des dommages: la destruction des noyaux supra-optiques et paraventriculaires, lors d'un acte chirurgical par exemple, entraînera un diabète insipide central permanent. À l'opposé, il est observé des types de diabètes post-chirurgie transitoires.

La forme héréditaire de ce diabète est causée par des mutations autosomiques dominantes ou récessives du gène codant l'AVP (Guyton and Hall 2000). Dans la plupart des cas, l'hérédité est autosomique dominante et la fonction de l'allèle normal est altérée.

Il s'agit en fait d'un processus d'accumulation progressive des précurseurs de l'AVP mal conformés dans le réticulum endoplasmique (RE) des cellules magnocellulaires. Cette accumulation est toxique pour la cellule et il va s'ensuivre une autophagie des précurseurs (Bichet 2006).

De très rares cas de transmission autosomique récessive ont été référencés et sont le plus souvent associés à un syndrome de Wolfram (caractérisé par différentes manifestations neurologiques et endocriniennes, entre autres, un diabète sucré, un DIN, une atrophie optique, des démences, des maladies mentales, etc.) (Minton, Rainbow et al. 2003). Ces défauts génétiques sont liés à des anomalies localisées sur le chromosome 4 et en particulier au niveau des gènes codant la wolframine, le gène *WFS1* (Inoue, Tanizawa et al. 1998; Strom, Hortnagel et al. 1998), et le gène codant la protéine ERIS (« endoplasmic reticulum intermembrane small protein »), le gène *ZCD2* (Amr, Heisey et al. 2007). Ces protéines sont toutes deux localisées au niveau du réticulum endoplasmique et jouent un rôle très important sur l'homéostasie calcique cellulaire (Takeda, Inoue et al. 2001; Osman, Saito et al. 2003; Amr, Heisey et al. 2007).

### **1.2.3. Les diabètes insipides néphrogéniques héréditaires (DIN)**

Si le diabète insipide central se caractérise par une incapacité, permanente ou non, à sécréter l'AVP, la forme néphrogénique est causée par une incapacité des cellules rénales à répondre à cette hormone malgré un taux circulant normal ou élevé. Une fois encore, ce type de diabète peut être soit de nature héréditaire, soit de nature acquise. Cependant, eu égard aux travaux qui ont conduit à la rédaction de ce manuscrit, seule la forme héréditaire, dite primaire, fera l'objet d'une étude détaillée dans les parties suivantes.

#### **1.2.3.1. Définitions et types de DIN**

Il n'existe pas, en fait, une mais deux définitions pour le DIN en fonction de la littérature (Bichet 2006):

- La première, dite restreinte, stipule que le DIN ne concerne que les états de résistance à l'hormone antidiurétique. Dans cette définition ne sont inclus que les états où l'hormone antidiurétique ne modifie pas la perméabilité à l'eau du canal collecteur rénal;
- La seconde, beaucoup plus large, précise que le DIN inclut également l'ensemble des états pathologiques caractérisés par une incapacité à établir le gradient osmolaire corticomédullaire avec ou sans résistance à l'hormone. Suivant cette définition, nous pouvons citer par exemple le syndrome de Bartter, l'insuffisance rénale aiguë ou chronique, etc. (**Tableau 1**).

**Tableau 1. Étiologies des diabètes insipides néphrogéniques (Bichet 2006).**

• **DIN (définition restreinte): la perméabilité à l'eau du canal collecteur rénal n'est pas augmentée par la vasopressine**

- Héritaire :
  - DIN lié à l'X
  - DIN autosomique récessif
- Hypercalcémie
- Hypokaliémie
- Médicaments :
  - lithium
  - démélocycline
  - amphotéricine B
  - méthoxyflurane
  - diphénylhydantoïne
  - nicotine
  - alcool

• **DIN (définition élargie): impossibilité d'établir un gradient corticomédullaire rénal**

- Héritaire :
  - syndrome de Bartter
- Insuffisance rénale :
  - aiguë
  - chronique (surtout néphrite interstitielle et polykystose rénale)
- Uropathie obstructive
- Altérations de la médullaire rénale :
  - anémie falciforme
  - amyloïdose
  - syndrome de Sjögren
  - sarcoïdose
  - hypercalcémie
  - hypokaliémie
  - malnutrition protéique
  - cystinose



Nous nous intéresserons ici uniquement aux états pathologiques qui entrent dans la définition restreinte et plus particulièrement aux formes de DIN insensibles à la vasopressine de nature héréditaire, lié à l’X, ou autosomique récessive. La majorité des personnes atteintes de DIN héréditaires sont des individus de sexe masculin présentant des défauts de structure du gène codant pour l’AVPR2; cela représente 90% des cas. Les 10% des cas restants sont caractérisés par un mode de transmission autosomique récessif ou dominant avec atteinte du gène codant l’AQP2 qui est un membre de la famille des aquaporines (Bichet 2006).

#### **1.2.3.1.1. Le DIN lié à l’X**

Cette forme de diabète est relativement rare: la fréquence au Québec est évaluée à 8,8 par million d’habitants (Arthus, Lonergan et al. 2000). Cependant, nous pouvons noter que certaines communautés présentent une fréquence plus élevée; c’est le cas par exemple dans certaines régions rurales de Nouvelle-Ecosse ou du Nouveau-Brunswick où celle-ci peut atteindre 24 pour 10 000 d’habitants. De la même manière, il semble qu’aucun groupe ethnique ne soit épargné par cette maladie (Bichet, Hendy et al. 1992).

Lorsque les patients atteints de DIN lié à l’X reçoivent un analogue de l’AVP, la 1-**désamino-8-D-arginine-vasopressine** (dDAVP), nous pouvons observer:

1) une résistance urinaire à ce composé: il n’y a aucune modification de la diurèse ou de l’osmolalité de l’urine (Bichet, Razi et al. 1988; Bichet, Razi et al. 1989);

2) une absence totale de réponse hémodynamique et coagulante: il n’y a aucune baisse de la pression artérielle et des résistances périphériques ainsi qu’aucune libération de facteurs de coagulation tels que le facteur de von Willebrand, ou le facteur VIIIc (Bichet, Razi et al. 1988; Bichet, Razi et al. 1989);

3) la production d’adénosine **monophosphate cyclique** (AMPc) plasmatique n’est pas stimulée (Bichet, Razi et al. 1988; Bichet, Razi et al. 1989).

Ces réponses, étant à l'opposé de celles observées chez des patients contrôles sains, laissent à penser, d'une part, qu'il existerait des récepteurs à l'AVP extrarénaux (bien que la présence de ces derniers soit pour le moment sujet à controverses, elle permettrait d'expliquer les effets hémodynamiques et coagulants de l'analogue de l'AVP) et d'autre part, que le défaut chez ces patients, se situerait en amont de l'étape de production de l'AMPc, soit au niveau du récepteur lui-même (Bichet, Razi et al. 1988; Bichet, Razi et al. 1989).

Cette dernière idée a été confirmée par la découverte de défauts de structure du gène codant pour l'AVPR2 (Bichet, Hendy et al. 1992; Bichet, Arthus et al. 1993). En effet, au niveau de ce gène, des mutations sont retrouvées dans les régions codantes. Celles-ci entraînent le plus souvent des pertes de fonction ou une séquestration dans le réticulum du récepteur produit conduisant à sa dégradation prématurée par ubiquitination (Morello and Bichet 2001).

#### **1.2.3.1.2. Le DIN autosomique récessif et dominant**

Des observations basées sur le test à la dDAVP effectué chez des patients de sexe masculin atteints de diabète insipide néphrogénique ont permis de mettre en évidence un second mode de transmission de la maladie. En effet, chez ces malades, les réponses hémodynamiques et coagulantes étaient, au contraire de celles observées chez des patients souffrant de DIN lié à l'X, tout à fait normales et similaires à celles des patients sains (Brenner, Seligsohn et al. 1988). De plus, les mesures de production d'AMPc plasmatique ont révélé une augmentation de celle-ci ce qui laissait croire que le défaut se situait cette fois-ci en aval de la production d'AMPc et n'avait donc aucun lien avec le récepteur à la vasopressine en lui-même (Ohzeki, Igarashi et al. 1984; Knoers and Monnens 1991). Par la suite, ont été localisées chez un patient atteint de DIN héréditaire et présentant des réponses normales à la dDAVP, des mutations affectant chaque allèle du gène codant pour l'AQP2 (Deen, Verdijk et al. 1994).

### 1.2.3.2. Les causes des DIN

Comme il vient d'être précisé, les patients atteints de DIN héréditaires présentent des défauts de structure des parties codantes des gènes de l'*AVPR2* ou de l'*AQP2*. Ces anomalies ayant pour conséquence une non expression des protéines correspondantes et la protéine de l'*AVPR2* faisant l'objet d'un chapitre ultérieur, nous nous contenterons de ne donner ici que quelques généralités concernant cette dernière et de traiter plus en détail le gène ainsi que la protéine de l'*AQP2*.

#### 1.2.3.2.1. Le récepteur à la vasopressine de type 2

Ce récepteur, liant l'AVP au niveau des cellules principales du tubule collecteur du rein, est la pierre angulaire du contrôle de la réabsorption hydrique de tout organisme humain. Le clonage de son gène en 1992 par l'équipe de M. Birnbaumer (Birnbaumer, Seibold et al. 1992) ainsi que plusieurs travaux ultérieurs, ont permis de mettre en évidence des altérations génétiques empêchant la bonne fonctionnalité de ce récepteur (Pan, Metzberg et al. 1992; Rosenthal, Seibold et al. 1992; van den Ouweland, Dreesen et al. 1992; Bichet, Arthus et al. 1993; Holtzman, Kolakowski et al. 1993; Merendino, Spiegel et al. 1993; Rosenthal, Antaramian et al. 1993; Bichet, Birnbaumer et al. 1994).

Les mutations touchant ce gène engendrent le plus souvent des pertes de fonction ou une séquestration dans le réticulum de la protéine conduisant à sa dégradation prématurée et par conséquent, entraînent *in fine* une absence totale ou partielle de réabsorption hydrique malgré une sécrétion normale d'AVP (Bichet 1992; Morello and Bichet 2001).

Il existe à ce jour plus de 193 mutations affectant l'*AVPR2* et entraînant un DIN lié à l'X dans plus de 239 familles d'origine ancestrales différentes (Morello, Salahpour et al. 2000; Bichet and Fujiwara 2001; Morello and Bichet 2001; Bichet 2006). Parmi l'ensemble de ces mutations, la majorité, 50%, sont des mutations faux-sens, c'est-à-dire qu'un seul aa sauvage est remplacé par un autre aa mutant. On retrouve également des mutations

entraînant un décalage du cadre de lecture par insertion ou délétion d'un ou plusieurs nucléotides (27%), des mutations non-sens générant un codon stop prématuré dans la structure de l'acide ribonucléique messager (ARNm) (11%), des grandes délétions (5%), des délétions ou des insertions en phase avec le cadre de lecture (4%) et enfin des mutations des sites d'épissage (2%) (Bichet 2006).

#### **1.2.3.2.2. L'aquaporine-2**

Suite à des études de perfusions de dDAVP et de caractérisations phénotypiques de patients atteints de DIN héréditaire, un second mode de transmission fut mis à jour. En effet, celui-ci n'est plus lié à l'X mais autosomique et dans ce cas, le gène affecté par des mutations n'est plus l'*AVPR2* mais l'*AQP2*. La protéine codée par ce gène est une protéine canal appartenant à la famille des **aquaporines** (AQPs) dont le seul et unique but est de permettre les échanges hydriques entre les milieux extra et intracellulaires (Agre 2006; Bichet 2006; Nielsen, Kwon et al. 2007).

##### **1.2.3.2.2.1. Propriétés générales des aquaporines**

Ces composés, dont plus de 200 membres sont répertoriés à travers le monde animal et végétal, sont des protéines membranaires indispensables à la vie de tout organisme vivant puisque permettant les flux hydriques à travers les membranes phospholipidiques des cellules. Cette caractéristique essentielle s'accompagne d'une imperméabilité de ces mêmes canaux aux ions ce qui permet donc à une cellule de ne réabsorber que de l'eau (de Groot and Grubmuller 2001; Bichet 2006). Bien que la plupart des aquaporines ne soient perméables qu'à l'eau, certaines d'entre elles, les AQP3, 7, 9 et 10, permettent de transporter également du glycérol alors que d'autres, les AQP6, 8, 11 et 12 font encore l'objet d'études quant à leurs rôles et fonctions exactes. Pour cette raison, on parle alors, respectivement, d'aquaglycéroporines et d'aquaporines « non orthodoxes » (Nielsen, Kwon et al. 2007; Rojek, Praetorius et al. 2008).

Chez les mammifères, à l'heure actuelle, pas moins de 13 membres de cette famille, les AQP0 à AQP12, sont répertoriés et caractérisés du point de vue de leurs localisations, de leurs régulations ainsi que de leurs structures (Agre 2004; Verkman 2006; Nielsen, Kwon et al. 2007; Rojek, Praetorius et al. 2008). Cependant, la découverte et la caractérisation de la première molécule appartenant à cette famille remontent à 1987 et ont valu à leur auteur, Peter Agre, le prix Nobel de Chimie en 2003. Cette petite protéine de 28 kilo Daltons (kDa), initialement baptisée CHIP28 pour « **channel-forming integral membrane protein of 28 kDa** », a été découverte après plus de 40 années de recherches infructueuses pour caractériser le premier canal à eau. Elle a été mise en évidence dans les membranes des globules rouges humain du fait de son abondance (plus de 200 000 copies par globule rouge) puis dans les tubules proximaux rénaux (Denker, Smith et al. 1988; van Hoek, Hom et al. 1991). Par la suite, le clonage de l'ADN (**acide désoxyribonucléique**) correspondant à cette protéine et différentes expériences d'expression dans l'ovocyte de *Xenopus laevis*, ont permis de démontrer qu'il s'agissait d'une part, d'un polypeptide de 269 aa comportant 6 segments transmembranaires et d'autre part, de confirmer la fonction de canal à eau de cette protéine. À partir de ce moment-là, la protéine CHIP28 prit la dénomination d'**aquaporine-1 (AQP1)** (Preston and Agre 1991; Preston, Carroll et al. 1992).

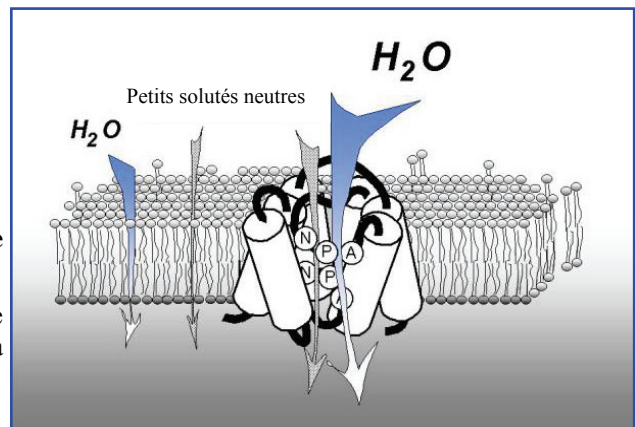
Dans un second temps, l'utilisation de techniques telles que la cristallographie, la diffraction aux rayons X, etc. ont permis de confirmer la structure et l'organisation tridimensionnelle de l'AQP1. Celle-ci est insérée dans la membrane sous forme d'homotétramères dans lesquels chaque sous-unité d'AQP1 est composée de 6 hélices délimitant un espace dans lequel l'eau va pouvoir s'infiltrer. Par conséquent, chaque molécule d'AQP1 permet le passage simultané de 4 molécules d'eau. En effet, parmi les caractéristiques organisationnelles communes à l'ensemble des aquaporines, il est important de noter la présence de deux motifs **Asparagine-Proline-Alanine** (ou motif NPA) par monomère orientés à 180° l'un par rapport à l'autre. Cette orientation spatiale des motifs NPA facilite ainsi la création de liaisons hydrogènes, bloquant le passage des protons, grâce aux résidus polaires, Asparagine, ou N dans le motif, et ainsi permet le

passage exclusif d'une molécule d'eau par monomère (**Figure 4**). Ceci peut expliquer le passage de volumes d'eau considérables observé à travers les membranes en comparaison avec le phénomène de diffusion simple: au niveau du rein, il est prédit un flux hydrique unidirectionnel de 3 milliards de molécules d'eau par seconde et par monomère (Zeidel, Ambudkar et al. 1992; Walz, Smith et al. 1994; Bichet 2006).

**Figure 4. Représentation d'un monomère d'AQP1.**

Comparaison quantitative du flux hydrique entre le phénomène de diffusion simple flèche bleue (à gauche) et le canal hydrique.

NB: Les deux motifs NPA sont représentés.



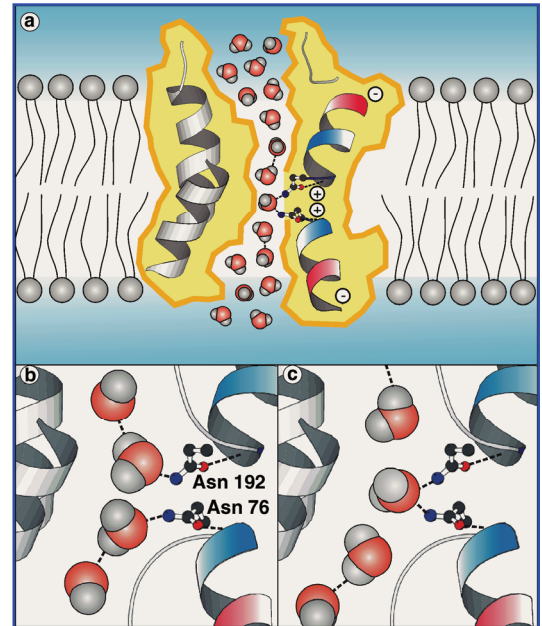
Cette caractéristique de perméabilité extrêmement élevée des aquaporines, s'accompagne d'une sélectivité remarquable. En effet, ces canaux sont totalement imperméables aux ions et en particulier aux protons (Bichet 2006). Ce point essentiel trouve son explication dans l'organisation générale à l'intérieur du monomère. En effet, à ce niveau nous pouvons noter la présence d'un aa cationique, l'Arginine en position 195, qui va imposer une répulsion électrostatique aux protons. De plus, lors du passage d'une molécule d'eau dans le monomère, il va y avoir une réorganisation du dipôle de cette même molécule: l'atome d'oxygène va former de manière temporaire des liaisons hydrogènes avec les groupements amides de deux résidus Asparagine, les Asn192 et Asn76 qui vont « entrer » dans le canal (**Figure 5**, page 21) (Murata, Mitsuoka et al. 2000). Ceci va engendrer une réorientation spatiale des atomes d'hydrogène de la molécule d'eau qui vont se trouver perpendiculaires à l'axe du canal et ainsi être incapables de créer de nouvelles liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau environnantes. La conséquence finale de cette

réorganisation est que les atomes d'hydrogène eux-mêmes repoussent les protons et laissent passer l'eau: c'est ce que l'on appelle la cassure du « câble de conduction des protons » (Roux, Lapointe et al. 2001; Bichet 2006).

**Figure 5. Représentation schématique d'une molécule d'AQP1.**

- a.** Réorientation et passage des molécules d'eau grâce aux charges partielles des dipôles.
- b et c.** La liaison d'une molécule d'eau aux résidus Asn76 et/ou Asn192 participe au passage des molécules d'eau et entraîne le non passage des protons suite à la réorientation de celle-ci.

Reproduit avec permission Copyright (2000) Macmillian Magazines Ltd.



Bien que les aquaporines soient disséminées dans l'ensemble de l'organisme, il semble évident que certains tissus à la perméabilité élevée présentent une population de ces protéines plus importante (**Tableau 2**, pages 23 et 24). C'est le cas par exemple du rein, où l'on peut noter la présence de molécules d'AQP1 au niveau du tubule proximal, mais également d'AQP2, 3 et 4 au niveau des cellules principales du tubule collecteur (CPTC), d'AQP6 dans les vésicules intracellulaires des cellules intercalaires de ce même tubule collecteur (CITC), d'AQP7 dans la bordure en brosse des cellules du tubule proximal (CTP), et d'AQP8 dans les CPTC et les CTP (**Figure 6**, page 22) (Nielsen, Frokiaer et al. 2002).

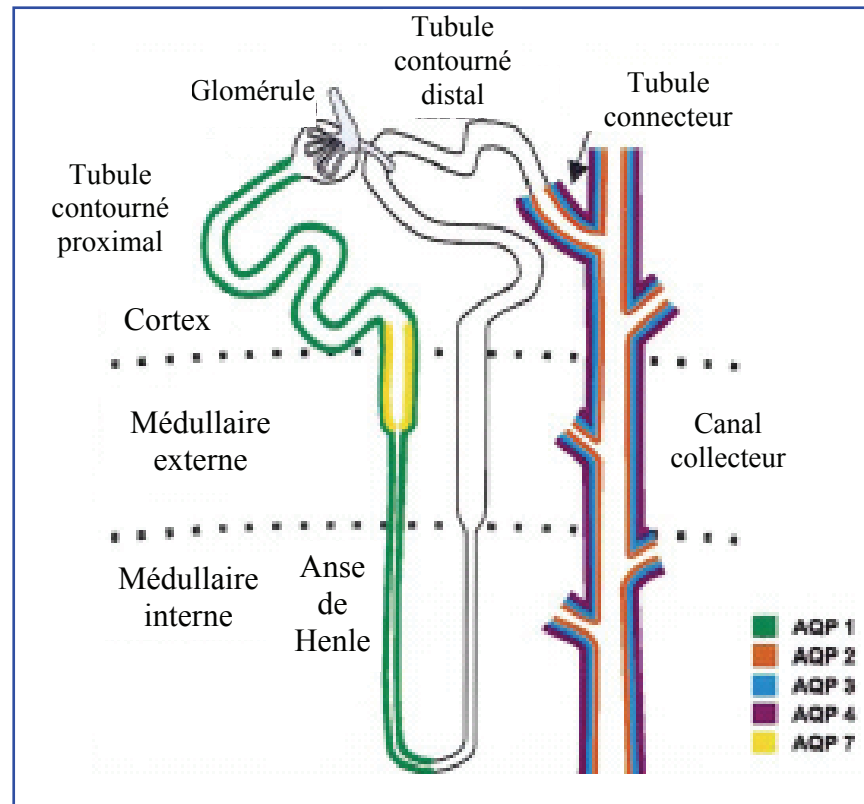


Figure 6. Représentation schématique de la répartition des différentes molécules d'aquaporine dans le rein adapté d'après (Marples, Frokiaer et al. 1999).

Les différentes molécules d'aquaporine étant localisées au niveau de divers organes, elles remplissent une variété de fonctions considérable. En effet, et bien que ne permettant « que » le passage de molécules d'eau à travers la membrane plasmique, ces molécules sont impliquées dans des actions physiologiques aussi variées que la reproduction, la digestion, l'hydratation de la cornée, la production du liquide céphalo-rachidien, la régulation de la température et surtout dans la diurèse (pour revue, (Ishibashi, Kuwahara et al. 2000; Verkman and Mitra 2000; Nielsen, Frokiaer et al. 2002; Verkman 2005; Verkman 2006; Nielsen, Kwon et al. 2007; Rojek, Praetorius et al. 2008)) (**Tableau 2** pages 23 et 24). En effet, parmi l'ensemble des membres de cette grande famille, les molécules d'AQP2, du fait de leur localisation tissulaire, exclusivement rénale, jouent un rôle prépondérant dans le



maintien de l'homéostasie en réponse à l'AVP, et des défauts d'expression du gène codant ce canal entraînent un DIN.

**Tableau 2. Distribution et rôles des aquaporines dans l'organisme.**

Aquaporines	Activités	Localisation		Distribution subcellulaire	Références
		Rénale	Extrarénale		
<b>AQP0</b>	Canal hydrique	-	Œil (cellules des fibres du cristallin)	Jonctions membranaires et protéoliposomes	(Bloemendal, Zweers et al. 1972; Bok, Dockstader et al. 1982; Gorin, Yancey et al. 1984; Mulders, Preston et al. 1995; Nielsen, Kwon et al. 2007)
<b>AQP1</b>	Canal hydrique et polyols à 3C	Tubule proximal et branche descendante de l'anse de Henle	Ubiquitaire (rein, œil, cerveau, cœur, poumon, etc.)	Membranes apicale et basolatérale	(Nielsen, DiGiovanni et al. 1993; Nielsen, Smith et al. 1993; van Os, Deen et al. 1994; Abrami, Tacnet et al. 1995; Nielsen, King et al. 1997; Nielsen, Frokiaer et al. 2002; Nielsen, Kwon et al. 2007)
<b>AQP2</b>	Canal hydrique	Cellules principales du tubule collecteur	-	Membrane apicale et vésicules intracellulaires	(Fushimi, Uchida et al. 1993; Nielsen, DiGiovanni et al. 1993; Fushimi, Sasaki et al. 1994; van Os, Deen et al. 1994; Nielsen, Frokiaer et al. 2002; Bichet 2006; Nielsen, Kwon et al. 2007)
<b>AQP3</b>	Canal hydrique et glycérol	Cellules principales du tubule collecteur	Poumon, vessie, appareil gastro-intestinal, épiderme	Membrane basolatérale	(Ishibashi, Sasaki et al. 1994; van Os, Deen et al. 1994; Ishibashi, Sasaki et al. 1995; Ishibashi, Sasaki et al. 1997; Nielsen, King et al. 1997; Nielsen, Frokiaer et al. 2002; Hara-Chikuma and Verkman 2005; Bichet 2006; Nielsen, Kwon et al. 2007; Rojek, Praetorius et al. 2008)
<b>AQP4</b>	Canal hydrique	Cellules principales du tubule collecteur de la médullaire	Œil, cerveau, cœur, poumon, intestin	Membrane basolatérale	(van Os, Deen et al. 1994; Ma, Yang et al. 1997; Nielsen, King et al. 1997; Nielsen, Frokiaer et al. 2002; Bichet 2006; Nielsen, Kwon et al. 2007)

Aquaporines	Activités	Localisation		Distribution subcellulaire	Références
		Rénale	Extrarénale		
<b>AQP5</b>	Canal hydrique	-	Glande salivaire, poumon, œil	Membrane apicale et vésicules intracellulaires	(Raina, Preston et al. 1995; Nielsen, King et al. 1997; Nielsen, Frokiaer et al. 2002; Nielsen, Kwon et al. 2007)
<b>AQP6</b>	Canal hydrique et anionique	Cellules intercalaires du tubule collecteur		Vésicules intracellulaires	(Yasui, Hazama et al. 1999; Yasui, Kwon et al. 1999; Ikeda, Beitz et al. 2002; Nielsen, Frokiaer et al. 2002; Bichet 2006; Nielsen, Kwon et al. 2007; Rojek, Praetorius et al. 2008)
<b>AQP7</b>	Canal hydrique et glycérol	Tubule proximal (segment 3)	Testicules et adipocytes	Membrane apicale	(Ishibashi, Kuwahara et al. 1997; Ishibashi, Imai et al. 2000; Nielsen, Frokiaer et al. 2002; Bichet 2006; Nielsen, Kwon et al. 2007; Rojek, Praetorius et al. 2008)
<b>AQP8</b>	Canal hydrique et urée	Médullaire, cortex	Testicules, foie pancréas, côlon, cœur, placenta	Vésicules intracellulaires	(Ishibashi, Kuwahara et al. 1997; Ma, Yang et al. 1997; Koyama, Ishibashi et al. 1998; Calamita, Mazzone et al. 2001; Calamita, Mazzone et al. 2001; Nielsen, Frokiaer et al. 2002; Nielsen, Kwon et al. 2007; Rojek, Praetorius et al. 2008)
<b>AQP9</b>	Canal hydrique et glycérol	-	Foie, leucocytes, poumon, cerveau, testicules, épидидyme	Membrane apicale	(Ishibashi, Kuwahara et al. 1998; Nielsen, Frokiaer et al. 2002; Nielsen, Kwon et al. 2007; Rojek, Praetorius et al. 2008)
<b>AQP10</b>	Canal hydrique et glycérol	-	Petit intestin	?	(Ishibashi, Morinaga et al. 2002; Nielsen, Kwon et al. 2007; Rojek, Praetorius et al. 2008)
<b>AQP11</b>	Canal hydrique	Cellules du tubule proximal	Foie	?	(Ishibashi, Kuwahara et al. 2000; Verkman 2005; Nielsen, Kwon et al. 2007; Rojek, Praetorius et al. 2008)
<b>AQP12</b>	?	?	Cellules acinaires pancréatiques	?	(Ishibashi, Kuwahara et al. 2000; Verkman 2005; Nielsen, Kwon et al. 2007; Rojek, Praetorius et al. 2008)

#### 1.2.3.2.2.2. L'aquaporine-2

Au contraire des molécules d'AQP1 et d'AQP3, dont l'expression est ubiquitaire, les molécules d'AQP2, sont présentes exclusivement au niveau du tubule collecteur rénal et plus particulièrement au niveau des cellules principales où elles vont permettre la réabsorption hydrique et ainsi participer activement au mécanisme de concentration urinaire (Fushimi, Uchida et al. 1993; Fushimi, Sasaki et al. 1994; Nielsen, Frokiaer et al. 2002). Cependant, de nombreuses études ont permis de démontrer que dans ces cellules, les molécules d'AQP2 étaient localisées dans des zones bien précises: tout d'abord et avant tout, au niveau de la membrane plasmique apicale qui est en contact avec la lumière du canal, et d'autre part, dans des vésicules intracellulaires, ou agrégophores (Nielsen, DiGiovanni et al. 1993; Nielsen, Chou et al. 1995; Nielsen, Marples et al. 1995; Borgnia, Nielsen et al. 1999). Il semblerait que, comme Wade et al. l'ont proposé au début des années 80, suite à la liaison de l'AVP sur son récepteur, situé à la membrane basolatérale des cellules, les vésicules précédemment citées, fusionnent avec la membrane apicale (Wade, Stetson et al. 1981). En effet, des études d'immunolocalisation des molécules d'AQP2 au niveau des CPTC, ont mis en évidence un système de « navette » de ces vésicules entre le compartiment cytoplasmique et la membrane apicale suite à la liaison de l'AVP (Nielsen, Chou et al. 1995). De plus, ce trafic des vésicules est un processus réversible: à l'arrêt de l'administration d'AVP ou de son analogue, la dDAVP, ces mêmes expériences de localisation cellulaire ont montré une diminution du nombre de molécules d'AQP2 à la membrane. Ceci semble confirmer le fait que les molécules d'AQP2, préalablement contenues dans les vésicules intracellulaires, gagnent la membrane suite à la liaison de l'AVP sur l'AVPR2 (Wade, Stetson et al. 1981).

D'un point de vue moléculaire, le processus aboutissant à la fusion des vésicules à la membrane fait suite à une série d'évènements, décrits dans le chapitre traitant de la protéine de l'AVPR2 (voir, « Voie de signalisation », page 66), permettant l'activation de la PKA qui va, à son tour activer la translocation des vésicules. En effet, les molécules d'AQP2

possèdent un site consensus pour cette kinase au niveau de l'extrémité C-terminale, le motif RRQS (Arginine-Arginine-Glutamine-Sérine). Suite à l'activation du récepteur à l'AVP, la Sérine de ce motif, en position 256, va être très rapidement (moins d'une minute) phosphorylée par la PKA (Nishimoto, Zelenina et al. 1999; Christensen, Zelenina et al. 2000). Ce délai concorde avec le temps nécessaire à l'AVP pour augmenter la perméabilité de la membrane tel que démontré par Wall et col. (Wall, Han et al. 1992). Plus récemment, il a été prouvé que cette même sérine pouvait être la cible d'une seconde kinase, la G-CK (« Golgi apparatus casein kinase ») (Procino, Carmosino et al. 2003). En effet, la séquence primaire de l'AQP2 révèle, au niveau du site de phosphorylation par la PKA, la présence du site cible de la G-CK: RRQSVEL (Arginine-Arginine-Glutamine-Sérine-Valine-Glutamate-Leucine) dont le résidu indispensable à l'action de la kinase, l'acide glutamique, est présent (Procino, Carmosino et al. 2003). De plus, l'étude des mutants de l'AQP2, S256A et E258K, suggère que la phosphorylation par la G-CK soit nécessaire au transport des molécules du Golgi vers les vésicules intracellulaires et que la PKA ne permette que la translocation de ces vésicules à la membrane (Procino, Carmosino et al. 2003). Ce système de régulation d'expression des molécules d'AQP2 est dit « à court terme » puisqu'il fait suite à la stimulation du récepteur à la vasopressine en réponse à une sensation de soif de l'organisme.

Cependant, et de manière pour le moins surprenante, il semblerait que ce processus de translocation des vésicules à la membrane ne dépende pas uniquement de la phosphorylation des résidus Sérine256 des molécules d'AQP2. En effet, différentes équipes ont montré que l'accumulation d'AQP2 à la membrane pouvait avoir lieu malgré l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la PKA, et ce malgré la stimulation de l'AVPR2 par l'AVP (Valenti, Procino et al. 2000; Lu, Sun et al. 2004). De plus, le recyclage des molécules d'AQP2 exprimées à la membrane, serait extrêmement rapide et aurait lieu de manière constitutive (Lu, Sun et al. 2004).

Parallèlement au système de régulation de l'expression de l'AQP2 « à court terme », un second mécanisme a été mis en évidence. Ce dernier serait lié à l'existence d'un élément de réponse à l'AMPc (« cAMP response element » ou CRE) situé dans le promoteur du gène de l'*AQP2* et jouerait donc sur l'activation de la transcription de ce gène (Yasui, Zelenin et al. 1997). En effet, un traitement à long terme à la dDAVP durant 5 jours ou une restriction hydrique de 24 à 48 heures entraîne une expression continue de molécules d'AQP2 à la membrane (Nielsen, DiGiovanni et al. 1993; DiGiovanni, Nielsen et al. 1994; Knepper 1997). Ce traitement à la dDAVP, ou la sécrétion d'AVP, entraînant une production continue d'AMPc, ce dernier pourrait lier le CRE dans le promoteur et ainsi activer la transcription du gène de l'*AQP2* sur une plus longue durée (Hozawa, Holtzman et al. 1996). Pour cette raison, ce système porte le nom de « régulation à long terme ».

#### 1.2.3.2.2.3. L'aquaporine-2 et DIN

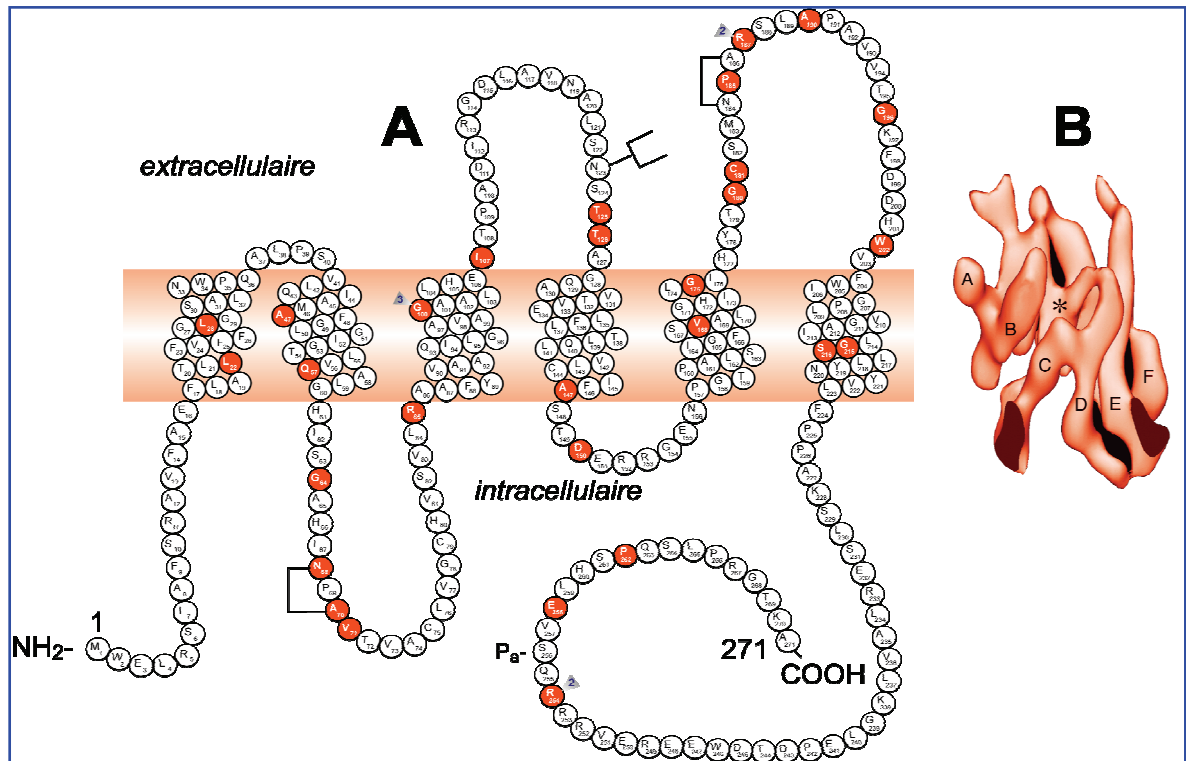
Comme nous venons de le voir, la réabsorption hydrique au niveau du tubule collecteur est due, non pas tant au récepteur à l'AVP lui-même, qu'aux molécules d'AQP2. Par conséquent, des altérations du gène codant cette protéine pourront entraîner des défauts de structure et/ou de fonction de la protéine qui conduiront à un dérèglement de la réabsorption d'eau et donc engendreront divers états pathologiques tel que le DIN.

Historiquement, l'existence de DIN de transmission autosomique a été suggérée par la présence d'un phénotype aussi sévère chez les patients de sexe masculin que féminin (Langley, Balfe et al. 1991; van Lieburg, Verdijk et al. 1994). En effet, de par sa localisation chromosomique, en position 12q13, les mutations affectant le gène de l'*AQP2* touchent également les garçons et les filles. L'équipe de P. Deen, a mis en évidence, chez un garçon atteint de DIN héréditaire, la présence de deux mutations différentes hétérozygotes: l'une de ces mutations provenait du père et la seconde était héritée de la mère (Deen, Verdijk et al. 1994).

À ce jour, 41 mutations sont répertoriées dans 40 familles avec DIN autosomique dominant ou récessif. Celles-ci se répartissent comme suit: 75% d'entre elles correspondent à des mutations faux-sens, 15% à des mutations avec décalage du cadre de lecture suite à des délétions ou des insertions de quelques nucléotides, 5% à des mutations non-sens et 5% à des mutations d'épissage (Bichet 2006). Des études d'expression des protéines mutées ont permis de démontrer leur rétention intracellulaire et leur incapacité d'acquérir une conformation leur permettant d'être insérées dans les vésicules intracellulaires (Deen, Croes et al. 1995; Mulders, Knoers et al. 1997; Tamarappoo and Verkman 1998; Marr, Bichet et al. 2002; Marr, Bichet et al. 2002).

Des expériences de souris transgéniques exprimant la mutation T126M (mutation non-sens touchant la deuxième boucle extracellulaire et entraînant un DIN autosomique récessif) ont démontré la sévérité de la maladie. En effet, ces animaux ne survivaient pas plus de 6 jours après la naissance suite à des problèmes de concentration urinaire et ce, malgré l'administration d'agoniste des récepteurs de l'AVP. Cependant, certaines souris voyaient leur durée de vie augmentée suite à un simple apport hydrique supplémentaire (Yang, Gillespie et al. 2001). En comparaison, d'autres études ont mis à jour un rôle beaucoup moins important que celui rempli par l'AQP2 des AQP1, 3 et 4: les souris « knockout » pour ces protéines présentaient des problèmes de concentration urinaire sans que toutefois ceux-ci n'entraînent la mort des animaux (Ma, Yang et al. 1997; Ma, Yang et al. 1998; Ma, Song et al. 2000). Par conséquent, l'ensemble de ces études tendent à démontrer le rôle très important de l'AQP2 dans le fonctionnement rénal et dans le développement du phénotype de la maladie.

L'ensemble de ces mutations ne semble épargner aucune partie du gène: celles responsables de la forme récessive de la maladie sont retrouvées dans tout le gène et celles entraînant la forme dominante sont localisées principalement dans la partie C-terminale de la protéine (**Figure 7**, page 29) (Bichet, Lonergan et al. 1998; Morello, Salahpour et al. 2000; Kuwahara, Iwai et al. 2001).



**Figure 7. Représentation schématique de l'AQP2 et localisation des mutations. D'après (Bichet 2006).**

**A.** Représentation schématique de l'AQP2, de ses 6 segments transmembranaires et de ses 271 acides aminés. Les motifs NPA sont représentés par 2 crochets dans la première et la troisième boucle intra- et extracellulaire respectivement.

**B.** Structure tridimensionnelle de l'AQP2.

NB : Seules les mutations faux-sens et non-sens sont représentées.

### 1.2.3.3. Signes cliniques et dépistage précoce de la maladie

Comme il a été précisé dans l'introduction sur les DIN héréditaires, cette pathologie est relativement rare, 8,8 cas par million d'habitants au Québec (Rosenthal, Seibold et al. 1992; Arthus, Lonergan et al. 2000), mais elle s'accompagne, cependant, de signes cliniques importants mais non moins évitables. Par conséquent, un dépistage précoce s'avère essentiel, d'autant que celui-ci est relativement aisé.

#### **1.2.3.3.1. Signes cliniques**

L'ensemble de ceux-ci trouve son origine dans la polyurie caractéristique et symptomatique de la maladie. En effet, le fait de sécréter de grandes quantités d'urine va, chez ces personnes et en particulier chez les enfants, engendrer un déficit hydrique général de l'organisme et conduire à des épisodes de déshydratation qui peuvent être sévères. Ce qui aura pour conséquence, dans certain cas, une chute de la pression artérielle et un apport en oxygène du cerveau et du rein très faible entraînant de graves retards du développement intellectuel et donc un retard mental considérable chez ces enfants (Bichet 2006). À cette conséquence grave, d'autres viennent s'ajouter comme par exemple un retard staturo-pondéral dû à un apport calorique trop faible causé par les vomissements réguliers de ces enfants, des épisodes de fièvre, une absence totale de sudation, une irritabilité excessive, des pleurs continuels, etc. (Bichet 2006).

L'histoire de la maladie a permis de montrer que l'évolution initiale de la pathologie était dominée par les épisodes de déshydratation et que seul un apport hydrique répondant aux besoins du sujet suffisait à les éviter. De plus, étant donné que dans la plupart des cas, les patients présentent également une hypernatrémie, lorsque l'apport en eau s'additionne d'un régime pauvre en sel, la maladie devient compatible avec une parfaite santé physique (Mathieu and Loirat 1980). Au niveau du traitement médicamenteux, les patients peuvent recevoir des hydrochlorothiazides et de l'indométhacine afin de réduire les pertes hydriques (Schotland, Grumbach et al. 1963; Jakobsson and Berg 1994).

#### **1.2.3.3.2. Dépistage**

Devant les conséquences qui peuvent être dramatiques et devant le fait que des mesures aussi « simples » qu'un apport en eau suffit à éviter, il semble évident que plus le diagnostic de la maladie a lieu précocement et plus les patients ont de chances de vivre normalement.



Le dépistage se compose de plusieurs phases. Tout d'abord, il faut prendre en compte l'histoire familiale d'un enfant atteint du fait du mode de transmission de la maladie, et la construction d'un arbre généalogique s'avère indispensable pour déterminer la présence de femmes transmettrices. De plus, la présence dans une famille d'enfants de sexe masculin décédés avant l'âge de 1 an ayant présenté un retard staturo-pondéral ainsi que des vomissements fréquents peut laisser penser à l'existence de la maladie dans cette famille. Dans la majorité des cas, la construction de l'arbre généalogique révèle une transmission liée à l'X et met en évidence une histoire familiale. Cependant, il existe des familles où plusieurs générations peuvent « passer » avant que, de nouveau, un enfant atteint ne naisse.

Devant le mode de transmission lié à l'X, si le dépistage des enfants de sexe masculin est aisé (car étant hémizygotés et très sévèrement polyuriques et polydipsiques), celui des enfants de sexe féminin, hétérozygotes, est plus problématique. En effet, les filles peuvent être atteintes avec plus ou moins de sévérité (Debrand 1974):

1. la plupart d'entre elles sont atteintes d'une forme mineure intermédiaire: elles sont polyuriques mais de façon modérée; celle-ci ne s'accompagne pas d'épisodes de déshydratation et la réponse à l'injection d'AVP est légèrement inférieure à celle d'une enfant « normale »;
2. une minorité sont atteintes d'une forme majeure: le syndrome polyurodipsique est très sévère et ces sujets sont totalement insensibles à l'injection d'AVP.

Une fois l'analyse généalogique effectuée, lorsqu'une femme a été identifiée comme transmettrice et que celle-ci attend un enfant de sexe masculin, il suffit d'effectuer une recherche de mutations des gènes *AVPR2* et *AQP2* à partir de sang de cordon (Bichet, Arthus et al. 1993; Bichet, Birnbaumer et al. 1994). Ceci afin d'agir le plus précocement possible à la naissance avec un apport hydrique suffisant ainsi qu'un traitement approprié.

## **2. Les récepteurs à la vasopressine**

Du fait de sa nature hormonale, et donc de sa sécrétion dans la circulation systémique, l'AVP remplit de nombreuses fonctions physiologiques. Celles-ci sont aussi variées que la réabsorption hydrique au niveau du rein, la stimulation de la sécrétion d'ACTH («**adrenocorticotrope hormone**»), la régulation de fonctions somatiques telle que l'augmentation de la pression artérielle, l'agrégation des plaquettes, la prolifération cellulaire et la sécrétion de facteurs de coagulation. Cette large diversité d'actions de l'hormone est étroitement liée à la stimulation de ses récepteurs spécifiques, subdivisés en trois classes: les récepteurs V1 vasculaires (V1a), les récepteurs V1 pituitaires (V1b ou V3) et les récepteurs rénaux (V2R ou AVPR2) (Guyton and Hall 2000; Thibonnier, Coles et al. 2001).

Chez l'homme, ainsi que chez la plupart des vertébrés, l'AVP est principalement responsable de la perméabilité du rein à l'eau et peut ainsi jouer un rôle très important sur l'équilibre hydrique de l'organisme. Suite à sa libération dans la circulation sanguine, cette hormone va gagner le segment distal du néphron, et plus précisément, le tubule collecteur, où elle va pouvoir se lier à ses récepteurs, les récepteurs à la vasopressine de type 2 ou AVPR2. Suite à cette liaison et à cette stimulation, l'AVP va entraîner une cascade d'événements dont la finalité sera l'expression à la membrane apicale des cellules de molécules chargées de permettre le passage des molécules d'eau entre le compartiment luminal et l'intérieur de la cellule. Par conséquent, des anomalies de structure et/ou de fonction du récepteur AVPR2, vont engendrer des dérèglements importants dans ce processus vital et conduire au développement de pathologies. En effet, une étude d'inactivation génique du gène codant pour l'AVPR2 a permis de mettre en évidence l'étroite relation existant entre le développement d'un DIN héréditaire et ce gène (Yun, Schoneberg et al. 2000).

Suite à une présentation générale des récepteurs à l'AVP, classe de récepteurs, structure et voies de signalisation, nous nous intéresserons plus particulièrement aux récepteurs V2 ainsi qu'au gène les codant et aux altérations géniques le touchant.

## **2.1. Les types de récepteurs**

Comme il a été mentionné, la vasopressine transmet ses informations aux cellules cibles par l'intermédiaire des récepteurs V1a, V1b ou V3 et V2R. Il faut ajouter à ceux-ci, les récepteurs à l'ocytocine présents chez la femme allaitante et permettant de réguler le métabolisme du galactose ainsi que la tonicité utérine au moment de l'accouchement (Jard, Elands et al. 1988).

Les nombreuses études visant à cloner et à séquencer les différents récepteurs à la vasopressine, révèlent que ces derniers appartiennent tous à la très grande famille des récepteurs à sept segments transmembranaires dont la signalisation se fait par l'intermédiaire d'une protéine G. Ce sont donc tous des récepteurs couplés aux **protéines G** (RCPG) (Birnbaumer, Seibold et al. 1992; Kimura, Tanizawa et al. 1992; de Keyzer, Auzan et al. 1994).

### **2.1.1. Classe de protéines: les récepteurs couplés aux protéines G**

Les RCPG semblent faire partie des plus anciens transducteurs de signaux: en effet, ils sont retrouvés dans des espèces aussi variées que les plantes, les levures, les champignons, les protozoaires, les métazoaires ainsi que les mammifères (Dohlman, Thorner et al. 1991; Devreotes 1994; Vernier, Cardinaud et al. 1995; New and Wong 1998; Plakidou-Dymock, Dymock et al. 1998; Bockaert and Pin 1999).

La famille des RCPG regroupe le plus grand nombre de récepteurs connus à ce jour: plus de 1% du génome humain code pour ce type de protéines. Depuis le clonage du premier récepteur, près de 800 gènes et plus de 1000 RCPG ont été identifiés (Takeda,

Kadowaki et al. 2002). Parmi ce nombre considérable de récepteurs, il est intéressant de noter que ceux-ci peuvent lier des molécules aussi diverses et variées que des hormones, des molécules du goût, de l'odorat, des ions, des photons, des lipides, des amines ainsi que de très grandes molécules telles que des protéines (Gether 2000) (**Figure 8**).

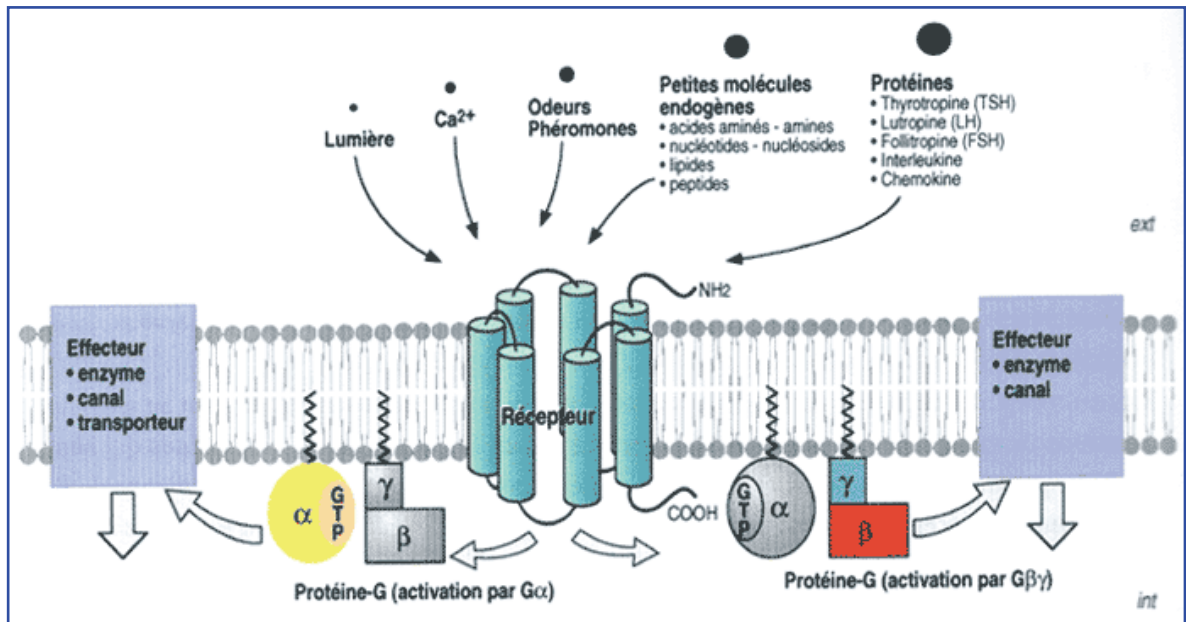


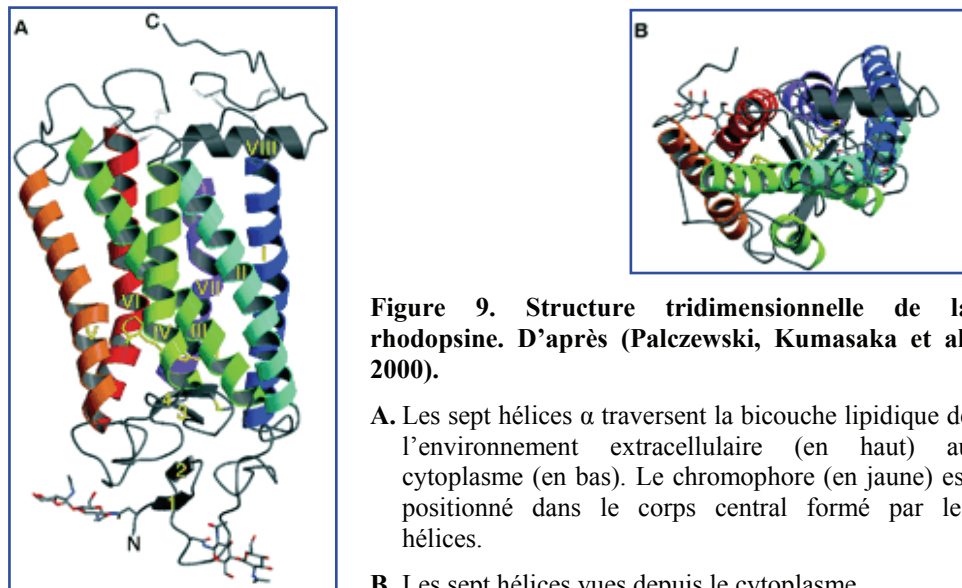
Figure 8. Les récepteurs couplés aux protéines G.

À la suite de la liaison du ligand spécifique du récepteur ou à la réception d'un signal physique, il va s'opérer un changement conformationnel à l'intérieur des sept hélices transmembranaires (Meng and Bourne 2001; Okada, Ernst et al. 2001). Cette modification structurelle va être ensuite transmise au niveau de la boucle cytoplasmique du récepteur qui activera à son tour un second membre de la voie de signalisation, ou protéine signal (Bockaert and Pin 1999). Dans la majorité des récepteurs à sept segments transmembranaires, cette protéine signal est une protéine G hétérotrimérique. Par la suite, cette dernière va moduler différents effecteurs (adénylate cyclase, phospholipase A et C) ce qui entraînera une augmentation de la production d'AMPc ou une élévation du taux de calcium intracytoplasmique provoquant une réponse cellulaire. Un tel mécanisme de

transduction du signal est dit à « 3 partenaires » (récepteur, transducteur et effecteur) comme il été proposé par M. Rodbell en 1971 (Rodbell, Birnbaumer et al. 1971).

### 2.1.1.1. Structure des RCPG

D'un point de vue structurel, les sept segments transmembranaires, constitués d'hélices  $\alpha$  hydrophobes de grandeur variable en fonction du récepteur (de 25 à 35 résidus) et maintenues entre elles par une multitude de liaisons hydrogène, forment une structure compacte en forme de baril, ou corps central (Baldwin 1993). Les travaux de l'équipe de K. Palczewski ont fourni la première structure à haute résolution d'un récepteur couplé aux protéines G, la rhodopsine bovine, par cristallographie aux rayons X (Palczewski, Kumasaka et al. 2000). Cette structure a permis de confirmer l'arrangement ainsi que l'orientation des sept hélices transmembranaires formant le corps central des RCPG (Figure 9).



**Figure 9. Structure tridimensionnelle de la rhodopsine. D'après (Palczewski, Kumasaka et al. 2000).**

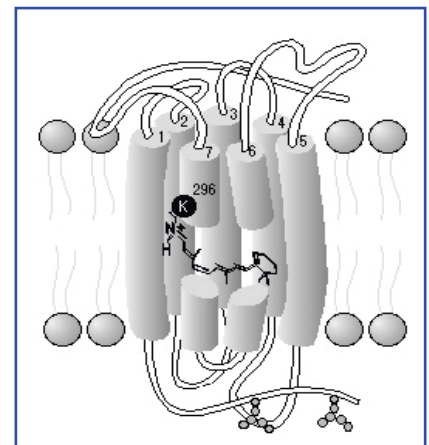
Les domaines transmembranaires sont connectés entre eux par trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires de longueur variable, de 10 à 40 résidus voir

150 pour la troisième boucle intracytoplasmique. Les régions N-terminale et C-terminale sont localisées respectivement au niveau extracellulaire et intracellulaire (**Figure 10**). Si les séquences des segments transmembranaires présentent de très fortes homologies, les boucles hydrophiles ainsi que les extrémités N et C-terminales divergent énormément d'un récepteur à l'autre.

**Figure 10. Représentation schématique du RCPG de la rhodopsine.**

Le domaine cytoplasmique est en haut et le domaine extracellulaire, en bas. Les 3 boucles extra et intracytoplasmiques sont représentées. Une quatrième boucle intracellulaire, due à un ancrage lipidique consécutif à la palmitoylation d'une cystéine, apparaît au niveau de l'extrémité C-terminale.

Le RCPG de la rhodopsine est particulier : le ligand est présent de manière constitutive dans le récepteur. En effet, Le chromophore est présent à l'intérieur du corps central lié à une lysine. Lorsque le photon va l'exciter, il y aura changement de conformation du récepteur et transmission du signal.

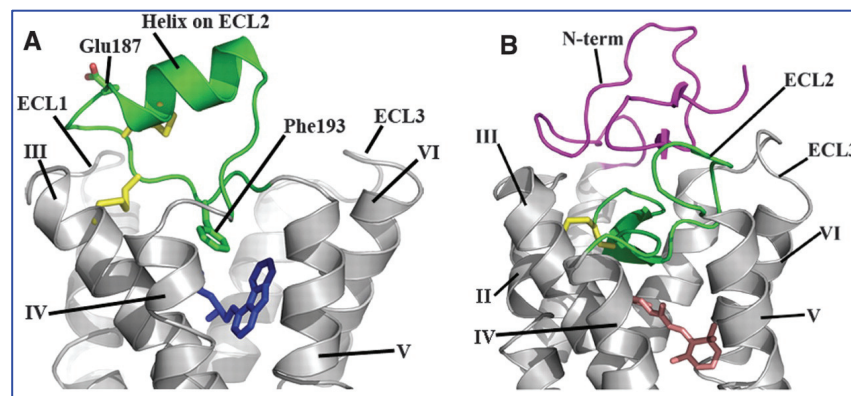
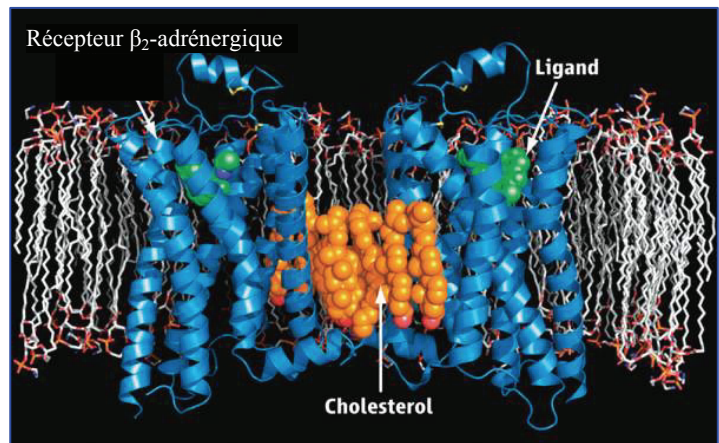


Plus récemment, une équipe internationale est parvenue à cristalliser un second membre des RCPG de la famille A (voir « Famille des RCPG », page 38), le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique humain ( $\beta_2$ AR) (Cherezov, Rosenbaum et al. 2007; Rasmussen, Choi et al. 2007; Rosenbaum, Cherezov et al. 2007). De ces études, il ressort que la structure de ce RCPG, bien qu'il comporte effectivement sept segments transmembranaires (**Figure 11**, page 37), présente certaines divergences avec le récepteur de la rhodopsine (Cherezov, Rosenbaum et al. 2007). En effet, bien que ces auteurs aient modifié la structure du récepteur en remplaçant la troisième boucle intracellulaire par la protéine lysozyme T4 et en éliminant l'extrémité N-terminale, ces modifications ayant pour seul but de faciliter la cristallisation sans altérer les propriétés du récepteur (Rosenbaum, Cherezov et al. 2007), le  $\beta_2$ AR comporte deux segments supplémentaires. Tout d'abord nous pouvons distinguer une

huitième hélice, à priori commune à bon nombre de RCPG (Katragadda, Maciejewski et al. 2004), ainsi qu'une petite hélice supplémentaire et un pont disulfure inhabituels au niveau de la deuxième boucle extracellulaire (**Figure 12**) (Cherezov, Rosenbaum et al. 2007).

**Figure 11. Structure du récepteur  $\beta_2$ -adrénergique humain. D'après (Cherezov, Rosenbaum et al. 2007).**

Les deux récepteurs sont enchâssés dans la membrane lipidique de part et d'autre des molécules de cholestérol. Le ligand est représenté en vert.



**Figure 12. Comparaison des faces extracellulaires des récepteurs  $\beta_2$ -adrénergique (A) et rhodopsine (B). D'après (Cherezov, Rosenbaum et al. 2007).**

**A.** Récepteur  $\beta_2$ -adrénergique: la boucle extracellulaire 2 (ECL2, en vert) comporte une petite hélice et 2 ponts disulfures (jaune) dont l'un n'est pas retrouvé au niveau du récepteur à la rhodopsine. Ce pont lie l'ECL2 avec l'hélice de la boucle extracellulaire 1 (ECL1).

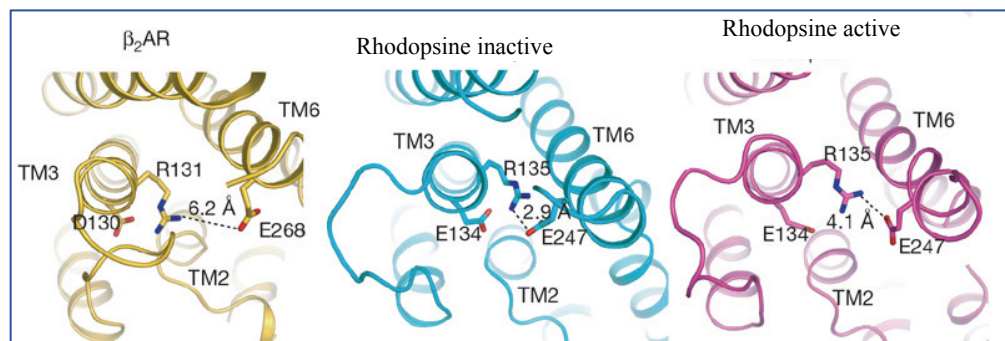
NB: l'élément en bleu correspond au carazolol qui est un agoniste inverse partiel du ligand habituel du récepteur, l'adrénaline; l'extrémité N-terminale n'a pas été représentée.

**B.** Récepteur à la rhodopsine: l'ECL2 est positionnée plus bas que dans le cas du  $\beta_2$ -AR et forme un feuillet avec la région N-terminale du récepteur occluant ainsi l'accès au chromophore (rose).

NB: les chiffres romains représentent les segments membranaires correspondant.



De plus, il apparaît que les extrémités cytoplasmiques des segments transmembranaires III et VI présentent des interactions plus faibles que dans la rhodopsine (**Figure 13**) (Rasmussen, Choi et al. 2007; Rosenbaum, Cherezov et al. 2007). Cette caractéristique pourrait expliquer à la fois l'instabilité structurale et le haut niveau d'activité de ce récepteur comparativement au récepteur à la rhodopsine (Rasmussen, Choi et al. 2007). En effet, dans le cas de ce dernier, le réseau de liaison hydrogène entre ces deux segments transmembranaires forme un « loquet ionique » (« ionic lock ») qui stabilise le récepteur dans sa conformation inactive (Ballesteros, Jensen et al. 2001).



**Figure 13. Comparaison structurale du  $\beta_2$ -AR avec les formes inactives et activées de la rhodopsine. D'après (Rasmussen, Choi et al. 2007).**

Le rapprochement des segments III et VI dans le  $\beta_2$ -AR dans sa forme inactive s'apparente plus à celui rencontré dans le récepteur à la rhodopsine activé (à droite) que non activé (au centre).

### 2.1.1.2. Familles des RCPG

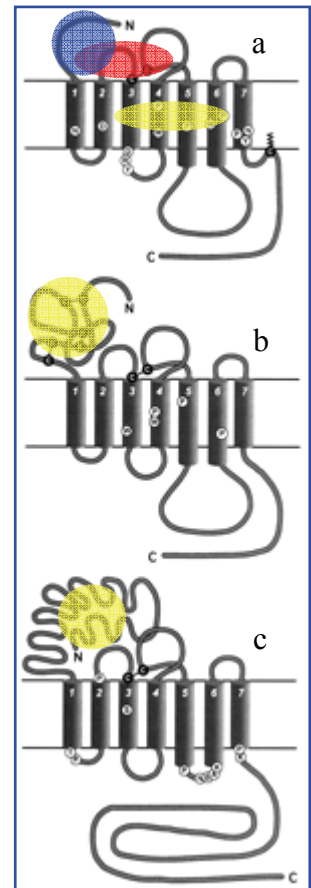
Les différents RCPG ont été classés en trois familles en fonction de leurs homologies de séquences et donc de structure (Gether 2000). Les membres de chacune de ces trois familles, présentent une similitude: en effet, chaque membre possède, dans les premières et deuxièmes boucles extracellulaires, deux résidus cystéines permettant la formation d'un pont disulfure responsable de la stabilité du récepteur (Dixon, Sigal et al. 1987; Dohlman, Caron et al. 1990). De plus, chacun des membres de ces trois familles, possède, au niveau de son extrémité N-terminale, différents sites potentiels de N-glycosylation; cette



modification post-traductionnelle permet de réguler l'expression des récepteurs à la surface cellulaire. En effet, l'inhibition de cette glycosylation entraîne une diminution du taux d'expression du récepteur à la membrane, c'est le cas par exemple pour les récepteurs  $\beta 2$  adrénergiques et à la rhodopsine (Rands, Candelore et al. 1990; Liu, Davis et al. 1993). Mises à part ces caractéristiques communes, les membres des trois familles divergent assez sensiblement au niveau structural (**Figure 14**).

**Figure 14. Classification des RCPG. D'après (Gether 2000).**

- a. La famille A comprend 3 sous-familles:
- Famille 1a dont le domaine de liaison du ligand se situe à l'intérieur des domaines transmembranaires (en jaune sur la figure). Les ligands de cette famille sont très variés : catécholamines, molécules olfactives, rétinien, enképhaline, ATP, adénosine, etc.
  - La famille 1b est structurellement identique à la famille 1a mais dont le domaine de liaison est localisé au niveau des boucles extracellulaires (en rouge). Parmi les ligands de cette famille nous pouvons noter, les cytokines, les peptides, la thrombine, etc.
  - La famille 1c dont le domaine N-terminal est plus long que ceux des deux sous-familles a et b ; c'est à son niveau que se trouve le site de liaison du ligand (glycoprotéines, hormones (LH, TGH et FSH), etc.) (en bleu).
- b. La famille B présente un long domaine N-terminal liant les ligands suivant : la calcitonine, le glucagon, le peptide vasiactif intestinal (VIP), etc. Le domaine de liaison se situe dans la partie N-terminale (en jaune).
- c. La famille C, dont le domaine N-terminal est très long, lie à ce niveau (en jaune), les ions calcium, le glutamate, le GABA, les pré hormones, etc.



La famille A, à laquelle appartiennent les récepteurs à la vasopressine, la rhodopsine et les récepteurs adrénergiques, représente la plus importante d'entre elles. Elle se caractérise par une très grande variabilité au niveau de l'extrémité N-terminale, ce qui permet la liaison d'une grande diversité de ligands, ainsi que par plusieurs homologies. Au niveau de

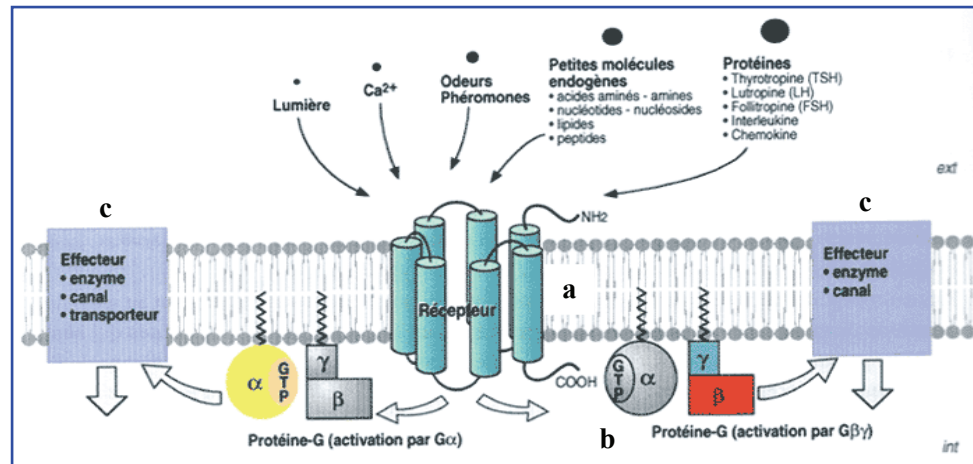
l'extrémité N-terminale de la deuxième boucle cytoplasmique, un triplet de résidus (Acide aspartique-arginine-tyrosine, ou motif DRY), retrouvé chez chacun des membres (Kobilka and Deupi 2007), joue un rôle primordial dans l'interaction du récepteur avec la protéine G. Nous pouvons noter également la conservation d'un acide aspartique localisé dans le deuxième segment transmembranaire ainsi qu'une asparagine située dans le septième passage transmembranaire. Ces derniers résidus semblent essentiels pour permettre de stabiliser les deux segments l'un à côté de l'autre, afin d'entraîner le changement de conformation nécessaire à l'activation de la protéine G couplée au récepteur. Enfin, la majorité des récepteurs de cette famille possède un résidu cystéine palmytoilé dans l'extrémité C-terminale, ce qui peut aboutir à la formation d'une quatrième boucle intracellulaire (O'Dowd, Hnatowich et al. 1989; Papac, Thornburg et al. 1992; Kennedy and Limbird 1993). Il semble que cette palmytoilation soit indispensable à certains récepteurs de cette famille pour activer la protéine G: il a été montré que la substitution de cette cystéine par une glycine entraînait une perte de la capacité du récepteur  $\beta_2$  adrénergique à activer la protéine G (O'Dowd, Hnatowich et al. 1989). Cependant, d'autres membres de la famille A (les récepteurs à la rhodopsine, à l'acide muscarinique,  $\alpha_2A$  adrénergique, etc.) semblent conserver leurs capacités à activer la protéine signal malgré la perte de cette modification post-traductionnelle (van Koppen and Nathanson 1991; Kennedy and Limbird 1993; Zhu, Wang et al. 1995). Concernant le site de liaison du ligand, les membres de cette famille présentent majoritairement un site localisé à l'intérieur du domaine transmembranaire formé par les hélices. Cependant, pour d'autres récepteurs, une partie du domaine N-terminal ainsi que certaines boucles extracellulaires sont impliquées dans la liaison du ligand. Comme mentionné dans la figure 10, page 36, la rhodopsine est particulière: le ligand, le rétinol, est lié de manière covalente et constitutive à un résidu lysine de l'hélice transmembranaire VII. Ce rétinol, excité par un photon, entraînera un changement conformationnel de la structure du récepteur ce qui activera la protéine G et permettra la transduction du signal.

Les membres appartenant à la famille B, tel que les hormones de haut poids moléculaire (glucagon, sécrétine, calcitonine, etc.) présentent une longue extrémité N-terminale. Celle-ci contient au minimum six résidus cystéine formant très certainement un réseau de ponts disulfure impliqué dans la reconnaissance du ligand.

Enfin, la famille C, regroupant les récepteurs au glutamate, aux ions calcium, à l'acide **gamma-aminobutyrique** (GABA), molécules du goût, se caractérise par un très long domaine N-terminal contenant le site de fixation du ligand ainsi que par une troisième boucle cytoplasmique relativement petite. L'extrémité C-terminale des membres de cette famille peut être de longueur très variable, bien qu'en général très longue.

### 2.1.1.3. Transduction du signal

Comme il a été mentionné auparavant, chacun des RCPG est obligatoirement associé à une protéine G chargée de véhiculer le message reçu par le récepteur suite à la liaison d'un ligand donné (photons, hormones, protéines, ions, etc.). Les protéines G sont des hydrolases régulatrices de nucléotide à **guanosine triphosphate** (GTP) hétérotrimériques se composant de trois sous-unités,  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Les sous-unités  $\alpha$  et  $\gamma$  sont liées à la membrane par des lipides; la sous-unité  $\beta$  quant à elle, est liée à la sous-unité  $\gamma$ . Dans la forme inactive de la protéine, les trois sous-unités sont liées entre elles, mais indépendantes du récepteur, et la sous-unité  $\alpha$  est liée au **guanosine diphosphate** (GDP) (**Figure 15**, page 42).



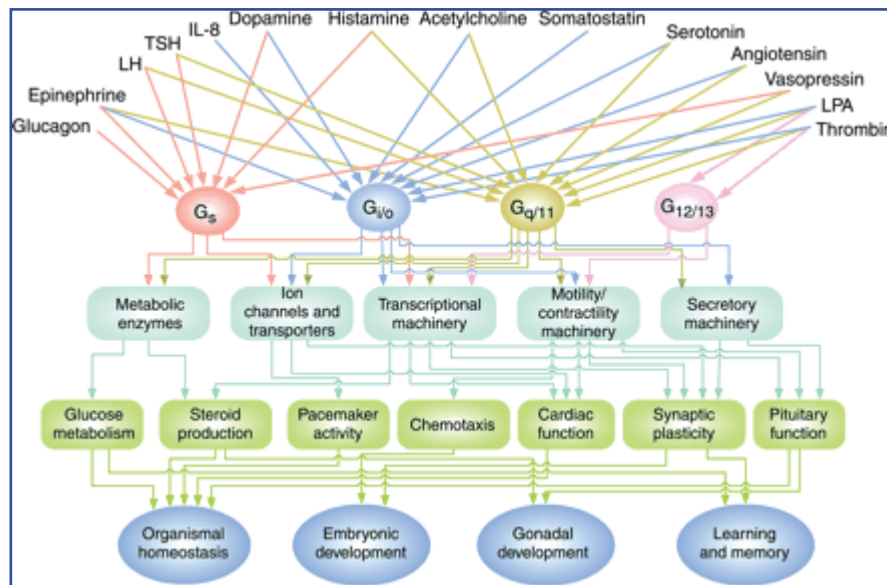
**Figure 15. Les récepteurs couplés aux protéines G: le modèle à trois partenaires.**

- Le récepteur constitué des sept segments transmembranaires, trois boucles intra et 3 boucles extracellulaires.
- La protéine G constituée de trois sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ .
- Les effecteurs qui peuvent être des enzymes, des canaux, etc.

Une fois le ligand fixé au récepteur, celui-ci va activer, suite à un changement conformationnel, la protéine G hétérotrimérique en se liant à elle par l'intermédiaire de la sous-unité  $\alpha$  et peut-être également par la sous-unité  $\gamma$ . Cette liaison de la protéine G au récepteur va entraîner un changement de conformation de la sous-unité  $\alpha$  provoquant le largage du GDP suivi de la liaison du GTP ce qui entraînera la dissociation de l'ensemble  $\beta\gamma$ /protéine G (Marinissen and Gutkind 2001). Les deux complexes, sous-unité  $\alpha$ /GTP et  $\beta\gamma$  vont pouvoir activer leurs effecteurs intracellulaires et engendrer une réponse cellulaire. Une fois le signal transmis aux effecteurs, il va y avoir hydrolyse du GTP, dissociation des complexes sous-unité  $\alpha$ /effecteurs et réassociation des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta\gamma$ . Ainsi, la protéine G retrouvera une conformation native inactive propice à une nouvelle activation par le récepteur.

Jusqu'à présent, on dénombre 20 sous-unités  $\alpha$ , 6 sous-unités  $\beta$  et 11 sous-unités  $\gamma$  (Neves, Ram et al. 2002). Les protéines G sont classées en différentes familles en fonction de la nature de la sous-unité  $\alpha$ : on distingue ainsi les familles  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_{q/11}$  et  $G\alpha_{12/13}$

(Neves, Ram et al. 2002). Chacune de ces familles peut moduler différents effecteurs ce qui entraînera une grande diversité de signaux (**Figure 16**) (Ulloa-Aguirre, Stanislaus et al. 1999; Neves, Ram et al. 2002).



**Figure 16. Diversité des voies d'activation et effets physiologiques. D'après (Neves, Ram et al. 2002).**

En effet, d'un point de vue général, la sous-unité  $G\alpha$  va pouvoir contrôler des enzymes (phospholipases A2 et C, adénylate et guanylate cyclase, c-Jun kinase, tyrosine phosphatase, etc.) dont le rôle va être de moduler le taux de second messagers (phosphoinositides et glycérol,  $Ca^{++}$ , AMPc, GMPc, etc.), des canaux potassiques, calciques, sodiques ou chlore, des échangeurs ioniques (sodium/proton), des kinases (tyrosine kinase) ou des MAP kinases (« **mitogen-activated protein kinase** ») (Bockaert and Pin 1999). De manière plus détaillée, les protéines  $G\alpha_s$  vont activer la voie de l'adénylate cyclase ce qui va provoquer une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc suite à l'hydrolyse d'adénosine triphosphate (ATP). Cet AMPc va ensuite activer la PKA impliquée dans de nombreuses réponses cellulaires. Les sous-unités  $G\alpha_i$  quant à elles vont, au contraire, inhiber cette voie de la PKA. Dans le cas des sous-unités  $G\alpha_q$ , la

phospholipase C (PLC) va être stimulée, ce qui engendrera une hydrolyse du phosphoinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) en diacylglycérol (Prié, Ronco et al.) et inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3). Ces deux derniers composés, vont permettre une augmentation de la concentration calcique intracellulaire ainsi qu'une activation de la protéine kinase C (PKC). Les sous-unités  $G_{\alpha_{12/13}}$  vont, pour leur part, activer la voie de la phospholipase A2 (PLA2) (Ulloa-Aguirre, Stanislaus et al. 1999). De plus, il est important de noter que différents effecteurs des protéines G (PKA, PKC, PLA2 ainsi que les ions calcium ( $Ca^{++}$ )) peuvent activer la voie des MAP kinases avec pour conséquence, une stimulation des facteurs de transcription (Thibonnier, Preston et al. 1997; Wetzker and Bohmer 2003). D'une manière pour le moins surprenante, divers travaux ont montré qu'un même récepteur pouvait activer de multiples seconds messagers. Ainsi, il a été prouvé que le récepteur endogène à la TSH (« thyroid-stimulating hormone ») n'activait pas uniquement les sous-unités  $G_{\alpha_s}$  et  $G_{\alpha_{q/11}}$ , mais également les familles  $G_{\alpha_i}$  et  $G_{\alpha_{12}}$  indiquant qu'il existait dans les cellules une modulation pour le moins complexe des voies de transduction du signal et donc des réponses cellulaires (**Figure 17**, page 45) (Laugwitz, Allgeier et al. 1996; Marinissen and Gutkind 2001).

Le complexe de sous-unités  $\beta\gamma$  peut également moduler l'activité de nombreux effecteurs: des enzymes (PLA2 et C, adénylate cyclase, etc.), des canaux (calciques dépendant du voltage, sodiques ou potassiques à rectification entrante) ainsi que des kinases (phosphoinositide3 kinase,  $\beta$ -adrenergique receptor kinase, c-Jun kinase, MAP kinase, etc.) (Jan and Jan 1997; Schneider, Igelmund et al. 1997; Ulloa-Aguirre, Stanislaus et al. 1999; Marinissen and Gutkind 2001).

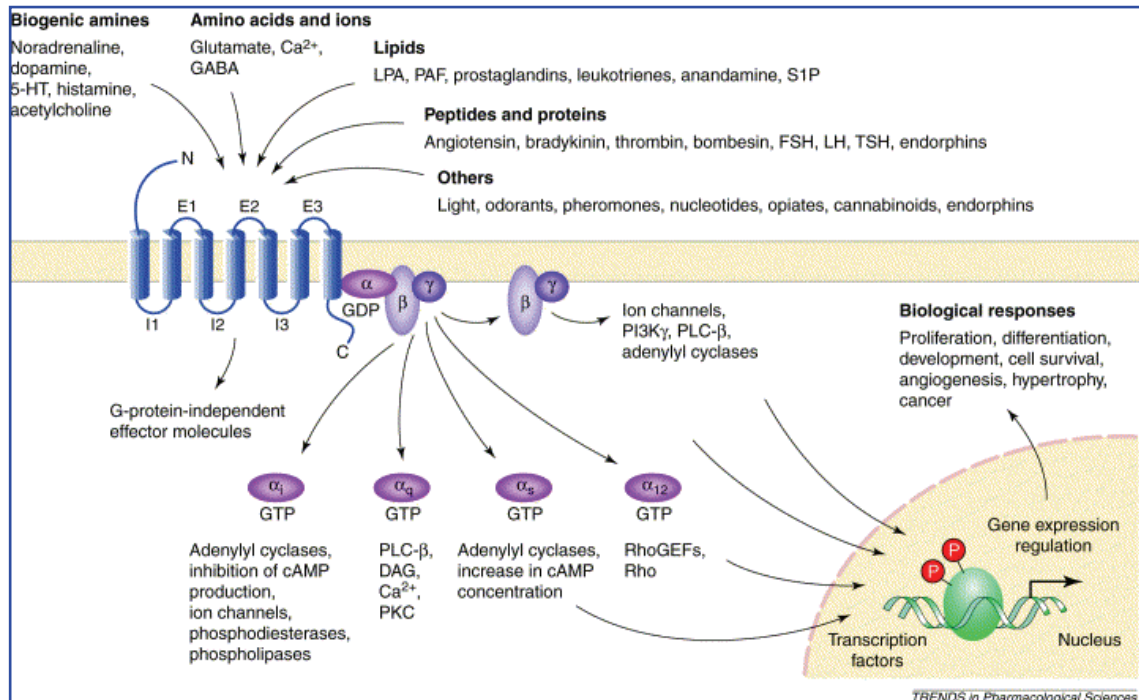


Figure 17. Voies d'activation des RCPG et transduction du signal en fonction des sous-unités. D'après (Marinissen and Gutkind 2001).

#### 2.1.1.4. Désensibilisation et oligomérisation des RCPG

Une stimulation continue ou prolongée d'un récepteur par un ligand, ou un agoniste, entraîne une atténuation de la réponse cellulaire. Ce phénomène, appelé « désensibilisation » vise, en fait, à protéger la cellule contre une stimulation excessive. En effet, une équipe a démontré qu'un défaut du mécanisme de « désensibilisation » entraînait des effets toxiques pour la cellule ainsi qu'une signalisation anarchique (Bohm, Grady et al. 1997). Ce mécanisme de « désensibilisation », qui se produit très rapidement (de quelques secondes à quelques minutes après l'activation du récepteur), implique la phosphorylation de celui-ci au niveau des boucles extracellulaires et de l'extrémité C-terminale (Benovic, Pike et al. 1985). Cette réaction est réalisée par les kinases des RCPG (« G protein-coupled receptor kinase » ou GRK) ou par des kinases qui sont elles-mêmes activées par les seconds messagers, comme par exemple la PKA et la PKC. La phosphorylation du

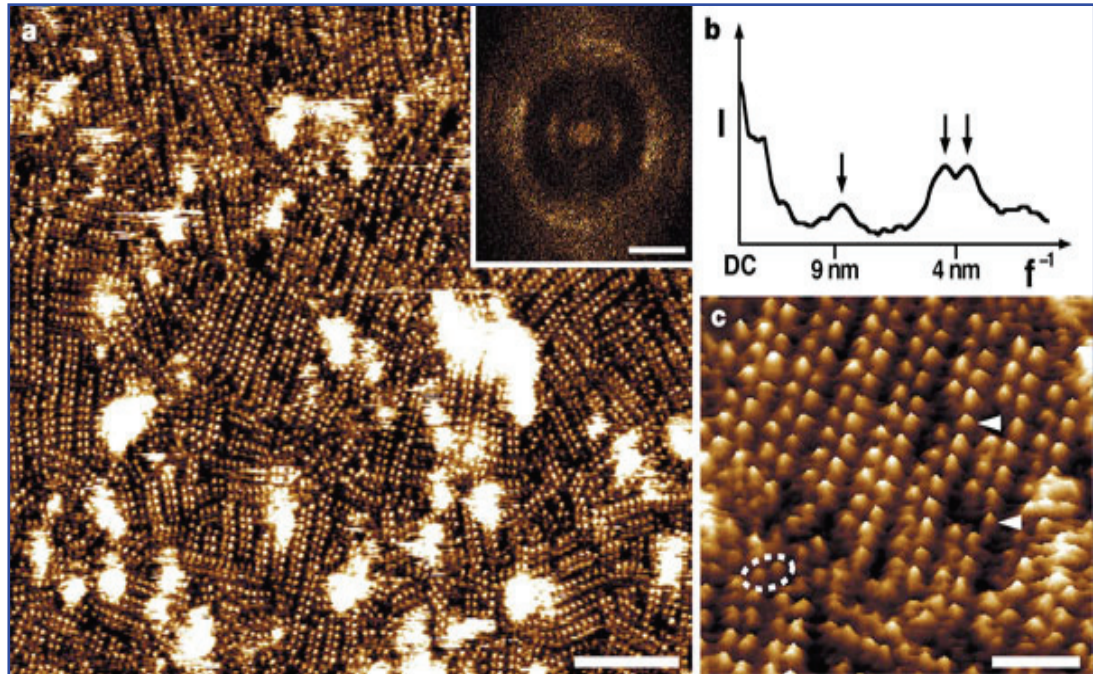


récepteur va ensuite provoquer le recrutement d'une protéine soluble du cytosol, l'arrestine, ce qui entraînera, la liaison de clathrine (Goodman, Krupnick et al. 1996) ainsi que le découplage du récepteur et de la protéine G et provoquera l'internalisation du récepteur en vue de son recyclage ou de sa dégradation (Bouvier, Hausdorff et al. 1988; Hausdorff, Bouvier et al. 1989; Lohse, Benovic et al. 1990; Ferguson, Menard et al. 1995; Gurevich, Dion et al. 1995).

À l'origine, le modèle traditionnel de fixation d'un ligand sur un récepteur couplé aux protéines G était basé sur l'idée qu'un ligand liait son récepteur sous forme monomérique (stœchiométrie récepteur/protéineG/effecteur 1:1:1) (Stryer 1986; Gilman 1987; Birnbaumer, Abramowitz et al. 1990; Park, Filipek et al. 2004). Cependant, plusieurs études ont clairement montré que les RCPG, comme de très nombreux récepteurs (tyrosine kinase, facteurs de croissance, cytokines, etc.) pouvaient se trouver sous forme d'homo ou d'hétérodimères (Angers, Salahpour et al. 2000; Salahpour, Angers et al. 2000; Angers, Salahpour et al. 2002; Terrillon and Bouvier 2004). En effet, à partir de la seconde moitié des années 90, il est apparu que l'ensemble des RCPG analysés existaient sous forme dimérique. Il est dorénavant admis que l'activité des récepteurs (transport dans le réticulum endoplasmique, liaison du ligand et transduction du signal) est étroitement liée à leur dimérisation, favorisant les interactions RCPG/protéines accessoires (Hebert and Bouvier 1998; George, Fan et al. 2000; Salahpour, Angers et al. 2000; Bouvier 2001; Angers, Salahpour et al. 2002; Brady and Limbird 2002; Milligan, Ramsay et al. 2003; Park, Filipek et al. 2004; Terrillon and Bouvier 2004). La preuve « structurelle » d'un tel phénomène de dimérisation a été apportée en 2003 par l'équipe de K. Palczewsky grâce à l'utilisation d'un microscope à force atomique (Fotiadis, Liang et al. 2003). En effet, cette équipe a montré pour la première fois que la rhodopsine existait sous forme de dimères dans la rétine: les récepteurs apparaissent organisés en rangées de dimères (**Figure 18**, page 47). Cependant, et malgré le fait que cette dimérisation ait été mise en évidence pour de nombreux RCPG, certaines questions restent à l'heure actuelle en suspens. La première, et la plus importante d'entre elles, est tout simplement de savoir si cette dimérisation est un processus général



des RCPG, et donc, si leur activation normale implique obligatoirement ce phénomène. Ensuite, les réponses à apporter concerneront le rôle de la dimérisation dans l'internalisation des récepteurs, dans l'affinité du ligand pour son récepteur et enfin dans la transduction du signal.



**Figure 18. Organisation et topographie de la rhodopsine à la surface cellulaire. D'après (Fotiadis, Liang et al. 2003).**

- a. Topographie en microscopie à force atomique: arrangement des dimères de rhodopsine. Encart, régularité de l'arrangement de la rhodopsine dans la membrane.
- b. Moyenne angulaire du pouvoir de diffraction.
- c. Grossissement de dimères de rhodopsine: l'ensemble des dimères apparaissent en rangées, excepté quelques uns individuels (pointillés) ainsi que des monomères occasionnels (flèches).

## **2.1.2. Localisations et voies de signalisation**

### **2.1.2.1. Les récepteurs V1a**

Ce type de récepteurs, bien que n'ayant pas une expression ubiquitaire, est présent dans différents tissus où ils vont entraîner diverses actions suite à la liaison de l'AVP: la

glycogénolyse dans les cellules hépatiques, la vasoconstriction au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires et l'agrégation plaquettaire étant les principaux effets de l'AVP liant les V1a. Cependant, nous pouvons également noter la présence de ces récepteurs dans d'autres organes tels que le rein, les organes reproducteurs, le cerveau, les poumons, l'uretère, la rate ainsi que dans certaines cellules cancéreuses (Ostrowski, Lolait et al. 1992; Firsov, Mandon et al. 1994). Au niveau rénal, ces récepteurs sont principalement localisés dans les vasa recta (système de vaisseaux sanguins de la médullaire) (Park, Mattson et al. 1997) où ils vont engendrer une diminution du flux sanguin, et donc entraîner une vasoconstriction, ce qui permettrait d'optimiser la capacité du rein à concentrer les urines en période de déshydratation (Franchini and Cowley 1996; Franchini and Cowley 1996; Franchini, Mattson et al. 1997). D'une manière moins importante, et plus controversée, ces récepteurs seraient également localisés dans les cellules du canal collecteur où ils participeraient à la réabsorption de l'eau et du sodium ainsi qu'à l'équilibre acide-base (Tashima, Kohda et al. 2001). De la même manière, la présence de ces récepteurs à la membrane apicale des cellules du tubule collecteur induirait la formation de prostaglandines dont le rôle serait de limiter l'accumulation d'AMP<sub>C</sub>, engendrée par la liaison de l'AVP au récepteur, et ainsi de limiter les effets antidiurétiques de l'hormone (Bankir 2001).

Le mécanisme général d'action, suite à la liaison de l'AVP, de ces récepteurs fait appel à la sous-famille G $\alpha_{q/11}$  (Thibonnier, Goraya et al. 1993). L'activation de la PLC par cette protéine va conduire à la formation de DAG et d'IP3. Le premier nommé, va par la suite stimuler l'activité de la PKC qui favorisera le flux de Ca<sup>++</sup> en activant les canaux calciques membranaires. Le second, quant à lui, de par son caractère hydrosoluble et sa capacité de diffusion, servira de second messenger et liera ses récepteurs localisés sur la membrane du réticulum endoplasmique. Au final, et suite à cette liaison, ce messenger entraînera la mobilisation intracellulaire de Ca<sup>++</sup> contenu dans le RE. Cette augmentation de la concentration de Ca<sup>++</sup> sera responsable, au niveau rénal, des effets cités ci-dessus (Aiyar, Nambi et al. 1986).

Cependant, une étude a permis de démontrer que ce type de récepteur, en plus d'activer la sous-unité  $G\alpha_{q/11}$  pouvait également transmettre son signal par l'intermédiaire d'un second type de protéine G. En effet, l'équipe de Kalkbrenner a mis en évidence dans des fibroblastes en phase de quiescence, l'activation par l'AVP de la protéine  $G_{i3}$  liée aux récepteurs V1a (Abel, Wittau et al. 2000). Dans ce cas-là, l'activation de  $G_{i3}$ , en plus d'entraîner l'inactivation de la voie de l'adénylate cyclase, entraînera le largage du complexe  $\beta\gamma$  qui provoquera lui-même la stimulation de la PLC et donc la mobilisation du  $Ca^{++}$  intracellulaire. En revanche, il faut noter que le couplage des récepteurs avec les sous-unités  $G\alpha_{q/11}$  et  $G_{i3}$  est dépendant de la progression du cycle cellulaire (Abel, Wittau et al. 2000). Ces résultats, ainsi que ceux d'autres équipes, permettent de démontrer qu'un seul type de récepteur peut, en interagissant avec différentes protéines G, activer diverses voies de transduction du signal. Cette capacité des RCPG à activer différentes voies apparaît étroitement liée à la densité des récepteurs présents à la surface cellulaire ainsi qu'à la quantité du ligand présent dans le milieu extracellulaire. Ces multiples voies activées pour un même récepteur, en fonction des tissus, peuvent, par conséquent, jouer un rôle important dans la régulation de la réponse cellulaire (George, Berrios et al. 1988; Zhu, Gilbert et al. 1994; Birnbaumer 1995; Laugwitz, Allgeier et al. 1996).

### 2.1.2.2. Les récepteurs V1b

Ce sous-type de récepteur, également appelé V3, a été initialement localisé à la surface des cellules corticotropes au niveau de la glande pituitaire antérieure où ils permettent la sécrétion de l'ACTH. Cette sécrétion est en fait sous le double contrôle de l'AVP et de la CRH (« corticotropin-releasing hormone ») (de Keyzer, Auzan et al. 1994; de Keyzer, Lenne et al. 1996; Kalogeras, Nieman et al. 1996; Tanoue, Ito et al. 2004). Il semble désormais acquis que ces récepteurs soient également retrouvés au niveau des cellules rénales, encéphaliques, pancréatiques et surrénaliennes (Grazzini, Lodboerer et al. 1996).

La voie de signalisation engendrée suite à la liaison de l'AVP sur ces récepteurs, est hautement similaire à celle mise en jeu dans le cas des récepteurs V1a. En effet, l'activation du récepteur va entraîner le couplage de celui-ci avec la même sous-unité  $G\alpha_{q/11}$  et donc la stimulation de la PLC. Celle-ci, au final, va provoquer, via la production de DAG et d'IP3, la libération d'ions  $Ca^{++}$  et l'activation de la PKC. Par la suite, cette protéine va stimuler la production d'ACTH ainsi que la prolifération cellulaire et l'induction de la synthèse d'ADN (Thibonnier, Preston et al. 1997). Cependant, et de manière similaire aux récepteurs V1a, ce type de récepteurs peut également activer différentes protéines G. En effet, en fonction de la densité de récepteurs présents à la surface des cellules pituitaires ainsi que de la quantité de l'agoniste, il va y avoir activation, soit des sous-unités  $G\alpha_s$  et  $G_{i3}$ , soit de la sous-unité  $G\alpha_{q/11}$ . En effet, lorsque la concentration en AVP et la quantité de récepteurs présents à la surface des cellules sont élevées, la stimulation des récepteurs va entraîner le couplage de celui-ci avec la sous-unité  $G\alpha_{q/11}$  et ainsi provoquer l'activation de la PLC et de la voie des MAPK. À l'inverse, une quantité d'AVP dans le milieu extracellulaire ainsi qu'une quantité de récepteurs faibles vont entraîner un couplage avec, à la fois, les sous-unités activatrices  $G\alpha_s$  et inhibitrices  $G_{i3}$ . Cette activation simultanée va engendrer la stimulation de la PLA2, provoquer la production d'AMP<sub>C</sub> et au final, la sécrétion d'ACTH et l'induction de la synthèse d'ADN (Thibonnier, Preston et al. 1997).

### **2.1.2.3. Les récepteurs à l'ocytocine**

Ces récepteurs sont retrouvés chez la femme au niveau des cellules de l'endomètre, du myomètre utérin, des ovaires ainsi que des glandes mammaires (Kimura, Tanizawa et al. 1992). Leur nombre varie en fonction du cycle ovarien ainsi qu'en période d'allaitement. Ainsi, au moment du début de la phase de travail lors de l'accouchement, le myomètre utérin, premier tissu cible de cette hormone, devient extrêmement sensible à l'ocytocine du fait de l'augmentation du nombre de ces récepteurs (pour revue voir (Gimpl and Fahrenholz 2001)).

La base moléculaire des contractions utérines, comme de l'ensemble des muscles lisses, est due à l'interaction des filaments de myosine et d'actine qui est, elle-même, calcium-dépendante (Lopez Bernal, Watson et al. 1993). Les contractions utérines sont provoquées par la liaison de l'ocytocine à ses récepteurs localisés au niveau des cellules du myomètre ce qui va activer, via une protéine G de type  $G\alpha_{q/11}$ , la PLC (Ku, Qian et al. 1995). Celle-ci pourra ensuite, via la production de DAG et d'IP3, entraîner la mobilisation du  $Ca^{++}$  intracellulaire (Schrey, Read et al. 1986; Molnar and Hertelendy 1990; Phaneuf, Europe-Finner et al. 1993). Ce dernier, lié à la calmoduline activera une kinase spécifique des chaînes légères de myosine. Celle-ci provoquera la phosphorylation des chaînes légères de myosine et permettra ainsi l'interaction rapide entre la myosine et les filaments d'actine (Mackenzie, Word et al. 1990). De plus, le DAG, via la stimulation de la PKC, provoquera la phosphorylation de différentes protéines. Ces deux événements entraîneront et moduleront ainsi les contractions de l'utérus lors de l'accouchement (Asaoka, Nakamura et al. 1992; Phillippe 1994).

Comme de nombreux autres RCPG, les ROT peuvent former des dimères. Devost et Zingg ont effectivement démontré l'existence, *in vivo*, d'homo et d'hétérodimères de ROT et de ROT/V1a et ROT/V2 à la surface cellulaire (Devost and Zingg 2004). Cependant, les deux récepteurs à la vasopressine semblent avoir une affinité moindre pour former les hétérodimères avec les ROT que les ROT eux-mêmes. Ce mécanisme d'oligomérisation des ROT semble « récepteur spécifique » : ces récepteurs ne semblent, en effet, capables de s'oligomériser uniquement avec les récepteurs de même « classe » (V1a et V2).

De manière similaire aux phénomènes observés dans le cas des récepteurs V1a et V1b, les récepteurs à l'ocytocine peuvent également transmettre leur signal par l'intermédiaire de différentes protéines G. Malgré les nombreuses études rapportant une activation de la sous-unité  $G\alpha_{q/11}$ , il semble que la sous-unité  $G_{i3}$  intervienne également dans la transduction du signal suite à la liaison de l'AVP (Phaneuf, Carrasco et al. 1996; Strakova and Soloff 1997). Cette dernière va, de concert avec la sous-unité  $G\alpha_{q/11}$ , permettre d'activer la voie

des MAP kinases (ERK1/ERK2, « extracellular signal-regulated protein kinase 1 et 2 ») pour, au final entraîner la formation de prostaglandine E2 et activer la transcription de différents gènes (Strakova and Soloff 1997; Strakova, Copland et al. 1998).

## **2.2. Les récepteurs à la vasopressine de type 2**

Du fait du rôle de la vasopressine dans le contrôle et le maintien de l'homéostasie de tout organisme, et devant le fait que cette fonction ne saurait avoir lieu sans la présence du récepteur de type 2 au niveau du rein et qu'une pathologie extrêmement rare soit liée à des défauts d'expression et/ou de fonction de ce récepteur, il convient de se pencher plus avant sur ce récepteur tant au niveau du gène le codant qu'au niveau de la protéine en elle-même.

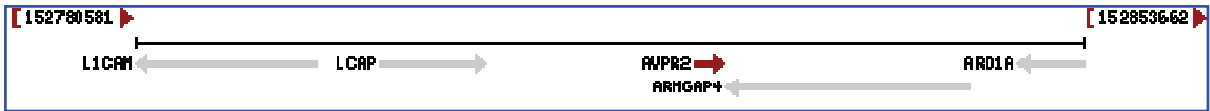
### **2.2.1. Le gène de l'*AVPR2***

À la suite du clonage du gène de ce récepteur, différents travaux ont permis une connaissance approfondie de ce gène quant à sa structure, son expression ainsi qu'aux défauts pouvant le toucher.

#### **2.2.1.1. Structure**

Le gène humain codant le récepteur V2 de la vasopressine est localisé dans le locus 28 du bras long du chromosome X (Xq28) (Seibold, Brabet et al. 1992), correspondant à la partie distale du chromosome (Kambouris, Dlouhy et al. 1988; Knoers, van der Heyden et al. 1988; Knoers, van der Heyden et al. 1989; Bichet, Hendy et al. 1992; van den Ouweland, Knoop et al. 1992). Il se trouve entouré du gène codant la molécule d'adhésion cellulaire L1 (« **L1 cell adhesion molecule** » ou L1CAM) jouant un rôle important dans le développement du système nerveux et le gène codant la « protéine 4 activant la RhoGTPase » (ARHGAP4). De plus il faut noter la présence, entre le gène *L1CAM* et l'*AVPR2*, d'un gène nouvellement identifié, le gène *LCAP* (« **lung carcinoma-associated protein** »). Un second point intéressant à relever, est qu'au niveau du locus 28, l'ensemble

des gènes, mis à part *LCAP*, retrouvés de part et d'autre de l'*AVPR2* présentent une orientation opposée à celle de ce gène (**Figure 19**).



**Figure 19.** Localisation et orientation du gène de l'*AVPR2* dans la partie distale du chromosome X.

Ce petit gène, de 2,271 kilo bases (kb), se compose uniquement de trois exons et de deux introns. Le premier exon est très petit (25 bases), le second beaucoup plus grand (884 bases) et le troisième relativement petit (204 bases); les introns, quant à eux sont, pour le premier, de taille moyenne et pour le second, relativement petit, respectivement de 362 et 107 bases (Pan, Metzberg et al. 1992; Seibold, Brabet et al. 1992). D'après les observations initiales il semblerait que la structure de ce gène, au contraire des autres gènes codant pour des récepteurs couplés aux protéines G, prédise que le deuxième exon ne code que pour 80% du récepteur, soit pour les six premiers segments transmembranaires. Le septième étant codé par l'exon 3 (Seibold, Brabet et al. 1992). Le site d'initiation de la transcription (SIT) du gène humain se trouve 422 paires de bases (pb) en amont du site d'initiation de la traduction au niveau de la région non traduite 5' (« untranslated region 5' » ou UTR 5' ) tel que démontré par A. Calmont (Calmont, Reichwald et al. 2000) (**Figures 20 et 21**, page 54). Cette distance est identique à celle rencontrée chez le rat tel que démontré par Mandon et al. (Mandon, Bellanger et al. 1995).



**Figure 20.** Structure du gène de l'*AVPR2*.

Les exons sont représentés en rouge, les introns en lignes coniques et les régions non traduites par les carrés vides à chaque extrémité du gène. La flèche indique le sens de transcription dans le sens 5' vers 3'.



```

gtcactcccagaggctgggctggggccagggcagggcagccgatggagagcagatctgagcAcccagccac
BRE Inr
cttcacgccaccgccagctgccaggagcaccagcaggt aaggggctgcgcctgcctgccccctgccc
DPE
agtccccagccctcggatgggtggcctctctcggcctcgggttggggcaggggagttctgcgtgtctgtctg
gggtgccactcccaaaccgggactcatgggctgcctgggggatcctgggttctgtgcatccgtctgtc
tgaccatccctctcaatcttccctgccaggactggccatactgccaccgacacgtgcacacacgccaac
aggcatctgccatgctggcatctctataagggctccagtccagagaccctgggcatatgaacttgctcct
caggcagaggctgagtcgcacatcacctccaggccctcagaacacctgccccagccccaccATGctcat
ggcgtccaccacttccggt aaggttgcccctccatgagtcgggtgggagagtggtttgacgatcag
ggaagcccctcttctaaagacctcttcacctcacctctgggtgtctctccaggctgccaatgagt
ggggaggggagcacagccccacttcccggcagggtggggctggggctggggctggggctgcccctctct
tctggactgcatgagcctggggtgtgtatccctcataacatggcttctctggagctcccctctgctaggag
ccaggaagtgggtgtccggatgggggacggggaggcaggcctgagtcacctgcacagcaccctctctaa
ccaggccctcttcccgaactcttcccagctgtgacctgggcatccctctctgccagcctgccagcaaca
gcagccaggagaggccactggacacccgggacccgctgctagcccggcggagctggcgtgctctccat
agtcttctgtggctgtggcctgagcaatggcctggtgctggcggccctagctcggcgggcccggcggc
cactgggcacccatacacgtcttcatggccacttgtgctggcggcagcctggcgtgctctgttccaag
tgctgccccagctggcctggaaggccaccgaccgcttccgtgggcccagatgcctgtgtcgggcccgtgaa
gtatctgcagatgggtgggcatgtatgcctcctcctacatgatcctggccatgacgctggaccgccaccgt
gccatctgcccgtcccctgctggcgtaccgcatggaagtggggctcactggaaccggccgggtgctagtgg
cttgggcccctctcgcctctctcagcctgccccagctcttcatcttcccccagcgaacgtggaagggtgg
cagcggggctcactgactgctgggctgcttggcggagccctggggccgtcgcacctatgtcacctggatt
gccctgatgggtgtcgtggcacctaccctgggtatcgcgcgectgccaggtgctcatcttccgggagattc
atgccagtctgggtgccagggccatcagagaggcctggggggcgcgcaggggacgcccggacaggcagccc
cgggtgaggagcccacgtgtcagcagctgtggccaagactgtgaggatgacgctagtgatgtgggtcgtc
tatgtgctgtgctgggcacccttcttctgggtgcagctgtggggcgcgctgggaccggaggcaccctctgg
aaggtgggtgtagcctggctagggtgacggggccacttgggcttggccgcatgccctgtgccccacc
agccatcctgaacccaacctagatcctccacctccacagggggcgccttctgtgctactcatgttgetggc
cagcctcaacagctgcaccaaccctggatctatgcatcttccagcagcagcgtgtcctcagagctgcga
agcttgctctgctgtgcccggggacgcaccccaccagcctgggtcccccaagatgagtcctgcaccaccg
ccagctcctccctggccaaggacacttcatcgtgaggagctgtgggtgtcttgcctctagaggctttga
gaagctcagctgccttctggggctggctcctgggagccactgggagggggacccgtggagaattggccag
agcctgtggccccgagctgggacactgtgtggccctggacaagccacagcccctgctgggtctccaca
tccccagctgtatgaggagagcttcaggccccaggactgtgggggcccctcaggtcagctcactgagctg
gggtgtaggggggctgcagcagaggcctgaggagtggcaggaaagaggagcaggtgccccaggtgaga
cagcggctcccaggggctgaaaaggaaaggaccaggtggggccaggggaccttctgtctccgcttct
aatccctccctcctcattctcctt aataaaaattggagctcatttccacatggcaaggggtctcctt
gga

```

**Figure 21. Séquence du gène de l'*AVPR2*.**

**Gg...gc:** cœur du promoteur.

**A:** site d'initiation de la transcription (noté +1).

**ATG:** site d'initiation de la traduction.

**Atg...ctc:** Exons 1, 2 et 3 avec les deux introns entre les exons 1 et 2 ainsi qu'entre les exons 2 et 3. Les régions non traduites 5' et 3' ne sont pas représentées mais s'étendent respectivement du site d'initiation de la transcription à l'ATG et de la fin de l'exon 3 au signal de polyadénylation.

**aataaaa:** Signal de polyadénylation.



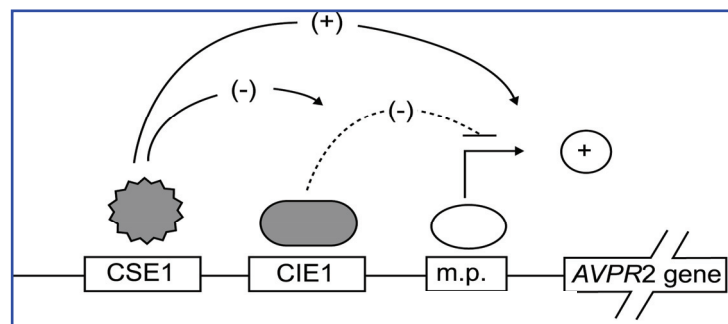
En ce qui concerne le cœur du promoteur à proprement parlé, s'étendant de -45 à +40 (Butler and Kadonaga 2002) de part et d'autre du SIT, servant de référence et noté par convention +1, aucune étude ne s'est véritablement intéressée à sa structure. Cependant, suite à une analyse de la séquence du promoteur, nous pouvons noter à son niveau:

- Une absence de « boîte TATA », habituellement localisée à -30 en amont du site d'initiation de la transcription (Calmont, Reichwald et al. 2000), mais vraisemblablement la présence d'une « boîte CAAT » (Mandon, Bellanger et al. 1995). Si la première séquence, « boîte TATA », est absente à la fois chez l'homme et le rat, la seconde ne semble présente que chez ce dernier;
- Potentiellement la présence d'un élément **initiateur** (Inr) localisé de part et d'autre du site d'initiation: séquence GCACCC à la position -2 à +4 dont l'homologie est de 4 nucléotides sur les 6 de la séquence consensus (C/T)(C/T)A(T/A)(C/T) (C/T);
- La présence possible d'un BRE (« **TFIIB** recognition element » ou élément de reconnaissance du facteur TFIIB), situé à environ -36 par rapport au site d'initiation: CCAGGGC dont l'homologie est de 5 nucléotides sur les 7 de la séquence consensus (G/C)(G/C)(G/A)CGCC;
- Un éventuel DPE (« **downstream promotor element** » ou élément amont du promoteur), se situant à +28 du site +1 dont la séquence est AGCTG et présentant 4 nucléotides en commun avec la séquence consensus de cet élément (A/G)G(A/T)(C/T)(G/A/C).

L'ensemble de ces séquences ainsi qu'une présentation minutieuse quant à leurs localisations, structures et fonctions feront l'objet d'une partie spécifique ultérieure (voir « Structure du promoteur », page 87).

La seule équipe à s'être intéressée au mécanisme d'expression de ce gène est celle du Dr. Rossert. En plus d'avoir localisé le site d'initiation de la transcription (à 422 pb en amont du site d'initiation de la traduction), ces chercheurs ont mis en évidence deux zones potentiellement importantes dans l'expression de l'*AVPR2* dans les cellules rénales (**Figure 22**):

- La première, nommée « élément inhibiteur du tubule collecteur 1 » (« collecting duct inhibitory element 1 » ou CIE1), localisée entre 1 et 2 kb en amont du site d'initiation de la transcription dont le but est de réprimer la transcription du gène;
- La seconde, est une région *cis*-activatrice, appelée « élément stimulateur du tubule collecteur 1 » (« collecting duct stimulatory element 1 » ou CSE1) se situant à plus de 4 kb en amont du gène. Cette séquence de 33 pb contient des sites de liaison potentiels pour des protéines régulatrices de type « winged-helix » et « MADS » (voir « Types de protéines régulatrices », page 118) et n'activerait le gène de l'*AVPR2* que dans les cellules du tubule collecteur.



**Figure 22. Représentation schématique de l'expression de l'*AVPR2* dans les cellules du tubule collecteur (Calmont, Reichwald et al. 2000).**

CSE1: collecting duct stimulatory element 1; CIE1: collecting duct inhibitory element 1; m.p: minimal promoter (1.4 kb).

Dans le modèle proposé par cette étude, il ressort que la protéine liant CSE1, plutôt que d'activer directement le gène, lèverait l'inhibition engendrée par celle se fixant sur CIE1 (**Figure 22**, page 56). Cependant, lorsque cette équipe a voulu confirmer ces résultats *in vivo*, en fabriquant des souris transgéniques comportant l'élément activateur, aucun résultat probant n'a été obtenu. Ceci laissait supposer l'existence d'un élément *cis*-activateur spécifique du tubule collecteur plus « puissant » (Calmont, Reichwald et al. 2000).

### 2.2.1.2. Expression spatio-temporelle

L'expression du gène de l'*AVPR2* est, comme il a été précisé auparavant, relativement limitée. En effet, au niveau de la néphrogénèse, celle-ci débutant aux alentours de la quatrième semaine de vie intra-utérine et se terminant au moment de la naissance, les reins ne sont fonctionnels que tardivement. Ce qui laisse à penser que le récepteur à la vasopressine ne soit exprimé, et donc fonctionnel, qu'une fois le nombre de néphrons atteint. De plus, aucune donnée n'est disponible quant au fait de savoir si l'*AVPR2* est exprimé de manière constitutive, et donc continue tout au long de la vie de l'organisme, ou bien si celle-ci répond à un quelconque stimulus (comme par exemple, le taux d'AVP circulante, l'auto activation, la présence de messagers chimiques, etc.). La seule étude qui se soit intéressée à l'expression de l'*AVPR2* a démontré, à partir de tissus de rats âgés de 2 à 34 jours postnatals, que la densité des récepteurs diminuait graduellement des tubules collecteurs corticaux aux tubules collecteurs de la médullaire interne (Ammar, Roseau et al. 1992). De plus, ces auteurs ont mis en évidence un nombre constant de récepteurs présents à la membrane durant les deux premières semaines suivant la naissance puis une augmentation après 20 jours. Cette augmentation se poursuit jusqu'à la cinquième semaine où le nombre de récepteurs se stabilise et atteint la quantité retrouvée chez les rats adultes (Ammar, Roseau et al. 1992).

En ce qui concerne l'expression tissulaire du récepteur de type 2 il a été démontré que celle-ci se localisait presque exclusivement au niveau du tubule collecteur de la médullaire

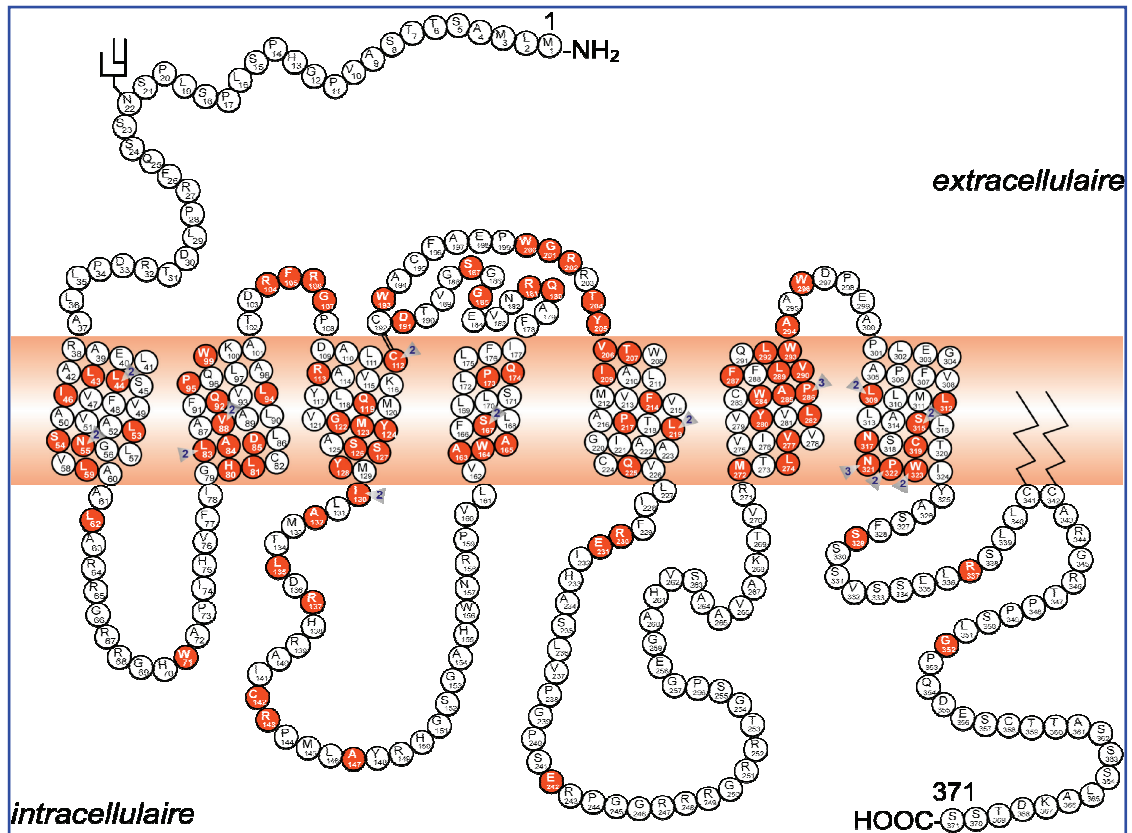
interne du rein (Park, Mattson et al. 1997), en particulier au niveau des cellules principales de ces tubules (Tashima, Kohda et al. 2001; Fenton, Brond, et al. 2007). Ceci laisse présager une expression « tissu-spécifique » de ce gène. Cependant, devant les effets observés chez des patients après qu'il leur ait été administré un agoniste de l'AVP, la dDAVP, il a été suggéré que des récepteurs extrarénaux pouvaient exister. En effet, plusieurs travaux ont permis de démontrer que ce composé n'entraînait pas, chez des patients atteints de DIN les deux types d'actions observées chez les patients contrôle: à savoir, la libération de facteurs de coagulation (les facteurs VIIIc et von Willebrand) d'une part, et un rôle dans la diminution de la pression artérielle et des résistances périphériques d'autre part (Bichet, Razi et al. 1988; Bichet, Razi et al. 1989). Ces deux observations ont permis de penser légitimement qu'il pouvait exister des récepteurs V2 extrarénaux et donc que ce gène pouvait être exprimé ailleurs que dans le seul tubule collecteur rénal. Cependant, aucune étude n'a permis de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse. À l'opposé, l'ARNm de ces récepteurs a été localisé à différents endroits sans que toutefois, ni la protéine en elle-même, ni le rôle physiologique exact n'aient été définis: dans le cerveau de rat nouveau-né et adulte, dans les poumons de rat et d'humain ainsi que dans les cellules endothéliales (Kato, Igarashi et al. 1995; Fay, Du et al. 1996). Cependant, Kaufmann et al. ont démontré une localisation ainsi qu'une fonctionnalité, se traduisant par une réponse au dDAVP et par une augmentation de la production d'AMPc, des AVPR2 au niveau des cellules endothéliales pulmonaires (Kaufmann, Oksche et al. 2000).

### **2.2.1.3. Défauts de structure de l'AVPR2 et DIN**

Comme bon nombre de gènes, le gène du récepteur à la vasopressine est sujet à mutations. Malheureusement, la protéine codée par ce gène représentant l'élément indispensable à la réabsorption hydrique, des anomalies de structure de celui-ci vont engendrer un diabète insipide néphrogénique héréditaire lié à l'X.

La première équipe à avoir établi un lien de cause à effet entre des défauts du gène codant le récepteur V2 et un DIN lié à l'X est celle de W. Rosenthal en 1992 (Rosenthal, Seibold et al. 1992). En effet, ces chercheurs ont démontré que des patients atteints de cette pathologie présentaient une délétion qui modifiait le cadre de lecture et entraînait une terminaison prématurée de la transcription du gène de l'*AVPR2*. Depuis lors, plus de 193 mutations différentes ont été répertoriées à travers le monde dans plus de 287 familles d'origine ancestrale différentes (Bichet, Hendy et al. 1992; Arthus, Lonergan et al. 2000; Arthus, Lonergan et al. 2002; Bichet 2006).

La majorité des mutations répertoriées jusqu'à présent sont, comme il a été mentionné auparavant, des mutations faux-sens qui entraîneront la formation d'un récepteur dont la structure n'est modifiée que sur un seul résidu. Le reste des mutations aboutissent à la formation d'un récepteur tronqué, soit suite à un décalage du cadre de lecture après une délétion ou une insertion, soit par mutations ponctuelles non-sens créant un signal de terminaison (codon Stop) prématuré. Enfin, nous pouvons noter la mise en évidence de grandes délétions touchant le gène, des mutations rares, ainsi que d'éventuels mécanismes de mutagénèses (Bichet, Hendy et al. 1992; Bichet, Arthus et al. 1993; Bichet, Birnbaumer et al. 1994; Arthus, Lonergan et al. 2000; Arthus, Lonergan et al. 2002; Bichet 2006). L'ensemble de ces mutations, bien que ne paraissant épargner aucun segment du récepteur, semble tout de même se concentrer au niveau des sept domaines transmembranaires (**Figure 23**, page 60).



**Figure 23. Représentation schématique de l'AVPR2 et des 108 mutations non-sens.**

Les symboles rouges des résidus indiquent la localisation des mutations et les flèches grises indiquent 2 ou 3 mutations différentes touchant le même codon.

Parmi toutes ces mutations, l'une semble particulièrement intéressante, la mutation non-sens W71X. En effet, celle-ci, affectant la première boucle intracellulaire de la protéine et provoquant la formation d'un codon stop prématuré, est très fréquemment retrouvée. L'incidence de cette mutation peut atteindre 24 pour 1000 dans certains villages de Nouvelle-Écosse (Bichet, Hendy et al. 1992). Cette incidence très élevée pour cette pathologie rare, trouve son explication au moment de la colonisation de cette région de l'est du Canada. En effet, lors de l'arrivée massive de migrants, en 1761 à Halifax, une famille était porteuse de cette mutation, également appelée « Hopewell » du nom du bateau débarquant les membres de cette famille. Depuis des générations, cette mutation s'est

transmise pour être aujourd'hui présente chez le plus grand groupe de patients avec DIN (Bichet, Arthus et al. 1993; Holtzman, Kolakowski et al. 1993).

Parmi l'ensemble des mutations affectant le gène de l'*AVPR2* et conduisant à un DIN, et malgré la grande diversité d'origine ancestrale de ces mutations, certaines d'entre elles semblent être récurrentes. C'est en effet le cas pour dix mutations qui sont retrouvées chez 35 familles d'origine indépendante: D85N, V88M, R113W, Y128S, R137H, S167L, R181C, R202C, A294P et S315R (Bichet, Birnbaumer et al. 1994; Arthus, Lonergan et al. 2000). Ces mutations sont survenues *de novo* chez des familles non reliées du fait qu'elles touchent des dinucléotides CpG .

En effet, ces derniers, sous leur forme méthylée, sont sujets à de très fréquentes mutations ne touchant qu'une seule base et favorisent les transitions CG →TG ou CG→TA (Cooper and Youssoufian 1988; Cooper, Krawczak et al. 1995). De plus, il est important de noter que ces mutations ne se concentrent pas à un endroit précis mais qu'elles touchent l'ensemble du récepteur.

Certaines mutations touchant le gène de l'*AVPR2* ont été caractérisées sur le plan fonctionnel ce qui a permis de confirmer leur rôle dans l'origine du défaut de l'insensibilité des tubules collecteurs à l'action de l'AVP. Ces études d'expression *in vitro* ont démontré que la majorité des récepteurs mutés étaient séquestrés dans le réticulum et ne pouvaient gagner la membrane plasmique pour remplir leur fonction de signalisation (voir « Défauts de structure de l'*AVPR2* et DIN » page 70).

#### **2.2.1.4. Gène de l'*AVPR2* normal et DIN**

Récemment, le laboratoire du Dr. Bichet a mis en évidence, chez des patients atteints de DIN lié à l'X, une absence de mutation au niveau des deux gènes impliqués dans le mécanisme de réabsorption de l'eau, l'*AVPR2* et l'*AQP2*. Cependant, et en accord avec les

signes cliniques de la maladie, une ségrégation parfaite entre le phénotype de la maladie et les marqueurs du locus Xq28 était observée.

De plus, chez ces patients, les réponses hémodynamiques et des facteurs de coagulation suite à l'administration de dDAVP, se sont révélées tout à fait normales. Le seul paramètre modifié suite à l'administration de cet analogue de l'AVP a été l'osmolalité urinaire qui atteignait celle observée chez les patients atteints de DIN présentant des mutations du gène codant l'*AVPR2*.

L'ensemble de ces observations, autorise à penser que, chez ces patients, l'apparition du DIN est liée, non pas à un défaut des séquences codantes du gène, mais plutôt à une non-expression de celui-ci. Une absence d'expression d'un gène est souvent associée à des délétions touchant les zones régulatrices et/ou les promoteurs: par exemple, les  $\beta$ -thalassémies liées à des délétions de la région contrôle du locus (« locus control region » ou LCR) du gène de la globine (Kioussis, Vanin et al. 1983; Grosveld, van Assendelft et al. 1987), la dysplasie campomélique, forme d'ostéochondrodysplasie autosomique, dont les délétions touchent les régions régulatrices du gène *SOX9* (Pop, Conz et al. 2004).

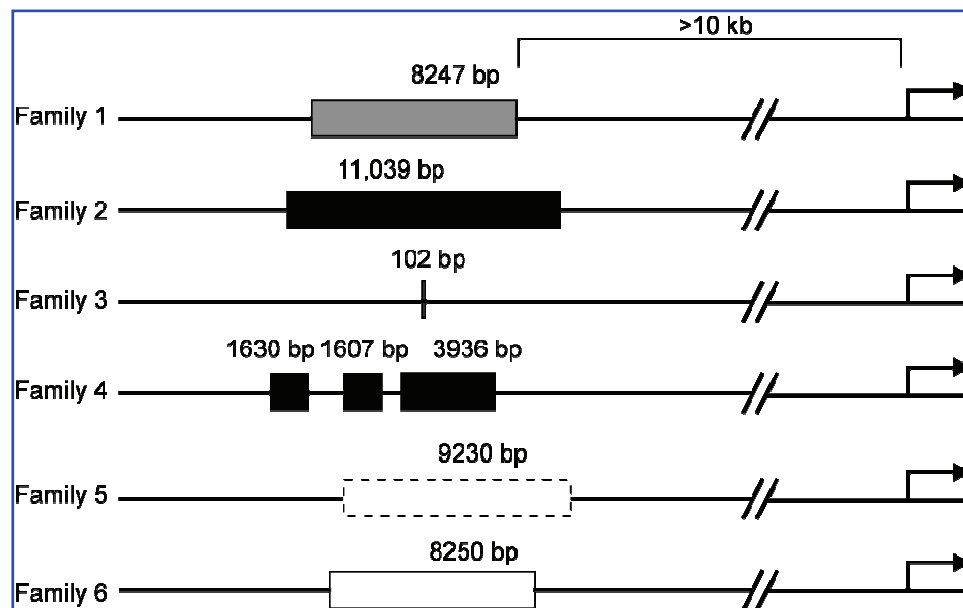
Dans le cas des patients atteints de DIN lié à l'X sans mutation touchant le gène de l'*AVPR2*, une analyse par séquençage de 60 kb de part et d'autre de ce gène (30 kb en amont et 31 en aval) a révélé la présence de grandes délétions. De plus, chez ces patients, la séquence de l'*AQP2* a été trouvée normale et l'ensemble des marqueurs du locus Xq28 ségréguait parfaitement avec le phénotype de la maladie. À ce jour, six délétions, répertoriées dans six familles indépendantes, localisées plus de 10 kb en amont du gène ont été identifiées (**Figure 24**, page 63):

- La première de plus de 8 kb;
- La seconde de plus de 11 kb;



- La troisième de 102 pb à laquelle est associée une substitution (une guanine est remplacée par une adénine) 222 pb en aval de la délétion. Il est important de noter que ce polymorphisme n'a jamais été retrouvé dans aucune famille comportant des patients atteints de DIN, ni sur plus de 30 allèles indépendants normaux;
- La quatrième famille présente, non pas une, mais trois délétions localisées dans la même zone que les précédentes (deux de 1,6 kb et une d'environ 4 kb);
- La cinquième délétion comporte plus de 9 kb;
- La sixième et dernière délétion fait plus de 8 kb;

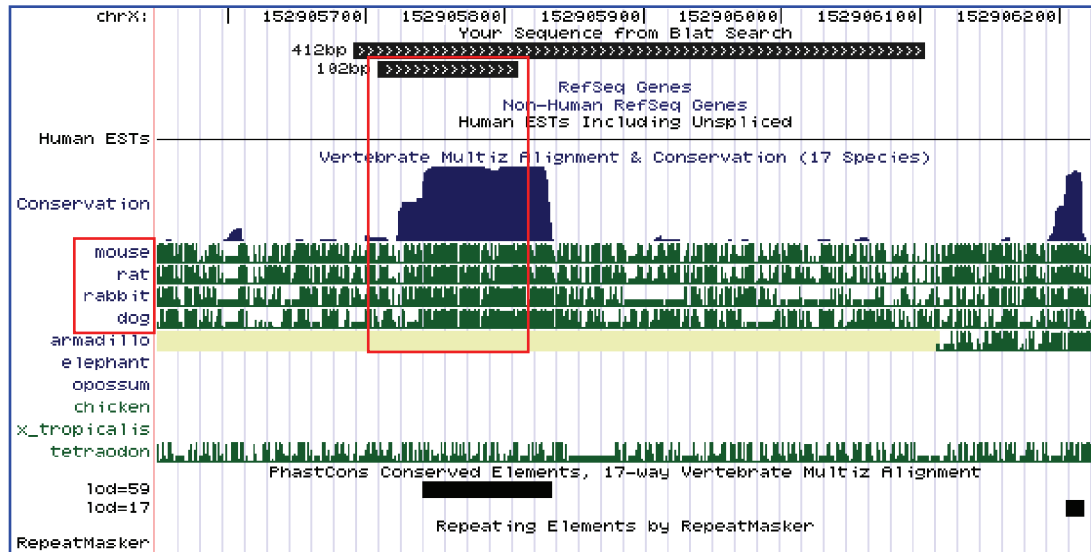
Il est important de noter que la délétion de 102 pb est commune aux six autres délétions retrouvées chez ces familles indépendantes.



**Figure 24 : Représentation schématique des délétions identifiées dans six familles avec DIN.**

La séquence d'ADN codant l'*AVPR2* est retrouvée intacte dans chacune des six familles et les délétions sont localisées plus de 10 kb en amont du gène. Le site d'initiation de la transcription est indiqué par une flèche.

Une comparaison de séquence inter espèces de la zone déléte de 102 pb retrouvée dans la famille 3, révèle un haut degré d'homologie entre l'humain, la souris, le rat, le lapin et le chien (**Figure 25**). Cette observation confirme le rôle potentiellement important de cette région dans l'activation de l'*AVPR2*.



**Figure 25.** Alignement de séquence inter espèces de la zone déléte de 102 pb.

### **2.2.2. Propriétés générales des récepteurs de type 2**

Comme mentionné précédemment, et devant l'absence d'étude infirmant ceci, ces récepteurs ne sont exprimés qu'au niveau de la membrane basolatérale des cellules principales du tubule collecteur de la médullaire interne rénale. Ils sont responsables de l'action antidiurétique de l'AVP en permettant l'expression de molécules d'AQP2 à la membrane luminale de ces mêmes cellules. Ces canaux permettront ensuite une réabsorption d'eau très importante entre le tubule du canal collecteur et le sang ce qui engendrera, au final, une concentration de l'urine à éliminer.

### 2.2.2.1. Classe de protéine

Les nombreux travaux visant à étudier ce récepteur, ont démontré, puis confirmé, l'appartenance de celui-ci à la grande famille des RCPG. En effet, la séquence de l'ADN complémentaire (ADNc) du gène codant ce récepteur, prédit un peptide de 371 acides aminés ayant, comme caractéristiques principales, la présence de sept segments transmembranaires, de quatre domaines extracellulaires ainsi que de quatre domaines intracellulaires (Birnbaumer, Seibold et al. 1992). De plus, ce récepteur peut subir diverses modifications post-traductionnelles typiques des RCPG: il existe différents sites de glycosylation dans les domaines extracellulaires ainsi que plusieurs résidus cystéines palmitoylés dans l'extrémité C-terminale. De la même manière, un pont disulfure entre deux résidus cystéines hautement conservés dans le troisième segment transmembranaire et la deuxième boucle extracellulaire, permet de classer l'AVPR2 dans la famille A des RCPG. Cependant, ce récepteur n'est, à l'heure actuelle, comme bon nombre d'autres RCPG, toujours pas cristallisé. Par conséquent, les propositions concernant sa conformation sont basées sur celle de la structure tridimensionnelle de la rhodopsine (Palczewski, Kumasaka et al. 2000).

Comme il a été précisé dans l'introduction concernant les RCPG, le ligand, l'AVP, lie le récepteur au niveau d'une poche localisée à l'intérieur des hélices transmembranaires. En effet, du fait de leur rapprochement structural, les hélices 2 et 7 forment cette poche de 15 à 25 résidus où viendra s'engouffrer l'hormone (Mouillac, Chini et al. 1995). En plus de ce réceptacle, l'AVP peut également interagir, grâce à son arginine en position 8, avec la deuxième boucle extracellulaire du récepteur, au niveau de l'acide aspartique en position 103. Il semblerait d'ailleurs que ce soit ce résidu qui permette la sélectivité du récepteur car dans le cas du V1a, ce résidu est remplacé par une tyrosine (Chini, Mouillac et al. 1995). D'après une étude récente, il semble que le fait que ce récepteur soit retrouvé exclusivement au niveau de la membrane basolatérale des cellules du tubule collecteur dépende d'un signal de localisation présent dans la deuxième boucle intracellulaire

(Hermosilla and Schulein 2001). Cependant il existerait un second signal de localisation, dans l'extrémité C-terminale, mais cette fois-ci pour la membrane apicale. Malgré la présence de ces deux signaux de localisation, il apparaît que le premier nommé, permettant l'expression à la membrane basolatérale, soit dominant.

De la même manière que l'ensemble des RCPG, l'AVPR2 transmet l'information apportée par le ligand à une protéine signal afin d'activer une cascade d'événements intracellulaires débouchant sur une réponse physiologique.

#### **2.2.2.2. Voie de signalisation**

Suite à la liaison de l'hormone, l'AVP, à son récepteur, l'AVPR2, il y aura activation de l'adénylate cyclase (Chabardes, Firsov et al. 1996). Cette activation résulte en fait de l'interaction du récepteur activé par l'AVP, avec une protéine G de type  $G\alpha_s$ , ou stimulatrice qui servira « d'interrupteur » moléculaire. À l'état inactif, la sous-unité  $\alpha_s$  est associée, d'une part, avec le complexe  $\beta\gamma$  et, d'autre part, avec le GDP. Le récepteur activé par l'AVP va agir de manière catalytique pour libérer le GDP de la sous-unité  $\alpha_s$  et permettre au GTP, abondamment présent dans la cellule, de se lier. Suite à cette liaison, le GTP va provoquer un changement conformationnel de la protéine G ce qui entraînera la dissociation de la sous-unité  $\alpha_s$  des deux autres membres. La sous-unité  $\alpha_s$  liée au GTP va ensuite parcourir la membrane lipidique jusqu'à ce qu'elle « rencontre » une adénylate cyclase qu'elle va activer. Par la suite, et comme il a été précisé auparavant, l'activation de cette adénylate cyclase va entraîner une accumulation d'AMPc, à partir d'ATP (Kurokawa and Massry 1973; Edwards, Jackson et al. 1981; Star, Nonoguchi et al. 1988). Cette accumulation va provoquer une série d'événements, activation de protéines kinases, phosphorylation de différents effecteurs par l'intermédiaire de la PKA, mobilisation du  $Ca^{++}$  intracellulaire, conduisant à la modification de la position des microtubules du cytosquelette subapical, dynéines et kinésines, et à la fusion des vésicules endocytaires contenant les molécules d'AQP2 à la membrane luminale des cellules (Marples, Knepper et

al. 1995; Nielsen, Marples et al. 1995; Sabolic, Katsura et al. 1995; Yip 2002). Cependant, la modification de la position des microtubules est référencée comme ne servant qu'au transport « longue distance » dans une cellule alors que le transport « courte distance », ou local, serait assuré par les filaments de myosine (Fath and Burgess 1993; DePina and Langford 1999). Dans le cas des molécules d'AQP2, il semblerait que les deux mécanismes soient mis en jeu: MA. Knepper et al. ont en effet montré que l'AVP pouvait, via l'augmentation de  $Ca^{++}$  intracellulaire, entraîner l'activation d'une kinase, la « **myosin light chain kinase** » (MLCK) (Chou, Christensen et al. 2004). Elle-même va, par la suite, phosphoryler deux isoformes de myosines conventionnelles, les myosines non musculaires de type IIA et IIB, chargées de lier, déplacer et organiser les filaments d'actine pour provoquer le déplacement des vésicules (DePina and Langford 1999; Rogers and Gelfand 2000; Chou, Christensen et al. 2004) (**Figure 26**, page 69). Cette fusion va permettre l'enchâssement des molécules d'AQP2 à la membrane ce qui entraînera la réabsorption d'eau à partir du filtrat glomérulaire (Morello and Bichet 2001).

Suite à la transmission du signal véhiculé par l'AVP au second messager, l'AMPc, la sous-unité  $\alpha_s$  va, de manière spontanée, hydrolyser son GTP, grâce à une activité GTPase intrinsèque, en GDP et revenir ainsi à son état inactif. La forme  $\alpha_s$  liée au GDP se dissocie de l'adénylate cyclase, rejoint le complexe  $\beta\gamma$  et le trimère protéine  $G\alpha\beta\gamma$  inactif se reforme. L'AVP se dissocie ensuite du récepteur restaurant ainsi la configuration « éteinte » de celui-ci. En fait, l'activité GTPase intrinsèque de la sous-unité  $\alpha_s$  assure que la protéine G ne reste active que peu de temps (Bourne, Sanders et al. 1991).

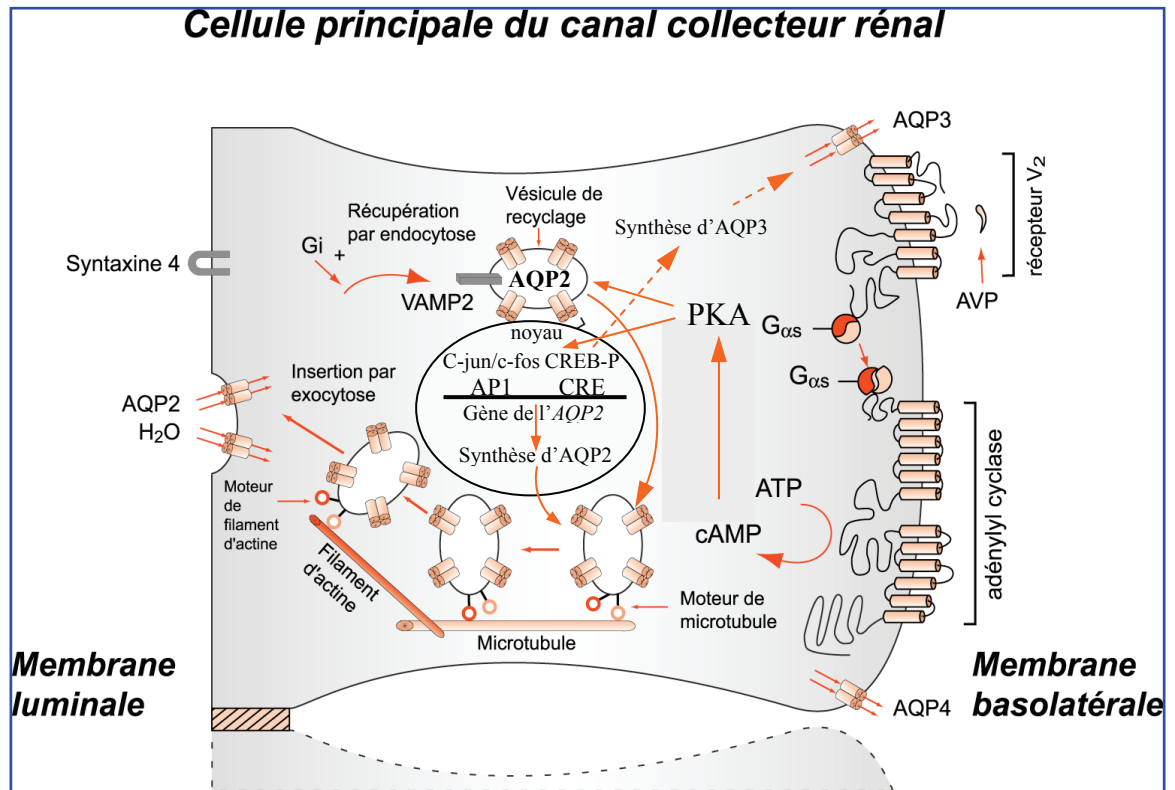
### **2.2.2.3. Effet moléculaire de l'activation de l'AVPR2**

Le mécanisme par lequel l'AVPR2 provoque la translocation des vésicules d'AQP2 à la membrane luminale est dit à court terme (Wade, Stetson et al. 1981; Nielsen, Chou et al. 1995). En effet, l'accumulation d'AMPc suite à l'activation du récepteur, est passagère du fait de la dégradation très rapide de ces molécules. De plus, la dissociation de l'AVP de

l'AVPR2 entraîne l'internalisation des molécules d'AQP2 et donc une réduction de la perméabilité des cellules à l'eau. Cependant, il existe un second mécanisme grâce auquel l'AVPR2 module l'activité des AQP2: ce mécanisme, dit à long terme, fait appel à une activité transcriptionnelle indirecte de l'AVPR2 (DiGiovanni, Nielsen et al. 1994; Terris, Ecelbarger et al. 1996). En effet, suite à l'accumulation d'AMPc et à l'activation de la PKA, les deux sous-unités catalytiques de cette dernière vont diffuser jusqu'au noyau. Une fois dans le noyau des cellules du tubule collecteur, ces sous-unités, suite à la phosphorylation de protéines régulatrices, telles que la protéine liant l'élément de réponse à l'AMPc (« cAMP response element-binding protein » ou CREB) et l'hétérodimère c-Jun/c-Fos, vont activer la transcription du gène de l'*AQP2* (Hozawa, Holtzman et al. 1996; Yasui, Zelenin et al. 1997; Nielsen, Frokiaer et al. 2002). Suite aux classiques processus de maturation du messager, de sa traduction ainsi que des modifications post-traductionnelles, les molécules d'AQP2 vont être stockées dans les agrégophores, vésicules intracellulaires regroupant plusieurs molécules d'AQP2, d'où elles pourront gagner la membrane à la suite de la stimulation de l'AVPR2 par l'AVP (**Figure 26**, page 69) (Nielsen, DiGiovanni et al. 1993; Marples, Frokiaer et al. 1999).

Ce mécanisme n'intervient que lorsque les récepteurs sont stimulés par l'AVP sur une longue période, plus de 24 heures, et ne touche pas seulement l'expression des molécules d'AQP2, mais également les AQP3 (Ecelbarger, Terris et al. 1995; Terris, Ecelbarger et al. 1996). En effet, et bien que les molécules d'AQP3 soient exprimées de façon constitutive dans les cellules du tubule collecteur, l'activation de la PKA va également permettre d'activer la transcription et donc leur synthèse. Celles-ci, bien qu'ayant un patron d'expression spécifique à la membrane basolatérale, peuvent également être retrouvées au niveau de la membrane basale. De plus, il semble que l'activation et l'expression d'AQP3 soit AVP-dépendante: des expériences menées chez le rat ont permis de démontrer que, lorsque les taux d'AVP circulante étaient augmentés, ou en cas de déshydratation, la quantité de molécules d'AQP3 l'était également à la membrane basolatérale des cellules du tubule collecteur (Terris, Ecelbarger et al. 1996). Les auteurs ont imaginé que ces

molécules étaient exprimées de manière concomitante aux molécules d'AQP2 et se localisaient à la membrane opposée afin de permettre l'élimination des quantités très élevées d'eau entrant par la face luminale, en direction du liquide interstitiel (Nielsen, Kwon et al. 2007).



**Figure 26. Représentation schématique d'une cellule principale du tubule collecteur et des mécanismes conduisant à l'expression des molécules d'AQP2 à la membrane luminale, régulation à court terme, ainsi qu'à l'activation du gène de l'AQP2, mécanisme à long terme.**

L'AMPc produit suite à l'activation de l'adénylate cyclase, active la PKA qui va avoir deux fonctions distinctes:

- La première, à court terme, consiste à phosphoryler les molécules d'AQP2 se trouvant dans les vésicules intracellulaires. Cette activation, va engendrer une modification de la structure des microtubules, ce qui provoquera une translocation des molécules en direction de la membrane;
- La seconde, à long terme, va activer la transcription du gène de l'AQP2. Les sous-unités catalytiques de la PKA vont phosphoryler des protéines activatrices, CREB-P et/ou c-jun/c-fos, de ce gène. Ces molécules nouvellement synthétisées, vont rejoindre le circuit de migration à la membrane.

En plus de ces actions, une synthèse accrue de molécules d'AQP 3 et d'AQP4 ainsi que leur transport à la membrane basolatérale des cellules est à observer.

Schéma redessiné et modifié à partir de (Bichet 2001) et (Nielsen, Frokiaer et al. 2002).

De manière similaire à de nombreux autres récepteurs transmembranaires (rhodopsine, tyrosine kinase, etc.) l'AVPR2 peut former des dimères. Cependant, parmi les nombreuses études ayant porté sur le fait que les AVPR2 existent sous forme dimérique, sur le rôle joué par cette oligomérisation, aucun consensus ne semble se dégager. En effet, si des travaux démontrent qu'il existe des hétérodimères V1a/V2 ou V2/OTR (DiGiovanni, Nielsen et al. 1994; Terrillon, Durroux et al. 2003; Devost and Zingg 2004; Terrillon, Barberis et al. 2004), d'autres font état d'homodimères V2/V2 (Sadeghi, Innamorati et al. 1998; Zhu and Wess 1998; Terrillon, Durroux et al. 2003). Récemment, des travaux ont démontré que les AVPR2 pouvaient exister, *in vivo*, au minimum, sous forme de dimères, sans toutefois préciser s'il s'agissait d'homo ou d'hétérodimères. Les auteurs ont, à partir de reins de rat, mis en évidence que ces récepteurs existaient sous forme monomérique dans les vésicules intracellulaires et dimérique au niveau de la membrane plasmique (Fenton, Brond et al. 2007). À l'heure actuelle, et bien que ceux-ci soient toujours sujets à controverse, il semble que cette dimérisation joue un rôle important dans: la fonction même du récepteur, la liaison du ligand, l'activation de la protéine G, dans la transduction du signal et dans l'internalisation du récepteur (Bai 2004; Bai 2004; Hansen and Sheikh 2004; Terrillon and Bouvier 2004).

#### **2.2.2.4. Défauts de structure de l'AVPR2 et DIN**

Dans la partie consacrée à la structure ainsi qu'aux mutations touchant le gène de l'AVPR2, nous avons mentionné le fait que les différentes mutations avaient un lien direct avec la survenue d'un DIN. Nous avons également précisé que ces mêmes mutations, bien qu'affectant différentes parties du gène, entraînaient, pour la plupart, une séquestration de la protéine dans le réticulum. Cependant, nous n'avons pas étudié le phénomène plus en détail.

Le fait que les mutations soient réparties sur l'ensemble de la séquence du gène, et bien qu'il semble y avoir une concentration de celles-ci sur les séquences codant pour les



segments transmembranaires, il est évident que les protéines produites présenteront différents défauts entraînant différents effets fonctionnels. Afin de démontrer ceci, plusieurs équipes ont fait appel à des systèmes d'expression hétérologue des récepteurs mutant (Tsukaguchi, Matsubara et al. 1995; Tsukaguchi, Matsubara et al. 1995; Tsukaguchi, Matsubara et al. 1995; Schöneberg, Yun et al. 1996; Morello, Lonergan et al. 2000; Morello, Salahpour et al. 2000; Bernier, Lagace et al. 2004; Bernier, Morello et al. 2006). De ces études semblent se dégager trois grands types de récepteurs en fonction des défauts les touchant: le premier, regroupant les mutations qui entraînent un problème au niveau de la cascade de signalisation en empêchant la liaison avec la protéine G (5%) (Rosenthal, Antaramian et al. 1993; Pan, Wilson et al. 1994; Oksche, Moller et al. 1996; Ala, Morin et al. 1998); le deuxième, comportant les mutations permettant au récepteur de gagner la membrane plasmique mais ne lui permettant pas de lier l'AVP (25%) (van Lieburg, Verdijk et al. 1994; Tsukaguchi, Matsubara et al. 1995; Ala, Morin et al. 1998; Morello, Salahpour et al. 2000); et le dernier, constitué des mutations entraînant un mauvais repliement de la protéine provoquant sa rétention dans le réticulum endoplasmique et provoquant la dégradation prématurée du récepteur (70%) (Tsukaguchi, Matsubara et al. 1995; Oksche, Moller et al. 1996; Schöneberg, Yun et al. 1996; Ala, Morin et al. 1998; Morello, Salahpour et al. 2000; Bernier, Lagace et al. 2004). La majeure partie des mutations, environ 70%, est représentée par ce dernier type de défaut alors que les mutations entraînant une abolition de la liaison de l'AVP ne représentent que 25% et celles provoquant une anomalie de couplage à la protéine G, 5%. Cependant, certaines de ces études concluant à une absence de liaison de l'AVP aux récepteurs mutants, n'ont pas vérifié l'expression, ou plutôt la non expression, des récepteurs comportant ces mutations (Pan, Wilson et al. 1994; Oksche, Moller et al. 1996). Par conséquent, il est fort probable que bon nombre de récepteurs, répertoriés comme incapables de lier l'AVP et/ou d'activer la protéine G, ne soient tout simplement pas capables de gagner la membrane et donc sont retenus dans les compartiments intracellulaires.

### **3. Expression et régulation des gènes chez les eucaryotes**

Chaque être vivant est composé d'une multitude d'une seule et même entité, la cellule. Dans cette cellule, se trouve, entre autre, le noyau qui renferme l'ADN comportant lui-même les gènes. Ces derniers, en plus de déterminer la structure des protéines nécessaires à la survie des cellules, permettent de mettre en place, moduler et organiser l'infrastructure cellulaire et orchestrent tout ce qui est indispensable à la cohésion de l'organisme dans son ensemble.

Si le rôle des gènes est une condition *sine qua non* au bon fonctionnement de la cellule, la manière avec laquelle ceux-ci vont être activés, réprimés, afin de moduler et de permettre à une cellule donnée de vivre, l'est tout autant. En effet, ce mécanisme présente de nombreuses caractéristiques communes à bon nombre d'espèces et d'organismes vivants et se trouve conservé au niveau de l'évolution: ceci révèle la haute importance de ce processus dans la pérennisation de la vie des cellules et donc des organismes dans leur ensemble.

Ce processus général se découpe en deux phases essentielles, la transcription et les mécanismes qui permettent de la moduler. La transcription en elle-même consiste, à partir de la molécule d'ADN, en la synthèse d'un ARN (**acide ribonucléique**) servant de messenger transportant l'information contenue dans l'ADN afin que celle-ci soit traduite en une protéine fonctionnelle. Ce mécanisme se décompose en trois étapes, l'initiation, l'élongation et la terminaison. La régulation de l'expression des gènes intervient à différents niveaux, tout d'abord au moment même de l'initiation de celle-ci, en l'activant ou en la réprimant, au niveau de la stabilité du messenger, en favorisant ou en empêchant sa dégradation, au niveau de la traduction de ce dernier et enfin au niveau des modifications touchant les protéines néoformées.

Nous nous attacherons à démontrer ici que, malgré le fait que la régulation de la transcription représente une infime partie de la régulation de l'expression des gènes, elle est tout à la fois extraordinairement complexe et la plus importante.

### **3.1. L'expression des gènes chez les eucaryotes**

La principale caractéristique de la cellule eucaryote, qui permet entre autre d'expliquer les différences dans l'expression des gènes avec les cellules procaryotes, est la présence d'une membrane nucléaire délimitant l'existence d'un vrai noyau contenant l'ADN. Cet organite est le siège de diverses actions: la transcription des messages codés par l'ADN qu'il renferme et qui vont intervenir dans la prolifération, la différenciation ainsi que dans les activités physiologiques des cellules; et la réplication de l'ADN qui est l'étape préparatoire à toute cellule entrant en division.

Si le noyau est le siège de nombreuses activités cellulaires, celles-ci ont lieu plus spécifiquement au niveau de l'ADN et plus particulièrement des gènes. Cette molécule d'ADN, portant en elle l'information nécessaire à l'élaboration d'une cellule et d'un organisme, est le patrimoine génétique de toute entité vivante. De 1953, date à laquelle fut déterminée sa structure et son organisation tridimensionnelle et qui valut à ses auteurs Watson et Crick le prix Nobel de Médecine et Physiologie en 1962 (Watson and Crick 1953), jusqu'à la fin des années 1970, l'avènement de la biologie moléculaire a permis d'élucider la structure, la synthèse d'ADN, d'ARN et des protéines.

Avant d'exposer les caractéristiques fonctionnelles des gènes, nous nous intéresserons à l'organisation macroscopique de la molécule d'ADN, puis à la structure des gènes.

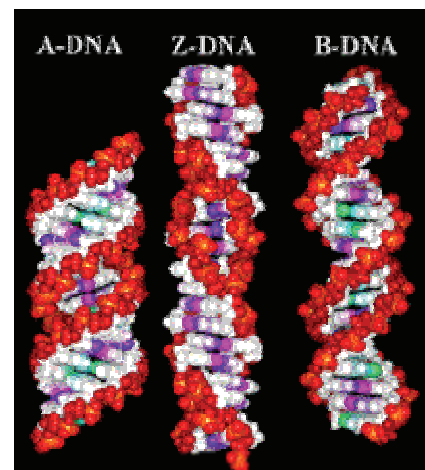
### 3.1.1. La Structure chromatinienne

#### 3.1.1.1. L'ADN

L'ADN, support de l'hérédité, constitué de deux brins antiparallèles formant une hélice bicaténaire, existe sous trois formes distinctes (**Figure 27**).

**Figure 27. Les différentes formes d'ADN dans le vivant.**

- La forme A: retrouvée en conditions de déshydratation, de pas droit, c'est la forme la plus courte; le petit sillon a quasiment disparu;
- La forme Z: forme la plus allongée, de pas gauche avec un seul petit sillon;
- La forme B: la plus répandue dans le monde vivant, de pas droit, présentant deux sillons, l'un petit et le second, plus grand.



La première, ou forme B, est la forme biologique la plus importante et la plus courante; elle correspond à celle décrite par Watson et Crick en 1953: les bases sont espacées régulièrement et l'hélice présente un pas droit. À son niveau les brins torsadés ménagent deux sillons hélicoïdaux différents: le petit et le grand sillon jouant un rôle important dans la liaison de protéines (Watson and Crick 1953). Une seconde forme, peu présente dans la nature puisque ne se retrouvant que dans les solutions non aqueuses, la forme A, est de pas droit également. Et enfin, une troisième forme, appelée ADN Z, présente les mêmes caractéristiques que l'ADN A, mais à son niveau, le pas de l'hélice n'est plus droit, mais gauche. Si à l'origine cette forme a été créée en laboratoire (Wang, Quigley et al. 1979), elle a été retrouvée dans des chromosomes de mammifères. Cette forme semble être spécifique à la transcription: elle est principalement retrouvée dans les régions promotrices

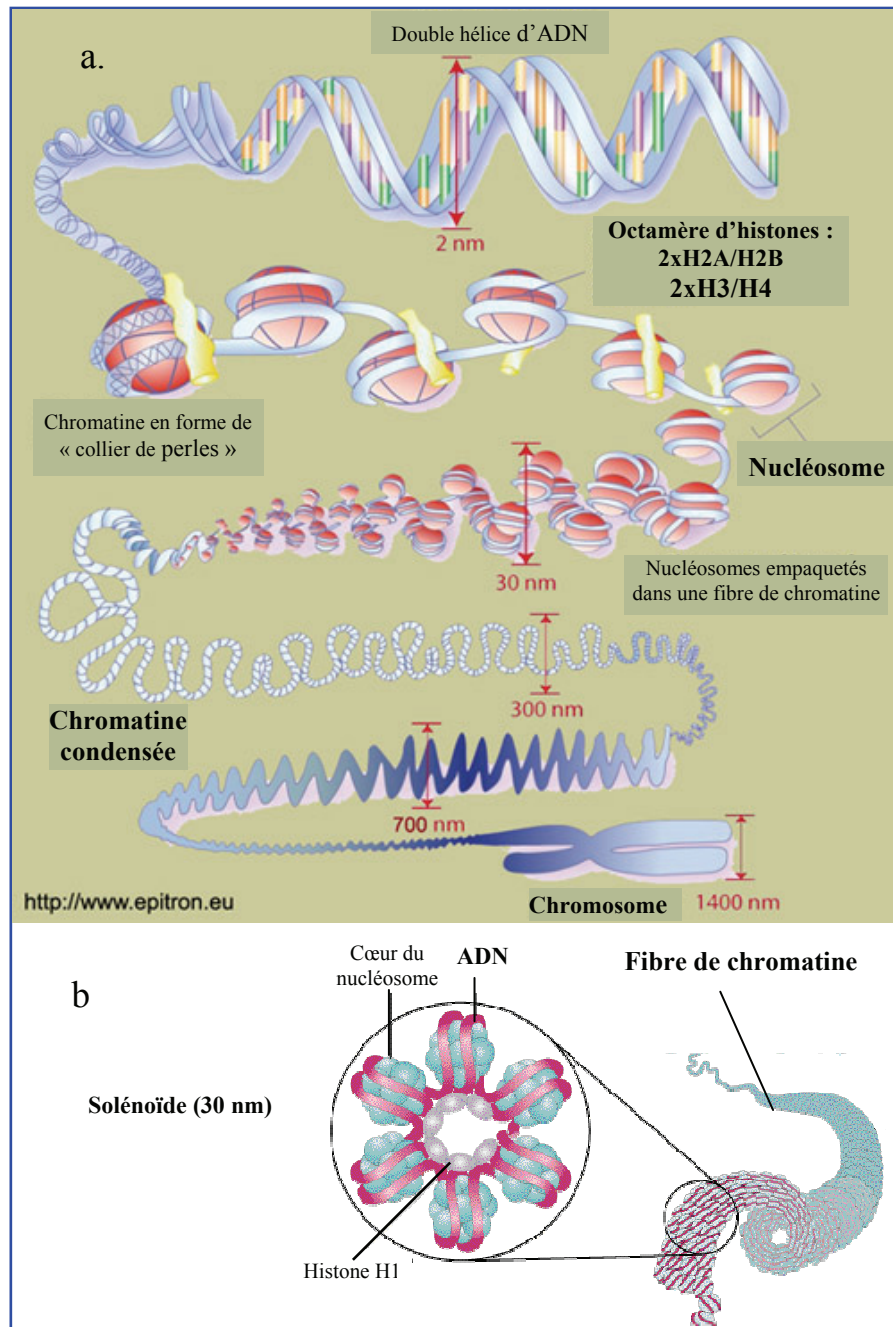
des gènes transcrits (Wittig, Wolfl et al. 1992; Herbert and Rich 1999) et l'adoption de cette forme au niveau de ces régions stimule la transcription (Liu, Liu et al. 2001; Oh, Kim et al. 2002). En effet, les régions proches du SIT contiennent fréquemment des motifs de séquences propices à l'adoption de la forme Z (Schroth, Chou et al. 1992; Champ, Maurice et al. 2004). L'ARN stimule un transfert de la forme B à la forme Z. À la fin de la transcription, lorsque la molécule d'ARN se détache, l'ADN reprend sa forme B.

### **3.1.1.2. La chromatine**

Dans le noyau de chaque cellule, l'ADN est fractionné en 46 chromosomes et condensé sous forme de chromatine (Johnson, O'Neill et al. 1998). En effet, la longueur totale de la molécule d'ADN représentant plusieurs milliers de fois celle de la cellule, ce filament doit impérativement être compacté: le taux de compaction atteint un facteur 10 000. Cependant, la condensation de l'ADN en chromatine est organisée de manière séquentielle et ordonnée.

Le premier niveau de compaction est représenté par l'association de l'ADN avec différentes protéines, les histones, pour former un nucléosome (Kornberg 1974; Kornberg and Thomas 1974). Autour d'un cœur protéique lui-même formé d'un octamère d'histones, deux paires d'histones H2A, H2B, H3 et H4, sont enroulées 146 pb d'ADN (Luger and Richmond 1998). Chaque nucléosome est séparé du suivant par un ADN « nu », ou ADN de liaison dont la taille varie en fonction des espèces et du type cellulaire. Cette association ADN/octamère d'histones formant le cœur du nucléosome est stabilisée grâce à la présence d'un cinquième type d'histone, l'histone H1 appelé histone de liaison; on parle alors de forme condensée de la molécule d'ADN. Celle-ci fait 10 **nanomètres** (nm) de diamètre et la structure est dite en « collier de perles ». Ce nucléosome se répète régulièrement tout le long de la molécule afin de former un nucléofilament qui pourra s'organiser, lui-même, en structures de plus en plus compactes.

Le second niveau découle de cette association des différents nucléosomes pour, tout d'abord, former une hélice composée de 6 nucléosomes par tour produisant une fibre de 30 nm de diamètre (**Figure 28b**, page 77) (Finch and Klug 1976). Cette fibre spiralée, appelée également solénoïde, est maintenue et stabilisée par les histones H1. Par la suite, une spiralisation de deuxième ordre de ce solénoïde donnera un nucléofilament de 100 nm de diamètre qui pourra s'enrouler sur lui-même pour former des filaments de 300 nm, formant ainsi l'euchromatine représentant une forme de condensation légère de l'ADN et propice à la transcription des gènes contenus dans cette zone (Smale 1997). Enfin, l'ultime niveau de compaction aboutira sur la formation d'un nucléofilament de 700 nm de diamètre correspondant à l'hétérochromatine qui est une forme de condensation prononcée et empêchant toute transcription de gènes. À l'entrée des cellules en mitose, cette fibre de 700 nm s'organise en se compactant de nouveau pour former les chromosomes métaphasiques (**Figure 28a**, page 77).



**Figure 28. Niveaux d'empaquetage de l'ADN.**

- a. Représentation schématique des différentes structures de la molécule d'ADN: de la double hélice au chromosome. Adaptée de [www.epitron.eu](http://www.epitron.eu).
- b. L'octamère d'histones, ou cœur du nucléosome, a la forme d'un disque où l'histone H1 permet au filament de se tordre pour adopter, au final, une structure solénoïdale très compacte (30 nm de diamètre).

Ces différents niveaux de compaction révèlent que la chromatine n'est pas une structure figée, mais au contraire, extraordinairement dynamique. Cette caractéristique, déterminante pour toutes les fonctions du génome (recombinaison, réplication, réparation et transcription), dépend en grande partie des nombreuses protéines qui peuvent modifier ce long filament.

Par conséquent, il apparaît clairement que l'organisation même de la structure de la molécule d'ADN constitue le premier niveau de régulation des gènes. Pour permettre la transcription d'un gène donné dans une région précise, la chromatine, comprise à la fois dans la région de contrôle du gène mais également au niveau du gène lui-même, doit être modifiée de manière à la rendre accessible aux divers acteurs de la transcription (Cobb, Morales-Alcelay et al. 2000). En effet, juste avant la transcription, l'ADN comportant le gène devant être transcrit se déroule et les histones H1, stabilisant la forme condensée de premier niveau, se détachent, permettant ainsi l'accès à la machinerie transcriptionnelle et/ou régulatrice.

### **3.1.2. Les différentes classes de gènes et de polymérases**

#### **3.1.2.1. Définition d'un gène**

Avant d'étudier en détail la structure et la fonction des différents gènes retrouvés dans le vivant, il convient de définir ce dernier. En effet, malgré le fait qu'à l'heure actuelle un gène soit considéré comme étant formé par l'unité de transcription (ensemble des séquences nucléotidiques codant, soit une protéine douée d'activité physiologique, soit un ARN, de transfert ou ribosomal), aucun consensus véritable n'est établi.

Au niveau moléculaire, la définition de base d'un gène correspond à l'ensemble de la séquence nucléotidique permettant la synthèse d'une molécule d'ARN fonctionnelle (Lodish, Baltimore et al. 1995; Berg, Tymoczko et al. 2002). D'après cette définition, il apparaît clairement que ne sont pas seulement incluses les unités de transcription, mais



également toutes les séquences nécessaires à la formation d'un transcrit, soit les régions amont, aval ainsi que le gène lui-même. Cependant, dans la suite de ce manuscrit, lorsque nous parlerons d'un gène, nous sous-entendrons que celui-ci correspond à l'unité de transcription. De la même manière, lorsque nous aborderons les différentes phases de la transcription, de sa régulation ainsi que les étapes de maturation des messagers et des niveaux de contrôle, nous nous limiterons aux mécanismes rencontrés dans les cellules eucaryotes.

### 3.1.2.2. Les différents types de gènes et de polymérases

Devant le nombre relativement faible de gènes composant le génome des eucaryotes, et humain en particulier, entre 20 000 et 25 000 (20 488 d'après une note récente, (Pennisi 2007), et étant donnée l'extraordinaire complexité structurale et fonctionnelle d'une cellule, il n'est pas surprenant de constater qu'il n'existe pas une, mais plusieurs enzymes chargées de transcrire l'intégralité du génome (pour revue sur la machinerie transcriptionnelle, (Thomas and Chiang 2006). En effet, et contrairement aux organismes unicellulaires chez lesquels n'est retrouvée qu'une ARN polymérase, pas moins de trois types d'enzymes ont été identifiées chez les eucaryotes: les ARN polymérases I, II et III (ou pol I, II et III) (Roeder and Rutter 1969; Roeder, Schwartz et al. 1976). Si la pol I est localisée dans le nucléole, lieu de synthèse des ARN ribosomiaux (Roeder and Rutter 1970), les pol II et III sont situées dans le nucléoplasme (Zylber and Penman 1971; Weil and Blatti 1976). De la même manière que ces enzymes peuvent être différenciées par leur localisation, elles présentent également des sensibilités différentes à une toxine, l' $\alpha$ -aminitine, qui bloque la phase d'élongation de la synthèse de l'ARN en empêchant la formation des **ARN messagers précurseurs** (pré-ARNm). En effet, si la pol I est totalement insensible et que la pol III est inhibée à de très fortes concentrations, la pol II, quant à, elle est fortement inhibée (Lindell, Weinberg et al. 1970).

Récemment, il a été découvert dans les plantes, une quatrième polymérase permettant la production de petits ARN interférants (siRNA ou « **small interfering RNA** ») impliqués dans l'« extinction » transcriptionnelle et la formation d'hétérochromatine (Herr, Jensen et al. 2005; Kanno, Huettel et al. 2005; Onodera, Haag et al. 2005). En outre, une équipe a caractérisé, dans des cellules HeLa humaines, une autre forme de polymérase résistante à l' $\alpha$ -amanitine, la « **single-polypeptide nuclear RNA polymerase** » (spnRNA-IV) (Kravchenko, Rogozin et al. 2005). Cette enzyme, structurellement distincte de la pol II, représente vraisemblablement, un second type de polymérase capable de transcrire les gènes produisant les ARNm. De plus, les promoteurs des gènes transcrits par cette polymérase, diffèrent sensiblement de ceux liant habituellement la pol II: ils ne contiennent pas les éléments du cœur du promoteur ou les séquences régulatrices habituellement rencontrées dans les gènes transcrits par la pol II; par contre, ils présentent deux motifs répétés très proches du SIT.

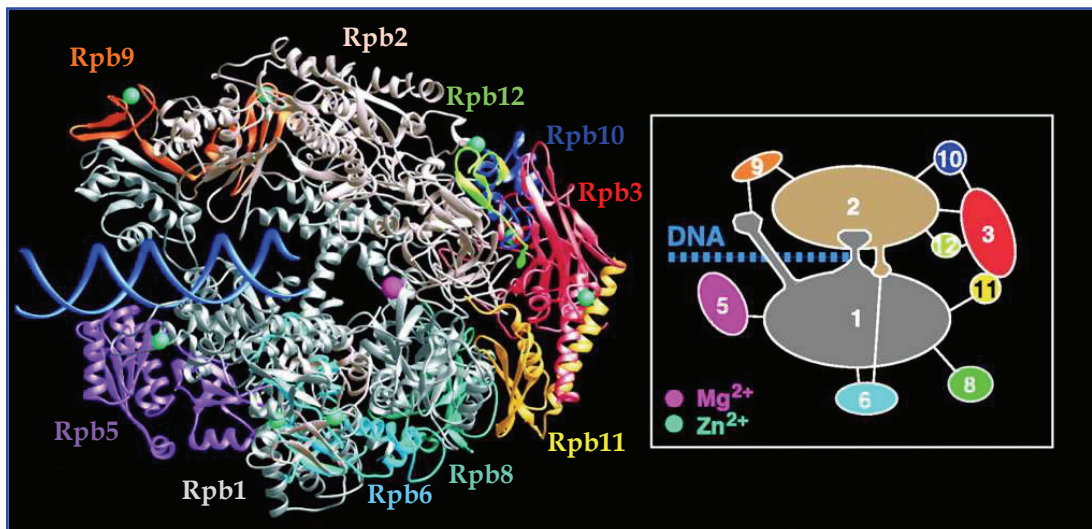
Les gènes sont répartis en trois classes en fonction de la polymérase qui les transcrit: les gènes de classe I, transcrits par la pol I, codent pour les **ARN ribosomiaux** (ARNr) de la petite sous-unité 40S (18S) et de la grande sous-unité 60S (28S et 5,8S). Les gènes appartenant à la deuxième classe, transcrits par la pol II, codent pour l'ensemble des ARN messagers aboutissant à la formation de protéines ainsi qu'à la plupart des ARN non traduits, snRNA (**small nuclear RNA**) et snoRNA (**small nucleolar RNA**). Enfin la pol III transcrit les gènes de classe III dont font partie, les **ARN de transfert** (ARNt) ainsi que l'ARNr de la grande sous-unité, l'ARNr 5S (Roeder and Rutter 1970).

La polymérase qui nous intéresse principalement est la pol II. Sa structure tridimensionnelle à une résolution de 2.8 Angström (Å) a été publiée en 2001 et révèle la grande complexité mais également les caractéristiques de cette enzyme qui sont conservées entre les espèces (Cramer, Bushnell et al. 2000; Cramer, Bushnell et al. 2001). En effet, celle-ci, de masse supérieure à 500 kDa, se compose toujours de 12 sous-unités différentes (**Tableau 3** et **Figure 29**, pages 82 et 83). Parmi ces sous-unités, cinq sont également

retrouvées dans les ARN pol I et III, soit Rpb5, 6, 8, 10 et 12, et les cinq autres, Rpb3, 4, 7, 9 et 11, bien que non communes aux trois polymérase, sont toutefois très conservées chez les eucaryotes et les procaryotes au niveau de leurs séquences. Les deux sous-unités restantes, Rpb1 et Rpb2, sont en fait des homologues des sous-unités bactériennes  $\beta'\beta$  et forment les « mâchoires » de l'enzyme qui renferment le site catalytique (Langelier, Trinh et al. 2002). En outre, un domaine particulier de la sous-unité Rpb1, extrêmement conservé dans toutes les polymérase, contient un motif invariant, NADFDGD, liant un ion  $Mg^{2+}$ , et porte vraisemblablement l'activité catalytique de l'enzyme (Dieci, Hermann-Le Denmat et al. 1995; Cramer, Bushnell et al. 2000). À l'extrémité C-terminale, la pol II possède une extension comportant plusieurs répétitions de la séquence Tyrosine-Sérine-Proline-Thréonine-Sérine-Proline-Sérine, le CTD (« carboxy terminal domain ») (Meininghaus, Chapman et al. 2000; Cabrejos, Allende et al. 2004; Hirose and Ohkuma 2007). Bien que le nombre de répétitions soit extrêmement variable, 26 chez la levure et 52 chez les mammifères (Young 1991), cette extension est essentielle au rôle de l'enzyme. En effet, le CTD, localisé à l'extérieur de la pol II, et donc accessible à différents facteurs, contient différents sites de phosphorylation importants pour la régulation de l'activité de l'enzyme (Hirose and Ohkuma 2007), en particulier au niveau de l'activation (Lu, Flores et al. 1991), de l'initiation (Serizawa, Conaway et al. 1993; Meininghaus, Chapman et al. 2000), de l'élongation (Lee and Greenleaf 1997; Komarnitsky, Cho et al. 2000) et de la terminaison de la transcription (Egyhazi, Ossoinak et al. 1996), de l'épissage des messagers ainsi que de la polyadénylation (Proudfoot, Furger et al. 2002; Bird, Zorio et al. 2004).

**Tableau 3. Composition et propriétés des sous-unités de l'ARN polymérase II.**

	Sous-unités			Propriétés	Références
	Nomenclatures		Masse		
<b>ARN polymérase II</b> (500 kDa)	Rpb1	B220	217 kDa	Homologues aux trois polymérases, forment les mâchoires de l'enzyme ainsi que le centre catalytique (Rpb1 lie l'ion Mg <sup>2+</sup> )	(Cramer, Bushnell et al. 2000; Cramer, Bushnell et al. 2001; Langelier, Trinh et al. 2002)
	Rpb2	B150	130 kDa		
	Rpb3	B44	30 kDa	Homologue aux trois polymérases, forme la charnière	(Cramer, Bushnell et al. 2000; Cramer, Bushnell et al. 2001; Langelier, Trinh et al. 2002)
	Rpb4	B32	14.5 kDa	Homologue aux trois polymérases	(Langelier, Trinh et al. 2002)
	Rpb5	ABC27	22 kDa	Commune aux trois polymérases eucaryotes, stabilise le complexe durant l'initiation	(Cheong, Yi et al. 1995; Lin, Nomura et al. 1997; Dorjsuren, Lin et al. 1998; Miyao and Woychik 1998; Cramer, Bushnell et al. 2001; Wei, Dorjsuren et al. 2001)
	Rpb6	ABC23	14 kDa	Commune aux trois polymérases eucaryotes, stabilise le complexe sur l'ADN et fait partie du centre catalytique	(Cramer, Bushnell et al. 2001; Minakhin, Bhagat et al. 2001; Langelier, Trinh et al. 2002)
	Rpb7	B16	17.8 kDa	Homologue aux trois polymérases	(Cramer, Bushnell et al. 2001; Langelier, Trinh et al. 2002)
	Rpb8	ABC14.5	15.4 kDa	Commune aux trois polymérases eucaryotes, rôle dans la stabilisation et l'import des polymérases dans le noyau	(Briand, Navarro et al. 2001; Cramer, Bushnell et al. 2001)
	Rpb9	B12.6	13.8 kDa	Homologue aux trois polymérases, rôle dans l'élongation et le clivage de l'ARN	(Awrey, Weillbaecher et al. 1997; Cramer, Bushnell et al. 2001; Langelier, Trinh et al. 2002)
	Rpb10	ABC10 $\beta$	9 kDa	Commune aux trois polymérases eucaryotes, participe à l'assemblage et au maintien de la structure des 3 polymérases (surtout pol I)	(Gadal, Shpakovski et al. 1999; Cramer, Bushnell et al. 2000; Cramer, Bushnell et al. 2001)
	Rpb11	B12.5	13,3 kDa	Homologue aux trois polymérases, forme la charnière	(Cramer, Bushnell et al. 2000; Cramer, Bushnell et al. 2001; Langelier, Trinh et al. 2002)
	Rpb12	ABC10 $\alpha$	10 kDa	Commune aux trois polymérases eucaryotes, participe à l'assemblage et au maintien de la structure des 3 polymérases (surtout pol III)	(Rubbi, Labarre-Mariotte et al. 1999; Cramer, Bushnell et al. 2000; Cramer, Bushnell et al. 2001)



**Figure 29. Structure cristallographique de l'ARN polymérase II eucaryote (*S. cerevisiae* à 2.8Å). D'après (Cramer, Bushnell et al. 2000; Cramer, Bushnell et al. 2001).**

Les sous-unités Rpb4 et Rpb7 ne sont pas représentées car elles n'ont pu être co-cristallisées. Les sous-unités Rpb5, 6, 8, 10 et 12 sont communes aux trois types de polymérases eucaryotes et les sous-unités Rpb1, 2, 3, 4, 7, 9 et 11 présentent de grandes homologies au niveau de leurs séquences.

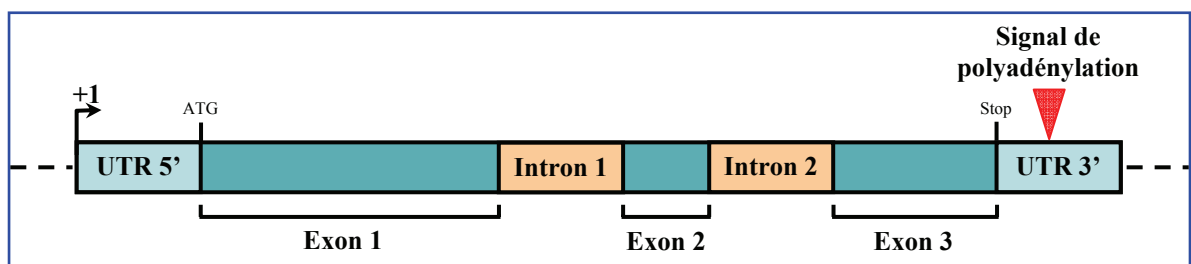
L'encart est un diagramme des contacts (traits blanc) entre les différentes sous-unités.

Les ARN polymérases eucaryotes ont la forme d'une pince dont l'armature est formée par les grandes sous-unités, Rpb1 (mâchoire supérieure) et Rpb2 (mâchoire inférieure), et la charnière par les sous-unités Rpb3 et Rpb11. Ce noyau est entouré dans l'enzyme eucaryote par un nuage de sous-unités. Le site catalytique (marqué par un point rose) est localisé au fond du sillon dans lequel s'engage l'ADN. Les résidus importants pour le fonctionnement sont conservés chez les eucaryotes et les procaryotes.

Si l'ARN polymérase II est le facteur permettant la transcription des gènes codant les protéines, il n'en reste pas moins insuffisant pour mener à bien ce processus. En effet, cette enzyme est totalement incapable de lier l'ADN et donc d'initier la transcription seule. Pour ce faire, elle a besoin de co-facteurs, plus communément appelés facteurs généraux de la transcription (FGT). Ces derniers vont permettre, suivant deux modèles détaillés plus loin, la formation de la machinerie transcriptionnelle de base comprenant la pol II et initiant la transcription. Avant de voir plus en détail le mécanisme précis de la transcription, il convient d'étudier plus avant les gènes codés par la pol II.

### 3.1.2.3. Les gènes de classe II

La plupart des gènes de classe II, comme il a été précisé précédemment, codent pour les ARN messagers aboutissant à la formation de protéines fonctionnelles. Un tel gène, chez les eucaryotes, et contrairement aux procaryotes, est unique. En effet, si les gènes procaryotiques sont polycistroniques, ceux des eucaryotes sont monocistroniques: ils sont séparés physiquement les uns des autres sur la molécule d'ADN et sont transcrits à partir de séquences promotrices qui leur sont propres. De plus, chaque gène est constitué, à la fois de séquences codantes, les exons (en bleu sur la **Figure 30**), et de séquences non codantes (en rose): pour cette raison, les gènes sont dits en « mosaïque ». En outre, à chaque extrémité d'un gène, sont retrouvées des séquences qui seront présentes dans la molécule d'ARN mais qui ne seront pas traduites: ce sont les régions non traduites 5' et 3', respectivement (UTR 5' et 3' « **untranslated region** »). L'UTR 5' permet la liaison du ribosome afin que celui-ci débute la traduction, et l'UTR 3' contient le site de polyadénylation. Ces deux séquences font respectivement partie du premier et du dernier exon. La transcription débute au niveau du SIT localisé en amont du premier codon traduit, le codon ATG, et se termine au niveau du codon de terminaison, ou codon Stop, présents dans chaque gène.



**Figure 30. Structure d'une unité de transcription (gène).**

A son niveau sont retrouvées les séquences codantes (les exons, en bleu) et les séquences non codantes (les introns, en rose). Les UTR sont transcrites mais seront absentes de la protéine et entourent le cadre de lecture ouvert du gène délimité par le site d'initiation de la traduction, l'ATG, et le codon stop.

Si l'ensemble de ces gènes présentent de nombreuses homologues au niveau de l'unité de transcription (présence d'exons, d'introns, d'UTR5' et 3', site d'initiation de la

transcription, codon de fin de transcription, signal de polyadénylation), il en existe également, comme nous le verrons plus loin, dans la zone qui promeut la transcription, le cœur du promoteur.

### **3.1.3. Structure et expression d'un gène de classe II**

Dans le vivant, la relation structure/fonction est à la base de chaque événement. Au niveau des gènes, cette logique est également retrouvée. En effet, de par sa structure, avec la présence de différents éléments en amont, en aval mais également à l'intérieur de celui-ci, un gène sera, ou non exprimé. Si les régions aval et amont permettent de réguler la transcription, la région la plus importante pour initier et activer celle-ci est le promoteur. Une fois le messenger formé, celui-ci va subir diverses modifications afin d'être transporté dans le cytoplasme où, grâce aux ribosomes, il va être traduit en une protéine fonctionnelle.

Afin de faciliter la lecture ainsi que la compréhension de cette section, nous rappelons ci-dessous l'ensemble des abréviations spécifiques employées dans cette partie.

<b>AdML</b> : Adenovirus major late	<b>Inr</b> : Initiator (élément initiateur)
<b>ATG</b> : Site d'initiation de la traduction	<b>MTE</b> : Motif ten element
<b>BRE<sup>d</sup></b> : TFIIB recognition element downstream	<b>PC4</b> : Positive co-factor 4
<b>BRE<sup>u</sup></b> : TFIIB recognition element upstream	<b>pol II</b> : ARN polymérase II
<b>CBF</b> : CCAAT box-binding factor	<b>pol IIA</b> : ARN polymérase II hypophosphorylée
<b>CCAAT box</b> : boîte CCAAT	<b>pol IIO</b> : ARN polymérase II hyperphosphorylée
<b>CK2</b> : Casein-kinase-2	<b>SAGA</b> : Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase
<b>CMVIE1</b> : Cytomegalovirus IE1	<b>SCPI</b> : Super core promoter 1
<b>CPI</b> : Complexe de pré initiation	<b>SIT</b> : Site d'initiation de la transcription
<b>CTD</b> : Carboxy-terminal domain	<b>SRB</b> : Suppressors of RNA polymerase B mutations
<b>CTF</b> : CCAAT-binding transcription factor	<b>TBP</b> : TATA box-binding protein
<b>DBTSS</b> : Database of human transcriptional start sites	<b>TFIIX</b> : Transcription factor X for polymerase II (A, B, D, E, F et H)
<b>DCE</b> : Downstream core element	<b>TFTC</b> : TBP-free TAF-containing complex
<b>DPE</b> : Downstream promoter element	
<b>EPD</b> : Eucaryotic promoter database	

**FGT**: Facteur général de transcription

**TAF** : TBP-associated factor

**HAT** : Histone acetyltransférase

**XCPE1** : X gene core promoter element 1

**HVVBX** : Hépatite B virus X gène

### 3.1.3.1. Rôle du promoteur: initier la transcription

Chez les eucaryotes, le promoteur d'un gène de classe II se décompose en plusieurs parties: le promoteur à proprement parlé, composé du promoteur proximal et du cœur du promoteur car mitoyen du gène dont il initie la transcription, et le promoteur distal, pouvant se localiser à plusieurs centaines de kb du gène, en amont ou en aval de celui-ci et régulant ce processus.

Si ces deux composantes du promoteur se différencient par leur localisation sur la molécule d'ADN par rapport au gène, elles se distinguent également par les éléments qu'elles contiennent. En effet, au niveau du promoteur proximal, sont localisés des éléments dits « constitutifs » car ils sont retrouvés dans la plupart des promoteurs et permettent la liaison des FGT (**Figure 31**, page 92) (Bucher 1990). Quant au promoteur distal, il comporte des éléments « spécifiques » d'un gène donné et favorise la liaison des protéines régulatrices (voir « Les régions régulatrices », page 116): pour cette raison, de telles séquences sont appelées séquences régulatrices. Il est également important de noter que des séquences spécifiques peuvent être localisées à l'intérieur du promoteur proximal ainsi que dans le gène. À des fins de clarté, et une nouvelle fois pour cause d'absence de consensus formel, nous utiliserons les termes suivants pour dénommer les différents composants du promoteur d'un gène: le promoteur correspondra à la zone à proximité du gène, car il initie la transcription, et les zones localisées à de grandes distances de celui-ci, appartenant au promoteur distal, seront qualifiées de séquences régulatrices car elles régulent la transcription. De la même manière, les protéines liant le promoteur seront les « facteurs de transcription » et les protéines liant les séquences régulatrices seront appelées « protéines régulatrices » et non facteurs de transcription comme il est commun de le trouver dans la littérature.



### 3.1.3.1.1. Structure du promoteur

D'un point de vue structural, le promoteur peut se décomposer lui aussi en deux sous-parties: nous pouvons distinguer le cœur du promoteur et le promoteur proximal. Si le promoteur proximal se localise de -200 à -45 pb du SIT, noté par convention +1, le cœur du promoteur couvre une séquence d'environ 90 pb de part et d'autre de ce même SIT (**Figure 31**, page 92). Cette caractéristique particulière suffit à elle seule à expliquer que dans de très nombreux gènes, le SIT puisse se trouver à de grandes distances de l'ATG (plus de 422 pb pour l'*AVPR2* par exemple).

Le rôle principal de ce cœur est, de par les séquences qu'il contient, d'initier ou d'activer la transcription. Il est généralement défini comme correspondant aux séquences d'ADN suffisantes pour initier la transcription par la pol II (Smale 1997). En effet, à son niveau sont retrouvés pas moins de sept éléments (**Figure 31**, page 92) pouvant agir indépendamment l'un de l'autre ou, au contraire, de concert et chargés de lier les FGT pour former la machinerie transcriptionnelle de base se composant de la pol II et des six FGT (TFIIA, B, D, E, F et H) (Orphanides, Lagrange et al. 1996; Roeder 1996; Nikolov and Burley 1997; Hampsey 1998).

Le premier, certainement le mieux caractérisé, correspond à la « boîte TATA », dénommée ainsi du fait de sa richesse en bases thymidine et adénine, se situant à environ -30 pb du SIT (Goldberg 1979; Lescure, Lutz et al. 1994). Cette séquence est le siège de la formation d'un complexe multiprotéique initiée par la liaison d'une sous-unité du facteur TFIID, la **TATA-binding protein (TBP)** (Buratowski, Hahn et al. 1988; Nakajima, Horikoshi et al. 1988). Il a longtemps été cru qu'une majorité de gènes eucaryotes contenaient cet élément et qu'il pouvait à lui seul être responsable de la transcription. Or, depuis quelques années il apparaît très clairement que la grande majorité de ces gènes ne contient pas de « boîte TATA ». En effet, une analyse informatique portant sur plus de 205 cœurs de promoteurs de drosophile a suggéré qu'environ 57% des cœurs ne contenaient aucune « boîte TATA » (Kutach and Kadonaga 2000).

Dans de tels gènes, la transcription peut être initiée par une multitude d'autres éléments. Parmi ceux-ci, nous pouvons tout d'abord citer un élément se situant à cheval sur le SIT, retrouvé également dans certains gènes comportant une boîte TATA, l'élément **Initiateur** (Abramowicz, Duprez et al.) (Smale and Baltimore 1989; Emami, Burke et al. 1998), ainsi qu'un élément localisé à l'intérieur même de l'UTR5', en aval du SIT, le « **downstream core promoter element** » (DPE), présent uniquement dans les promoteurs sans « boîte TATA » mais fonctionnant en coopération avec l'Inr (Burke and Kadonaga 1996; Burke and Kadonaga 1997; Kutach and Kadonaga 2000; Willy, Kobayashi et al. 2000; Zhou and Chiang 2001). Il est intéressant de noter que l'Inr peut initier la transcription seul ou en association avec la « boîte TATA » ou le DPE (Smale and Baltimore 1989). Chacun de ces éléments peut lier le même facteur que la « boîte TATA », soit TFIID. Cependant, si TFIID peut lier l'Inr et le DPE, ces interactions n'ont plus lieu via la TBP mais grâce à des facteurs associés à la TBP (**TBP-associated factors** ou TAF), soit TAF1 et TAF2 pour l'Inr (Chalkley and Verrijzer 1999) et TAF6 et TAF9 pour le DPE (Burke and Kadonaga 1996; Burke and Kadonaga 1997; Chen and Hahn 2003; Smale and Kadonaga 2003).

Récemment, il a été découvert un nouvel élément auquel le TFIID pourrait se lier, le « **motif ten element** », ou MTE, localisé en aval du SIT (Ohler, Liao et al. 2002; Lim, Santoso et al. 2004). Ce MTE peut agir, en liant TFIID, soit de manière concomitante avec l'Inr, mais indépendamment de la « boîte TATA » ou du DPE afin d'augmenter le taux basal de transcription, soit en se substituant à une boîte TATA et/ou à un DPE, ou enfin en complément de ces derniers éléments et ce, de manière indépendante à un Inr présent (Lim, Santoso et al. 2004). Bien qu'il soit fort probable que TFIID lie ce MTE, du fait que cet élément contrecarre la perte soit de la « boîte TATA », soit du DPE, aucune certitude n'existe (Lim, Santoso et al. 2004).

Un quatrième élément, mitoyen de la « boîte TATA » a également été mis en évidence: le « **TFIIB recognition element** » ou BRE. Celui-ci est, la plupart du temps, retrouvé dans les cœurs de promoteur contenant déjà une « boîte TATA »: son rôle est, en plus de lier TFIIB, d'augmenter l'affinité de celui-ci pour le cœur du promoteur, de stabiliser TFIID sur la

« boîte TATA » (Lagrange, Kapanidis et al. 1998; Qureshi and Jackson 1998) ainsi que d'orienter le complexe multiprotéique sur le promoteur (Bell, Kosa et al. 1999; Littlefield, Korkhin et al. 1999; Tsai and Sigler 2000). Ce dernier élément a récemment été renommé BRE<sup>u</sup> (pour BRE **u**pstream ou amont, en référence à la « boîte TATA ») après que plusieurs équipes aient démontré la présence d'un second BRE localisé cette fois-ci en aval de la « boîte TATA » (Tsai and Sigler 2000; Fairley, Evans et al. 2002; Chen and Hahn 2003). En effet, celles-ci se sont appuyées sur des études cristallographiques et biochimiques qui ont montré que le facteur TFIIB pouvait se lier de manière spécifique sur des séquences localisées en aval de la « boîte TATA » (Tsai and Sigler 2000; Fairley, Evans et al. 2002; Deng and Roberts 2005; Deng and Roberts 2006). Ce BRE aval, ou BRE<sup>d</sup> pour « **d**ownstream », semble stabiliser le complexe TFIIB/promoteur et moduler la sélectivité du cœur pour les différents FGT (Deng and Roberts 2005). Au contraire du BRE<sup>u</sup> qui, dans les cellules vivantes, réprime la transcription (Evans, Fairley et al. 2001; Chen and Hahn 2003), le BRE<sup>d</sup> semble n'avoir qu'un effet activateur (Deng and Roberts 2006). D'un point de vue fonctionnel, ces deux BRE présentent également une différence notable: si le BRE<sup>u</sup> peut lier le facteur TFIIB de manière indépendante de la TBP, la liaison de TFIIB sur BRE<sup>d</sup> est dépendante de la TBP (Lagrange, Kapanidis et al. 1998; Deng and Roberts 2006). En outre, bien qu'ayant été initialement localisés dans les promoteurs contenant une « boîte TATA », il apparaît que ces deux éléments BRE puissent être retrouvés dans des promoteurs sans « boîte TATA » (Deng and Roberts 2005; Gershenzon and Ioshikhes 2005). Ceci pousse à croire que le facteur TFIIB augmenterait la liaison de TFIID sur le cœur du promoteur grâce à de multiples points de contact.

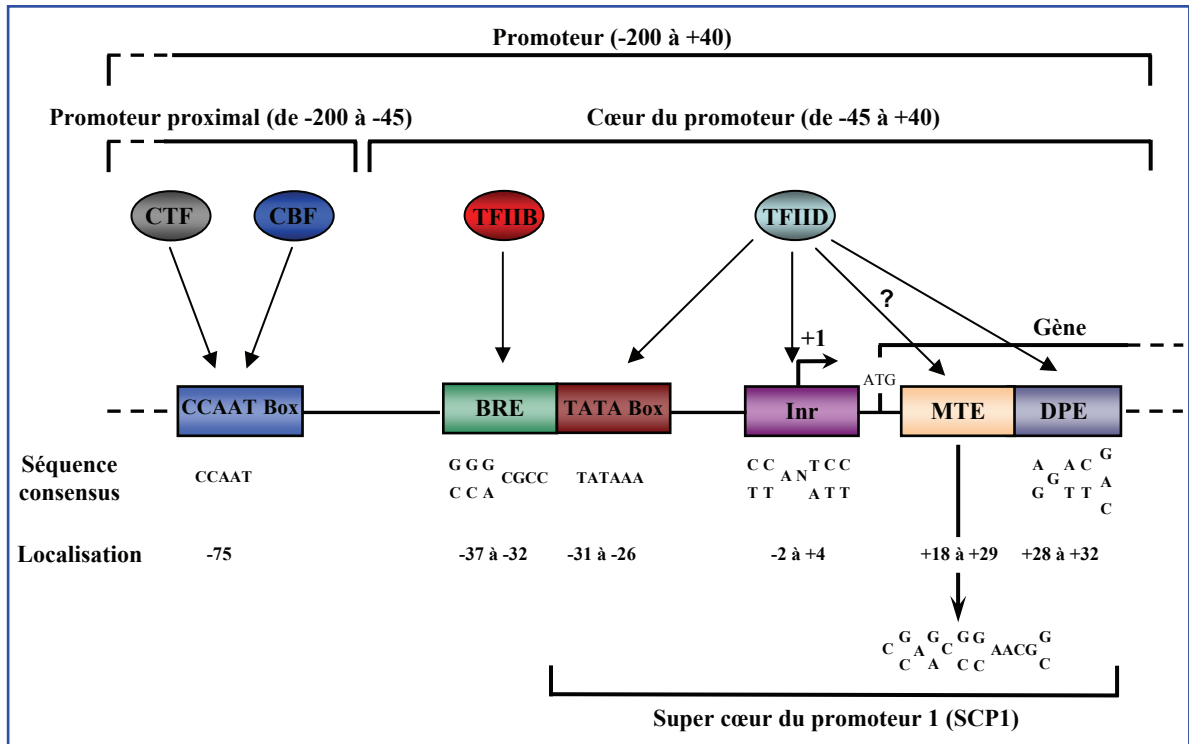
Plus récemment, un sixième élément a été découvert, le DCE (« **d**ownstream **c**ore **e**lement »), également localisé en aval du SIT (Lewis, Kim et al. 2000; Lee, Gershenzon et al. 2005). Ce DCE, contrairement aux autres motifs présents dans le cœur des promoteurs, ne se compose pas d'un seul et même élément mais de trois sous-séquences: S<sub>I</sub>, S<sub>II</sub> et S<sub>III</sub>. Chacune de ces sous-séquences présente un cœur dont les séquences sont, respectivement, CTTC, CTGT et AGC pouvant lier une sous-unité du facteur TFIID, TAF1 (Lee,

Gershenzon et al. 2005). De manière pour le moins surprenante, et malgré le fait que ces trois sous-séquences soient physiquement distinctes, l'analyse de quelques 1 871 promoteurs humains a permis de montrer qu'elles ne sont quasiment jamais retrouvées ensemble. Il apparaît d'ailleurs que c'est la combinaison de ces trois sous-éléments qui soit importante pour leur fonctionnalité (Lee, Gershenzon et al. 2005). Dans tous les cas de figure, ces sous-éléments agissent préférentiellement lorsque le promoteur comporte un élément Inr (Lewis, Kim et al. 2000; Lee, Gershenzon et al. 2005). La présence des sous-éléments S<sub>I</sub> et S<sub>III</sub> n'est pas corrélée avec la présence du DPE, suggérant que ceux-ci et ce dernier soient mutuellement exclusifs. Du fait de sa localisation, le sous-élément S<sub>III</sub> n'est jamais retrouvé avec un DPE. En outre, il semble que ce sous-élément S<sub>III</sub> puisse fonctionner indépendamment des deux autres: il est en effet retrouvé seul dans de très nombreux promoteurs (Lee, Gershenzon et al. 2005). De par sa localisation au niveau du cœur du promoteur, de +6 à +34, ce DCE englobe à la fois le MTE et le DPE. Si le facteur liant le MTE n'est pas encore découvert, bien que de fortes présomptions permettent d'imaginer que ce facteur soit TFIIB (Lim, Santoso et al. 2004), le facteur liant le DCE est le même que celui liant le DPE, TFIID via la sous-unité TAF1 (Lewis, Kim et al. 2000; Lee, Gershenzon et al. 2005).

Enfin, un septième élément a été mis en évidence dans le promoteur du gène X du virus de l'hépatite B (« **hepatitis B virus X gene** » ou HVBX) et dans les promoteurs eucaryotes, XCPE1 ou **X gene core promoter element 1** (Tokusumi, Ma et al. 2007). Il semblerait que cet élément, localisé entre les positions -8 et +2, ne soit retrouvé que dans les promoteurs humains ne comportant pas de « boîte TATA ». Son activité pourrait se faire suivant deux modes: soit par le FGT commun à de nombreux éléments, TFIID via ses sous-unités TAF1, soit, comme il a été démontré par différentes études, par la sous-unité TBP seule, c'est-à-dire ne faisant pas partie de TFIID. En effet, une étude utilisant une souris « **knock-out** » (KO), pour le gène codant la sous-unité TBP de TFIID, a montré que cette inactivation n'avait aucune conséquence sur la transcription par la pol II (Martianov, Viville et al. 2002). De la même manière, différentes équipes ont montré que dans plusieurs

gènes, la transcription par la pol II pouvait avoir lieu grâce à un complexe ne contenant pas de TBP mais contenant d'autres sous-unités de TFIID, les TAF. Ce complexe, ou TFTC pour « **TBP-free TAF-containing complex** » (Wieczorek, Brand et al. 1998; Hardy, Brand et al. 2002), ainsi que d'autres (TFTC-related PCAF/GCN5, SAGA (« **Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase** »), etc.) comportent des TAF et diverses protéines, dont des HAT (« **histone acetyltransferase** ») et sont impliqués dans différents aspects de la transcription par la pol II, en particulier par des interactions avec des activateurs (Cavusoglu, Brand et al. 2003). Ce qui semble indiquer qu'il existe différentes voies de recrutement de la pol II sur le promoteur et donc de l'activation de la transcription.

Si ces différents éléments peuvent être présents dans divers cœurs de promoteurs, ensemble ou individuellement, il a récemment été démontré que quatre d'entre eux, la « boîte TATA », l'Inr, le MTE et le DPE, pouvaient former un super cœur. En effet, l'équipe de JT. Kadonaga, a mis en évidence, chez les métazoaires, une fonctionnalité indissociable de la présence de ces quatre éléments (Juven-Gershon, Cheng et al. 2006). Le taux de transcription atteint avec ce super cœur, appelé SCP1 pour « **super core promoter 1** » se révèle plus élevé que celui observé avec les promoteurs forts habituels, du **cytomégalo**virus **IE1** (CMVIE1) et de l'adénovirus majeur tardif (« **Adenovirus major late** » ou AdML). Cependant, afin d'atteindre ce haut taux, la présence et la fonctionnalité simultanées de chacun de ces éléments est indispensable. Il semblerait que ce SCP1 exerce son activité par TFIID ce qui laisserait penser que la présence de ces quatre éléments stabiliserait ce facteur sur le cœur ainsi que l'ensemble de la machinerie transcriptionnelle.



**Figure 31. Structure du promoteur d'un gène de classe II.**

Celui-ci se décompose en deux parties principales, le cœur du promoteur, localisé de part et d'autre du site d'initiation, comportant 5 éléments impliqués dans l'initiation de la transcription liant soit le TFIID (la boîte TATA, l'Inr, le MTE et le DPE), soit le TFIIB pour le BRE; le promoteur proximal comportant, entre autres, la boîte CCAAT chargée de lier soit le CTF, soit CBF. Quelque fois est retrouvée également une boîte GC ; cependant celle-ci présente une localisation moins bien définie et n'a pas été représentée ici. Ces deux derniers éléments, boîtes CCAAT et GC, fonctionnent en fait plus comme des régions régulatrices et servent à moduler l'activité transcriptionnelle de base du promoteur (Strachan and Read 2004).

CTF, facteur de transcription liant de la boîte CCAAT (**CCAAT binding transcription factor**); CBF, facteur liant la boîte CCAAT (**CCAAT box-binding factor**); TFIIB, facteur de transcription B de la polymérase II; BRE<sup>u</sup>, élément de reconnaissance de TFIIB aval (**upstream TFIIB-recognition element**); TFIID, FT D de la polymérase II; Inr, élément initiateur (**I**nitiator **e**lement); MTE, élément du motif dix (**m**otif **t**en **e**lement); DPE, élément amont du promoteur (**d**ownstream **p**romoter **e**lement); SCP1, super core promoter 1.

Schéma adapté de Butler and Kadonaga 2002; Lim, Santoso et al. 2004; Strachan and Read 2004, Juven-Gershon, Cheng et al. 2006.

NB: Le DCE (**D**ownstream **c**ore **e**lement) composé de trois parties couvrant le MTE et le DPE, de +6 à +34, ainsi que le XCP1 n'ont pas été représentés. De la même manière, seul le BRE amont a été indiqué; le BRE aval, liant également TFIIB, a été volontairement omis.

Depuis l'analyse menée par JT. Kadonaga au début des années 2000 portant sur les cœurs de promoteurs de la drosophile, plusieurs autres équipes ont étendu ces analyses afin de déterminer avec le plus de précision possible la fréquence relative de chacun de ces éléments dans les gènes humains. Parmi celles-ci, nous pouvons mentionner une étude, portant sur 1031 promoteurs de gènes humains ayant démontré, que seulement 1/3 de ceux-ci contenait une « boîte TATA » et que quasiment 70% des promoteurs étaient sans « boîte TATA » (Suzuki, Tsunoda et al. 2001).

De la même manière, une seconde étude, plus complète car utilisant les bases de données « EPD » (« Eucaryotic Promoter Database ») et « DBTSS » (« Database of Human Transcriptional Start Sites »), contenant respectivement 1 871 et 8793 séquences de promoteurs, a révélé que moins de 22% des promoteurs humains contenaient cet élément (Gershenzon and Ioshikhes 2005). De plus, parmi ce pourcentage, il est apparu que 62% des promoteurs analysés présentaient un Inr, 24% un DPE et 12% un BRE<sup>u</sup>; parmi les 78% restants, donc sans « boîte TATA », 45% des promoteurs contenaient un Inr, 25% un DPE et enfin, 28% un BRE<sup>u</sup> (Gershenzon and Ioshikhes 2005). L'abondance relative de BRE<sup>d</sup>, semble similaire à celle de BRE<sup>u</sup> et représente environ 25% des cœurs de promoteurs contenus dans la banque de données « EPD » (Deng and Roberts 2005; Gershenzon and Ioshikhes 2005). Il est important de noter que la base de données « EPD » ne contient que des séquences de promoteurs dont les sites d'initiation ont été déterminés expérimentalement (Bucher 1990; Schmid, Praz et al. 2004). Concernant le DCE, l'équipe ayant mis en évidence sa structure, a analysé sa fréquence dans la base de données EPD et il ressort, en plus de ce qui a été mentionné auparavant, qu'1/3 des promoteurs analysés comportent soit le sous-élément S<sub>I</sub>, soit le sous-élément S<sub>II</sub> et seulement 13% contiennent le sous-élément S<sub>III</sub> seul (Lee, Gershenzon et al. 2005).

Plus récemment, une équipe ayant mis en évidence le nouvel élément XCPE1, a de nouveau analysé la fréquence des différents éléments du cœur du promoteur en utilisant toujours la DBTSS mais comportant cette fois-ci plus de 15 000 séquences promotrices

(Tokusumi, Ma et al. 2007). D'après leur analyse, il ressort qu'environ 20% des promoteurs contiennent une « boîte TATA », 19% un DPE, 40% un Inr. De manière très surprenante, ces auteurs n'ont retrouvé le MTE dans une seule séquence promotrice sur les 15 262 étudiées (soit 0,01%). De la même manière, l'élément qu'ils ont caractérisé, XCPE1, n'est présent que dans moins de 1% des séquences totales. Cependant, à l'heure actuelle cette base de données comporte beaucoup plus de séquences de promoteurs, plus de 17 000 (<http://dbtss.hgc.jp/>; (Tokusumi, Ma et al. 2007)), et ce nombre ne cessera d'augmenter jusqu'à atteindre le nombre total de gènes présents dans le génome. Il est donc possible d'imaginer que les fréquences relatives des éléments caractérisés depuis de très nombreuses années, « boîte TATA », Inr et DPE, ne varient quasiment plus. Par contre, les éléments récemment mis à jour, MTE, DCE, XCPE1, ou de nouveaux encore inconnus, pourraient voir leurs proportions augmenter. En effet, ces derniers éléments semblent fonctionner de concert avec d'autres éléments (Lee, Gershenzon et al. 2005; Juven-Gershon, Cheng et al. 2006; Juven-Gershon, Hsu et al. 2006) et du fait de la taille des séquences de liaison de ces éléments (quatre bases pour chacun des sous-éléments du DCE), il n'est pas interdit de penser que le « flottement » de leurs séquences consensus ne fasse augmenter leur nombre de manière très importante. Si ces constatations découlent d'études bio-informatiques, des résultats similaires sont obtenus lors d'analyses expérimentales: plusieurs catégories de gènes codant pour différentes protéines ne comportent pas de « boîte TATA » mais au contraire un ou plusieurs éléments décrits précédemment.

En conclusion générale sur les différents éléments composant le cœur du promoteur, nous pouvons dire que, plus que la présence de tel ou tel élément, il semble que ce soit la combinaison de ceux-ci qui permette la liaison de la machinerie transcriptionnelle et donc l'activation de la transcription. Il semble également que, du fait de l'expression spatio-temporelle des gènes, la structure et la fonctionnalité des promoteurs soient beaucoup plus complexes qu'il n'était imaginé il y a encore peu de temps. Cependant, leur rôle reste toujours le même, permettre la formation du complexe multiprotéique permettant le démarrage de la transcription par la pol II.



### 3.1.3.1.2. Formation du complexe de pré initiation (CPI)

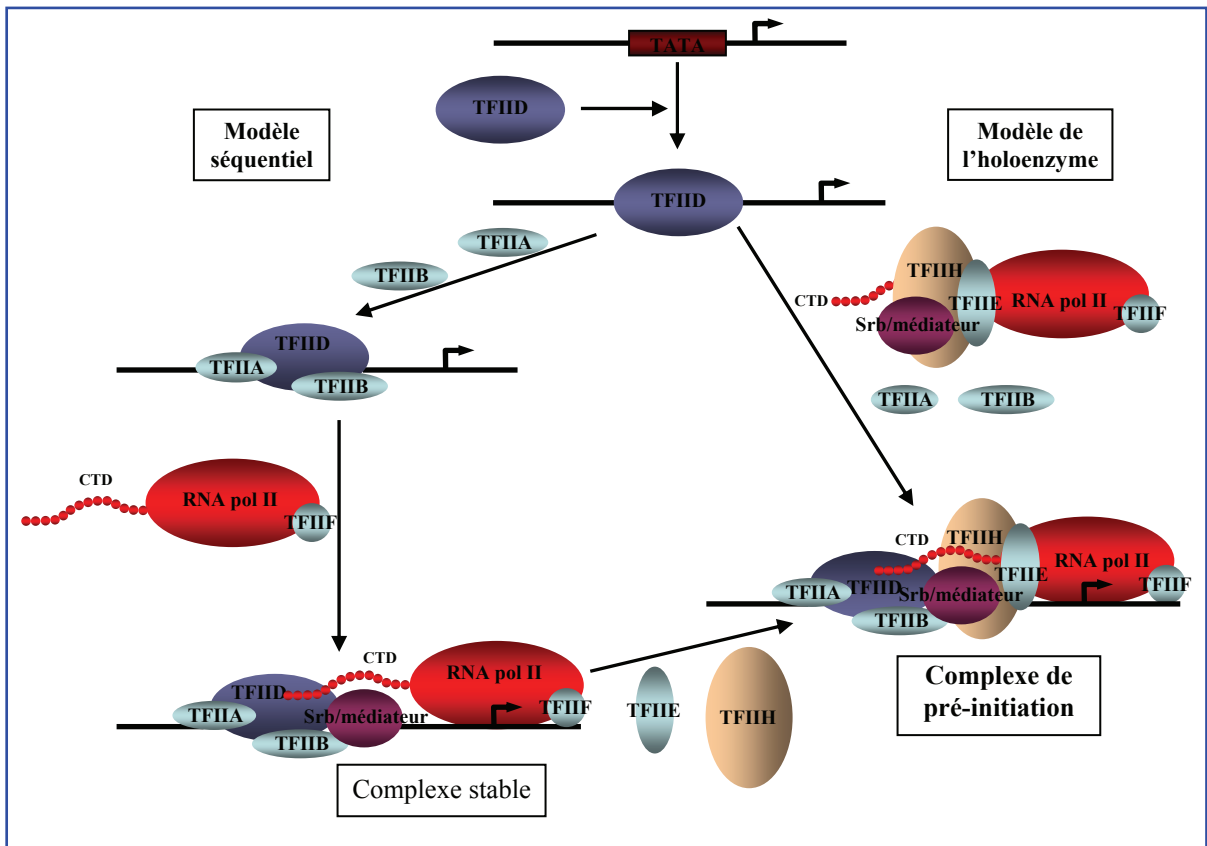
D'un point de vue fonctionnel, comme il a été mentionné succinctement dans les parties précédentes, chacun des éléments peut lier différents facteurs faisant partie de la machinerie transcriptionnelle. Cependant, le but de chacun de ces éléments n'est, ni plus ni moins, que de permettre la liaison de l'enzyme chargée de transcrire le gène, la pol II, au niveau du promoteur. En effet, cette dernière est incapable de lier l'ADN par elle-même et a donc besoin des FGT.

Le plus important d'entre eux, car pouvant lier différents éléments du cœur, à l'exception de BRE<sup>u</sup> et BRE<sup>d</sup> (Lagrange, Kapanidis et al. 1998), est TFIID. Ce facteur, composé de la TBP (Nakajima, Horikoshi et al. 1988) et de 13 TAF (Pugh and Tjian 1991; Tanese, Pugh et al. 1991) (**Tableau 4**, page 99), est le premier FGT à lier le cœur du promoteur, au niveau de la « boîte TATA », et à permettre l'assemblage du complexe d'amorçage de la transcription, le complexe de pré initiation (CPI) ou complexe fermé (Davison, Egly et al. 1983; Fire, Samuels et al. 1984). Cette liaison, au niveau du petit sillon de l'ADN, sur la « boîte TATA », se fait par l'intermédiaire de la TBP sans spécificité d'orientation (Cox, Hayward et al. 1997) et engendre une courbure importante de la molécule d'ADN (Kim, Nikolov et al. 1993). Cette courbure permettra la fixation ultérieure des autres FGT et en particulier de TFIIB (Nikolov, Chen et al. 1995). La formation de ce complexe peut se faire suivant deux modes, le modèle séquentiel (Buratowski, Hahn et al. 1989) et le modèle dit de l'holoenzyme (Parvin and Young 1998).

Si ces deux modes de formation du complexe font appel aux mêmes FGT, ils divergent en revanche dans l'ordre de fixation. En effet, l'assemblage du CPI se fait par étapes successives dans le modèle séquentiel. TFIID reconnaît initialement la « boîte TATA » grâce à sa sous-unité TBP, puis TFIIA et TFIIB rejoignent le complexe en formation et stabilisent la liaison de TFIID sur le promoteur (Fan, Shi et al. 2004). Par la suite, le complexe pol II/TFIIF est recruté par TFIIB pour former le complexe stable. Enfin, TFIIE et TFIIF sont recrutés au niveau de la pol II pour ainsi donner naissance au CPI. Le modèle

d'assemblage de l'holoenzyme a été proposé suite à la purification *in vivo* d'un énorme complexe protéique, contenant la pol II, non lié au promoteur. Cependant, à l'heure actuelle, la composition exacte de ce complexe est sujette à controverse. Il apparaît qu'il soit composé de l'enzyme, des protéines SRB (« suppressors of **R**NA polymerase **B** mutations »), de protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine (HAT; SWI/SNF) et, ou non, des FGT (Kim, Bjorklund et al. 1994; Koleske and Young 1994; Wu and Chiang 1998; Wu, Thomas et al. 1999) (**Figure 32**, page 97). Malgré tout, un consensus semble établi concernant le TFIID. Il apparaît en effet que celui-ci soit absent de ce complexe pré assemblé et qu'il soit, au contraire, déjà localisé sur le promoteur afin de faciliter le recrutement de ce complexe.

Quelque soit le modèle permettant l'assemblage du complexe chargé de la transcription, au préalable divers facteurs de remodelage de la chromatine vont se lier afin de faciliter la fixation de la machinerie basale (Cosma 2002).



**Figure 32. Modèles d'assemblage du complexe de pré initiation (CPI).**

La formation du CPI peut se faire par recrutement par étape des FGT (modèle séquentiel) ou par recrutement d'un complexe contenant la pol II pré assemblé (modèle de l'holoenzyme). Le facteur TFIID est au préalable lié à la boîte TATA dans les deux modèles.

NB: Seule la boîte TATA a été représentée sur ce schéma, mais, en fonction des éléments présents dans le cœur du promoteur, TFIID liera l'Inr ou le DPE de la même manière via d'autres sous-unités de TFIID.

Si les différents FGT permettent la formation du CPI, il n'en reste pas moins qu'ils ont, pour la plupart, des actions bien précises dans le mécanisme transcriptionnel en lui-même (**Tableau 4**, page 99):

- TFIIA joue un rôle très important dans le processus d'activation de la transcription et non dans la transcription basale. De par son interaction avec la TBP, il empêche certains inhibiteurs de se joindre au complexe ADN/TFIID bloquant l'accès aux autres FGT, permettant ainsi la stabilisation du complexe et la poursuite du processus d'assemblage (Buratowski, Hahn et al. 1989; Buratowski 1994; Weideman, Netter et al. 1997);
- TFIIB permet le positionnement adéquat de la pol II au niveau du SIT en jouant le rôle de pont entre TFIID et l'ensemble pol II/TFIIF (Elsby and Roberts 2004);
- TFIIF facilite le recrutement de la pol II par le complexe préalablement formé et serait important pour l'initiation et l'élongation de la transcription en se réassociant, après son départ du promoteur, avec le complexe regroupant les facteurs d'élongation (Bengal, Flores et al. 1991; Izban and Luse 1992; Tan, Aso et al. 1994; Zawel, Kumar et al. 1995);
- TFIIIE régule l'initiation de la transcription ainsi que l'activité enzymatique de TFIIH (Bushnell, Bamdad et al. 1996);
- Enfin, TFIIH présente diverses actions: il permet l'ouverture des brins d'ADN, et donc la formation de la « bulle de transcription », grâce à son activité hélicase (Douziech, Coin et al. 2000) et il participe à la phosphorylation du CTD de la pol II (Lu, Zawel et al. 1992; Watanabe, Fujimoto et al. 2000).

**Tableau 4. Composition et propriétés des facteurs généraux de transcription.** D'après Woychik et Hampsey 2002; Thomas et Chiang 2006.

Facteur général de transcription	Sous-unités	Propriétés
<b>TFIIA</b>	37 kDa ( $\alpha$ )	- Dissocie les dimères de TBP - Requisite pour l'activation de la transcription
	19 kDa ( $\beta$ )	- Requisite pour l'activation de la transcription (coactivateur) - Stabilisent le complexe TBP-boîte TATA
	13 kDa ( $\gamma$ )	
<b>TFIIB</b>	35 kDa	- Lie les BRE <sup>u</sup> et BRE <sup>d</sup> - Stabilise le complexe TBP-boîte TATA - Recrutement et positionnement du complexe polIII/TFIIF
<b>TFIID</b>	TBP 38 kDa	Lie la TATA Box, l'Inr et le DPE (MTE?)
	TAF1 250 kDa	Lie l'Inr et le DCE, activité histone acétyl transférase, histone ubiquitine ligase et kinase
	TAF2 150 kDa	Lie l'Inr en coopération avec TAF1
	TAF3 140 kDa	
	TAF4 130/135 kDa	Similarité de séquence avec l'histone H2A
	TAF5 100 kDa	Similarité de séquence avec l'histone H4
	TAF6 80 kDa	Lie le DPE avec TAF9, similarités de séquence avec l'histone H4
	TAF7 55 kDa	Inhibe l'activité histone acétyl transférase de TAF1
	TAF9 31 kDa	Lie le DPE avec TAF6, similarité de séquence avec l'histone H3
	TAF10 30 kDa	
	TAF11 28 kDa	Histone-fold
	TAF12 20 kDa	Similarité de séquence avec l'histone H2B
	TAF13 18 kDa	Histone-fold
<b>TFIIE</b>	56 kDa ( $\alpha$ )	Recrutement de TFIIF avec TFIIE $\beta$ et induit l'élongation
	34 kDa ( $\beta$ )	Lie l'ADN
<b>TFIIF</b>	58 kDa (RAP74)	- Recrutent l'ARN polymérase II - Stimulent l'élongation
	26 kDa (RAP30)	- Activité kinase
<b>TFIIH</b>	XPB 89 kDa	- Activité ATPase pour l'initiation de la transcription et le dégagement du promoteur - Ouverture de la double hélice (activité hélicase des sous-unités du core: XPB, XPD, p62, p52, p44 et p34) - Réparation de l'ADN (activité hélicase des sous-unités du core) - Phosphorylation de la CTD de la polymérase II par cdk7 - Activité ubiquitine ligase E3
	XPD 80 kDa	
	p62 62 kDa	
	p52 54 kDa	
	p44 44 kDa	
	p34 34 kDa	
	cdk7 40 kDa	
	Cycline H 38 kDa	
MAT1 32 kDa		

De manière surprenante, une étude récente a démontré que, malgré l'importance des FGT dans l'activation de la transcription, ceux-ci ne seraient pas les seuls facteurs impliqués dans ce processus. En effet, Lewis et al. ont démontré que dans les promoteurs contenant le DPE, les FGT étaient incapables d'initier la transcription *in vivo* (Lewis, Sims et al. 2005). Pour ce faire, ceux-ci nécessitent la présence de co-facteurs, d'une part, la protéine kinase CK2 (« casein-kinase-2 ») dont l'association avec la TBP et son effet activateur ont été démontrés (Ghavidel, Hockman et al. 1999; Ghavidel and Schultz 2001; Pinna 2002) et d'autre part, par le controversé co-activateur PC4 (**p**ositive **c**o-**f**actor **4**) (Ge and Roeder 1994; Ge, Zhao et al. 1994; Kretzschmar, Kaiser et al. 1994; Luo, Ge et al. 1998), au niveau du promoteur. Ceci semble donc confirmer l'existence, pour le moment non démontrée, de différents activateurs et de mécanismes d'initiation beaucoup plus complexes qu'il n'avait été originellement pensé. Ces mécanismes, ainsi que l'existence de nombreux éléments du cœur de promoteur, pourraient également constituer un nouveau niveau de régulation de l'expression des gènes en fonction des tissus et/ou du stade de développement.

Parmi les éléments indispensables à l'initiation de la transcription, la présence d'un dernier complexe protéique a été mise en évidence, le complexe médiateur (Lewis and Reinberg 2003). Ce dernier, composé d'un module de tête, d'une partie médiane et d'un module de queue (Conaway, Sato et al. 2005), et contenant, entre autre des protéines SRB (nouvellement nommées MED (Bourbon, Aguilera et al. 2004)) et une ou plusieurs kinases, est relativement conservé entre les espèces (Boube, Joulia et al. 2002). Son rôle serait, en interagissant avec le domaine CTD de la pol II, de servir de pont entre les FGT et les protéines régulatrices (Riedl and Egly 2000; Kim and Lis 2005). Chez l'humain, il n'existerait pas une, mais au minimum deux formes de ce médiateur, le médiateur-P5 et le médiateur-P85, jouant chacun un rôle particulier. Si le médiateur-P85, plus petit que le médiateur-P5, respectivement 11 et 14 sous-unités, augmente la transcription basale, ce dernier semble plus impliqué dans l'activation du processus en réponse aux éléments activateurs (Wu, Zhou et al. 2003).

Une fois l'ensemble des facteurs composant le CPI localisé au niveau du promoteur, la transcription peut débuter. L'initiation de celle-ci aura lieu lorsqu'un facteur de la machinerie, TFIIF, via sa sous-unité cdk7, phosphorylera le domaine C-terminal du CTD de la pol II. Celle-ci sera donc sous une forme hypophosphorylée, ou pol IIA, correspondant aux stades de l'activation et de l'initiation de la transcription (Lu, Flores et al. 1991), par opposition à la forme sous laquelle se trouve la pol II pendant l'élongation, forme hyperphosphorylée ou pol IIO (Payne, Laybourn et al. 1989; O'Brien, Hardin et al. 1994). Chaque heptamère du CTD, 52 répétitions chez l'homme, comporte deux résidus sérine, en position 2 et 5, qui sont le siège de phosphorylations aboutissant, soit à la formation de la pol IIO, soit de la pol IIA, respectivement (Komarnitsky, Cho et al. 2000). De cette action s'ensuivra, grâce à la libération de l'énergie engendrée, une séparation des deux brins de la molécule d'ADN entre les positions -9 et +2 de part et d'autre du SIT (Douziech, Coin et al. 2000). L'un des deux brins, celui devant être transcrit, ou brin matrice, se positionnera alors au niveau de la fissure du site actif de la pol II et formera ainsi le complexe ouvert, ou « bulle de transcription » (Wang, Carey et al. 1992). À partir de ce moment, la transcription en elle-même peut débuter.

### **3.1.3.2. Mécanisme général de la transcription: formation des pré-ARNm**

Le mécanisme général de la transcription, visant à former le messager chargé de véhiculer l'information contenue dans l'ADN, se décompose en quatre phases, dont les deux premières sont étroitement liées, l'initiation, le dégagement du promoteur (« promoter clearance »), l'élongation et la terminaison (pour revue voir (Shilatifard, Conaway et al. 2003; Shilatifard 2004; Sims, Belotserkovskaya et al. 2004)).

La phase d'initiation consiste en la création de la première liaison phosphodiester de l'ARNm par la pol II. Cependant, celle-ci va effectuer une transcription, dite avortée, qui consiste en la création de plusieurs « messagers » de courtes tailles, entre 2 et 11

nucléotides (Luse and Jacob 1987; Holstege, Fiedler et al. 1997), qui sont ensuite relâchés. Cette séquence de transcription avortée voit également la pol II reculer sur l'ADN, se repositionner sur le SIT et entreprendre un nouveau cycle jusqu'à ce qu'elle atteigne la position +10 (Holstege, Fiedler et al. 1997). Ensuite, la transcription en tant que telle démarre et la pol II va ajouter progressivement les nucléotides au messager. Pendant cette phase de transcription, la pol II effectue une série de pauses, trois, d'environ 30 secondes, à différents endroits du promoteur (Pal and Luse 2002), ce qui, d'une part, permet un recrutement de divers facteurs impliqués dans la maturation du messager, addition de la coiffe entre autres, par le CTD (Hirose and Manley 2000; Proudfoot 2000; Orphanides and Reinberg 2002; Proudfoot, Furger et al. 2002), et d'autre part, traduit un changement conformationnel de la pol II lui permettant d'entrer en phase d'élongation (Pal and Luse 2002). Après l'ajout d'environ 30 de ces nucléotides, la pol II cesse ses contacts avec le promoteur, se détache du reste de la machinerie: c'est la phase de détachement du promoteur (« promoter clearance ») (Zawel, Kumar et al. 1995; Yudkovsky, Ranish et al. 2000). Certains FGT restent liés au promoteur et permettent une ré-initiation plus rapide que l'initiation « primaire ». La pol II acquiert à ce moment précis sa forme hyperphosphorylée, pol IIO, et une transition entre la phase d'initiation et d'élongation s'opère (Payne, Laybourn et al. 1989; O'Brien, Hardin et al. 1994).

L'élongation consiste en l'addition de l'ensemble des nucléotides complémentaires de la molécule d'ADN au niveau de la molécule d'ARN suivant la règle d'appariement de Watson et Crick. Cependant cette phase est beaucoup plus complexe qu'un simple ajout de nucléotides les uns à la suite des autres (pour revue, (Sims, Belotserkovskaya et al. 2004)). En effet, le complexe d'élongation ternaire (Sachs, Fawcett et al.), formé de la pol II, du brin matrice d'ADN et du messager naissant, peut, de manière similaire à ce qui est observé lors de la phase d'initiation, entrer en pause ou être totalement arrêté (Shilatifard, Conaway et al. 2003; Sims, Belotserkovskaya et al. 2004). Ces états résulteraient une nouvelle fois de mouvements arrières du complexe sur la matrice (Komissarova and Kashlev 1997; Palangat and Landick 2001). Différentes protéines, les facteurs d'élongation, sont recrutées au



niveau du CTD de la pol II et permettent, au CET d'entrer dans l'un ou l'autre de ces états alors que d'autres, au contraire, lui permettent de les quitter et donc de reprendre la phase d'élongation. Parmi l'ensemble des protéines permettant une reprise et donc une stimulation de l'élongation, nous pouvons distinguer:

- Les membres de la famille SII (dont le membre principal est TFIIS) exprimés ubiquitairement, ou de manière spécifique, en fonction des tissus et/ou du stade de développement (Sekimizu, Kobayashi et al. 1976; Kanai, Kuzuhara et al. 1991; Xu, Nakanishi et al. 1994; Taira, Kubo et al. 1998). Ils agissent en prévenant l'arrêt prématuré du CET lors de l'élongation (Reines, Chamberlin et al. 1989) ou en permettant un nouveau départ du complexe suite à un arrêt engendré par une entrée en pause du CET (Wind and Reines 2000; Kulish and Struhl 2001). Il semble cependant que TFIIS augmente l'efficacité de l'élongation plutôt que d'augmenter tout simplement le taux de synthèse en diminuant le temps de pause du complexe (Reinberg and Roeder 1987; Bengal, Flores et al. 1991);
- la famille des élongines qui permet au CET de quitter la phase de pause en augmentant la synthèse de pré-ARN (Bradsher, Jackson et al. 1993; Bradsher, Tan et al. 1993; Aso, Yamazaki et al. 2000; Yamazaki, Guo et al. 2002);
- la famille des ELL, « eleven-nineteen lysine-rich leukemia », dont la fonction est analogue à la famille des élongines (Shilatifard, Lane et al. 1996; Shilatifard, Duan et al. 1997; Miller, Williams et al. 2000);
- TFIIF qui, en plus de son rôle dans l'initiation, peut, d'une part, diminuer le temps de pause du complexe et donc stimuler le taux de transcription (Bengal, Flores et al. 1991; Izban and Luse 1992; Tan, Aso et al. 1994; Zawel, Kumar et al. 1995) et, d'autre part, prévenir les arrêts prématurés du complexe lors du début de la phase d'élongation (Yan, Moreland et al. 1999);

- P-TEFb, « **p**ositive **t**ranscription **e**longation **f**actor **b** » (Marshall and Price 1992; Marshall, Peng et al. 1996), permettant au CET de quitter l'état de pause engendré par un autre facteur d'élongation, NELF, « **n**egative **e**longation **f**actor », grâce à son activité kinase (Price 2000). Ce facteur a la capacité de phosphoryler le CTD de la pol II lorsque celle-ci est dans la phase de dégagement du promoteur (Marshall, Peng et al. 1996);
- FCP1, « transcription factor IIF (TFIIF)-associated **c**arboxyl-terminal domain (CTD) **p**hosphatase **1** », qui est une phosphatase ciblant le CTD de la pol II (Chambers and Dahmus 1994) permettant ainsi la reprise de l'élongation (Mandal, Cho et al. 2002);
- TREX, « **t**ranscription/**e**xport » (Strasser, Masuda et al. 2002), jouant un rôle dans l'efficacité de l'élongation et dans le processus d'export du messenger mature dans le cytoplasme grâce à ses différentes sous unités (Rondon, A. G., S. Jimeno, et al. 2003).

À l'opposé, d'autres facteurs stoppent le CET et la phase d'élongation entre en pause. C'est le cas par exemple de NELF, (Yamaguchi, Takagi et al. 1999), et DSIF, « **D**RB-sensitivity-inducing **f**actor » (Wada, Takagi et al. 1998) qui inhibent la phase d'élongation. Il semble cependant que ces deux facteurs ne peuvent exercer leur action inhibitrice qu'ensemble (Yamaguchi, Takagi et al. 1999; Yamaguchi, Inukai et al. 2002). D'un point de vue fonctionnel, le rôle de ces facteurs est de permettre, via l'arrêt de l'élongation, le recrutement de facteurs de maturation des ARNm par le CTD de la pol II (Mandal, Chu et al. 2004) ainsi que par une des sous-unités de DSIF, l'homologue humain de la protéine Spt5 (« **s**uppressor of **Ty 5** ») de *Saccharomyces cerevisiae* (Lindstrom and Hartzog 2001; Pei and Shuman 2002; Lindstrom, Squazzo et al. 2003). Si l'état de pause est un processus « auto-réversible » par le CET, mais modulé par les protéines accessoires mentionnées ci dessus, la phase d'arrêt est irréversible à moins de l'intervention de TFIS qui est nécessaire

au clivage du transcrit naissant permettant ainsi au CET de redémarrer (Izban and Luse 1992; Reines 1992).

Si l'ensemble des facteurs cités ci-dessus influence directement la machinerie transcriptionnelle durant la phase d'élongation, d'autres protéines, vont également moduler cette phase mais cette fois-ci de manière indirecte. Ces différentes protéines présentent toutes la particularité d'agir au niveau de la structure chromatinienne. En effet, la présence des nucléosomes représente un frein à la progression du CET et favorise l'entrée en pause de ce dernier (Izban and Luse 1991; Izban and Luse 1992). Par conséquent, d'autres facteurs d'élongation sont nécessaires afin de permettre la poursuite de la phase d'élongation dans le contexte chromatinien. Parmi ceux-ci, nous pouvons noter les facteurs qui remodelent la chromatine de manière dépendante de l'ATP (SWI/SNF (Brown, Imbalzano et al. 1996; Sullivan, Weirich et al. 2001), Chd1 (« chromo-ATPase/helicase-DNA-binding domain ») (Tran, Steger et al. 2000), Iswi (« imitation switch ») (Morillon, Karabetsou et al. 2003)), ceux déstabilisant la structure même du cœur du nucléosome en déplaçant un dimère H2A/H2B (FACT (« facilitates chromatin transcription ») (Orphanides, LeRoy et al. 1998; Orphanides, Wu et al. 1999; Belotserkovskaya, Oh et al. 2003), Spt6 (Hartzog, Wada et al. 1998; Endoh, Zhu et al. 2004)) et enfin ceux agissant directement sur les histones du cœur du nucléosome telles que les acétyltransférases (Elongator (Otero, Fellows et al. 1999; Wittschleben, Otero et al. 1999; Kim, Lane et al. 2002)) et les méthyltransférases (Set 1 (Ng, Robert et al. 2003), Set 2 (Krogan, Kim et al. 2003) et le complexe PafI (Squazzo, Costa et al. 2002; Krogan, Dover et al. 2003)).

La phase de terminaison se compose de deux étapes intimement liées, la première, correspondant au clivage du messenger ainsi qu'à sa polyadénylation (voir « maturation des pré-ARNm chez les eucaryotes », ci-dessous), et la seconde étant matérialisée par le recyclage de la pol II (pour revue, voir (Sims, Belotserkovskaya et al. 2004; Rosonina, Kaneko et al. 2006)). Cependant, à l'heure actuelle, il ne semble pas y avoir de consensus quant à l'étroite relation entre ces deux phases. En effet, il apparaît que l'ensemble clivage du messenger/polyadénylation soit indispensable, modèle « torpedo » (Connelly and Manley

1988), ou non, modèle allostérique (Logan, Falck-Pedersen et al. 1987), à la phase de terminaison. La phase de terminaison en elle-même peut avoir lieu plusieurs kb en aval du site de clivage, référencé habituellement comme le site de polyadénylation (Zhao, Hyman et al. 1999) et nécessite une entrée en pause du CET (Enriquez-Harris, Levitt et al. 1991; Yonaha and Proudfoot 1999). Cette pause permet à différents facteurs, Pcf11 (Zhang, Fu et al. 2005), TTF2 (« transcription termination factor 2 ») (Jiang, Liu et al. 2004), entre autres, de déstructurer la CET et d'aboutir au relâchement de la pol II. Par la suite, des phosphatases, parmi lesquelles Ssu72 (Krishnamurthy, He et al. 2004), vont alors entraîner un recyclage de la pol II en déphosphorylant les résidus Sérine 2 et 5 du CTD de la pol II. Ceci va permettre à la pol II de retrouver sa forme non phosphorylée en vue d'initier un nouveau cycle de transcription (Reinberg, Orphanides et al. 1998).

Comme nous venons de le voir, la phase d'élongation du transcrit est un processus très complexe et fait intervenir une grande variété de facteurs à chacune de ses étapes. Par conséquent, il apparaît évident que l'élongation, au même titre que la formation du CPI, constitue un niveau de régulation de l'expression d'un gène. Cependant, le messager ainsi formé, pré-ARNm ou transcrit primaire, n'est pas encore prêt à être exporté et traduit. Pour ce faire, il va subir différentes modifications lors de la phase de maturation.

### **3.1.3.3. La maturation des pré-ARNm chez les eucaryotes**

La maturation d'un pré-ARNm est une étape nécessaire à la bonne fonctionnalité dudit messager. En effet, lors de la transcription, le CET transcrit l'ensemble de la séquence d'ADN, soit les séquences codantes et les séquences non-codantes. De plus, un messager « nu », sans modification de ses extrémité 5' et 3', serait à la fois, instable et sujet à dégradation par diverses nucléases, incapable de gagner le cytoplasme et impossible à traduire (Furuichi, LaFiandra et al. 1977; Bernstein and Ross 1989; Sachs and Deardorff 1992; Muhlrads, Decker et al. 1994; Beelman, Stevens et al. 1996; LaGrandeur and Parker 1996). Afin de permettre, d'une part l'élimination des séquences non-codantes, d'assurer

son export dans le cytoplasme, et d'autre part de le stabiliser, ce pré-ARNm va subir diverses modifications: addition d'une coiffe, élimination des introns et ajout d'une queue poly(A) (pour revue voir (Shatkin and Manley 2000; Zorio and Bentley 2004)).

La première étape de la maturation est l'ajout d'une coiffe méthylée à l'extrémité 5' du messenger naissant (Varani 1997): dès que celui-ci quitte le canal de sortie de la pol II, correspondant à une taille d'environ 20 nucléotides (Coppola, Field et al. 1983), un complexe enzymatique, composé de l'enzyme « capping » (« capping enzyme », CE) recrutée par la forme pol IIO et catalysant les deux premières étapes du processus, et d'une méthyltransférase, va « coiffer » (« capping ») ce messenger (Shatkin and Manley 2000). La coiffe va ensuite être reconnue, dans le noyau, par un complexe, le CBC (« cap-binding complex ») ainsi que par la sous-unité 4E du facteur d'initiation de la traduction eucaryotique eIF4F (« eukaryotic initiation factor **4F** ») jouant un rôle primordial dans l'étape ultérieure de traduction (Gingras, Raught et al. 1999). Cette coiffe joue plusieurs rôles: elle protège le messenger contre les attaques des nucléases, en jouant le rôle d'obstacle à leur action (Beelman and Parker 1995), elle permet de lier différentes protéines impliquées dans les phases ultérieures de maturation via le CBC (Izaurrealde, Lewis et al. 1994; Lewis, Izaurrealde et al. 1996), et elle permet un positionnement adéquat des ribosomes lors de la traduction cytoplasmique (Lewis, Gunderson et al. 1995; Gingras, Raught et al. 1999). De plus elle semble jouer un rôle primordial dans la transition entre la phase d'initiation de la transcription et la phase d'élongation (Shatkin and Manley 2000).

La maturation du transcrit se poursuit avec l'élimination de toutes les séquences introniques contenues dans le messenger (pour revue voir (Jurica and Moore 2003)). Dans ce dernier, les introns forment des boucles auxquelles sont associés les petits ARN nucléaires U1, U2, U4, U5 et U6, ou snRNA, formant le spliceosome (Jurica and Moore 2003). Ce spliceosome est directement responsable de l'élimination des introns et de la jonction des exons mitoyens de chacun de ces introns. Ce processus d'épissage, bien que n'étant pas directement dépendant de la coiffe, semble être beaucoup plus efficace lorsque cette

dernière est présente (Furuichi and Shatkin 2000; Shatkin and Manley 2000; Shuman 2001). En effet, celle-ci permet la liaison du CBC qui est lui-même responsable de l'alignement approprié à l'extrémité 5' du site d'épissage du premier exon, du snRNA U1 (Izaurrealde, Lewis et al. 1994; Lewis, Izaurrealde et al. 1996).

Le troisième type de modification qu'un messenger subisse consiste en un largage du messenger et en l'addition d'une queue de poly (A) à l'extrémité 3' de celui-ci (Wahle and Kuhn 1997) (pour revue voir (Zhao, Hyman et al. 1999; Buratowski 2005)). Ces événements sont dus à la présence, dans la quasi-totalité des gènes codant les protéines, de différentes séquences composant le cœur du signal de polyadénylation. Parmi celles-ci, les principales sont l'hexanucléotide AAUAAA, correspondant au signal de polyadénylation et se situant à 10-30 nucléotides en amont du site de clivage et l'élément de séquence aval riche en GU, « **downstream sequence element** » ou DSE, (Zhao, Hyman et al. 1999; Proudfoot 2004). Différentes protéines ont la faculté de reconnaître ces séquences et, en se liant à elles, d'entraîner le clivage et la polyadénylation du messenger. Parmi celles-ci, nous pouvons noter le facteur de clivage et de polyadénylation CPSF (« **cleavage/polyadelylation specificity factor** »), le facteur stimulateur de clivage CstF (« **cleavage stimulatory factor** »), les facteurs de clivage Im et IIm (« **cleavage factors Im et IIm** » ou CFIm et CFIIIm), la **poly(A) polymérase (PAP)**, ainsi que la protéine liant la queue poly(A), PABPII (« **poly(A)-binding protein II** ») (Rosonina, Kaneko et al. 2006). Si CstF, reconnaissant le DES, CPSF, liant le signal de polyadénylation, la PAP, chargée de catalyser l'addition d'adénosine, entre 150 à 200, au niveau de la queue poly(A) (Proudfoot, Furger et al. 2002), ainsi que les CFIm et IIm sont impliqués dans la phase de clivage, CPSF et la PAP sont également impliqués dans la phase de polyadénylation, au même titre que la PABPII (Zhao, Hyman et al. 1999). La liaison de CPSF, bien que n'étant pas directement lié au CstF, est stabilisée par une interaction avec celui-ci (Barabino, Hubner et al. 1997).

Il a longtemps été cru que ces différentes actions étaient séparées dans le temps et dans l'espace nucléaire, mais il semble acquis aujourd'hui que ces événements ont lieu de manière simultanée à la phase d'élongation de la transcription, pour l'épissage et l'ajout de la coiffe, ainsi qu'à la phase de terminaison pour l'addition de la queue poly(A) (Proudfoot, Furger et al. 2002). De plus, le CTD de la pol II joue une nouvelle fois un rôle primordial dans ce processus de maturation (Proudfoot 2004). En effet, celui-ci permet de recruter, lors des entrées en pause du CET au moment des phases d'initiation et d'élongation, les différentes protéines chargées de cette maturation (McCracken, Fong et al. 1997; Kwek, Murphy et al. 2002).

#### **3.1.3.4. L'export et la traduction des messagers matures**

Après avoir été « mûré », un pré-ARNm devient un ARN messager fonctionnel, à savoir qu'il pourra être traduit en une protéine. Cependant, cette étape de production de la protéine se déroulant dans le cytoplasme, cet ARNm doit donc gagner ce dernier (pour revue voir (Reed and Hurt 2002; Cole and Scarcelli 2006; Stewart 2007)). Le transport d'un ARNm à travers la membrane nucléaire a lieu via les mêmes complexes de pores nucléaires (NPC, pour « **nuclear pore complexes** ») (Pemberton, Blobel et al. 1998; Tran and Wente 2006), composés de nucléoporines, que ceux utilisés pour l'acheminement des protéines au, et du, noyau. De la même manière que lors des étapes de transcription et de maturation, le messenger seul ne peut gagner l'espace cytoplasmique (Vasudevan and Peltz 2003). Pour ce faire, il a besoin d'être pris en charge par des protéines ou, plus généralement, par des complexes protéiques se composant de « récepteurs de transport », ou karyophérines, comportant des importines/exportines/transportines (Pemberton and Paschal 2005), formant, à ce moment précis, une particule ribonucléoprotéine messenger (mRNP pour « **messenger ribonucleoprotein particles** ») (Jensen, Dower et al. 2003). Ces complexes, nécessaires à l'export du messenger, sont recrutés par le CET au moment même de la phase de transcription et, plus particulièrement, au moment de la phase de maturation du messenger (Hammell, Gross et al. 2002; Zenklusen, Vinciguerra et al. 2002; Vasudevan and

Peltz 2003). Le plus important complexe actuellement connu, car jouant également un rôle dans la phase d'élongation, est le complexe TREX (Strasser, Masuda et al. 2002). Celui-ci se compose, entre autres, de deux facteurs couplant des fonctions d'export et de transcription, Aly et UAP56 (homologues de Yra1 et de Sub2 chez la levure, respectivement) ainsi que d'un sous-complexe impliqué dans la transcription, THO (Chavez and Aguilera 1997; Chavez, Beilharz et al. 2000; Libri, Dower et al. 2002). Ce complexe présente la particularité de pouvoir lier, via la sous-unité Yra1, et donc Aly chez les mammifères, le facteur d'export le plus étudié et le plus répandu, Mex67p (Strasser and Hurt 2001). L'ensemble des études portant sur le transport du messager ont porté sur le mécanisme impliqué chez la levure, mais il apparaît que celui-ci soit transposable aux eucaryotes supérieurs (Cole and Scarcelli 2006). Si les protéines responsables de ce processus ne sont, pour l'heure, pas toutes identifiées, il semble cependant de plus en plus évident que la transition entre la phase de maturation du messager et son repliement adéquat, grâce aux karyophérines, représente un point de contrôle du messager devant, ou ne devant pas être transporté et donc traduit (Saguez, Olesen et al. 2005; Cole and Scarcelli 2006). En effet, l'ensemble des protéines impliquées dans les phases de maturation du messager ainsi que celles aboutissant à la formation de la mRNP (Jensen, Dower et al. 2003) formeraient, avec l'exosome nucléaire (Butler 2002), un système de surveillance du messager. L'exosome nucléaire entraînerait, en cas de défauts dans une quelconque étape de la formation du messager, sa dégradation suite à son accumulation dans le nucléoplasme (Bousquet-Antonelli, Presutti et al. 2000; Butler 2002).

Suite à son arrivée dans le cytoplasme, le messager est pris en charge par les ribosomes localisés à la surface du RE: la grande sous-unité va reconnaître la coiffe via eIF4 ce qui entraînera la liaison de la petite sous-unité. Par la suite, les différents aa portés par les ARN de transfert vont être additionnés les uns aux autres dans la chaîne polypeptidique suivant la règle d'appariement de type Watson et Crick grâce au système codon (représenté par un triplet de nucléotide du messager débutant à l'ATG) /anticodon (triplet complémentaire porté par l'ARNt). Au fur et à mesure de la traduction, le polypeptide s'engouffre dans la



lumière du RE ou il va subir diverses modifications (formation de ponts disulfure, addition de lipides, de sucres, élagage de certains de ces sucres, acquisition de la structure 3D de la protéine). Par la suite, il va prendre le chemin de l'appareil de Golgi où, là encore, il sera modifié. Cependant, cet organite joue plutôt un rôle de « centre de triage » de la protéine en fonction de sa destination, insertion membranaire, sécrétion, retour dans le noyau, etc.

## **3.2. La régulation de l'expression des gènes**

Si le mécanisme général de l'expression des gènes eucaryotes permet de comprendre la production de protéines douées d'activités physiologiques, il ne peut à lui seul expliquer l'expression spatio-temporelle de telle ou telle protéine. Ce rôle incombe au processus global de régulation intervenant à différentes étapes de la production d'une protéine à partir d'un gène.

### **3.2.1. Importance que l'expression des gènes soit régulée**

Chaque organe du corps humain est constitué de populations cellulaires distinctes remplissant chacune des fonctions précises: le foie se compose d'hépatocytes, le cerveau de neurones, le cœur de cellules cardiaques, le rein de cellules rénales, etc. Or, chaque cellule de l'organisme renferme le même ADN et donc la totalité de l'information génétique. Il faut donc qu'une cellule spécialisée, ou différenciée, dans le rein par exemple, n'exprime que certains des gènes contenus dans son noyau et, qu'au contraire, en réprime d'autres. De la même manière, chaque gène ne s'exprime pas tout au long de la vie de l'organisme, certains ne sont exprimés que lors du développement du fœtus, ou à d'autres stades du développement, alors que d'autres le sont de manière constitutive. Le processus par lequel ces gènes sont exprimés ou non consiste en une régulation et un contrôle minutieux de chacune des étapes conduisant de la molécule d'ADN aux protéines par la cellule.

### **3.2.2. Les différents niveaux de régulation dont la cellule dispose**

Nous avons vu lors de l'étude détaillée de l'expression des gènes chez les eucaryotes, que chacune des étapes de la transcription menant à la formation d'une protéine faisait appel à bon nombre de protéines permettant, non seulement, le bon déroulement du processus mais également représentant différents points de contrôle. Cependant, la cellule peut à toute étape de la production de la protéine réguler celle-ci:

- ✓ Au niveau même de la structure de la chromatine;
- ✓ Au moment de la transcription, et en particulier lors de l'initiation;
- ✓ Lors de la maturation du transcrit: des facteurs impliqués dans le repliement, la maturation du messager en mRNP et la destinée de celle-ci interagissent avec le messager en formation au moment de la transcription. Des défauts dans l'une ou l'autre de ces étapes entraînent la rétention du messager et sa destruction (Jensen, Dower et al. 2003; Vasudevan and Peltz 2003);
- ✓ En régulant la stabilité du messager: il existerait des exonucléases cytoplasmiques, et surtout nucléaires (exosome), jouant le rôle de système de surveillance du messager, le dégradant suite à des défauts de maturation ou de la voie d'export (Bousquet-Antonelli, Presutti et al. 2000; Butler 2002);
- ✓ Au moment de la traduction et en particulier de son initiation;
- ✓ En effectuant les modifications post-traductionnelles des protéines (glycosylation, acétylation, phosphorylation, formation de ponts disulfures);
- ✓ En orientant les protéines en fonction de leurs destinations finales;
- ✓ En régulant la stabilité de la protéine biologiquement active.

Chacune de ces étapes est essentielle à la production de toute protéine. Cependant, ayant déjà traité le point de contrôle principal représenté par l'initiation de la transcription, nous nous attacherons dans cette partie à traiter le processus complexe permettant l'activation de celle-ci, à savoir, le rôle primordial joué par la structure de la chromatine ainsi que les régions régulatrices.

### **3.2.2.1. Au niveau de la structure chromatinienne**

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la structure de la molécule d'ADN présente différents niveaux de compactage, chacun représentant un état actif ou inactif de l'expression des gènes. Diverses protéines vont, suivant deux modes d'action distincts, permettre une entrée de la chromatine dans une forme active en déstructurant cette dernière: ceci vise à rendre accessibles les zones régulatrices et promotrices aux protéines activatrices ainsi qu'aux FGT (pour revue voir (Li, Carey et al. 2007; Henikoff 2008)).

La première catégorie de protéines regroupe des enzymes permettant la modification des extrémités N-terminales des histones composant le cœur du nucléosome affectant de manière directe la structure de la chromatine. En effet, ces histones peuvent être acétylées, méthylées, phosphorylées ou ubiquitinées (Strahl and Allis 2000; Goll and Bestor 2002). Si l'acétylation, modification la plus étudiée, est directement liée à des zones transcriptionnellement actives de la chromatine (Noma, Allis et al. 2001), les rôles respectifs des trois autres types de modifications sont, pour l'heure, mal compris bien que paraissant également liés à une activation transcriptionnelle. Il a été suggéré que la combinaison de chacune de ces modifications post-traductionnelles des histones, plus que chacune prise individuellement, participait à l'entrée, dans une forme active ou répressive, de la chromatine. Ceci a abouti à la création du dogme du « code des histones » (Turner 2000; Jenuwein and Allis 2001; Turner 2002). Celui-ci stipule que les modifications des extrémités N-terminales des histones influent, soit directement, en modifiant les interactions histone/histone ou histone/ADN, soit indirectement, en permettant le

recrutement de protéines reconnaissant les marques chimiques des extrémités des histones, sur la structure de la chromatine (Strahl and Allis 2000).

Le second type de protéines, faisant partie de complexes multiprotéiques ou complexes de remodelage, permet de modifier la disposition des nucléosomes sur la molécule d'ADN ou de remodeler, via des changements d'interactions histone-ADN, le nucléosome sans en altérer sa structure (Narlikar, Fan et al. 2002). Pour ce faire, les complexes de remodelage utilisent l'hydrolyse de l'ATP pour libérer l'énergie nécessaire au déplacement du nucléosome (par exemple, SWI/SNF) (Imbalzano, Kwon et al. 1994; Kwon, Imbalzano et al. 1994). Ce dernier acquiert une plus grande fluidité dans sa position et sa conformation (Kingston and Narlikar 1999) ce qui engendre une oscillation entre la forme d'origine et une forme nucléosomique dite « altérée » entraînant une plus grande accessibilité de l'ADN aux protéines, entre autres aux FGT (Schnitzler, Sif et al. 1998).

Jusqu'à récemment, il a été pensé que les différentes modifications connues, et touchant les histones (phosphorylation, méthylation, acétylation), ne concernaient que les extrémités N-terminales des histones en surface du nucléosome. Or, différentes études ont mis en évidence la présence de ces mêmes modifications à d'autres endroits sur le nucléosome: aux surfaces latérales de ceux-ci au niveau même de zones de contacts étroits entre l'ADN et le nucléosome (Zhang, Tang et al. 2002; Cocklin and Wang 2003; Zhang, Eugeni et al. 2003). Par la suite, l'ensemble des modifications touchant les histones ont été cartographiées sur l'ensemble de la structure du nucléosome et il ressort que ces nouvelles modifications pouvaient cette fois, non plus intervenir uniquement dans des zones sans contact avec l'ADN, queues des histones, mais également dans des zones de contact ADN/nucléosome (Freitas, Sklenar et al. 2004). Ces observations ont amené à une remise en question du « code des histones » et un nouveau modèle de régulation de la dynamique de la chromatine a été proposé. En effet, celui-ci, ou modèle de la « mobilité régulée du nucléosome », précise que les changements d'affinité du nucléosome pour l'ADN résulteraient de modifications de l'équilibre entre les nucléosomes « mobiles » et les

nucléosomes « stables » (Cosgrove, Boeke et al. 2004). Cet équilibre serait régulé de concert par les enzymes modifiant les extrémités N-terminales des histones et les complexes de remodelage de la chromatine.

Lors de l'introduction sur la structure chromatinienne, nous avons mentionné qu'il existait quatre types d'histones. Or, les histones H3 et H2A du cœur du nucléosome peuvent exister sous d'autres formes, on parle alors de variants d'histones (Kamakaka and Biggins 2005). Ces variants jouent un rôle primordial dans l'acquisition de structure chromatinienne plus ou moins permissive pour la transcription (Henikoff and Ahmad 2005). Le variant H3.3, remplaçant l'histone H3, est retrouvé dans des régions transcriptionnellement actives, et permet de délimiter l'euchromatine de l'hétérochromatine (Henikoff, Furuyama et al. 2004). De la même manière, il existe un variant CenH3 spécifique des centromères permettant de séparer les bras du chromosome et le kinétochore (Henikoff 2008). À l'inverse, les variants de l'histone H2A, plus nombreux, sont retrouvés généralement dans des zones d'extinction de la chromatine: le variant macroH2A, localisé au niveau du chromosome X inactivé, joue un rôle dans l'inactivation de ce chromosome X, le variant H2AZ, situé dans les promoteurs ou lié à l'hétérochromatine peut, soit réprimer soit activer la transcription, et enfin, le variant H2ABdb est associé à des zones actives de transcription puisqu'il est retrouvé préférentiellement au niveau du chromosome X activé et des autosomes (Li, Carey et al. 2007).

### **3.2.2.2. Activation de la transcription des gènes**

Une fois l'entrée de la chromatine dans un état actif de transcription, les différents FGT vont pouvoir se lier à leurs séquences respectives et ainsi activer le processus de transcription en lui-même. Du fait de l'extraordinaire complexité de séquences et du nombre de combinaisons potentielles de ces séquences de liaison composant le promoteur proximal (voir « Structure du promoteur », page 87), et de la présence de zones régulatrices, cette étape représente un niveau de régulation très important pour la cellule.

L'analyse des composantes du promoteur proximal ayant déjà été traitée, nous nous attacherons ici à ne donner que quelques notions entourant la structure ainsi que le rôle des régions régulatrices faisant partie du promoteur distal et permettant l'activation de la transcription.

### **3.2.2.2.1. Les régions régulatrices**

#### **3.2.2.2.1.1. Description**

Si le promoteur proximal se trouve situé juste en amont du gène dont il dirige l'initiation, le promoteur distal présente une localisation plus aléatoire. En effet, les régions régulatrices présentent la particularité de pouvoir se situer soit en amont, soit en aval, soit à l'intérieur même du gène au niveau des introns (Serfling, Lubbe et al. 1985; Tognoni, Cattaneo et al. 1985; Maniatis, Goodbourn et al. 1987). De plus, elles peuvent parfois se localiser à de très grandes distances du SIT (plus de 20 kb dans le cas du gène de la bêta-globine, par exemple (Levings and Bungert 2002)) et exercent leurs fonctions indépendamment de leur orientation (Grosveld, van Assendelft et al. 1987). Ces séquences, dites *cis*-régulatrices car influant sur l'expression d'un gène positionné sur le même brin de chromatine, au contraire des séquences *trans*-régulatrices agissant sur des chromatines différentes, constituant la régulation *trans*-chromatinienne, peuvent soit augmenter, dans ce cas on parle d'amplificateur ou « enhancer », soit réprimer, on parle alors d'extincteurs ou « silencers », la transcription.

#### **3.2.2.2.1.2. Fonctions**

Le rôle de ces régions est de lier des protéines, dites régulatrices ou facteurs *trans*-régulateurs, qui vont influencer directement sur la vitesse de formation du complexe de pré-démarrage en interagissant avec l'un des éléments présents au niveau du promoteur proximal (soit les FGT et/ou le médiateur et/ou la pol II) (Dylan and Tjian 1985), ceci dans le but de permettre une transcription accrue du gène. Du fait de leur éloignement,

l'interaction entre les protéines liant les régions régulatrices et celles liant les éléments du promoteur va engendrer une courbure de l'ADN afin de permettre un rapprochement de ces séquences. Cependant, d'autres protéines, les co-activateurs ou les co-represseurs, peuvent s'insérer entre les protéines régulatrices et les éléments présents sur le promoteur, jouant ainsi le rôle de « pont protéique » sans toutefois se lier elles-mêmes à l'ADN (Woychik and Hampsey 2002). Elles influeraient ainsi sur la cinétique et l'efficacité de l'initiation de la transcription. Le médiateur, cité précédemment comme étant lié à la pol II, ferait partie de ces co-activateurs et permettrait à celle-ci d'effectuer plusieurs cycles de transcription (Yudkovsky, Ranish et al. 2000).

### **3.2.2.2. Les protéines régulatrices**

#### **3.2.2.2.1. Structure générale**

Une protéine régulatrice, activatrice ou extinctrice, lie de manière « séquence-spécifique » l'ADN, via un domaine appelé domaine de liaison à l'ADN (DBD pour « **DNA-binding domain** »), et interagit avec d'autres protéines (FGT ou co-activateur), grâce à un domaine de transactivation (TAD pour « **trans-activation domain** »). Si les domaines de transactivation sont interchangeable entre diverses protéines, le domaine de liaison, est, fort logiquement, propre à chacune des protéines: ces deux domaines présentent la particularité d'être à la fois physiquement et fonctionnellement indépendants (Harrison 1991). Chacune des classes de protéines régulatrices présente deux caractéristiques communes: la liaison de chacune des protéines a lieu au niveau du sillon majeur de l'ADN via une hélice  $\alpha$  (Harrison 1991) et ces protéines agissent sous forme de dimères. Il est d'ailleurs intéressant de noter que les FGT, sont constitués suivant le même modèle, domaine de liaison et domaine de trans-activation.

### 3.2.2.2.2. Types de protéines régulatrices

La spécificité de liaison de ces protéines a permis de classer les protéines régulatrices en quatre super-classes dépendamment de la séquence de leur DBD, de leur structure tridimensionnelle ainsi que de leur manière de lier la molécule d'ADN (Harrison 1991; Pabo and Sauer 1992; Tan and Richmond 1998; Warren 2002). Ainsi, nous pouvons citer:

- ✓ Les protéines appartenant à la super-classe des domaines basiques parmi lesquelles on retrouve les protéines comportant un motif à « agrafe à leucine » (« leucine zipper » ou bZIP) car constituées d'une répétition de sept résidus leucine responsables de la dimérisation et donc de l'activité biologique de la protéine (Landschulz, Johnson et al. 1988). De nombreuses protéines appartenant à cette classe ont été identifiées (par exemple, AP-1, CREB, etc.) et sont impliquées dans la différenciation et le développement des eucaryotes. Sont retrouvées également dans cette superclasse, les protéines à motif hélice-boucle-hélice (bHLH ou « **b**asic **h**elix-**l**oop-**h**elix »). Cette structure, composée de deux hélices  $\alpha$  amphipathiques (les résidus hydrophiles étant situés sur une face de l'hélice et ceux hydrophobes sur l'autre face (Murre, McCaw et al. 1989)), est, là encore, responsable de la dimérisation de la protéine régulatrice (Voronova and Baltimore 1990). Enfin, une troisième classe, représentée par une structure composée à la fois d'une agrafe à leucine et d'un motif HLH appartient à cette famille. Dans ce cas, la dimérisation peut se faire soit par l'intermédiaire de l'agrafe, soit grâce au motif HLH (Hu, Banerjee et al. 2005);
- ✓ Les protéines faisant partie de la super-classe des coordinateurs à motif en doigt de zinc (« zinc finger ») impliquant un ion zinc central lié par quatre résidus conservés (cystéine et histidine) (Klug and Rhodes 1987). La plupart des membres de cette famille se composent de deux résidus cystéine et de deux résidus histidine et forment la sous-classe C2H2 (Tan and Richmond 1998). Cependant, il existe d'autres sous-classes comme par exemple C4 ou C6



regroupant respectivement les protéines régulatrices de type récepteur d'hormones et les régulateurs métaboliques. Ce motif en doigt de zinc est le plus souvent répété en tandem et la grande variation du nombre de ces tandems permet d'expliquer le nombre considérable des membres de cette famille. Les protéines comportant ce motif sont impliquées dans des processus transcriptionnels touchant aussi bien à la différenciation et la croissance cellulaire, aux proto-oncogènes, qu'aux FGT (Berg 1986; Klug and Rhodes 1987; Berg 1990);

- ✓ Les protéines appartenant à la super-classe des motifs hélice-tour-hélice (HTH ou « **helix-turn-helix** ») (Pabo and Sauer 1992), regroupant les protéines « winged-helix » (ou « hélices ailées ») impliquées dans la croissance et la réplication de l'ADN (Slansky and Farnham 1996) ainsi que les protéines à homéodomaine jouant un rôle important dans le développement (Scott, Tamkun et al. 1989; Gehring, Muller et al. 1990). Cette famille est conservée au cours de l'évolution puisqu'elle est retrouvée aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes (Harrison and Aggarwal 1990);
- ✓ Les protéines faisant partie de la super-classe des facteurs à architecture  $\beta$  dont la particularité réside dans le fait que, contrairement aux trois autres familles, la liaison à l'ADN ne se fait plus par le grand sillon mais via le petit sillon de l'ADN engendrant une courbure importante de la molécule (Stegmaier, Kel et al. 2004). Appartenant à cette famille, nous pouvons citer les protéines de la classe des « boîtes MADS » (nommée ainsi du fait des homologies retrouvées entre les levures (« **MCM1**, **Agamous** »), les plantes (« **deficiens** ») et les vertébrés (« **SRF** »)) liant spécifiquement les régions riches en AT (Nurrish and Treisman 1995) et dont l'action dépend de la présence de facteurs accessoires qui influenceront sur le choix du gène à réguler et sur le type même de régulation (Messenguy and Dubois 2003). Les « boîtes MADS » sont retrouvées chez tous

les eucaryotes (Shore and Sharrocks 1995) où elles remplissent des fonctions aussi variées que le développement, la différenciation cellulaire et la réponse aux signaux des facteurs de croissance (Treisman 1994).

Enfin, d'autres protéines présentant la structure des protéines régulatrices ainsi que leur action ne sont, pour l'heure, pas classées du fait de leur domaine de liaison particulier. C'est le cas, par exemple, du domaine « jumonji » conservé chez les eucaryotes et impliqué dans le développement précoce (Lee, Song et al. 2000).

Pour une classification complète et détaillée des protéines régulatrices ainsi que leurs éléments de régulation répertoriés à ce jour, voir la base de données TRANSFAC® (<http://www.gene-regulation.com/pub/databases/transfac/cl.html> ).

Comme nous l'avons démontré dans cette partie, l'expression d'un gène codant une protéine fonctionnelle est un processus pour le moins complexe. En effet, nous avons vu que chacune des structures (chromatine, gène, régions régulatrices) ainsi que chacune des étapes (activation, initiation, élongation et terminaison de la transcription, maturation, export et traduction du messager) faisait appel à un ensemble de points de contrôles visant chacun à aboutir à la formation de la protéine au bon endroit et au bon moment. Une altération d'un quelconque de ces points de contrôle et c'est la biologie de la cellule, et au final de l'organisme dans son ensemble, qui s'en trouve modifiée et perturbée.

**Matériel**  
**et**  
**méthodes**

## **4. Identification des zones délétées en amont du promoteur du gène de l'AVPR2**

Lorsqu'un patient est suspecté d'être atteint par un DIN, la confirmation est apportée par une analyse des séquences codant les gènes de l'AVPR2 et de l'AQP2 de la personne suspectée ainsi que, si possible, de différents membres de sa famille (mère ou sœurs transmettrices, frères non affectés, grand-pères, etc.).

Cette analyse est réalisée par la réaction de polymérase en chaîne à partir, soit du sang de cordon si l'on veut confirmer que l'enfant à naître d'une mère connue transmettrice est atteint, soit du sang de la personne. Par la suite une confirmation de la transmission liée à l'X ainsi que la recherche de mutations, par séquençage, est effectuée. Cependant, cette recherche ne se limite pas aux seules régions codantes des gènes, mais englobe également une analyse minutieuse et systématique des séquences de part et d'autres du gène (Bichet, Arthus et al. 1993; Bichet, Birnbaumer et al. 1994).

De plus, parallèlement à cette étude « moléculaire », l'analyse détaillée de l'histoire familiale et la construction d'arbres généalogiques, grâce à l'analyse de l'ADN des membres de la famille, ainsi que le test au dDAVP du patient s'avèrent essentiels.

### **4.1. Amplification par réaction de polymérase en chaîne (PCR) de l'ADN de patient**

Suite à l'extraction classique de l'ADN de patient à partir de prélèvements sanguins (technique phénol/chloroforme), l'ensemble de la séquence de l'AVPR2 est amplifié par la technique de réaction de polymérisation en chaîne (« **polymerase chain reaction** » ou PCR). Cette technique mise au point initialement à des fins de recherches, s'avère un outil indispensable dans la recherche de maladies génétiques comme c'est le cas par exemple du

DIN. En effet, de par son principe, amplifier la quantité de matériel génétique à partir d'une matrice double brin grâce à une succession de réactions de réplication de celle-ci, elle permet d'obtenir de très grandes quantités de matériel initialement présent en quantités infinitésimales, à des fins de recherches et d'analyse. Les cycles de réplication sont rendus possibles par l'utilisation de couples d'amorces spécifiques des extrémités 5' et 3' de chacun des gènes. Cette technique a connu un essor considérable après que K. Mullis eut découvert l'existence d'une polymérase bactérienne résistante à des températures extrêmement élevées, la Taq polymérase issue de la bactérie *Thermophilus aquaticus* (Mullis, Faloona et al. 1986).

Dans le cas du gène de l'*AVPR2*, l'amplification fait appel à une double PCR: tout d'abord une première PCR entraîne une amplification « large » du gène puis une seconde, « nested PCR », permet de « cibler » plus spécifiquement le gène puisqu'un fragment de 2 kb est obtenu (Bichet, Arthus et al. 1993).

## **4.2. Séquençage du produit PCR du gène de l'*AVPR2***

Suite à l'amplification du gène de l'*AVPR2*, un séquençage de l'ensemble des séquences codantes et non codantes ainsi que des régions flanquant le gène, 150 pb de la région 5'-UTR et 220 pb de la région 3'-UTR respectivement, est effectué (Arthus, Lonergan et al. 2000). Un ensemble de 12 séquences d'amorces est nécessaire afin de couvrir l'ensemble de la séquence à analyser (Bichet, Arthus et al. 1993).

## **4.3. Recherche de marqueurs de la transmission liée à l'*X***

Le DIN ségrégue avec différents marqueurs de la région chromosomique Xq28 (Kambouris, Dlouhy et al. 1988; Bichet, Hendy et al. 1992; Arthus, Lonergan et al. 2000). Ces différents marqueurs, quatre au total, DXS52, DXS15, G6PD et F8C, correspondent à

des loci flanquant le gène de l'*AVPR2* et englobent, *AVPR2* compris, une région de 5 Mégabase (Mb) (Schlessinger, Mandel et al. 1993). La recherche de ces marqueurs, s'avère essentielle quant à l'attribution du mode de transmission du DIN.

#### **4.4. Délimitation des points de cassure des délétions**

Dans 15% des familles au DIN lié à l'X, l'amplification classique par PCR s'avère impossible (aucun produit PCR obtenu) suggérant que les amorces utilisées ne trouvent pas leurs séquences complémentaires. Ces observations indiquent la présence d'une délétion englobant tout ou partie de l'*AVPR2*. Dans ce cas, il est utile de déterminer la taille exacte de la délétion et des points de cassure.

La découverte des zones délétées, données page 151, a été possible grâce à l'étude systématique d'une région de 60 kb englobant le gène de l'*AVPR2*, 30 et 31 kb, respectivement, en amont et en aval du gène. Ce « balayage » est réalisé grâce à l'utilisation de 15 couples d'amorces, 4 intragéniques et 11 extragéniques. Concrètement, chaque couple doit, après amplification par PCR, donner un fragment d'une taille donnée. Lorsque le produit d'amplification par l'emploi d'un couple, devant fournir un fragment de X pb, est absent alors cela signifie que l'une des deux amorces, au moins, ne s'est pas fixée. Chaque amplification est ainsi réalisée et les résultats sont ensuite compilés: si, par exemple, sur les 15 fragments devant être obtenus, 2 mitoyens sont absents alors cela signifie qu'une possible délétion se situe dans cette zone. Pour confirmer celle-ci et délimiter les points de cassure, une seconde PCR, utilisant cette fois les deux amorces externes de chacune des zones amont et aval de la zone supposée délétée ayant donné un produit d'amplification, est réalisée. Si la séquence nucléotidique répertoriée (Genbank U52112) stipulant un fragment de 14 kb et que le fragment obtenu n'est que de 11 kb, alors la délétion est de 3 kb. Par la suite, un séquençage des extrémités du fragment obtenu permet de déterminer avec précision les points de cassure.

## **4.5. Test au dDAVP**

Ce test a pour but de déterminer la résistance de l'organe cible, le rein, à la vasopressine. L'agoniste V2, le dDAVP, est alors utilisé.

Le patient suspecté de DIN lié à l'X reçoit une perfusion intraveineuse de dDAVP à raison de 0,3 µg/kg pendant 20 min. Cette perfusion fait suite à une période témoin de 60 min. Puis, des prélèvements plasmatiques (pour mesurer les effets hémodynamiques et coagulants) et urinaires (pour mesurer l'osmolalité) sont effectués toutes les 30 min pendant une période couvrant la période témoin et 150 min après le début de l'injection (Bichet, Razi et al. 1988; Bichet, Razi et al. 1989).

## **5. Expériences *in vitro***

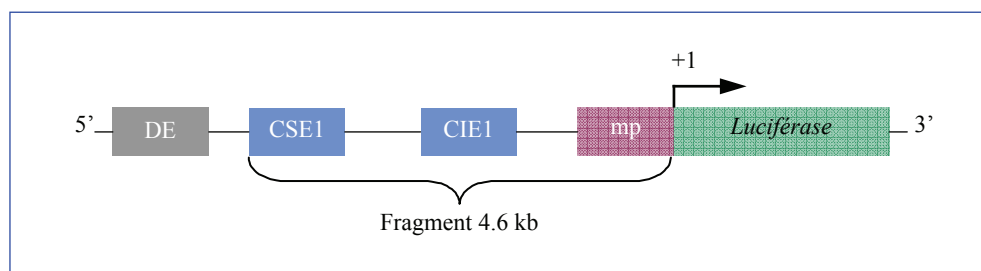
### **5.1. Étude visant à confirmer le rôle de l'élément distal**

Si l'observation suivant laquelle l'élément distal, représentant la délétion identifiée dans la famille 3 (voir page 160), joue effectivement un rôle dans l'activation de la transcription *in vivo*, il convient, tout d'abord, d'étudier sa fonction potentielle *in vitro*. Pour ce faire, nous avons fait appel à un système d'expression du gène rapporteur de la luciférase: différentes constructions ont été fabriquées et clonées en amont d'un gène rapporteur. Chacune de ces constructions est ensuite transfectée dans différentes lignées cellulaires afin d'observer, ou non, un effet de l'élément distal (Calmont, Reichwald et al. 2000).

#### **5.1.1. Clonage de l'élément distal en amont du gène rapporteur**

L'élément distal (DE), est obtenu par digestion enzymatique du cosmide QC7C1 puis amplifié par PCR, cloné dans un vecteur intermédiaire puis inséré dans le vecteur d'expression dépourvu de promoteur contenant le gène de la luciférase, pLuc5m (Calmont, Reichwald et al. 2000; Debrand 2004). Différents éléments ont été ajoutés entre l'élément distal et le gène de la luciférase: le « promoteur minimal » de l'*AVPR2* et les différents fragments tels que décrits par A. Calmont soit CSE1 et CIE1 appartenant tous trois au fragment de 4.6 kb (**Figure 33**, page 127) (Calmont, Reichwald et al. 2000). Il est important de noter que la longueur du DE dépasse le cadre des 102 pb correspondant à la délétion et fait 150 pb. Ceci implique, en plus des sites de restrictions incorporés, environ 20 pb en amont et en aval de ladite délétion.





**Figure 33. Représentation schématique de la construction utilisée pour déterminer le rôle de l'élément distal *in vitro*.**

Le fragment de 4.6 kb précédemment identifié comporte l'élément activateur (CSE1), l'élément inhibiteur (CIE1) ainsi que le « promoteur minimal » de l'*AVPR2* (mp). Ce dernier correspond en fait à un fragment de 1000 pb situées juste en amont du SIT (Calmont, Reichwald et al. 2000).

NB: Certaines constructions utilisées ne comportent pas le fragment complet de 4.6 kb mais un fragment de 1.4 kb n'incluant que le « promoteur minimal ».

### **5.1.2. Promoteur de la $\beta$ -globine**

Devant le fait que le DE semble effectivement jouer un rôle dans l'activation de l'*AVPR2*, il convenait de vérifier que cet élément se comporte comme une région régulatrice augmentrice (« enhancer »). Dans ce but, nous l'avons cloné seul, sans aucune autre séquence appartenant au promoteur au sens large de l'*AVPR2*, en amont d'un promoteur hétérologue, le promoteur de la  $\beta$ -globine. En effet, une séquence supposée régulatrice ne remplissant que la fonction « d'accélérateur » de formation du CPI, celle-ci peut agir quelque soit le promoteur dirigeant la transcription du gène dans « son type » cellulaire de prédilection. Par conséquent, l'utilisation de ce promoteur, en plus d'établir le rôle, positif ou négatif, du DE sur la transcription de l'*AVPR2* permettrait de confirmer son activité spécifique en fonction du type cellulaire.

### **5.1.3. Multimérisation de l'élément distal**

Si le DE exerce une fonction « tissu-spécifique », et donc permet la liaison d'une protéine présente de manière plus importante dans le tubule collecteur, le fait de le multimériser devrait permettre une activité plus importante dans ce tissu que dans les autres.

Dans ce but, nous avons donc fabriqué une construction contenant quatre copies de ce DE qui sont par la suite clonées en amont du fragment de 4.6 kb. L'orientation adéquate des quatre copies du DE est vérifiée par séquençage.

#### **5.1.4. Constructions comportant une séquence similaire à TonEBP localisée en 5' de la délétion**

L'une des extrémités du DE comporte une séquence similaire, bien que non identique, à une séquence répertoriée comme liant un élément de réponse à la tonicité (« TonEBP » pour « **tonicity-responsive enhancer binding protein** ») (Voir « Séquence homologue à TonEBP », page 188).

Devant le fait que TonEBP permette, entre autre, l'activation de l'*AQP2* suite à une modification de l'osmolalité environnante des cellules rénales, nous nous sommes posés la question suivant laquelle cette protéine régulatrice pourrait, ou non, influée conjointement sur l'expression de l'*AVPR2* via cette séquence homologue. Pour ce faire, une cassette de 30 pb comportant les 11 pb de la séquence similaire à TonEBP a été clonée en amont du promoteur de l'*AVPR2* dans une forme sauvage ou mutée, en présence ou en absence du DE. Il est important de noter que cette séquence similaire à TonEBP fait partie intégrante du DE dans sa forme clonée, c'est-à-dire lorsque celui-ci comporte 150 pb.

## **5.2. Lignées et culture cellulaires**

Chacune des constructions présentées ci-dessus fait ensuite l'objet de transfection dans diverses lignées cellulaires afin de confirmer le rôle potentiel de l'élément distal. Celles-ci se composent tout d'abord de cellules rénales et d'une lignée contrôle. Les deux lignées d'origine rénale sont issues de cellules primaires de cortex de lapin et représentent un outil performant pour étudier l'expression « tissu spécifique » de l'*AVPR2* (Vandewalle, Lelongt

et al. 1989; Prié, Ronco et al. 1991). Nous nous sommes limités à ne retenir pour nos manipulations que trois types cellulaires: des cellules présentant des caractéristiques de cellules principales du tubule collecteur, des cellules ayant des caractéristiques de cellules du tubule proximal et enfin une troisième lignée totalement différente sur le plan phylogénique, des fibroblastes.

### **5.2.1. Cellules du tubule proximal**

Lors de nos expériences, les cellules présentant des caractéristiques de cellules de tubule proximal, sont les cellules RC.SV1 (Vandewalle, Lelongt et al. 1989). Ces cellules, suite à l'infection de cellules isolées de cortex de lapin par le virus simien 40 (« simien virus 40 » ou SV40) de type sauvage, présentent toutes les caractéristiques des cellules du tubule proximal: présence de microvillosités à la membrane apicale, forte expression d'hydrolases au niveau de la bordure en brosse, transport de glucose dépendant du sodium et enfin, production importante d'AMPc suite à une stimulation par l'hormone parathyroïdienne, PTH. Il faut toutefois noter, que ces cellules, bien que ne devant pas exprimer les récepteurs V2, répondent malgré tout à une stimulation par l'agoniste de l'AVP, la dDAVP, par une légère accumulation d'AMPc (Vandewalle, Lelongt et al. 1989).

### **5.2.2. Cellules du tubule collecteur**

La lignée cellulaire permanente RC.SVtsA58 utilisée dans cette étude est obtenue suite à l'infection de cellules tubulaires corticales isolées par le mutant tsA58 du virus SV40 thermosensible (Vandewalle, Lelongt et al. 1989). Le phénotype de ces cellules est le même que celui des cellules principales du tubule collecteur: elles expriment le récepteur V2 à leurs membranes, sont sensibles à l'AVP, expriment à leurs surfaces la molécule d'adhésion L1 et répondent à une stimulation par la bradykinine, l'isoproterenol et les prostacyclines E2 (Prié, Ronco et al. 1991; Prié, Dussaule et al. 1994; Debiec, Christensen et al. 1998).

### **5.2.3. Lignée témoin**

L'emploi d'une lignée cellulaire autre que rénale, en l'occurrence une lignée fibroblastique de type C<sub>3</sub>H 10T1/2, et pour cette raison nommée 10T1/2, s'explique par le fait que celle-ci ne présente aucune activité d'expression de l'*AVPR2*. Cette lignée sert donc de contrôle négatif.

### **5.2.4. Culture cellulaire**

Les cellules du tubule collecteur sont cultivées et entretenues à 33°C: à cette température le génome du virus est exprimé et permet une croissance cellulaire rapide ainsi qu'une transformation du phénotype des cellules. En effet, celles-ci acquièrent toutes les caractéristiques des cellules du tubule collecteur à 33°C, qui correspond à la température permissive pour l'expression du génome viral, alors qu'à 39°C, température restrictive, les cellules retrouvent leur phénotype d'origine et cessent de se diviser. Les deux autres lignées, cellules du tubule proximal et fibroblastes, sont cultivées quant à elles à 37°C (Vandewalle, Lelongt et al. 1989; Prié, Ronco et al. 1991).

Les deux lignées de cortex rénal croissent dans un milieu défini afin de préserver leurs caractéristiques propres aux cellules du tubule collecteur et aux cellules de tubule proximal (milieu DMEM pour « **D**ulbecco's **m**odified **E**agle's **m**edium »-enrichi) à 2% de sérum de veau foetal (SVF); la lignée de fibroblastes, quant à elle, est entretenue dans un milieu DMEM simple à 10% de SVF comme décrit par A. Calmont (Prié, Ronco et al. 1991; Calmont, Reichwald et al. 2000). Les expériences de transfection ont lieu lorsque les cellules atteignent approximativement 70 à 80% de confluence (Calmont, Reichwald et al. 2000).

Chacune de ces lignées est transfectée par la séquence supposée activatrice de 102 pb ainsi que par différentes constructions de celle-ci. De plus, dans le cas de la transfection du vecteur contenant la séquence similaire à TonEBP, afin de vérifier la possibilité d'une

activation du gène par une augmentation de la tonicité, il convient de varier celle-ci lors de l'expérience. Dans ce but, l'hypertonie du milieu de culture est obtenue par un ajout de NaCl 5M pour atteindre une hypertonie d'environ 500 mOsmol, l'isotonie se situant à 300 mOsmol.

### **5.3. Expériences de transfection transitoire**

La transfection consiste à introduire, le plus souvent sous forme plasmidique, un ADN recombinant dans une cellule. Cette technique présente deux finalités différentes en fonction des buts recherchés. La première, dite de manière stable, c'est-à-dire que le vecteur portant l'ADN recombinant va s'insérer dans le génome de la cellule et y demeurer pendant de très nombreuses générations cellulaires, permet d'étudier, par exemple, le rôle de régions de contrôle, type LCR, qui sont directement sous la dépendance de la structure chromatinienne (Strachan and Read 2004). La seconde, celle que nous avons utilisée lors de nos expériences, est dite transitoire.

#### **5.3.1. Principe de la transfection transitoire**

La transfection transitoire, ne permet pas, au contraire de la transfection stable, l'insertion dans le génome du vecteur et celui-ci est perdu progressivement au cours des divisions cellulaires, généralement au moment de la mitose suivant son introduction (Strachan and Read 2004). Cette méthode sert, par exemple, à étudier le rôle d'un élément activateur ou d'un promoteur en dosant de manière aisée la production soit de l'ARNm soit de la protéine. Le but de notre recherche étant de vérifier le rôle supposé activateur de l'élément distal, nous avons donc adopté cette stratégie rapide et aisée.

### **5.3.2. Technique de transfection à la lipofectamine plus**

Un jour avant la transfection, nous répartissons 200 000 cellules par puits dans une plaque à 6 puits. La transfection est réalisée suivant le protocole établi par A. Calmont (Calmont, Reichwald et al. 2000). Brièvement, chaque puits « reçoit » un mélange, composé du milieu spécifique à chaque lignée, de 900 nanogrammes (ng) d'ADN de chaque construction, 50 ng du vecteur de normalisation, pSV- $\beta$ -galactosidase, et de 4 microlitres ( $\mu$ l) de lipofectamine (Invitrogen). Afin d'augmenter l'efficacité des transfactions, 6  $\mu$ l par puits de Plus Reagent (Invitrogen) sont ajoutés au milieu. Trois heures après la transfection, les milieux sont changés. L'expression du gène rapporteur est mesurée 48 heures après le début de la transfection. Les cellules sont lavées au PBS (« Phosphate buffer solution »), grattées et décollées des puits et enfin lysées par cycles de congélation/décongélation dans un tampon phosphate (Debrand 2004)).

Les activités luciférase sont mesurées en utilisant un luminomètre Tropix TR 717/Winglow (EG&G Berthold). L'extrait cellulaire est mis en présence de D-Luciférine (Roche) et l'émission du flash lumineux est mesurée suivant un mode d'intégration sur un délai de 10 secondes (Rossert, Eberspaecher et al. 1995; Calmont, Reichwald et al. 2000; Debrand 2004).

L'activité  $\beta$ -galactosidase est utilisée pour corriger l'efficacité de la transfection. La mesure de cette activité repose sur une réaction colorimétrique entre l'enzyme, la  $\beta$ -galactosidase et le substrat, la résorufine  $\beta$  D-galactopyrannoside (Sigma). Lorsqu'un changement de coloration apparaît, la mesure spectrométrique est réalisée à 562 nanomètres (nm) grâce à un lecteur de microplaque standard (EL 800 Bio-TEK instrument, Inc) (Goldberg, Helaakoski et al. 1992; Calmont, Reichwald et al. 2000; Debrand 2004).

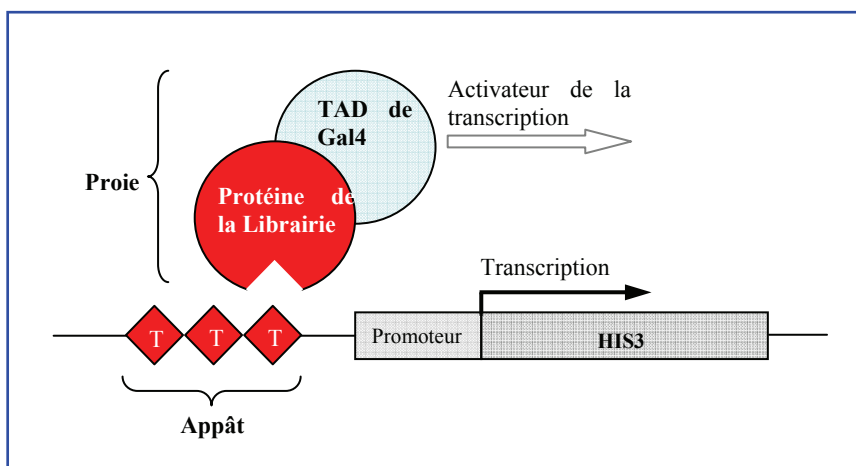
## 5.4. Caractérisation des protéines liant l'extrémité 3' du DE chez la levure

Lors d'études préalables, nous avons identifié une zone à l'intérieur du DE comme paraissant responsable de l'effet activateur du DE dans les cellules rénales (Debrand 2004). Suite à cette identification, nous avons entrepris d'identifier les protéines liant cette zone. Pour ce faire, nous avons choisi une technique simple et rapide, bien qu'étant particulièrement aléatoire et hasardeuse, la technique du simple hybride chez la levure (Alexandre, Grueneberg et al. 1993; Liu, Wilson et al. 1993; Deplancke, Dupuy et al. 2004). Chacune des étapes de cette technique sont regroupées sous forme de kit, BD Matchmaker™ One-Hybride System (Clontech).

### 5.4.1. Principe de la technique du simple hybride

Cette technique, basée sur les propriétés structurales des protéines régulatrices, permet en connaissant un site de liaison potentiel de déterminer la protéine s'y rattachant à partir d'une librairie d'ADNc du type cellulaire d'intérêt (dans notre cas le tissu rénal).

Le principe consiste à créer *in vivo* une protéine régulatrice de fusion qui pourra lier la séquence d'ADN supposée régulatrice et ainsi permettre l'activation d'un gène de sélection (**Figure 34**, page 134).

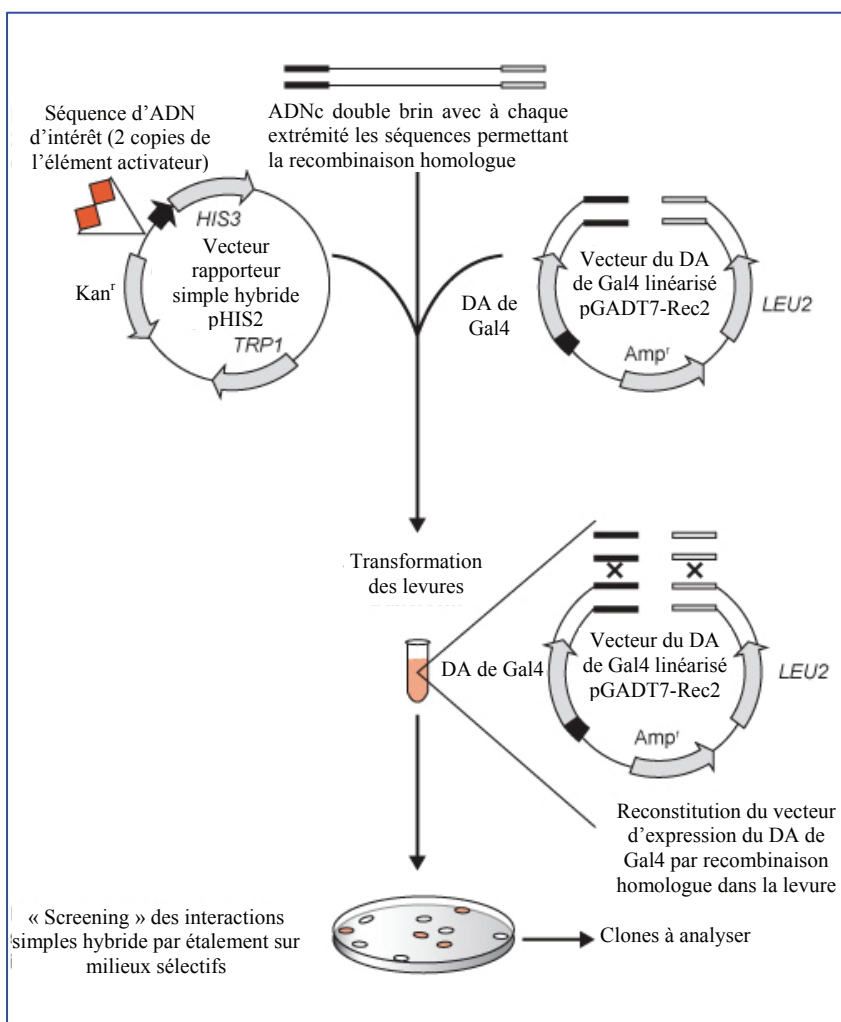


**Figure 34. Principe de la technique du simple hybride dans la levure. D'après « BD Matchmaker™ Library Construction & Screening Kits User Manual », Clontech, 2004.**

La protéine de fusion représentée par le domaine de trans-activation de Gal4 lié à une protéine de la librairie, formant la proie, activera la transcription du gène de sélection dans la levure si ladite protéine lie la séquence d'ADN d'intérêt, représentant l'appât.

Pratiquement, cette technique fait appel à deux vecteurs, l'un, pHIS2, contenant un gène de sélection, le gène *HIS3*, en amont duquel est clonée la séquence d'ADN supposée lier la protéine, appelé « appât » en raison de sa capacité à « attirer » la protéine de fusion issue du second vecteur. Ce dernier, pGADT7-Rec2, contient la librairie d'ADNc de tissu rénal clonée en amont du domaine d'activation hétérologue fort, Gal4. La protéine de fusion issue de ce second vecteur est appelée « proie » du fait qu'elle sera piégée par le premier vecteur. Lorsque les deux vecteurs sont transfectés dans la souche de levure cible, et que l'une des protéines de fusion de la banque d'ADNc lie de manière spécifique la séquence d'ADN, le domaine Gal4 pourra interagir avec la machinerie transcriptionnelle et ainsi activer la transcription du gène de sélection ce qui permettra aux levures de croître sur un milieu sélectif (**Figure 35**, page 135).





**Figure 35. Principe du « screening » de la banque d'ADNc rénale dans la levure. Image adaptée de « BD Matchmaker™ Library Constructions & Screening Kits user Manual », Clontech, 2004.**

Le vecteur linéaire utilisé pour reconstituer la structure de la protéine régulatrice, composée du domaine d'activation de Gal4 (DA) et d'un fragment de la banque d'ADNc liant potentiellement la séquence d'ADN d'intérêt (rectangle rouge du vecteur pHIS2), pGADT7-Rec2, est mis en présence du vecteur contenant la séquence d'ADN de liaison (pHIS2) et de la banque d'ADNc. Les levures, chargées de lier par recombinaison homologue les fragments de la librairie d'ADNc dans le vecteur, sont transformées par le mélange et étalées sur différents milieux sélectifs (voir texte). Les interactions positives sont par la suite analysées.

#### **5.4.2. Clonage de l'élément supposé régulateur**

La zone identifiée à l'extrémité 3' du DE, appelée DE15 (Debrand 2004) et « Identification des zones importantes dans l'expression de l'*AVPR2* à l'intérieur de l'élément distal » page 169), est clonée dans le vecteur dit « appât » en vue de piéger l'élément la liant issu de la banque d'ADNc rénale. Afin d'augmenter la probabilité d'observer une interaction ADN/protéine, et malgré le fait qu'une seule copie puisse suffire (Wei, Angerer et al. 1999), il convient de fabriquer différentes versions contenant une ou plusieurs copies de la zone d'intérêt (Ghosh, Selby et al. 1993). À cette fin, nous avons fabriqué trois vecteurs contenant respectivement, 1, 2 ou 3 copies de la zone DE15.

Par la suite, il est impératif de déterminer et d'éliminer l'activité intrinsèque, ou « bruit de fond », du gène *HIS3* du vecteur contenant les différentes copies de la séquence d'ADN. En effet, il est généralement observé une « auto activation » du gène de sélection lorsque celui-ci est dans la levure: il arrive que cet élément puisse lier une protéine régulatrice endogène de levure et donc permettre à celle-ci de croître sur le milieu sélectif. Afin d'éviter ceci, nous ajoutons un inhibiteur compétitif de l'enzyme produite par le gène *HIS3* (l'imidazole glycérol phosphate déshydratase), le 3 amino-1, 2, 4 triazole 1 molaire (3AT 1 M) (Kishore and Shah 1988).

#### **5.4.3. Fabrication et clonage de la banque d'ADNc de la médullaire rénale de rat**

Suite au prélèvement d'un rein sur un rat et isolement des cortex, nous avons extrait les ARN totaux afin de construire la banque d'ADNc rénale en vue de l'identification des protéines liant la séquence d'ADN. La banque est construite grâce à la technologie BD SMART<sup>TM</sup> (« switching mechanism at 5' end of RNA transcript ») (Zhu, Machleder et al. 2001) qui utilise deux particularités de la transcriptase inverse du MMLV (« moloney murine leukemia virus »): d'une part, son activité transcriptase inverse pour synthétiser le

premier brin de l'ADNc, grâce à une amorce (CDSIII ou CDSIII/6 primer, Clontech) et d'autre part, sa capacité à changer de matrice (« template-switching ») (Kulpa, Topping et al. 1997). Lorsque l'enzyme atteint l'extrémité 5' du brin d'ARN, son activité terminale transférase incorpore plusieurs résidus cytosine au brin d'ADNc naissant. L'ajout dans le milieu réactionnel d'un oligo(G) (« BD SMART anchor »), complémentaire à la queue de cytosine, crée une extension de matrice sur laquelle la reverse transcriptase va glisser et ainsi synthétiser un premier brin plus long que le brin d'ARN correspondant (Zhu, Machleder et al. 2001). Par la suite, le second brin est synthétisé par PCR « longue distance » (« LD PCR ») utilisant l'oligo(G) et soit, CDSIII ou CDSIII/6 comme amorces. Le programme d'amplification est le suivant: 1) dénaturation initiale pendant 30 secondes, 2) 20 cycles de, a. dénaturation à 95°C, 10 secondes, b. extension des amorces pendant 6 minutes à 68°C et 3) extension finale à 68°C pendant 5 minutes. Après une vingtaine de cycle PCR, la banque d'ADNc double brin est purifiée sur colonnes BD CHROMA SPIN™ TE-400 (Clontech) et prête à être clonée dans le vecteur contenant la séquence du domaine de trans-activation de Gal4, pGADT-Rec2 (Clontech). Du fait du haut pouvoir de recombinaison homologue de la levure, l'étape de clonage de la banque a lieu au moment même de la transformation des levures par les différents éléments lors du criblage.

#### **5.4.4. Souche de levures et milieux de croissance et de sélection utilisés**

La souche utilisée lors des différentes étapes de caractérisation des protéines liant la séquence d'ADN est la souche Y187. Cette souche MAT $\alpha$  est issue du croisement entre les souches Y 153 (Durfée, Becherer et al. 1993) et GGY1::171 (Fields and Song 1989). Son génotype est: *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*, *leu2-3*, *112*, *gal4 $\Delta$* , *gal80 $\Delta$* , *met<sup>-</sup>*, *URA3::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-LacZ*, *MEL1* (Harper, Adami et al. 1993). Elle est auxotrophe pour le tryptophane, la leucine, l'histidine, l'uracile et l'adénine puisqu'elle requiert chacun de ces aa pour croître. Cependant, la souche Y187 est dite prototrophe pour l'histidine dans

la mesure où, lorsqu'on lui incorpore le vecteur « appât », portant le gène *HIS3*, elle est capable de synthétiser sa propre histidine sans que celle-ci ne soit présente dans le milieu. Ce vecteur, ou marqueur de transformation, est utilisé pour « compléter » l'allèle auxotrophe de l'histidine.

Le milieu de base de croissance de la souche, appelé YPD, comprend: 20 g/l de peptone (Difco), 10 g/l d'extrait de levure, « Yeast extract » (Clontech), 20 g/l de glucose (Sigma), 20g/l d'agar dans le cas de milieux solides, complété à 1 litre (l) avec de l'eau stérile puis le milieu complet est autoclavé. Pour sélectionner les levures qui contiennent un plasmide spécifique, nous utilisons un milieu minimum, appelé SD, composé d'une source d'azote et de glucose, et de différents «Dropout» 10x (DO). Le «Dropout» est un mélange des aa essentiels auquel un ou plusieurs de ces aa ont été enlevés en fonction du milieu de sélection désiré. Par exemple si l'on veut isoler les souches transformées par le vecteur « appât », comportant le gène *HIS3*, nous utilisons le milieu SD sans histidine (SD/-His). Le milieu SD contient: 6,7g/l de «Yeast nitrogen base» sans acides aminés (Clontech), 20g/l glucose (Sigma), 100ml de la solution «Dropout» appropriée puis l'ensemble est autoclavé.

#### **5.4.5. Transformation des levures**

En vue de la transformation, il faut tout d'abord rendre les levures compétentes. Pour ce faire, plusieurs colonies fraîches de levure Y 187, gardées à 30°C, sont prélevées et mises en culture dans 50ml de milieu YPD, vortexées pendant 30 sec et enfin placées pendant la nuit sous agitation 260 rotation par minute (rpm) à 30°C. Le lendemain, le tout est déposé dans un Falcon de 50 ml, centrifugé à 2500 rpm pendant 3min. Le surnageant est retiré et le culot de levures est lavé deux fois avec 40 ml d'eau stérile froide et le culot est de nouveau vortexé. Une nouvelle centrifugation est effectuée à 2500 rpm pendant 3 min. Le surnageant est enlevé et le culot est suspendu dans 1 ml d'eau froide en vortexant. À ce stade, les levures sont compétentes et les transformations peuvent avoir lieu (Schiestl, Manivasakam et

al. 1993). Quelle que soit la transformation, la technique est la même et fait appel à l'acétate de lithium (LiAc) et au polyéthylène glycol (PEG) (Gietz, St Jean et al. 1992). Cependant, les quantités utilisées lors de ces différentes transformations varient ainsi que, bien évidemment, les milieux de culture.

#### 5.4.5.1. Par la banque d'ADNc

Lors du criblage par la banque d'ADNc, les levures sont co-transformées par les deux vecteurs, le vecteur « appât » contenant la séquence d'ADN et le vecteur « proie » linéaire destiné à accueillir la banque d'ADNc et enfin la banque purifiée (**Figure 35**, page 135). Le protocole est, succinctement, le suivant: la quantité totale de la banque d'ADNc est mise en présence de 6  $\mu$ l de pGADT7-Rec2 (500 ng/ $\mu$ l), 5  $\mu$ g de pHis2/séquence ADN d'intérêt et 20  $\mu$ l d'ADN porteur (« Herring Testes Carrier DNA », Clontech). À ce mélange sont ajoutés 600  $\mu$ l de levures rendues préalablement compétentes, le tout est mélangé doucement et 2,5 ml d'une solution de PEG/LiAc (Clontech) sont ajoutés. Le mélange de transformation et les levures compétentes sont par la suite soumis à un choc thermique: 45 min à 30°C, puis ajout de 160  $\mu$ l de DMSO (diméthylsulfoxyde) dans chaque tube et bain-marie à 42°C pendant 20 min. Les tubes sont ensuite centrifugés à 2500 rpm, le culot lavé dans 3 ml de « YPD Plus Liquid Medium » (Clontech) et incubés 90 min à 30°C à 265 rpm. Une ultime centrifugation est effectuée à 2500 rpm pendant 5 min et le culot est repris dans 6 ml d'une solution de chlorure de sodium (NaCl) à 0,9%. Le mélange de transformation est par la suite étalé sur différents milieux:

- ✓ Tout d'abord sur milieu SD/-Leu afin de vérifier l'efficacité de transformation par le vecteur « proie » et donc l'efficacité avec laquelle les levures ligent les ADNc dans le vecteur linéaire, milieu SD/-Leu;

- ✓ Sur milieu SD/-Trp pour déterminer l'efficacité de la transformation par le vecteur « appât » contenant la séquence d'ADN d'intérêt;
- ✓ Sur milieu SD/-Leu/-Trp pour mesurer le nombre total de clones obtenus suite à la transformation. Ces clones sont en effet constitués de « faux positifs » dus au bruit de fond, et de « vrais positifs » correspondant aux interactions réelles, ADN/protéine;
- ✓ sur milieu SD/-His/-Leu/-Trp + concentration optimale de 3AT pour sélectionner les interactions entre la protéine dont la séquence est contenue dans la banque d'ADNc et la séquence d'ADN étudiée. C'est de ce milieu que sont prélevés les clones à analyser.

Des dilutions sont réalisées afin de déterminer l'efficacité de transformation: 100 µl de dilutions au 1/10, 1/100 et 1/1000 du mélange de transformation sont étalés sur milieux SD/-Leu, SD/-Trp et SD/-Leu/-Trp. Le restant de la solution est réparti, à raison de 150 µl par plaque, sur des plaques de grand format (150mm) contenant du milieu SD/-His/-Leu/-Trp + concentration optimale de 3AT. L'ensemble des plaques du criblage est entreposé à 30°C pendant 3 à 7 jours jusqu'à l'apparition des colonies.

#### **5.4.5.2. Par les vecteurs contenant les protéines d'intérêt**

La transformation des levures par les vecteurs contenant les protéines d'intérêt, fait appel à la même méthodologie que lors du criblage de la banque. Pendant les différentes centrifugations effectuées lors de l'étape visant à rendre les levures compétentes, le milieu de transformation est préparé: 50 µl d'eau stérile, 36 µl de LiAc 1,0 M, 240 µl de PEG 50% (Sigma), 25 µl d'ADN de sperme de saumon (10 mg/ml) (Invitrogen), servant d'ADN porteur préalablement bouilli pendant 5min, 2 µl de chacun des plasmides (à 500ng/µl), dans le cas d'une co-transformation, et enfin, 50 µl de levures compétentes. Le tout est

vortexé et incubé à 30°C pendant 30 minutes sous agitation continue à 260 rpm suivi d'un choc thermique au bain-marie à 42°C pendant 25 min. Le mélange est alors refroidi sur de la glace, une centrifugation est effectuée à 7500 rpm pendant 15 sec et le culot est suspendu dans un volume final d'eau stérile permettant d'étaler 60 µl dans le cas d'une transformation normale. Enfin, le produit de transformation est étalé sur un milieu sélectif, c'est-à-dire un milieu ne contenant pas un ou plusieurs aa essentiels pour la croissance de la levure: dans le cas des protéines de liaison, le milieu est SD/-Leu. Les boîtes de pétris sont par la suite incubées à 30°C pour 2 à 4 jours jusqu'à l'apparition des colonies.

#### **5.4.6. Extraction des plasmides d'intérêt**

Après avoir obtenu les clones positifs lors du criblage de la banque, il convient de récupérer les vecteurs contenant les protéines d'intérêt ayant entraîné une activation du gène rapporteur afin de caractériser celles-ci. Pour ce faire, nous utilisons un système de kit permettant un isolement rapide de chacun des vecteurs contenus dans les levures, RPM<sup>®</sup> Yeast Plasmid Isolation kit (Bio 101 System). Brièvement, chaque clone est mis en culture sur milieu liquide SD/-Leu durant une nuit. La culture est centrifugée, le culot repris dans 250 µl d'une solution de lyse alcaline puis vortexé vigoureusement en présence de microbilles. Une solution de neutralisation est ajoutée, 250 µl, et les tubes sont de nouveau centrifugés. Le surnageant est prélevé, déposé sur une colonne et 250 µl du tampon de centrifugation, GLASSMILK<sup>®</sup> Spin Buffer, est ajouté et les tubes centrifugés. La colonne est ensuite lavée deux fois avec une solution alcoolique et enfin, l'ADN est élué dans 100 µl d'eau stérile.

Les vecteurs issus de cette extraction sont ensuite transfectés dans les bactéries *E. Coli* Top 10<sup>®</sup> (Invitrogen) par choc thermique et étalés sur milieu LB + ampicilline. Le lendemain 10 clones sont prélevés, digérés par HindIII afin de vérifier la présence d'un insert et séquencés. Les résultats des séquençages sont ensuite analysés dans la banque de données

NCBI Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) afin de trouver parmi l'ensemble des séquences répertoriées des homologues permettant l'identification des protéines d'intérêt (Altschul, Gish et al. 1990).

#### **5.4.7. Vérification de la spécificité des protéines potentielles**

Une fois l'analyse de comparaison de séquences effectuée et après avoir identifié des protéines potentiellement activatrices, il convient de vérifier la spécificité d'action de chacune d'entre elles. Pour ce faire nous effectuons de nouveau des séries de transformations dans les levures comme il a été précédemment décrit (« Par les vecteurs contenant les protéines d'intérêt », page 140).

##### **5.4.7.1. Constructions utilisées**

Parmi les différentes constructions nécessaires à cette vérification, nous avons utilisé lors de notre étude:

- ✓ Le vecteur pHis2 contenant la séquence d'ADN d'intérêt, « l'appât » dans sa forme « sauvage », c'est-à-dire gardant sa capacité à lier les protéines identifiées;
- ✓ Chacun des vecteurs pGADT-Rec2 contenant une protéine potentiellement intéressante, identifiée grâce à l'analyse de comparaison de séquence;
- ✓ Et enfin, un vecteur pHis2 contenant la séquence d'ADN d'intérêt mais cette fois sous forme mutée afin d'empêcher la liaison possible de la protéine identifiée.



### 5.4.7.2. Co-transformation dans la levure et milieux de sélection

Les vecteurs contenant les séquences protéiques intéressantes sont à nouveau testés dans les levures, afin de déterminer la spécificité d'action de chacune de ces protéines: les levures sont co-transformées comme précédemment par le vecteur purifié contenant la séquence de la protéine d'intérêt, pGADT7-Rec2, et le vecteur contenant la séquence d'ADN de liaison, pHIS2. Cependant, plusieurs contrôles négatifs sont nécessaires pour s'assurer, d'une part que le clone n'est pas un faux positif, et d'autre part, que l'expression de la protéine ainsi que sa liaison à la séquence d'ADN d'intérêt est bien responsable de l'activation du gène d'expression:

- ✓ La transformation des levures se fait avec le vecteur contenant la séquence d'ADN d'intérêt, DE15, seul; ceci afin de vérifier que le gène de « survie » est bien activé par la liaison de la protéine. Il ne devrait y avoir aucun clone dans la mesure où la protéine supposée activatrice est absente;
- ✓ Un second contrôle vise à transformer les levures avec le vecteur, contenant le clone d'intérêt codant pour la protéine supposée activatrice, seul; si la protéine active l'expression du gène en se liant à la séquence d'ADN, il ne devrait y avoir aucun clone dans la mesure où la « cible », l'ADN d'intérêt, est absente;
- ✓ Le troisième contrôle consiste à transformer les levures avec le vecteur devant contenir la séquence d'ADN « nu », c'est-à-dire sans la séquence d'AND d'intérêt, et le vecteur contenant le clone d'intérêt codant pour la protéine. Là encore il ne devrait y avoir aucun clone car la séquence d'ADN de liaison est absente et donc la protéine ne peut pas lier sa séquence cible.

Chacune des quatre séries de transformation citées ci-dessus est ensuite étalée sur les mêmes milieux que ceux utilisés lors du criblage de la banque: SD/-Leu ; SD/-Trp ; SD/-Leu/-Trp et SD/-His/-Leu/-Trp + concentration optimale de 3AT.

## **6. Expériences *in vivo***

### **6.1. Validation des résultats obtenus *in vitro* chez la souris**

Bien que le fait que les patients « portant » les délétions soient atteints de DIN lié à l'X représente en soit une preuve *in vivo* irréfutable, il convient tout de même de vérifier le rôle régulateur du DE dans un autre modèle. Pour ce faire, nous utilisons la souris comme modèle expérimental. En effet, celle-ci s'avère être un excellent modèle pour définir les fonctions des gènes humains du fait de son anatomie, de sa physiologie et de ses homologies génétiques avec l'espèce humaine. De plus ce modèle est très largement utilisé dans l'étude des pathologies humaines du fait de l'étroite relation phénotypique entre les gènes humains responsables de ces maladies et leurs homologues murins (Bedell, Largaespada et al. 1997).

Ces études ont été réalisées en collaboration avec le Dr. Alan Peterson (Biologie du Développement et Oncologie Moléculaire, Université Mc Gill, Montréal).

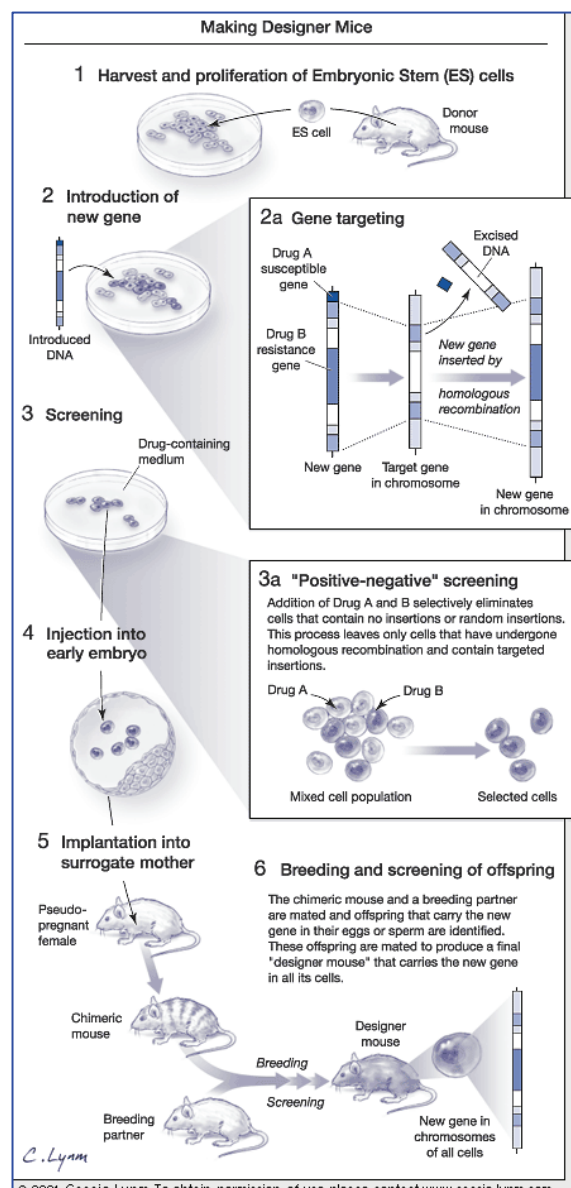
#### **6.1.1. Principe**

Le principe général d'une souris transgénique est l'insertion d'une séquence d'ADN (gènes, promoteurs, régions régulatrices ou fragment comportant des mutations) dans le génome de la souris afin d'observer son action (pour revue, voir (van der Weyden, Adams et al. 2002). Cependant, l'insertion de tels fragments dans une cellule de mammifère peut se faire suivant deux modes. Le premier, consistant en une injection pro nucléaire de l'ADN exogène dans un œuf fertilisé (Palmiter and Brinster 1986), présente le désavantage de l'intégration aléatoire du fragment et de la nécessité d'une surexpression du transgène pour produire le phénotype désiré (van der Weyden, Adams et al. 2002). À l'inverse, l'ADN exogène peut servir à modifier les cellules souches embryonnaires (« embryonic stem » ou, ES) de souris qui seront par la suite injectées dans un blastocyte (Kuehn, Bradley et al.

1987). Cette méthode présente l'avantage, en faisant appel à la recombinaison homologue entre le fragment exogène et la séquence homologue correspondante de l'ADN de la cellule ES avant l'injection dans le blastocyte (stade embryonnaire 3,5 jours), d'une insertion à un locus donné (Kuehn, Bradley et al. 1987) (**Figure 36**). Ce procédé, dénommé « targeting gene » et ciblant le gène de l'hypoxanthine-guanine-phosphorybosyltransférase (*Hprt*, un gène localisé sur le chromosome X requis pour la synthèse des purines et de ce fait exprimé ubiquitairement), a valu à ses auteurs, M. R. Capecchi, M. J. Evans et O. Smithies, le Prix Nobel de Médecine et Physiologie en 2007 (Smithies, Gregg et al. 1985; Doetschman, Gregg et al. 1987; Kuehn, Bradley et al. 1987; Thomas and Capecchi 1987). Cette technique permet, de plus, de contrôler le nombre de copies de l'insert ainsi que leurs orientations et le niveau d'expression de ceux-ci est le même dans toutes les lignées comportant la même construction (Guillot, Guan et al. 1999).

**Figure 36. Principe du « targeting gene » par recombinaison homologue dans les cellules ES.** Image tirée de l'URL [http://www.laskerfoundation.org/awards/2001\\_b\\_description.htm](http://www.laskerfoundation.org/awards/2001_b_description.htm).

Brièvement, la construction d'intérêt est insérée dans les cellules ES par électroporation. Puis ces cellules sont cultivées en présence d'un agent de sélection (milieu HAT, contenant de l'hypoxanthine, de l'aminoptérine et de la thymidine) dans le but d'éliminer les cellules qui n'ont pas intégré dans leur génome la construction de manière stable. Après vérification (par PCR et southern blot), les cellules contenant le fragment exogène sont injectées dans les blastocytes et transférées dans une souris porteuse. Par la suite, les mâles issus de cette mère porteuse présentant un haut pourcentage de chimérisme sont croisés avec des souris femelles sauvages. Les souris issues de ce croisement, génération F1 hétérozygotes, sont croisées entre elles afin d'obtenir des souris homozygotes comportant toutes le transgène (van der Weyden, Adams et al. 2002).



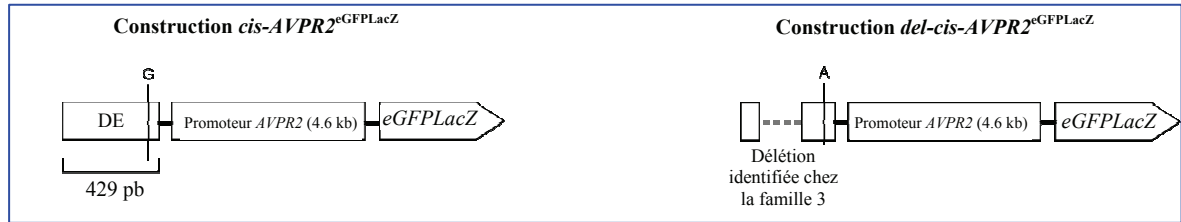
## **6.1.2. Introduction de la séquence régulatrice dans le locus *Hprt* de la souris**

Afin d'étudier *in vivo* le rôle de la délétion observée dans une des familles, nous avons cloné celle-ci ainsi que le promoteur de l'*AVPR2* dans différents vecteurs. Ces derniers sont ensuite employés pour générer les souris transgéniques grâce à la technologie décrite ci-dessus.

### **6.1.2.1. Constructions et vecteurs utilisés**

La séquence correspondant à la zone délétée de 102 bp est clonée en amont du promoteur de l'*AVPR2* tel que décrit par A. Calmont et al. (Calmont, Reichwald et al. 2000) et comportant le fragment de 4.6 kb et l'ensemble est ensuite cloné dans le vecteur d'entrée pEntry LacZ. Nous avons utilisé un second vecteur d'entrée, pENTR1A-eGFPLacZ comportant, en plus de *LacZ*, un second gène rapporteur, le gène de la *GFP* (« green fluorescence protein »). Un troisième vecteur, le vecteur de destination, comportant le promoteur ainsi que le premier exon du gène *Hprt* humain suivi de la séquence génomique de ce même gène, mais murin, est utilisé afin de cloner la séquence correspondant à la délétion, le promoteur de l'*AVPR2* ainsi que le gène de fusion *GFPLacZ* contenus dans le second vecteur. Ceci dans le but, en plus d'insérer le transgène, de recréer le locus *Hprt* dans les cellules ES. Ce vecteur final est dénommé *cis-AVPR2<sup>eGFPLacZ</sup>*. Un second vecteur de destination est créé suivant le même modèle mais cette fois-ci comportant la délétion de 102 pb et appelé pour cette raison *del-cis-AVPR2<sup>eGFPLacZ</sup>*.

Il est important de noter qu'en plus de la délétion de 102 pb, le fragment cloné dans ce second vecteur comporte en plus le polymorphisme observé dans la famille 3 (substitution d'une guanine par une adénine) ce qui représente un fragment de 429 pb (**Figure 37**, page 148).



**Figure 37. Représentation schématique des constructions utilisées pour étudier le rôle de l'élément activateur dans les souris transgéniques.**

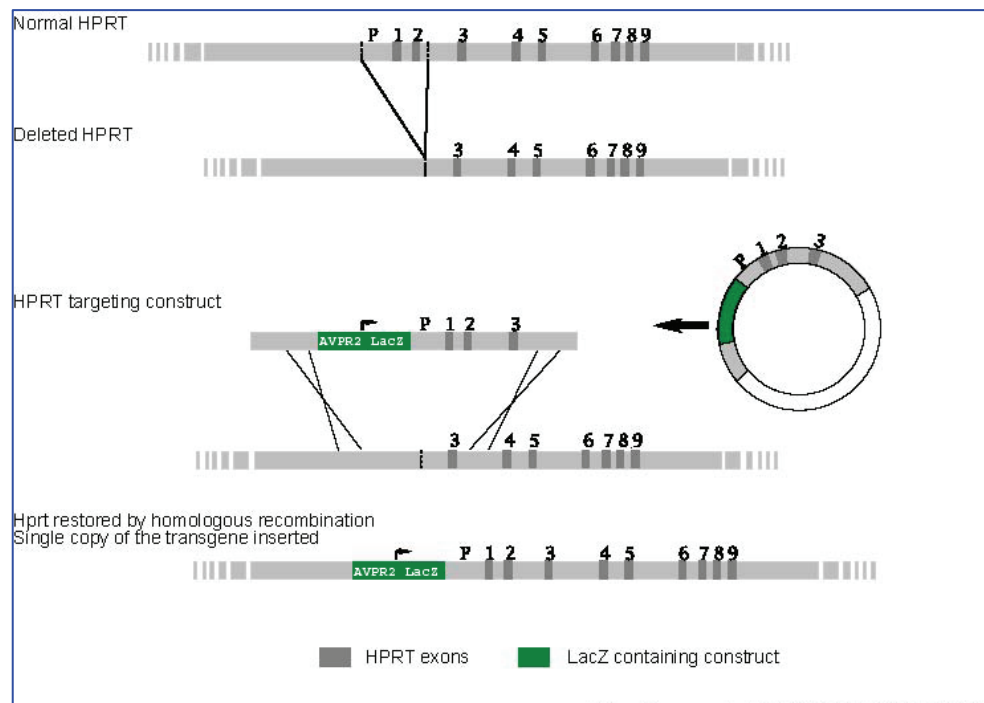
La construction *cis-AVPR2<sup>eGFPLacZ</sup>* (à gauche) sert de contrôle positif car devant permettre une expression « tissu spécifique » au niveau rénal. La seconde, *del-cis-AVPR2<sup>eGFPLacZ</sup>* (à droite), devant démontrer une absence d'expression du fait de la délétion de 102 pb et de la présence du polymorphisme.

NB: Le fragment complet, représentant la séquence de la molécule d'ADN englobant la délétion et le polymorphisme a une longueur totale de 429 pb. Par conséquent, le fragment délété, en plus de contenir le polymorphisme, comporte deux fragments d'ADN génomique (matérialisés par les rectangles de part et d'autres de la délétion représentée par les pointillés).

### 6.1.2.2. Cellules souches embryonnaires et recombinaison homologue

Les deux vecteurs décrits ci-dessus, *cis-AVPR2<sup>eGFPLacZ</sup>* et *del-cis-AVPR2<sup>eGFPLacZ</sup>*, sont introduits dans des cellules ES, dépourvues d'un gène *Hprt* fonctionnel, issues de souris C57Bl/6. En effet, ces cellules comportant une délétion du promoteur ainsi que des deux premiers exons de ce gène, ne pourront croître, sur milieu sélectif, milieu HAT, que lorsque le gène *Hprt* sera reconstitué (**Figure 38**, page 149). De plus, le fait que ce gène ne soit pas fonctionnel, implique que l'insertion de celui-ci par recombinaison homologue permettra de s'assurer que le transgène est inséré à la bonne place, dans la bonne orientation ainsi qu'en une seule copie (Bronson, Plaehn et al. 1996).

La recombinaison est rendue possible dans les cellules ES par l'intermédiaire des séquences de recombinaison attR1 et attR2 localisées de part et d'autre du transgène et de l'ensemble promoteur/exons 1, 2 et 3 du vecteur de destination. Séquences qui sont homologues à celles retrouvées dans le locus endogène.



**Figure 38. Reconstitution du locus *Hprt*. D'après (Bronson, Plaehn et al. 1996).**

Le gène *Hprt* normal est représenté en haut et celui présent dans les cellules ES est représenté en dessous. Celui-ci comporte l'ensemble promoteur/exons 1 et 2 délétés. Le vecteur de destination, comportant le fragment d'ADN d'intérêt (séquence supposée régulatrice, promoteur de l'*AVPR2* et gène rapporteur) ainsi que l'ensemble promoteur/exons 1, 2 et 3 du gène *Hprt* est tout d'abord linéarisé par digestion enzymatique puis injecté dans les cellules ES. La recombinaison homologue dans les cellules permet de recréer un gène *Hprt* normal et donc permettant aux cellules de croître tout en comportant le transgène dans une quantité, une orientation ainsi qu'un locus précis.

### 6.1.2.3. Obtention de lignées homozygotes

Les cellules ES présentent un caryotype mâle et sont, donc, toutes hémizygotés pour le locus *Hprt* délété. Par conséquent, après sélection sur milieux HAT (culture des cellules pendant une dizaine de jours), les cellules sélectionnées ayant reconstitué le locus *Hprt* et contenant le transgène le seront également. Ceci facilitera l'obtention de souris hétérozygotes lors du croisement avec les souris C57Bl/6 sauvages. En effet, suite à l'injection des cellules ES dans le blastocyte et à la réimplantation dans une souris porteuse,

les mâles chimères issus de ce croisement sont croisés avec les souris femelles sauvages. Les souris ainsi obtenues, génération F1, seront soit des femelles hétérozygotes pour le transgène, soit des mâles non transgéniques c'est-à-dire ne contenant pas le transgène. Par la suite les femelles hétérozygotes pour le transgène sont utilisées pour obtenir des mâles transgéniques hémizygotés, suite au croisement avec des mâles sauvages. Enfin, le croisement des souris mâles ainsi obtenus avec des femelles transgéniques permettra d'obtenir des femelles homozygotes pour chacun de nos deux transgènes, *cis-AVPR2<sup>eGFPLacZ</sup>* et *del-cis-AVPR2<sup>eGFPLacZ</sup>*.



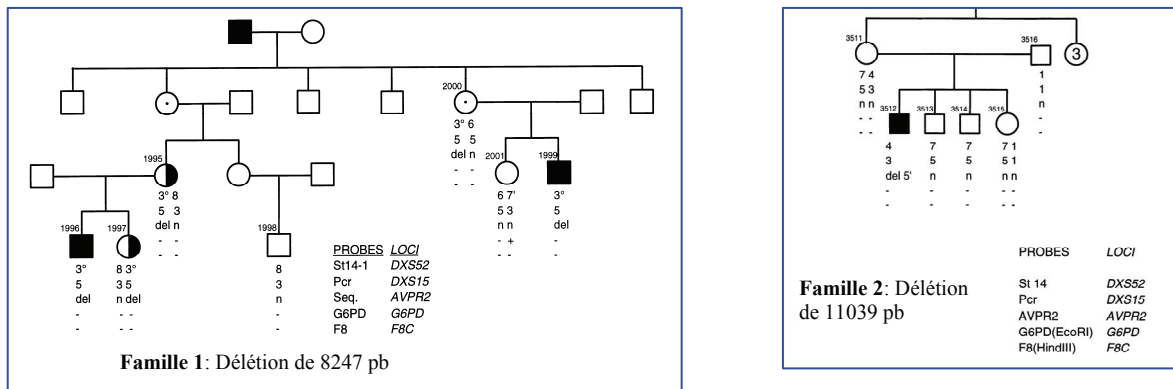
# Résultats

## 7. Identification des zones délétées chez les patients atteints de DIN

### 7.1. Phénotype des patients porteurs de délétions et confirmation de la transmission liée à l’X

Pour l’heure, le laboratoire a identifié, chez différents patients atteints de DIN et appartenant à 6 familles indépendantes, 5 grandes délétions localisées très en amont de l’*AVPR2* et une délétion de 102 pb. Celle-ci est partagée par chacune des 5 autres grandes délétions. De plus, ces personnes présentent, à la fois des séquences codantes pour l’*AVPR2* et l’*AQP2* totalement normales, ainsi qu’un DIN dans sa forme « pure », c'est-à-dire correspondant à la définition restreinte et se traduisant uniquement par des pertes hydriques considérables accompagnées d’une osmolalité très faible.

La construction des arbres généalogiques de chacune des 6 familles, établis grâce aux prélèvements sanguins des membres de la famille disponibles et à la recherche des marqueurs du locus Xq28, confirme la transmission liée à l’X de la pathologie (**Figure 39a et b**, page 153).

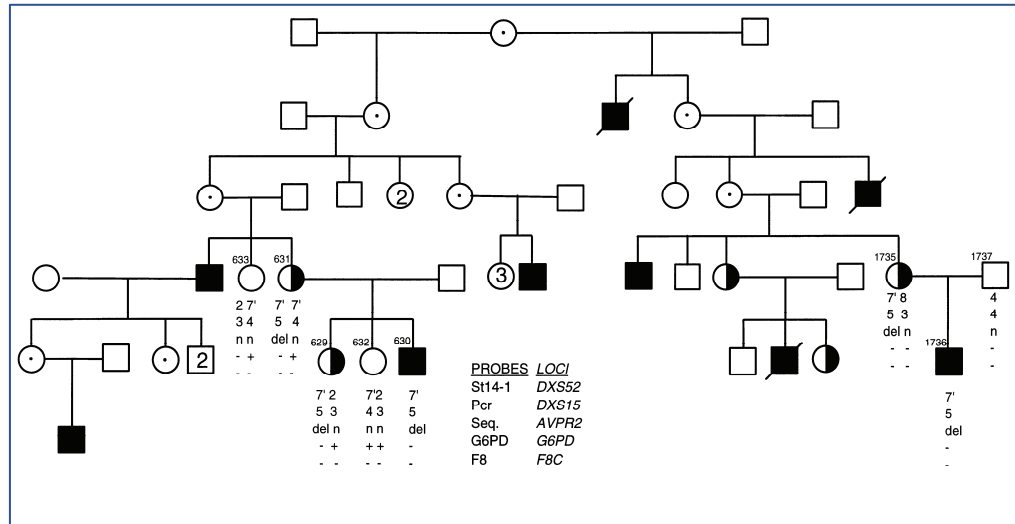


**Figure 39a. Arbres généalogiques des familles 1 et 2 porteuses de délétions en amont de l’*AVPR2*.**

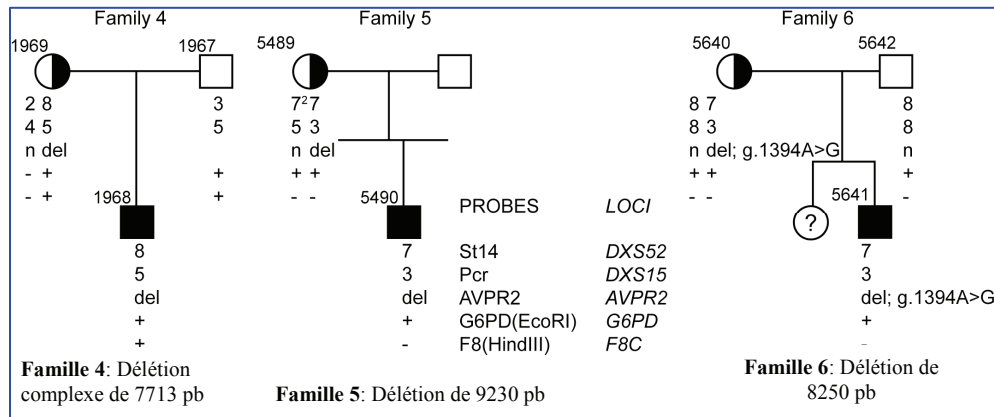
Les chiffres au dessus des symboles indiquent que l’ADN du locus Xq28 a été analysé et les numéros à l’intérieur des symboles précisent le nombre de mâles non affectés par la maladie.

**Légende:** ■ : Patients atteints de DIN; ● : Femmes hétérozygotes porteuses de la délétion;

⊙ : Femmes transmettrices impliquées; ▬ : Patients décédés.



**Famille 3:** Délétion de 102 pb. Les patients 630 et 1736 ont subi le test au dDAVP. : les réponses hémodynamiques et coagulantes sont normales mais leurs osmolalités urinaires sont insensibles à ce composé.



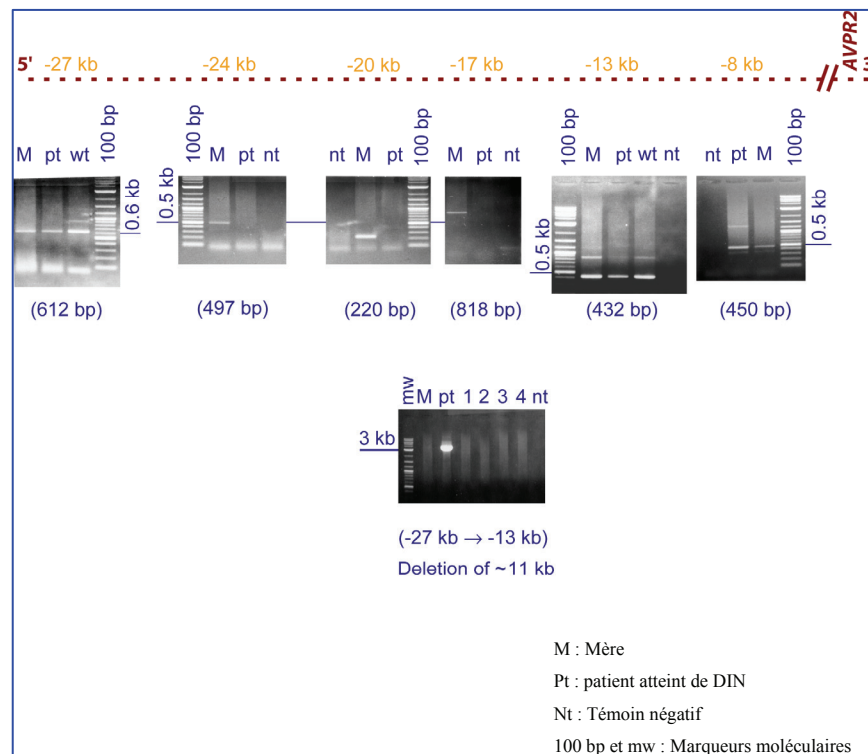
**Figure 39b. Arbres généalogiques des familles 3 à 6 porteuses de délétions en amont de l'AVPR2.**

Les chiffres au dessus des symboles indiquent que l'ADN du locus Xq28 a été analysé et les numéros à l'intérieur des symboles précisent le nombre de mâles non affectés par la maladie.

**Légende:** ■ : Patients atteints de DIN; ● : Femmes hétérozygotes porteuses de la délétion;  
 ⊙ : Femmes transmettrices impliquées; ▣ : Patients décédés.

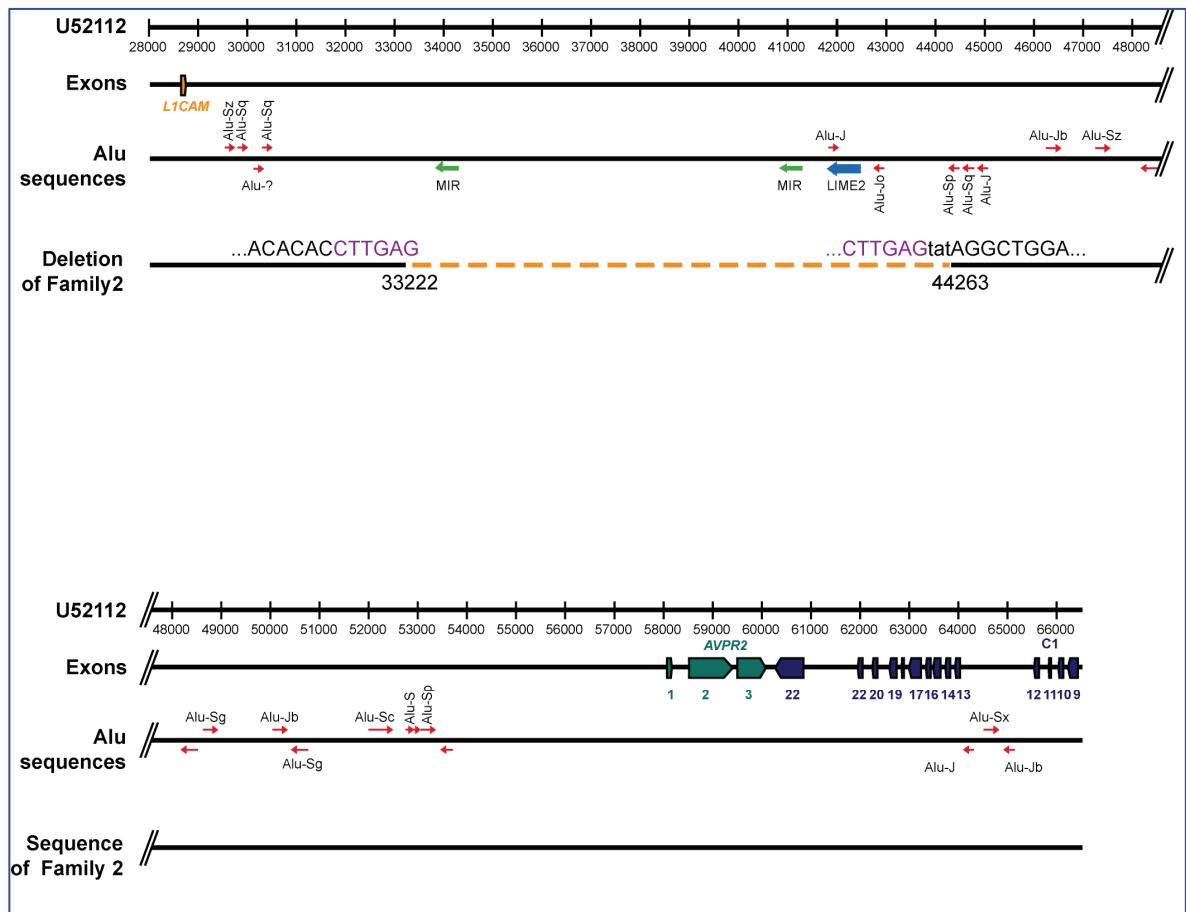
## 7.2. Détermination des délétions et des points de cassure

L'analyse PCR suivie d'un séquençage de l'ADN du patient mâle de la famille 2 ainsi que de sa mère, non porteuse de la délétion et ce faisant servant de contrôle positif, a facilité la mise en évidence de la délétion de plus de 11 kb. Les couples d'amorces, utilisés pour amplifier sélectivement des petites régions de l'ADN couvrant au total environ 27 kb en amont du gène, ont permis de délimiter les points de cassure; un exemple est donné pour l'identification de la délétion de 11 kb (manuscrit en préparation) (**Figure 40 et 41**, page 155).



**Figure 40. Détermination de la délétion de 11 kb et des points de cassure.**

Une région de 27 kb est analysée par PCR avec 6 couples d'amorces permettant d'amplifier, respectivement, les zones se situant à -27, -24, -20, -17, -13 et -8 kb en amont de l'*AVPR2*. Suite à l'amplification par le couple d'amorce de la région -27, un fragment de 612 pb est attendu: la mère (M), non porteuse de la délétion, et le fils (pt), porteur de la délétion, présentent l'un et l'autre le fragment à la taille désirée. De la même manière, les amplifications des régions -24, à -17 donnent, pour la mère, contrairement au fils, les fragments à la taille attendue (respectivement 497, 220 et 818 pb). L'analyse des régions -13 et -8 kb donne, pour la mère comme pour le fils, les fragments attendus (respectivement 432 et 450 pb) indiquant que cette région est intacte. Par la suite, une amplification avec l'amorce externe de la région -27 et l'amorce interne de la région -13 kb donne un fragment de seulement 3 kb pour le patient alors que la taille attendue est de 14 kb. Ceci indique donc une délétion de 11 kb qui est par la suite confirmée par séquençage des points de cassure.



**Figure 41. Délimitation des points de cassure de la délétion de 11039 pb.**

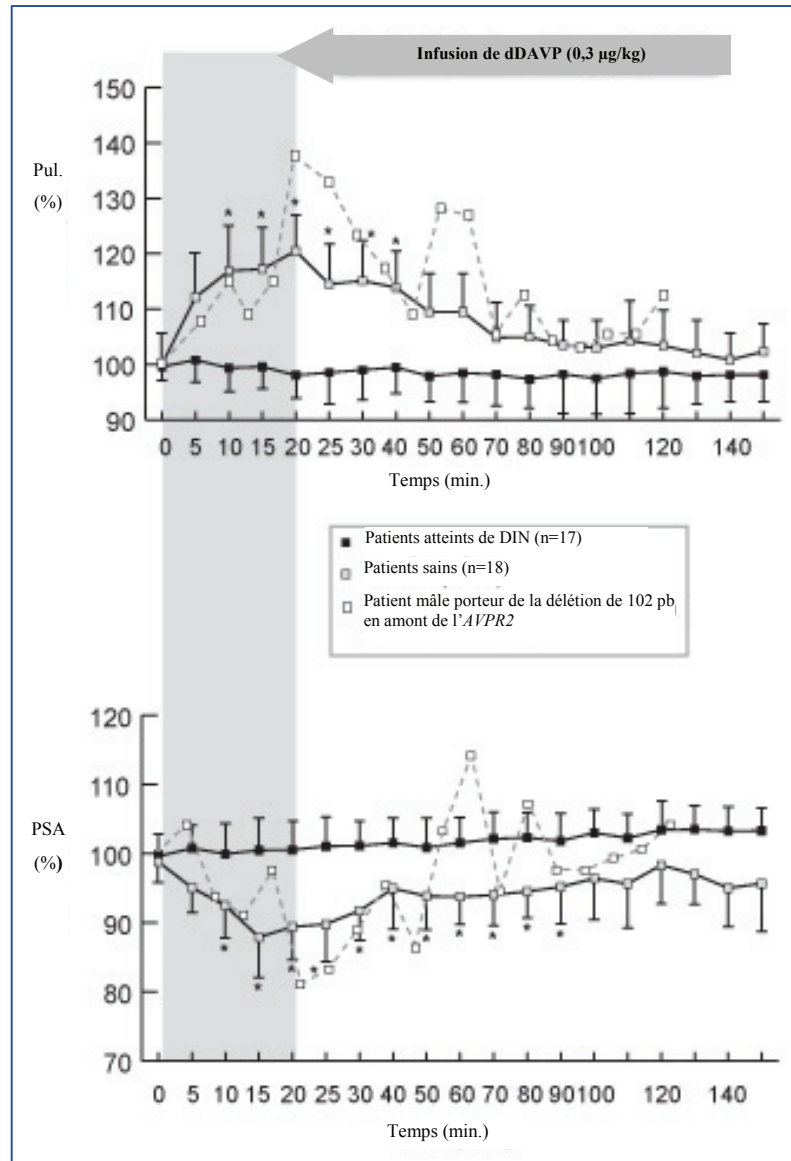
Suite à la détermination de la taille de la délétion, le séquençage du produit issu de la PCR utilisant les amorces, externe et interne, des deux dernières régions amplifiées permet d'obtenir de façon précise les points de cassure.

La séquence décrite ci-dessus représente le locus Xq28 de la position 28000 à 66000 kb à partir du centromère (numérotation de la séquence suivant le numéro d'accèsion Genbank U52112).

### 7.3. Effet de l'administration de dDAVP aux patients porteurs de délétions

Comme il a été mentionné dans l'introduction, la plupart des personnes atteintes de DIN suite à des mutations touchant le gène de l'*AVPR2* présentent des réponses hémodynamiques et coagulantes suite à l'administration de dDAVP totalement différentes de celles observées chez des personnes « saines » ou atteinte de DIN autosomique récessif secondaire aux mutations de l'*AQP2* (voir « Le DIN lié à l'X » page 15). Or, chez deux patients mâles porteurs de la délétion de 102 pb, famille 3, ces réponses sont semblables à celles observées chez les personnes saines: la pression sanguine diminue (**Figure 42**, page 157), l'activité de la rénine plasmatique augmente (**Figure 43**, page 158) et le facteur de von Willebrand est également augmenté (**Figure 44**, page 159).

Il est important de noter que le laboratoire, malgré sa très grande expertise en matière de caractérisation génotypique et phénotypique de la maladie, n'a jamais mis en évidence, chez des patients atteints de DIN lié à l'X causé par des mutations des séquences codantes de l'*AVPR2*, des réponses hémodynamiques et coagulantes normales. Second point important à mentionner, seuls les patients de la famille 3 ont été testés par la dDAVP et bien que nous pensions que les réponses des patients des autres familles soient similaires à celles observées chez les porteurs de la délétion de 102 pb, nous n'en avons pas la preuve formelle. Malgré tout, un doute subsiste quant aux résultats potentiels à ce test pour la famille 4 (voir « Récapitulatif des délétions identifiées », page 160).

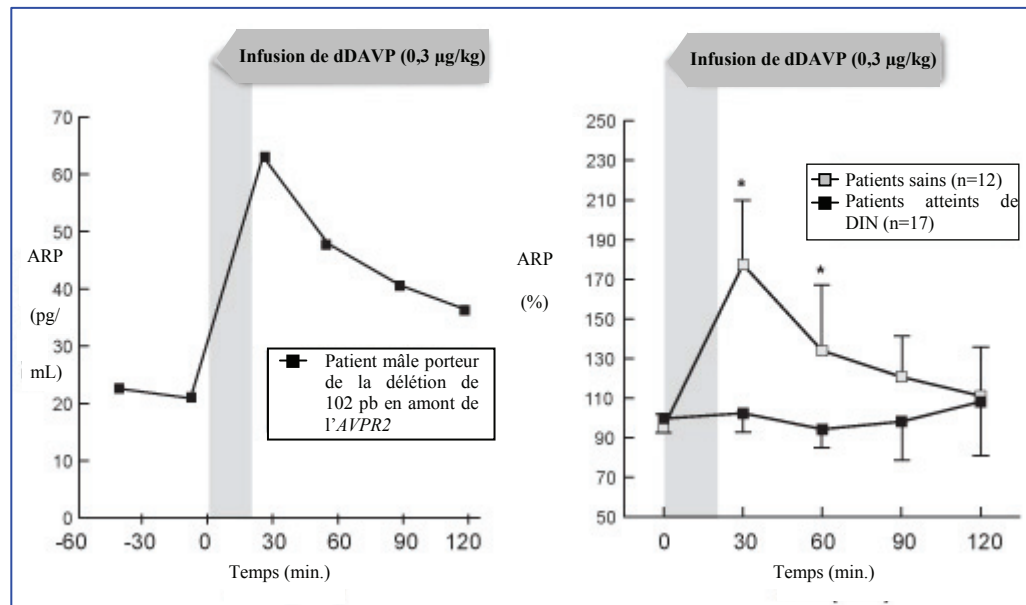


**Figure 42. Comparaison de l'effet du dDAVP sur les pulsations (Pul.) et la pression sanguine artérielle (PSA) entre des sujets sains, des patients atteints de DIN par mutation de l'AVPR2 et un sujet mâle porteur de la délétion de 102 pb.**

Les réponses observées chez le patient porteur de la délétion de 102 pb sont relativement similaires à celles obtenues chez les personnes saines. À l'opposé, elles sont totalement différentes de celles observées chez les patients atteints de DIN lié à l'X dû à des mutations du gène chez qui une absence de réponse est observée. Par conséquent, les réponses hémodynamiques sont normales chez cette personne.

À des fins de clarté, seules les barres supérieures, pour les sujets sains, et inférieures, pour les patients atteints de DIN lié à l'X, des écarts-types sont représentées. Les astérisques indiquent des différences significatives par rapport à la valeur basale. Les mesures répétées dans chaque groupe de sujets ont été comparées avec les valeurs basales suivant la méthode de Dunnet (Bichet, Razi et al. 1988; Bichet, Razi et al. 1989).

NB: Les analyses statistiques n'ont pu être réalisées chez les patients porteurs de délétion du fait que seul un patient de la famille 3 a pu être testé par le dDAVP.

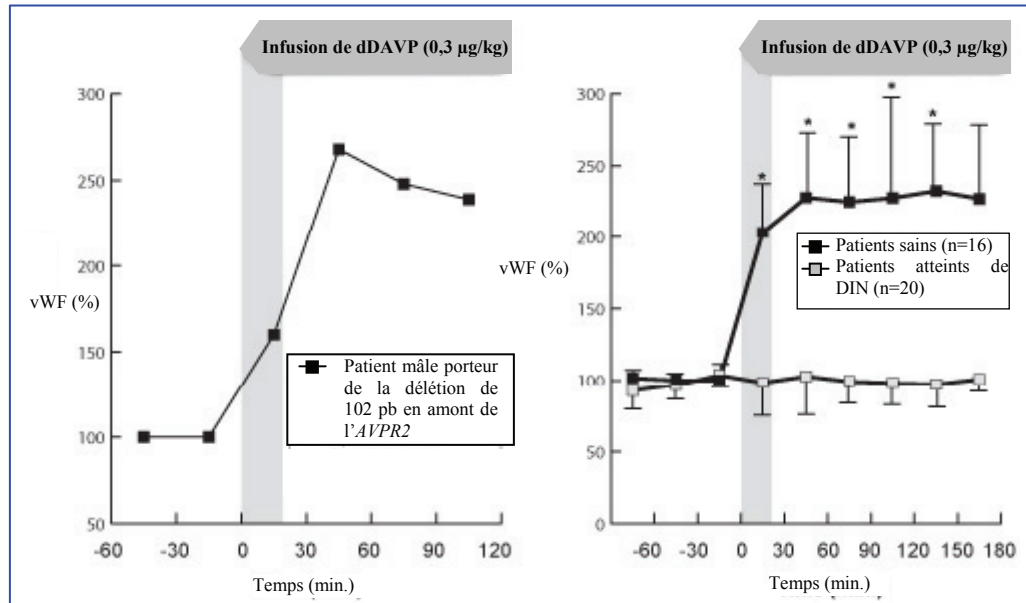


**Figure 43. Comparaison de l'effet du dDAVP sur l'activité de la rénine plasmatique (ARP) chez le patient porteur de la délétion (à gauche) par rapport à l'effet observé chez les sujets sains et atteints de DIN lié à l'X dû aux mutations de l'AVPR2.**

Chez le patient porteur de la délétion, la réponse de l'activité de la rénine au dDAVP est identique à celle observée chez les sujets sains. Une nouvelle fois, ces résultats sont totalement à l'opposé de ceux obtenus habituellement chez les patients atteints de DIN dont l'AVPR2 est retrouvé muté puisqu'aucun effet notable n'est observé. En conclusion, nous pouvons voir que l'activité de la rénine plasmatique est normale.

NB: les analyses statistiques sont identiques à celles indiquées à la figure 42.





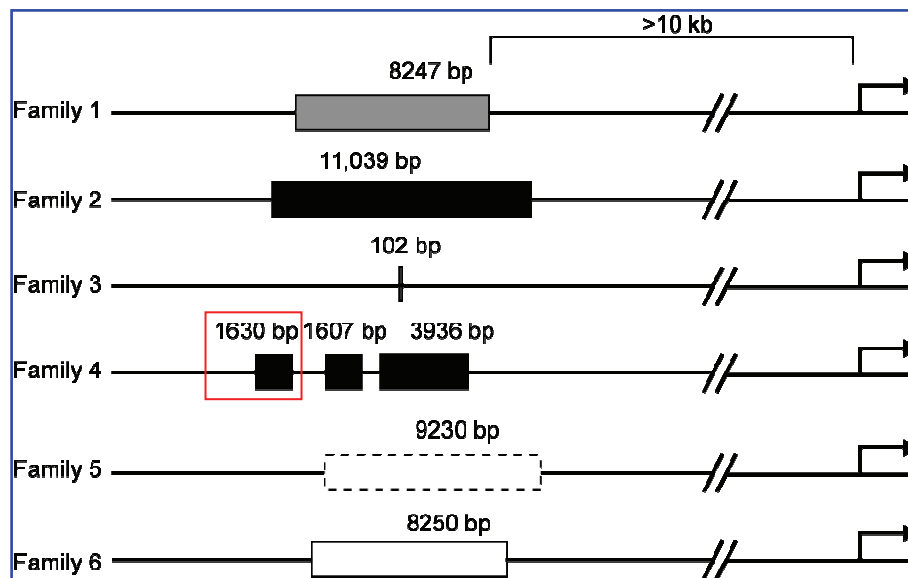
**Figure 44. Comparaison de l'effet du dDAVP sur la sécrétion du facteur de von Willebrand (vWF) chez le patient atteint de DIN porteur de la délétion de 102 pb (à gauche) et chez des sujets sains et des personnes atteintes de DIN lié à l'X avec mutations du gène de l'AVPR2 (à droite).**

Le fait d'administrer du dDAVP au sujet porteur de la délétion entraîne une augmentation importante de la sécrétion du facteur de von Willebrand. Cette réponse est similaire à celle observée chez les sujets sains (augmentation de 2,5 fois dans les deux cas). À contrario, l'injection de cet analogue de l'AVP n'engendre aucun effet sur la sécrétion du facteur chez les patients atteints de DIN lié à l'X causé par des mutations du gène de l'AVPR2.

NB: les analyses statistiques sont identiques à celles indiquées à la figure 42.

## 7.4. Récapitulatif des délétions identifiées

L'ensemble des délétions ainsi que des points de cassure a été obtenu suivant le même procédé que précédemment décrit. Ainsi nous avons pu identifier 6 grandes délétions localisées dans la même région génomique (manuscrit en préparation) (**Figure 45**).



**Figure 45.** Schéma récapitulatif des délétions identifiées dans les six familles avec DIN.

La séquence d'ADN codant l'*AVPR2* est retrouvée intacte dans chacune des six familles et les délétions sont localisées plus de 10 kb en amont du gène. Le site d'initiation de la transcription est indiqué par une flèche.

NB: La délétion identifiée chez la famille 4 est une délétion complexe et l'extrémité 5' de la délétion de 1630 pb (cerclée en rouge) n'est pas commune aux autres délétions répertoriées.

D'après ce schéma, en plus de voir que la plus petite délétion, 102 pb, est commune aux 5 autres, nous pouvons constater que la famille 4 ne comporte pas une seule et même délétion, mais 3. Ce point important, conjugué au fait que le test à la dDAVP n'a pas été réalisé, et qui peut donc s'avérer négatif, peut permettre d'imaginer que dans la délétion la plus en 5' (1630 pb dont une grande partie n'est pas commune aux 5 autres délétions) il existerait un élément qui pourrait éventuellement jouer un rôle dans l'expression

extrarénale de l'*AVPR2*. De plus, il est important de mentionner que la délétion de 102 pb s'accompagne d'une substitution nucléotidique (une adénine remplace une guanine) 222 pb en aval de la délétion. Devant le fait qu'il a été très difficile, lors de la fabrication des différentes constructions, de dissocier la délétion du polymorphisme A, ce dernier pourrait jouer un rôle dans la stabilisation de la molécule d'ADN en présence de la délétion. En outre, une recherche de ce polymorphisme sur plus de 51 allèles de personnes atteintes de DIN ou saines, s'est révélée infructueuse. Par conséquent, il est fort probable que les deux événements, délétion et polymorphisme, aient eu lieu lors du même mécanisme mutationnel.

L'ensemble de ces observations, présence de délétions chez des personnes de sexe masculin atteints de DIN lié à l'X mais comportant des gènes *AVPR2* et *AQP2* intacts et présentant des réponses hémodynamiques et coagulantes normales, laisse à penser:

1. que les délétions, et en particulier la délétion de 102 pb commune aux 6 familles, joueraient un rôle important dans l'expression de l'*AVPR2* au niveau des cellules du tubule collecteur;
2. qu'il existerait bel et bien des récepteurs *AVPR2* extrarénaux et que leur expression serait sous la dépendance d'autres séquences régulatrices.

Devant la complexité des expériences à réaliser, nous nous sommes attachés à répondre à la première hypothèse. Par conséquent, les expériences suivantes ont pour seul but de confirmer le rôle de la délétion dans l'expression de l'*AVPR2* au niveau rénal.

## **8. Confirmation du rôle « enhancer » de l'élément distal dans les cellules rénales**

Lors d'expériences précédentes, nous avons pu démontrer que la délétion de 102 pb (dénommée DE) seule présentait un effet « augmenteur » dans les deux lignées rénales, que cet effet n'était influencé par aucune des deux séquences identifiées précédemment par A. Calmont et al., CSE1 et CIE1 et enfin, que le DE comportait possiblement deux zones responsables de cet effet (**Tableau 5, Figures 50 à 52**, pages 170 à 172, et (Debrand 2004)). Devant le fait qu'aucun des éléments impliqués jusqu'alors dans l'expression de l'*AVPR2* ne semblait influencer sur l'effet intrinsèque du DE, l'ensemble des expériences suivantes ont été réalisées avec la séquence comportant les deux éléments régulateurs CSE1 et CIE1 ainsi que le « promoteur minimal », ainsi nommé par les auteurs, soit un fragment total de 4.6 kb.

**Tableau 5. Récapitulatif des résultats précédents (Debrand 2004).**

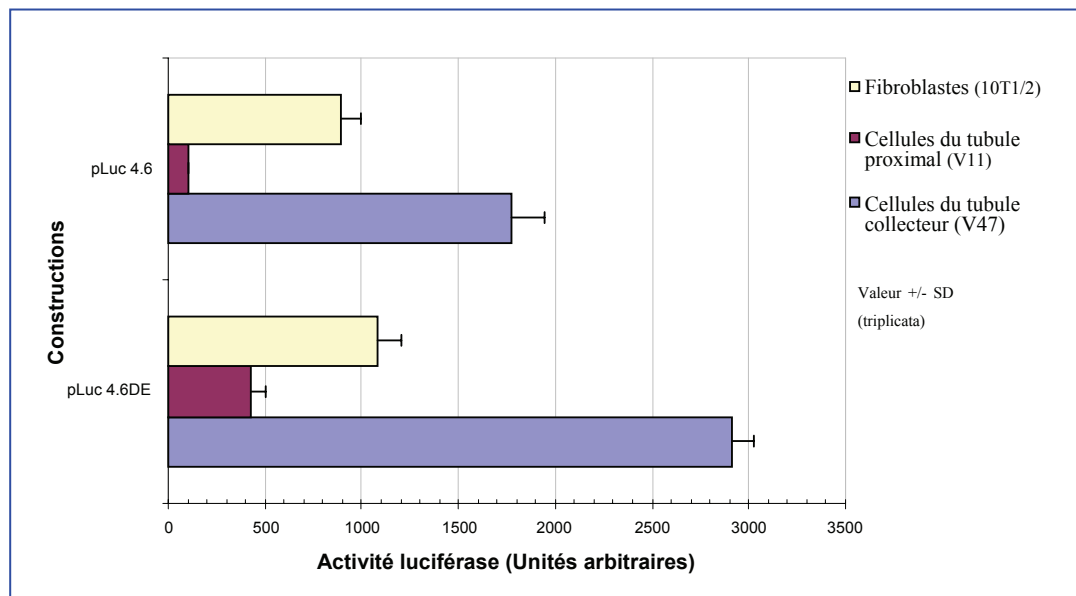
Fragment (kb)	Niveau d'expression du gène rapporteur de la luciférase		
	Cellules tubule collecteur (V47)	Cellules tubule proximal (V11)	Fibroblastes (10T1/2)
1.4	+	+	+
2.5	-	a	a
4.6	+	+	+
1.4 DE	++++	++++	+
2.5 DE	++++	a	a
4.6 DE	++++	++++	+

**Légende:** 1.4 = « promoteur minimal » de l'*AVPR2* (1400 pb); 2.5 = « promoteur minimal » + CIE1 (2500 pb); 4.6 = « promoteur minimal » + CIE1 + CSE1 (4600 pb) (Calmont, Reichwald 2000); + = proportionnel au niveau d'expression; a= résultats non disponibles.

### **8.1. Comparaison de l'effet dans les trois lignées cellulaires**

Afin de confirmer le rôle « tissu spécifique » du DE, nous avons analysé et comparé son effet dans la lignée fibroblastique par rapport aux lignées rénales (**Figure 46**, page 163). Dans ce but, nous avons cloné le DE en amont du fragment de 4.6 kb du « promoteur » de

l'*AVPR2* dans le vecteur d'expression pLuc et transfecté ce dernier dans les cellules du tubule collecteur, du tubule proximal et dans les fibroblastes. Si le DE joue un rôle « tissu spécifique », alors les deux premières lignées citées devraient démontrer une augmentation du niveau d'expression ; à l'opposé, celui-ci ne devrait avoir aucun effet notable dans les fibroblastes dans la mesure où ceux-ci n'expriment pas l'*AVPR2*.



**Figure 46. Comparaison de l'effet du DE dans trois lignées cellulaires.**

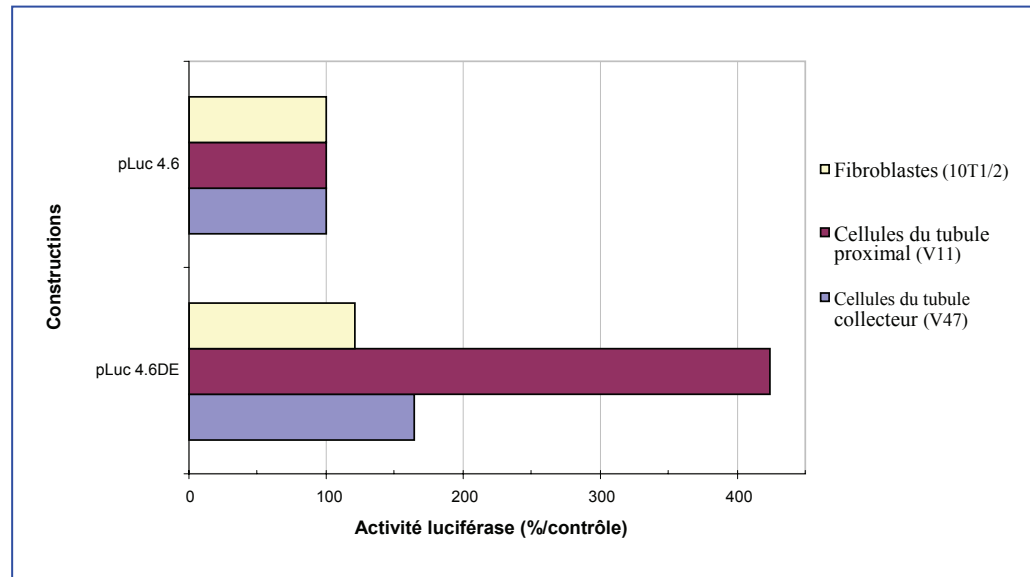
La construction « pLuc 4.6 » correspond au vecteur d'expression dans lequel seul le fragment de 4.6 kb du promoteur de l'*AVPR2* a été cloné en amont du gène de la luciférase. Pour rappel, ce fragment comporte l'ensemble des éléments identifiés par A. Calmont et al. soit, CSE1, CIE1 et le « promoteur proximal ». Le vecteur « pLuc 4.6DE », quant à lui, comporte en plus le DE. Par conséquent, l'effet observé est directement imputable au DE.

Comme il est habituellement rencontré lors d'expériences de ce type, les unités de mesure de luminescence sont arbitraires. Les valeurs obtenues correspondent à une série de mesures effectuée en triplicata et seuls les écarts-types supérieurs sont représentés (barres).

Comme nous pouvons le voir sur ce graphique, et bien que le niveau basal d'expression (pLuc 4.6) soit relativement élevé dans le cas des fibroblastes et des cellules du tubule collecteur, le fait de cloner le DE entraîne bel et bien une augmentation du niveau

d'expression du gène rapporteur dans les lignées rénales: pour les cellules du tubule collecteur, 1776 et 2914 unités respectivement sans et avec le DE; pour les cellules du tubule proximal, 100 et 424 unités alors que pour les fibroblastes, l'absence de DE entraîne une expression de 890 unités, et sa présence, de 1080 unités. Second point intéressant à noter, l'effet du DE semble plus important dans les cellules du tubule proximal que dans les cellules du tubule collecteur; ce qui va à l'encontre de ce qui est observé physiologiquement, à savoir, une expression de l'*AVPR2* dans le tubule collecteur et une absence d'expression dans le tubule proximal. Cette observation tend à démontrer que le DE permettrait bien une expression « tissu spécifique » mais non « cellule spécifique » de l'*AVPR2* ce qui pousse à croire que la régulation de l'expression de ce gène n'est pas aussi « simpliste » qu'initialement proposé et ferait appel à d'autres régions. Cependant, nous pouvons noter que les niveaux d'expression, avec ou sans DE, sont beaucoup moins élevés dans les cellules du tubule proximal, respectivement 424 et 100 unité arbitraires, que dans les cellules du tubule collecteur, 2914 et 1776 respectivement.

Si le graphique précédent permet d'observer un effet direct du DE sur le niveau d'expression du gène rapporteur, les données ne traduisent pas de manière irréfutable cet effet. Par conséquent, nous avons repris les mêmes résultats, moyenne de chaque triplicata, mais cette fois-ci en les exprimant en pourcentage par rapport à un contrôle propre à chaque lignée cellulaire. Celui-ci est défini comme étant le niveau d'expression basal observé dans chacune des lignées cellulaires ayant été transfectées par le vecteur d'expression ne contenant que le fragment de 4.6 kb. Cette valeur est arbitrairement définie comme correspondant à 100% puis les résultats obtenus dans les mêmes lignées mais transfectées avec le vecteur contenant le DE leur sont rapportés (**Figure 47**, page 165).



**Figure 47. Effet du DE dans les trois lignées cellulaires par rapport aux contrôles.**

Chacune des valeurs obtenues dans les trois lignées cellulaires ne contenant que le promoteur de l'*AVPR2*, pLuc 4.6, est considérée comme correspondant au niveau d'expression basal (100%). Les résultats obtenus dans ces mêmes lignées, mais cette fois-ci avec le DE cloné en amont du promoteur, pLuc 4.6DE, sont rapportés à chacun des contrôles.

Dans la mesure où ces valeurs correspondent aux pourcentages de chacune des moyennes rapportées aux moyennes des niveaux de base dans chaque lignée, aucun écart-type n'est possible.

Les moyennes sont obtenues sur une série de mesures réalisée en triplicata.

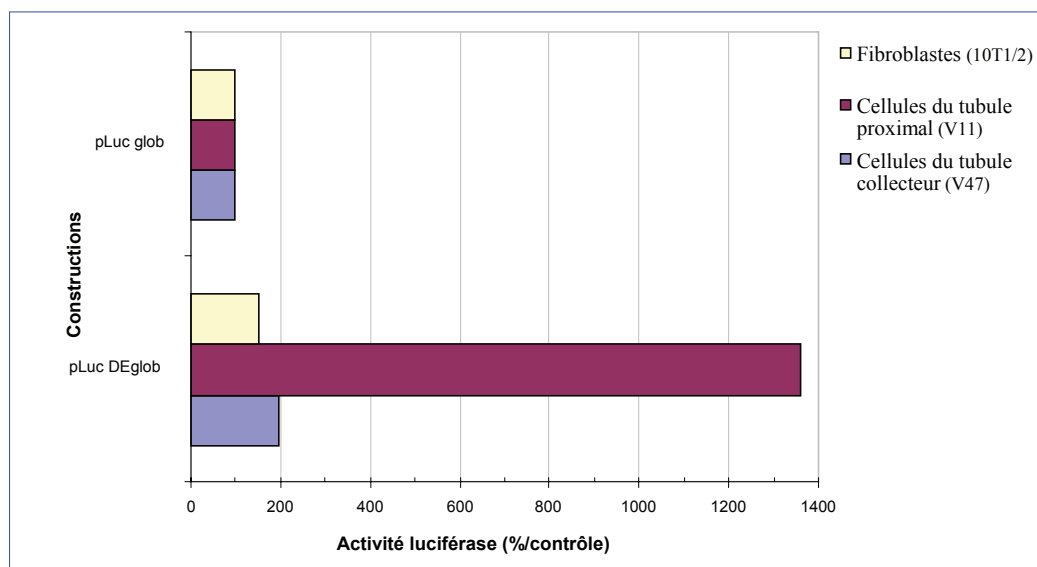
Cette manière de présenter les résultats permet de confirmer le rôle du DE dans les lignées rénales, à fortiori dans les cellules du tubule proximal. En effet, l'augmentation du niveau d'expression n'est que d'environ 1,7 fois, soit une augmentation de 70%, dans les cellules du tubule collecteur alors que celle-ci est de plus de 4 fois dans les cellules du tubule proximal, soit plus de 400%. Dans le même temps, l'effet du DE dans les fibroblastes est dérisoire puisqu'il est d'à peine plus d'une fois celui du contrôle ce qui correspond à environ 20% d'augmentation par rapport au contrôle.

Cette première série d'expériences nous permet, par conséquent, de dire que le DE joue effectivement le rôle « d'enhancer » « tissu spécifique » qu'on lui prêtait. Cependant celui-

ci semble plus important dans le tubule proximal que dans le tubule collecteur. L'étude de l'effet du DE sur l'activité d'un promoteur hétérologue devrait permettre de confirmer ce rôle « enhancer ». En effet, un enhancer, classiquement défini comme pouvant agir en aval, en amont ou à l'intérieur du gène qu'il régule, et ce, quelque soit son orientation (Banerji J, Rusconi S et al. 1981), peut également se caractériser par son aptitude à exercer son rôle, quelque soit le promoteur qui lui est associé (Banerji J, Rusconi S et al. 1981 ; Biben C, Kirschbaum BJ et al. 1994).

## 8.2. Effet de l'élément distal sous l'influence du promoteur de la $\beta$ -globine

Afin, d'une part, de confirmer une nouvelle fois le rôle « enhancer » du DE, et son rôle « rénal spécifique », d'autre part, cet élément est cette fois-ci cloné en amont d'un promoteur hétérologue, le promoteur de la bêta-globine. Cependant, et contrairement aux expériences précédentes, dans cette série, seul le DE est cloné, le fragment contenant le promoteur de l'*AVPR2*, 4.6 kb, est absent. Ceci dans le but d'étudier l'effet intrinsèque du DE indépendamment d'une quelconque autre séquence (**Figure 48**).



**Figure 48. Effet du DE sur le gène rapporteur sous la dépendance d'un promoteur hétérologue.**

Les trois lignées cellulaires sont transfectées, soit avec le vecteur d'expression ne contenant que le promoteur



de la bêta-globine (pLuc glob), soit avec le vecteur contenant le DE cloné en amont de ce même promoteur (pLuc DE glob).

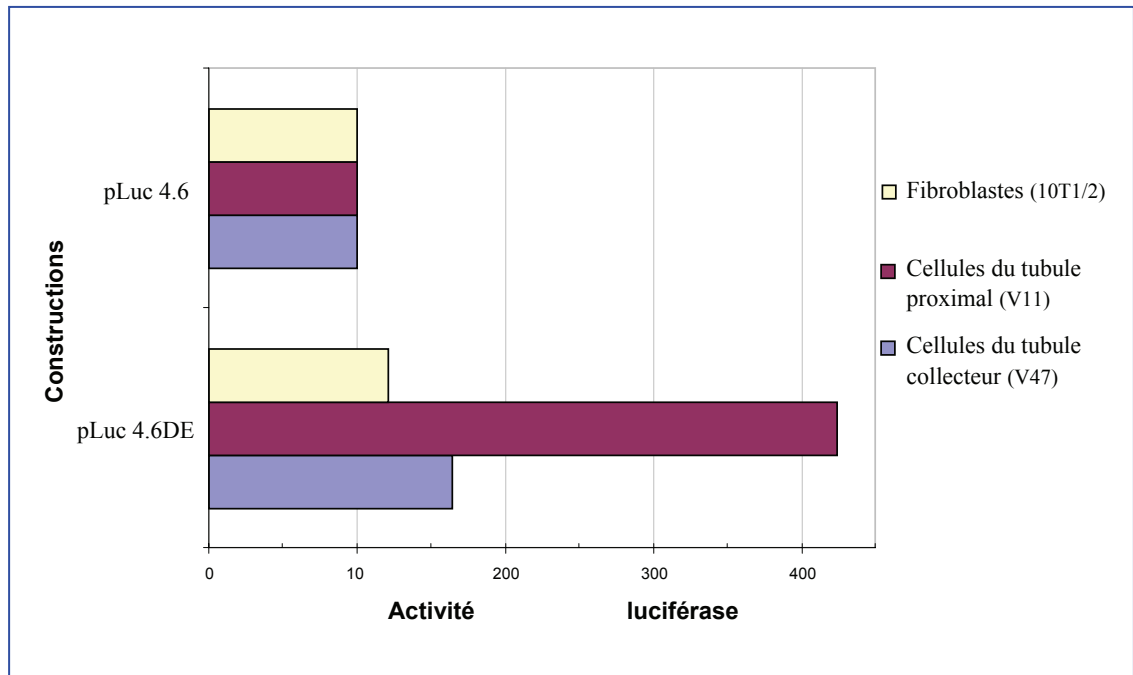
Les moyennes sont obtenues sur une série de mesures réalisée en triplicata.

Bien qu'étant fixés à 100% et correspondant au niveau d'expression de base dans chacune des lignées cellulaires, il faut noter que, sous la dépendance du promoteur de la bêta-globine, les niveaux d'expression du vecteur ne contenant que ce promoteur (sans DE) sont très faibles (résultats non présentés). Cependant, le fait de cloner en amont de ce promoteur le DE entraîne une augmentation légère dans les cellules du tubule collecteur, 2 fois, alors que dans les cellules du tubule proximal cet effet est beaucoup plus marqué, 14 fois plus d'expression. Dans les fibroblastes, le DE ne présente quasiment aucun effet puisque celui-ci est d'environ 1,4 fois.

Le fait que le DE exerce son effet sur l'activation du gène de la luciférase lorsque celui-ci est sous la dépendance du promoteur hétérologue, confirme la fonction « enhancer » ainsi que le rôle imputé préalablement au DE dans l'activation « tissu spécifique » de l'*AVPR2*.

### **8.3. Effet de la multimérisation dans chacune des lignées cellulaires**

Dans le but de confirmer une nouvelle fois le rôle du DE dans le tissu rénal et de démontrer que celui-ci permet un haut niveau d'expression du gène rapporteur dans les lignées de ce tissu, nous avons multimérisé le DE. Une construction contenant 4 copies du DE, toutes suivant l'orientation 5'-3', a été réalisée puis transfectée dans chacune des lignées cellulaires (**Figure 49**, page 168).



**Figure 49. Effet de la multimérisation du DE dans chacune des lignées cellulaires.**

Comme précédemment, nous avons fixé de manière arbitraire le niveau du contrôle, pLuc 4.6 ne contenant que le promoteur de l'*AVPR2*, à 100% et rapporté par la suite chacune des valeurs obtenues à celui-ci. Le vecteur pLuc 4.6DE contient une seule copie du DE alors que le vecteur pLuc 4.6DE4X en contient 4.

Les moyennes sont obtenues sur une série de mesures réalisée en triplicata.

Une nouvelle fois, nous pouvons voir que le DE entraîne une augmentation du niveau d'expression dans les deux lignées rénales, environ 1,7 fois dans les cellules du tubule collecteur, correspondant à 64% d'augmentation, et plus de 4 fois, correspondant à plus de 320%, dans celles du tubule proximal. À contrario, dans les fibroblastes, l'effet retrouvé est le même que précédemment, soit à peine plus d'une fois la valeur du contrôle, soit environ 20% d'augmentation. Ces observations sont non seulement retrouvées mais également amplifiées dans le cas des mesures effectuées avec le DE multimérisé. En effet, dans les cellules de tubule collecteur le fait d'avoir 4 copies du DE entraîne une augmentation de plus de 4 fois, soit plus de 280% et dans les cellules de tubule proximal, une augmentation de plus de 40 fois, soit quasiment 3700%, est enregistrée. À l'opposé, le fait de

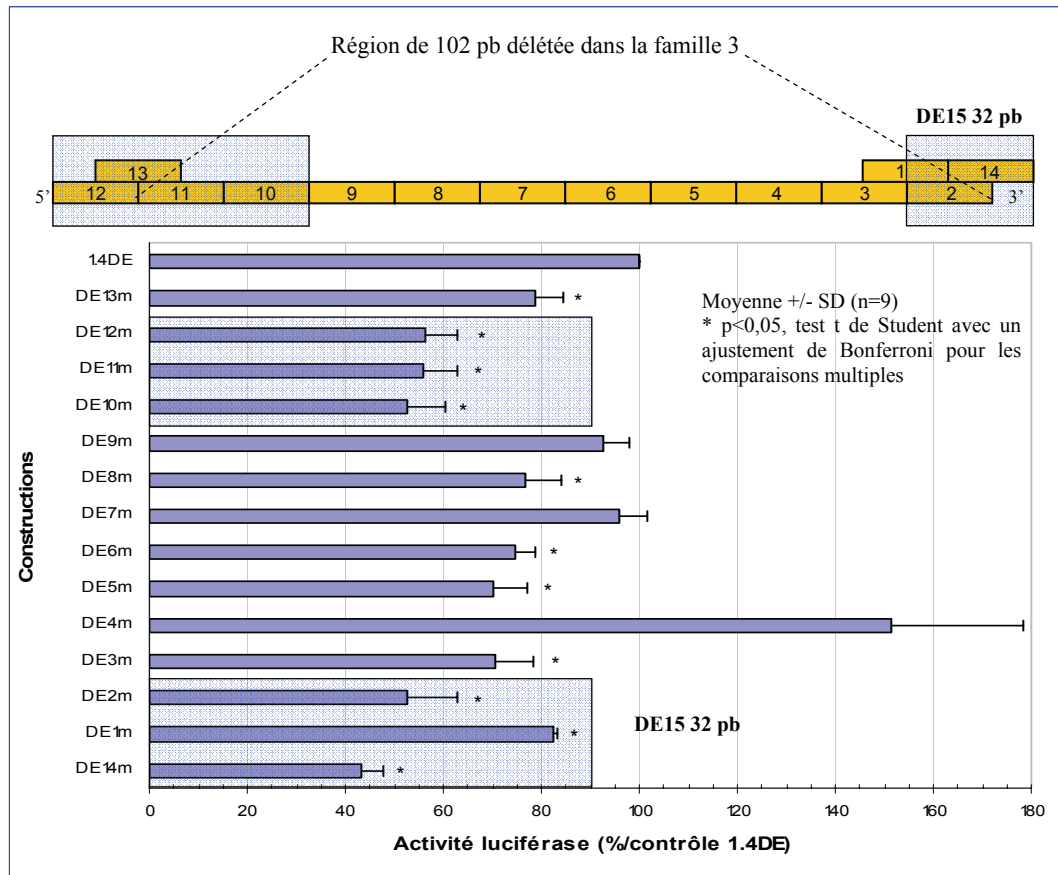
multimériser le DE n'a absolument aucun effet dans les fibroblastes puisqu'une augmentation de seulement 1,6 fois, soit 60%, est observée ce qui est similaire à l'effet d'une seule copie du DE dans les cellules du tubule collecteur.

Par conséquent, les résultats obtenus par la multimérisation du DE permettent de confirmer que cet élément autorise bel et bien une activation « rénale spécifique » de l'*AVPR2*.

D'un point de vue plus global, nous pouvons conclure de cette première série d'expériences (à mettre en parallèle avec celles réalisées précédemment et démontrant le rôle du DE dans les deux lignées rénales (Debrand 2004)) que le DE se comporte comme un élément « enhancer » dans un système en culture et que, de plus, ce rôle semble « tissu spécifique » car permettant une augmentation très importante du niveau d'expression dans le tissu rénal.

#### **8.4. Identification des zones importantes dans l'expression de l'*AVPR2* à l'intérieur de l'élément distal**

Suite à la confirmation du rôle possible joué par le DE dans l'activation « tissu spécifique » de l'*AVPR2*, nous avons entrepris la localisation précise de la, ou des, zone(s) présente(s) dans ce DE, responsable(s) de cet effet. Pour ce faire, nous avons muté l'ensemble de la séquence (pour rappel, celle-ci fait 102 pb) par séries successives de 10 pb en gardant le reste de la séquence intacte et en tenant compte des points de cassure (Debrand 2004). Les différentes constructions sont ensuite transfectées dans chacune des lignées cellulaires. Les récapitulatifs des résultats obtenus pour chaque lignée cellulaire, permettant d'avoir ainsi une vision d'ensemble du rôle joué par chacune des zones, sont présentés ci-dessous (**Figures 50, 51 et 52**, pages 170 à 172).



**Figure 50. Récapitulatif des résultats des expériences de mutations en série dans les cellules du tubule collecteur.**

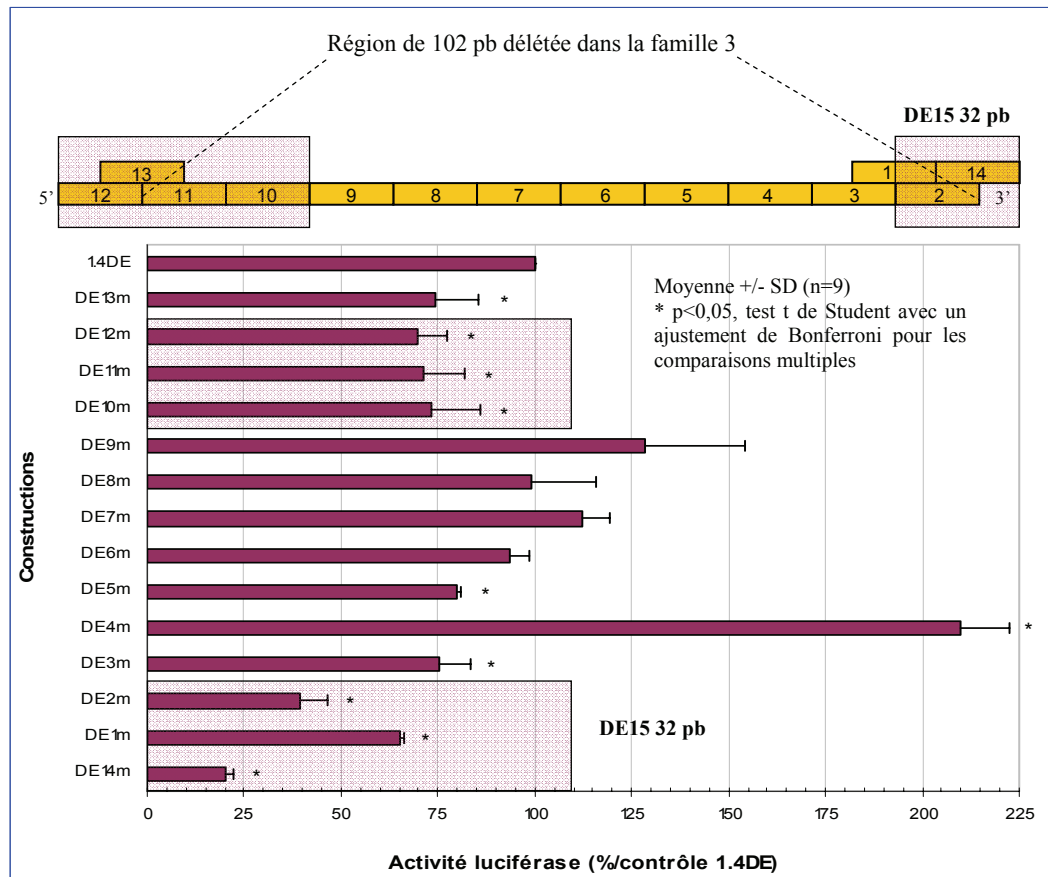
Les expériences ont été réalisées avec comme contrôle, le DE dans sa forme « sauvage » c'est-à-dire sans aucune mutation, cloné en amont du fragment de 1.4 kb servant de contrôle interne: du fait d'une absence de phénomène de coopération entre le DE et les séquences identifiées par A. Calmont et al., l'utilisation de ce fragment a été privilégiée pour cause de comodité de réalisation des constructions.

Chaque série de 10 pb, matérialisée par un rectangle jaune, est mutée afin d'empêcher la fixation éventuelle d'une protéine régulatrice. Les séquences des points de cassure ont également été incluses. Les valeurs sont rapportées au contrôle interne à chaque lignée dont la valeur est une nouvelle fois fixée arbitrairement à 100%.

Les rectangles bleutés représentent les zones identifiées à l'intérieur du DE. Le rectangle de l'extrémité 3' correspond à la séquence utilisée dans le crible simple hybride chez la levure.

Sur l'ensemble de la séquence, deux zones semblent se dégager: la première, correspondant à l'extrémité 5' du point de cassure (DE10m, DE11m et 12m) où une chute

du niveau d'expression de l'ordre de 50% est observée, et la seconde, se situant au niveau du point de cassure 3' (DE1m, 2m et surtout 14m) où la diminution est encore plus flagrante puisque atteignant quasiment 60% (DE14m).

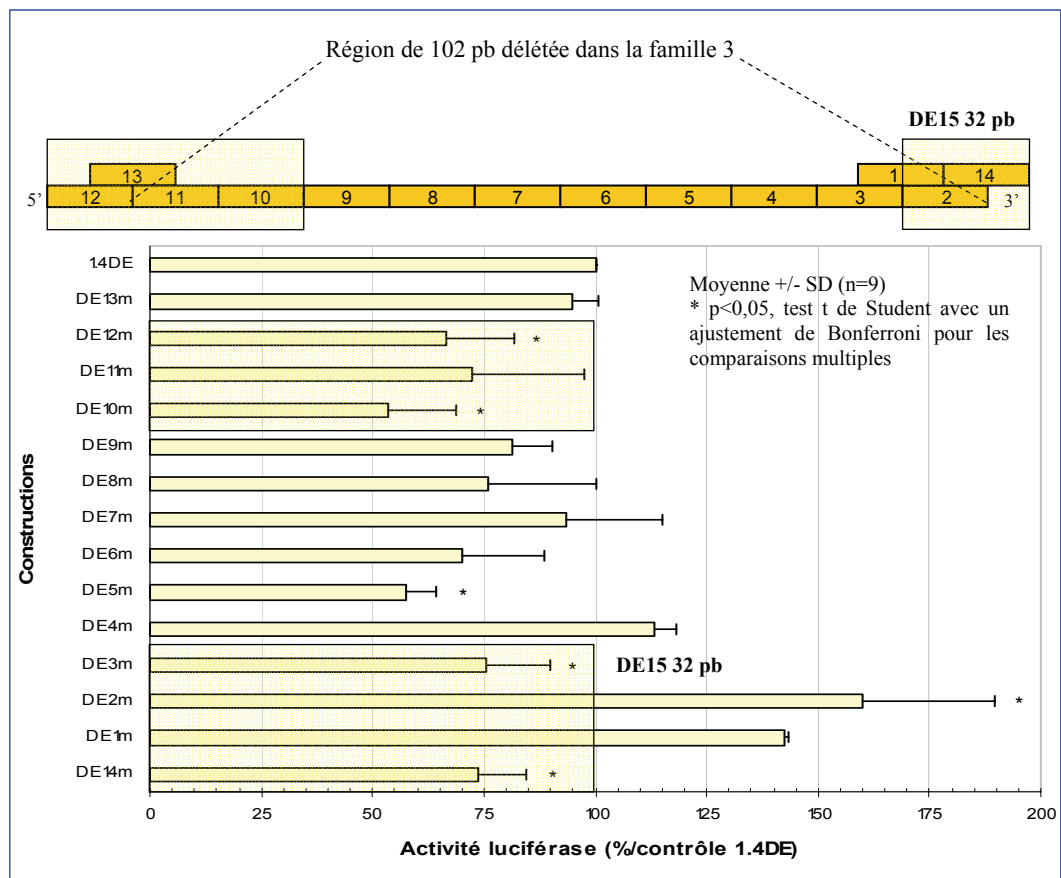


**Figure 51. Récapitulatif des résultats des expériences de mutations en série dans les cellules du tubule proximal.**

Les zones précédemment identifiées dans les cellules du tubule collecteur, en 5' et 3' de la délétion, sont représentées par les rectangles violacés. Le rectangle de l'extrémité 3' correspond à la séquence utilisée dans le crible simple hybride chez la levure.

Nous pouvons voir sur ce graphique que les niveaux d'expression, pour la région localisée en 5' du point de cassure, présentent une baisse moins importante que dans le cas des cellules du tubule collecteur (environ 30% contre 50%). À l'opposé, la zone située en

3' montre une baisse très importante, puisqu'étant de plus de 80% par rapport au contrôle interne, du niveau d'expression. De plus, cette diminution est beaucoup plus prononcée que celle qui était observée dans les cellules du tubule collecteur (plus de 80% contre 60%) ce qui semble confirmer les observations faites jusqu'alors, à savoir que le DE présentait une activité plus importante dans les cellules proximales que dans les cellules du tubule collecteur.



**Figure 52. Récapitulatif des résultats des expériences de mutations en série dans les fibroblastes.**

Les zones précédemment identifiées dans les cellules du tubule collecteur, en 5' et 3' de la délétion, sont représentées par les rectangles jaunes. Le rectangle de l'extrémité 3' correspond à la séquence utilisée dans le crible simple hybride chez la levure.

Cette série d'expériences dans la lignée contrôle permet de voir que les résultats observés dans les lignées rénales ne sont pas retrouvés: les extrémités 5' et 3' du point de cassure présentent des niveaux d'expression très variables, soit plus élevés, soit légèrement diminués mais en aucun cas une diminution très prononcée n'est observée. Ce qui confirme, une fois de plus, l'idée suivant laquelle le DE présente un effet « tissu spécifique ». De plus, l'ensemble des mesures s'accompagne de déviations standards très importantes, ce qui traduit et confirme à la fois, une relative « anarchie » de croissance, observée *de visu* lors des expérimentations, ainsi qu'un haut niveau de transfection de la part de ce type cellulaire.

En conclusion de ces expériences de mutations en série, il ressort deux points essentiels. Le premier semble confirmer que le DE exerce une activité importante dans l'expression de l'*AVPR2* dans le tissu rénal. Le second permet de distinguer deux zones à l'intérieur du DE, l'une localisée en 3' du point de cassure paraissant responsable de cette activation « tissu spécifique », et la seconde, située en 5' de la délétion, semblant spécifique aux cellules du tubule collecteur, et ainsi, porterait l'activité « cellule spécifique » de l'expression de ce gène. La première citée, matérialisée par un rectangle à l'extrémité 3' de la délétion sur les **figures 50 à 52** (pages 170 à 172), appelée DE15 par la suite, fait l'objet des expériences ultérieures dans le but de caractériser les protéines s'y fixant par la technique du simple hybride chez la levure.

## **9. Caractérisation des protéines liant l'extrémité 3'**

Après avoir identifié les zones du DE responsables de son rôle dans l'activation de l'*AVPR2*, nous avons entrepris l'identification des protéines les liant. Pour ce faire, nous avons adopté la technique dite du simple hybride dans la levure. En effet, celle-ci est la plus fréquemment utilisée pour caractériser les protéines liant des séquences d'ADN quel qu'elles soient, régions régulatrices, origine de réplication, télomères, etc. et ce, quel que soit le tissu (Li and Herskowitz 1993; Wang and Reed 1993; Lehming, Thanos et al. 1994; Wei, Angerer et al. 1999; Kim, Kim et al. 2003; Kiefer, Chatail-Hermitte et al. 2005). Cependant, devant la lourdeur des manipulations à réaliser, nous n'avons pu effectuer ces expériences qu'avec la zone localisée en 3' du point de cassure, soit celle paraissant expliquer l'effet « rénal spécifique » du DE.

### **9.1. Résultats obtenus suite au « screening » de la banque d'ADNc rénal**

La zone 3', dénommée par la suite DE15, est clonée dans le vecteur « appât », pHIS2 en 2 copies et la dose de 3AT est fixée à 15 mM. Ce vecteur, ainsi que la banque d'ADNc purifiée et le second vecteur, dit « proie », transforment les levures rendues préalablement compétentes.

À l'issue de cette transformation, et après une croissance d'environ 1 semaine, 50 clones ont été obtenus. Suite à l'extraction, au séquençage et à l'analyse de comparaison de séquences des ADNc de chacun de ces clones, il est apparu que la majorité d'entre eux, 42 exactement, s'avèraient d'aucune utilité puisque qu'ils correspondaient, par exemple, à des séquences de protéines mitochondriales, de génome mitochondrial ou encore à des



séquences d'enzyme. Cependant, 8 clones sont ressortis de cette analyse comme étant particulièrement intéressants (**Tableau 6**).

**Tableau 6. Séquences d'ADNc isolées suite au screening simple hybride avec la zone DE15.**

Clones	Homologie	Longueur de l'ADNc et taux d'homologie	Références
1.1	Cut-like 1	413/507 pb; 81%	(Nepveu 2001)
2.1	Aucune	524 pb	
5.2	FLYWCH-type zinc finger 1	387/441 pb; 87%	(Strausberg, Feingold et al. 2002)
7.1	Aucune	353 pb	
8.2	Aucune	585 pb	
34.1	Aucune	798 pb	
36.1	Transcription elongation factor B, polypeptide 1-like	792/917 pb; 86%	(Bai, Sen et al. 1996; Freed, Lacey et al. 1999)
45.2	HP1-BP74	323/365 pb; 88%	(Le Douarin, Nielsen et al. 1996)

NB: les taux d'homologie correspondent au degré d'homologie des séquences du rat par rapport aux séquences humaines. Les comparaisons de séquences ont été réalisées trois fois, la dernière ayant eu lieu le 20 avril 2008.

Ces 8 clones ont ensuite fait l'objet de la vérification de leurs spécificités respectives par co-transformation dans les levures. Les résultats de ces expériences seront exposés ci-dessous après avoir effectué une analyse bibliographique pour chacune d'entre elles.

## 9.2. Analyse détaillée des huit protéines potentiellement positives

Chacune des protéines présentées ci-dessus, nous a semblé être intéressante à analyser dans la mesure où, en plus des homologies données dans le tableau, certaines portions de ces séquences présentaient des similitudes avec d'autres protéines régulatrices, ou référencées comme telles.

Suite à une revue de la littérature de chacune des protéines identifiées, nous exposerons les différentes expériences à réaliser afin de confirmer leur présence ainsi que leurs actions au niveau des cellules rénales.

## **9.2.1. Analyse bibliographique des protéines**

### **9.2.1.1. Protéines connues**

#### **9.2.1.1.1. Cut-like 1**

Cut-like 1, ou également appelée CDP, pour « **CCAAT displacement protein** », CUX1, pour « **cut homeobox** », est une protéine à homéodomaine liant l'ADN et impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires: morphogenèse, différenciation, promotion de la progression du cycle cellulaire (Nepveu 2001). Cependant, il a été démontré que cette protéine joue un rôle prépondérant dans la régulation négative de l'expression de gènes permettant une expression spécifique en fonction des tissus (Liu, Barnett et al. 1999; Nirodi, Hart et al. 2001).

D'un point de vue structurel, cette protéine, codée par le gène *Cut-like 1* (il existe en effet un second gène orthologue chez les vertébrés supérieurs, *Cut-like 2* généré par duplication génique (Quaggin, Heuvel et al. 1996)), de 1505 aa comporte 4 segments de liaison à l'ADN, 3 domaines répétés Cut (CR1 pour « **cut repeat 1** », CR2 et CR3) et un **homéodomaine** (HD) (Blochlinger, Bodmer et al. 1988). Parmi les domaines Cut, CR1 et CR2 fonctionnent comme des domaines spécifiques de liaison à l'ADN de manière indépendante à l'homéodomaine, alors que le dernier, CR3, ne peut fonctionner qu'en coopération avec celui-ci (Andres, Chiara et al. 1994; Aufiero, Neufeld et al. 1994; Harada, Dufort et al. 1994; Harada, Berube et al. 1995). De plus, deux domaines supplémentaires ont été localisés dans la partie N-terminale de la protéine et portent l'activité répressive de Cut-like 1 (Mailly, Berube et al. 1996).

Des études génétiques menées chez *Drosophila melanogaster* ont permis de démontrer que Cut-like 1 jouerait un rôle très important dans la détermination et le maintien de la spécificité cellulaire dans différents tissus (Liu, McLeod et al. 1991). En effet, des mutations de ce gène entraînent des défauts de structure de différentes protéines impliquées dans la différenciation de tissus aussi variés que les pattes, les ailes, les organes sensoriels externes, les tubules de Malpighi, le système trachéal ainsi que dans le système nerveux central. D'un point de vue général, il apparaît que ces mutations ne permettent pas aux cellules en voie de spécialisation de suivre la « bonne route » leur permettant de se différencier (Blochlinger, Jan et al. 1991; Liu, McLeod et al. 1991).

De plus il a été démontré que l'expression de cette protéine dans le rein de souris diminuait au fur et à mesure de l'état de différenciation des cellules rénales au cours de la néphrogénèse (Vanden Heuvel, Bodmer et al. 1996). De la même manière, cette même protéine semble jouer un rôle important dans la progression du cycle cellulaire: sa liaison à l'ADN, et donc son action, est minimale lors de la phase G0 et au début de la phase G1, puis augmente pendant celle-ci pour atteindre son maximum à la fin de G1 et lors de l'entrée en phase S (Coqueret, Berube et al. 1998). Cette augmentation d'activité est en fait corrélée avec la répression transcriptionnelle du gène de l'inhibiteur de la progression du cycle, *p21<sup>WAF1</sup>*. De manière plus surprenante et pour le moins paradoxale, la séquence de liaison à l'ADN de Cut-like 1 a été localisée au niveau d'un promoteur liant un complexe, le facteur D des histones nucléaires (« **histone nuclear factor D** » ou HiNF-D), induisant la transcription de plusieurs gènes d'histones lors de la transition phase G1/S (van Wijnen, Wright et al. 1989; van Wijnen, Choi et al. 1991; Wright, Dell'Orco et al. 1992). Par la suite, il a été démontré que la liaison du complexe à l'ADN avait lieu via Cut-like 1 qui, en plus de faire partie intégrante de HiNF-D, serait le partenaire de liaison de celui-ci (van Wijnen, van Gurp et al. 1996). L'ensemble de ces observations a permis d'imaginer, comme cela est déjà le cas pour d'autres gènes, qu'il existerait plusieurs isoformes de Cut-like 1 qui, exprimés dans différents tissus et à différents moments, expliqueraient ce

paradoxe: différentes analyses par séquençage et de type Northern blot semblaient confirmer ceci (Neufeld, Skalnik et al. 1992; Valarche, Tissier-Seta et al. 1993; Lievens, Tufarelli et al. 1997). Cette idée a par la suite été confirmée avec la découverte de 3 isoformes, p200, p110 et p75 (Moon, Premdas et al. 2001; Goulet, Watson et al. 2002). Si l'isoforme p200, correspondant à la protéine « pleine longueur » et donc comportant les 4 domaines de liaison à l'ADN, porte l'activité répressive (Mailly, Berube et al. 1996), les isoformes courtes, p110 et p75, contenant les domaines CR2CR3/HD (Moon, Premdas et al. 2001; Goulet, Baruch et al. 2004) et CR3/HD (Goulet, Watson et al. 2002)), respectivement, semblent agir comme activateurs ou répresseurs transcriptionnels en fonction du contexte du promoteur (Moon, Premdas et al. 2001; Truscott, Raynal et al. 2003). Récemment, il a été découvert un quatrième isoforme, p90, présentant, tant au niveau de son origine (clivage protéolytique de l'isoforme p200), de sa structure (présence des domaines CR2CR3/HD) que de sa fonction (activateur transcriptionnel associé à la prolifération cellulaire), une très forte homologie avec l'isoforme p110 (Goulet, Truscott et al. 2006). Cependant, si p110 semble exprimé de manière ubiquitaire, p90 paraît présenter un patron d'expression préférentiel au niveau des cellules endothéliales (Goulet, Truscott et al. 2006). Cette expression « cellule-spécifique » serait due à des modifications post-traductionnelles n'intervenant que dans ce type cellulaire.

De manière très intéressante, il a récemment été démontré que le plus court isoforme, p75, est impliqué dans le développement de la polykystose rénale (Cadieux, Harada et al. 2008). En effet, les travaux menés ont montré que, dans un modèle murin knock-out pour le gène *pkdl*, cet isoforme était surexprimé dans les reins polykystiques au contraire de l'isoforme p200. La polykystose rénale, pathologie autosomique dominante, également dénommée ADPKD (« **autosomal dominant polycystic kidney disease** ») se caractérise par la formation de kystes rénaux entraînant, à terme, une destruction du rein. La formation des kystes est due, entre autre, à une surproduction d'une protéine, la polycystine-1, codée par le gène *PKDI* (Hughes, Ward et al. 1995) qui interagit au niveau de la membrane avec une

seconde protéine, qui est en fait un canal calcium, la polycystine-2. Cette même pathologie présente d'autres caractéristiques qui rendent Cut-like 1 particulièrement intéressant à étudier dans le cadre de la régulation de l'*AVPR2*. En effet, l'étude de l'ADPKD dans un modèle murin (souris knock-out pour le gène orthologue au *PKD2* humain) a révélé, que la formation des kystes était corrélée à une surexpression, à la fois de l'*AVPR2*, de l'*AQP2* ainsi qu'à une surproduction d'AMPc (Torres, Wang et al. 2004; Torres and Harris 2006). De plus, l'utilisation d'un antagoniste non peptidique de l'*AVPR2* permettait un arrêt total du développement de ces kystes ce qui tend à prouver le rôle de ce récepteur dans le déclenchement de la maladie. Par conséquent, l'ensemble de ces observations permet de penser légitimement que Cut-like 1, via l'isoforme p75, pourrait, lorsqu'il est surexprimé, entraîner une surproduction d'*AVPR2* ce qui, au final, par un mécanisme à découvrir, provoquerait l'accumulation de polycystine-1 et -2 à la membrane avec pour conséquence, la formation des kystes. Cependant, lors de cette étude, les auteurs, bien que sachant que les deux isoformes p75 et p110 présentent de très fortes similitudes d'action, ne se sont pas du tout attachés à étudier le rôle de cette dernière dans la formation des kystes. Cette observation, peut donc nous laisser penser que l'isoforme p110, en stabilisant le liaison Cut-like 1/ADN via le CR supplémentaire (CR2), pourrait également intervenir dans le développement de l'ADPKD.

Dans notre cas, la séquence identifiée comme correspondant à Cut-like 1 semble correspondre à l'isoforme p110 (ou peut être à p90), soit comportant les domaines CR2CR3/HD de liaison à l'ADN, ce qui en ferait un activateur transcriptionnel. Cependant, cette constatation ne signifie pas pour autant que cette protéine jouerait un rôle activateur dans notre cas, dans la mesure où les découvertes entourant Cut-like 1 semblent ne connaître aucune limite: 4 isoformes, au moins, découverts jusqu'alors, rôle à la fois activateur et/ou répresseur en fonction de l'isoforme et/ou du contexte cellulaire et/ou des modifications post-traductionnelles, etc. De plus, si l'on se réfère aux résultats d'expression de notre DE en conditions isotoniques versus hypertoniques (« Effet basal de l'hypertonie

», page 192), il semblerait que l'isoforme Cut-like 1 liant notre séquence d'intérêt joue préférentiellement un rôle activateur lorsque les conditions extracellulaires sont isotoniques et répresseur lorsque celles-ci deviennent hypertoniques.

#### 9.2.1.1.2. **HP1-BP74**

Une seconde protéine impliquée dans la régulation de l'expression génique: la protéine HP1-BP74 (pour « **heterochromatin protein 1-binding protein 74** ») également appelée, HP1-BP3. Cette protéine est en fait une protéine interagissant avec une protéine spécifique de l'hétérochromatine, la protéine HP1 (Le Douarin, Nielsen et al. 1996; Richards and Elgin 2002). Celle-ci est retrouvée conservée chez l'ensemble des eucaryotes chez lesquels 3 isoformes ont été mis en évidence: HP1 $\alpha$ , HP1 $\beta$  et HP1 $\gamma$  pour les mammifères (Eissenberg and Elgin 2000). Toute protéine HP1 partage la même architecture qui se compose de 3 segments, deux domaines globulaires, le chromodomaine (« **chromo, chromosome modifier organizer, domain** », ou CD) et « l'ombre » du chromodomaine (« **chromo shadow domain** » ou CSD) reliés entre eux par une charnière flexible (Aasland and Stewart 1995).

Il a été démontré que HP1 jouait un rôle très important dans la modification de la structure chromatinienne: son rôle est de favoriser l'acquisition d'une forme « interdisant » l'expression des gènes en reconnaissant un résidu lysine méthylé de l'extrémité N-terminale de l'histone H3, la lysine numéro 9 (H3K9Me) (Bannister, Zegerman et al. 2001; Nakayama, Rice et al. 2001). Cette interaction HP1/H3K9Me, via le CD et le CSD (Powers and Eissenberg 1993), est essentielle à l'établissement et au contrôle épigénétique de l'assemblage de l'hétérochromatine (Lachner, O'Carroll et al. 2001). Cependant, et malgré leurs similitudes de structure, seules les isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  sont retrouvées au niveau de l'hétérochromatine alors que la forme  $\gamma$  se localiserait préférentiellement au niveau de l'euchromatine (Minc, Courvalin et al. 2000; Greil, van der Kraan et al. 2003). De plus, une

équipe a montré que HP1 pouvait interagir avec le facteur de remodelage de la chromatine permettant l'activation des gènes, SWI/SNF (Le Douarin, Nielsen et al. 1996). Ce qui, d'une part, confirme l'existence de HP1 au niveau de l'euchromatine (Sun, Cuaycong et al. 2000; Nielsen, Schneider et al. 2001; Schultz, Ayyanathan et al. 2002), et d'autre part, laisse penser que SWI/SNF pourrait « lever » l'inhibition induite par HP1. Récemment, une étude a révélé que HP1 pouvait avoir plusieurs sites cibles et que différents facteurs auxiliaires favoriseraient cette liaison (Eskeland, Eberharter et al. 2007).

Malgré le peu d'informations entourant la protéine HP1-BP74, une équipe a démontré que celle-ci interagissait avec, d'une part l'isoforme  $\alpha$  de la protéine HP1, et d'autre part avec un intermédiaire transcriptionnel, TF1 (« transcriptional intermediary factor 1 ») sans toutefois préciser son rôle exact (Le Douarin, Nielsen et al. 1996). Cependant, l'étude de sa structure primaire a révélé une très forte homologie avec les domaines globulaires de l'histone H1 (Cerf, Lippens et al. 1993) et de son variant, l'histone H5 (Ramakrishnan, Finch et al. 1993) liant tous deux les points d'entrée et de sortie des nucléosomes (Le Douarin, Nielsen et al. 1996). Ce qui laisse supposer que HP1-BP74, comme les autres protéines liant HP1, servirait de « pont protéique » à diverses protéines impliquées dans la régulation de l'expression des gènes. Celle-ci pouvant être soit activatrice, soit répressive.

De plus, HP1-BP74 a été localisée au niveau des neurones corticaux où elle semblerait jouer un rôle dans la différenciation fonctionnelle des neurones (Li, Li et al. 2002). En effet, il a été démontré que l'ARNm de cette protéine était surexprimé, dans les neurones en culture, entre le quatrième et le septième jour de différenciation ce qui coïncide avec le début de fonctionnalité des neurones GABA adrénérgiques. Cependant la protéine n'a pas été mise en évidence ce qui ne permet donc pas de statuer de manière irréfutable sur le rôle de cette protéine et plus particulièrement sur un lien direct entre celle-ci et la maturation fonctionnelle des neurones.

#### **9.2.1.1.3. Transcription elongation factor B, polypeptide 1-like**

Une troisième protéine impliquée dans le processus d'expression des gènes, et plus particulièrement dans l'activation transcriptionnelle, a été mise en évidence: la « transcription elongation factor B, polypeptide 1-like », également appelée la « RNA polymerase II elongation factor-like protein OCP2 (« organ of Corti protein 2 ») ». Cette protéine, initialement identifiée comme étant une protéine associée à une kinase de phase S, SKP1 (« S-phase kinase-associated protein 1 ») impliquée dans la progression du cycle cellulaire (Bai, Sen et al. 1996), pourrait également jouer un rôle dans l'organisation du centrosome et donc influencer la ségrégation des chromosomes au moment de la mitose (Freed, Lacey et al. 1999). De plus, une étude plus récente a mis en évidence *in vivo* un rôle très important pour cette protéine dans la transformation cellulaire (Piva, Liu et al. 2002). Ceci laisse présager d'autres rôles et fonctions potentiels et pourquoi pas, un jouer un rôle dans la transcription de gènes cibles ? Un groupe a mis en évidence la présence de l'ADNc de cette protéine dans le rein de mâle adulte de souris sans parvenir à identifier la protéine correspondante, malgré le haut niveau d'homologie entre cet ARNm et celui produisant la protéine « transcription elongation factor B, polypeptide 1-like » (numéros Genbank, nucléotide AK027909 ou GenPept, protein BAC25660.1) (Kawai, Shinagawa et al. 2001; Okazaki, Furuno et al. 2002).

#### **9.2.1.1.4. FLYWCH-type zinc finger 1**

Une quatrième séquence codant pour une protéine impliquée dans l'expression des gènes a été mise en évidence. Celle-ci correspond à une protéine de liaison à structure en « doigt de zinc »: FLYWCH-type zinc finger 1. L'ARNm de cette protéine a été localisé au niveau rénal et le gène correspondant sur le chromosome 16 (Strausberg, Feingold et al. 2002; Ota, Suzuki et al. 2004). Cependant, aucune autre information n'est disponible quant au rôle exact de cette protéine, pas plus qu'à son expression spatio-temporelle.



### 9.2.1.2. Protéines « inconnues »

Enfin, l'analyse comparative de séquences a révélé 4 autres séquences pour lesquelles aucune information n'est répertoriée (ni ADNc, ni ARNm, ni séquence protéique), excepté pour l'une d'entre elles, correspondant au clone 34.1 et dont le taux d'homologie s'élève à 825/898, pour laquelle l'ADNc a été localisé au niveau du rein de souriceaux nouveau-nés mais dont le rôle de la protéine correspondante est inconnue (Strausberg, Feingold et al. 2002). Cette même séquence présente également un haut niveau de similitude, 825/900, avec un ARNm inconnu mis en évidence dans le rein de souris. Cependant, cette dernière, d'après la base de données, présenterait des homologies avec une séquence « similaire » de la glycérate kinase 1 humaine (voir numéro Genbank, nucléotide AF455785 et AF448855). De manière plus intéressante, chez l'homme, un court fragment, 21 nucléotides, de la séquence étudiée présenterait une similitude parfaite (100%) avec une séquence localisée sur le chromosome 4 et codant pour une protéine impliquée dans la régulation de la structure chromatinienne ainsi que dans la régulation positive de la transcription, « SWI/SNF-related, matrix-associated actin-dependant regulator of chromatin, subfamily a, containing DEAD/H box1 » (SMARCAD1) (Adra, Donato et al. 2000). Cette protéine, initialement dénomée hHel1 (« human helicase 1 »), appartient à la super famille des hélicases liant les acides nucléiques et remplissant diverses fonctions (réplication, transcription et excision/réparation de bases) (Lohman and Bjornson 1996). SMARCAD1, comme la plupart des hélicases, comporte un motif hautement conservé, le motif « boîte DEAD/H » permettant la déstructuration de la molécule d'ADN grâce à l'hydrolyse des nucléotides triphosphate. Le clonage de cette protéine a permis de la classer dans la sous famille SNF2 (Adra, Donato et al. 2000), appartenant à la famille SNF connue comme jouant un rôle très important dans l'activation transcriptionnelle (Imbalzano, Kwon et al. 1994; Kwon, Imbalzano et al. 1994).

### **9.2.2. Vérification de la spécificité de chacune des protéines**

L'étape de vérification des diverses protéines identifiées a permis de confirmer la liaison de plusieurs protéines identifiées. Parmi celles-ci, nous pouvons citer Cut-like 1, HP1-BP74 ainsi que la protéine « transcription elongation factor B, polypeptide 1-like ». Par contre, la protéine « FLYWCH-type zinc finger 1 » est apparue comme étant un faux positif dans la mesure où les différentes étapes de vérifications se sont révélées négatives. Concernant les séquences inconnues, deux d'entre elles, correspondant aux clones 8.2 et 34.1, se sont révélées positives alors que les deux autres apparaissent comme étant négatives.

Devant le temps ainsi que la complexité des expériences à effectuer afin de confirmer de manière définitive le rôle des 4 séquences potentiellement positives, nous n'avons pu les réaliser. Cependant nous proposons ci-dessous, les différentes études ultérieures possibles.

En tout premier lieu, il faut d'abord obtenir les séquences complètes d'ADNc ainsi que les cadres de lecture ouverts (« open reading frame », ou ORF) de chacune des séquences codant ces protéines. Si dans le cas des protéines connues (Cut-like 1, HP1-BP74 et la protéine « transcription elongation factor B, polypeptide 1-like »), l'obtention des séquences complètes ainsi que l'identification des ORF sont aisées, il n'en est pas de même concernant les deux clones inconnus. Par conséquent, dans ce cas, la première étape à réaliser consiste à obtenir la séquence complète de l'ADNc de la protéine supposée activatrice.

La technique utilisée est, dans le cas du clone 8.2, la « single-stranded ligation of cDNA » (initialement connue sous le nom de « single strand ligation to ss-cDNA », ou SLIC (Edwards, Delort et al. 1991)) permettant, grâce à la ligation d'un oligonucléotide modifié à l'extrémité 3' du brin d'ADNc synthétisé, d'obtenir la séquence 5' inconnue. En effet, à partir d'ARN totaux issus de médullaire rénale de rat, le premier brin d'ADNc correspondant à notre séquence peut être synthétisé par transcription inverse grâce à une

amorce spécifique de l'extrémité 3' (comportant la queue poly(A)). L'extrémité 3' de cet ADNc simple brin est, par la suite, ligué par un oligonucléotide modifié (son extrémité 3' doit être bloquée, en fixant le radical hydroxyle, afin d'empêcher une « auto ligation » et/ou une éventuelle recircularisation). Cet oligonucléotide servira ensuite de base à une PCR conventionnelle utilisant une amorce qui lui est complémentaire ainsi qu'une seconde amorce se liant à l'extrémité 5' de l'ADNc simple brin. L'incorporation de sites de restriction au niveau des différentes amorces permettra par la suite, de récupérer et de séquencer le fragment obtenu. Celui-ci fera l'objet d'une construction visant à obtenir la séquence complète, regroupant l'extrémité 3' connue et l'extrémité 5' identifiée, de la protéine d'intérêt.

Dans le cas du clone 34.1, la situation est plus complexe dans la mesure où la séquence obtenue ne comporte pas l'extrémité poly(A). Dans ce cas, il nous faut donc obtenir à la fois les extrémités 5' et 3'. Pour ce faire, nous utilisons simultanément la technique SLIC pour obtenir l'extrémité 5' (voir ci-dessus), et la technique de la « PCR ancrée » (« anchored PCR ») (Loh, Elliott et al. 1989) pour avoir l'extrémité 3' complète (Kiefer, Chatail-Hermitte et al. 2005). Ce type de PCR permet d'obtenir et d'amplifier une séquence d'ARNm à partir d'un très court fragment de celui-ci (Kiefer, Chatail-Hermitte et al. 2005). Dans notre cas, l'utilisation d'ARN totaux de la médullaire rénale de rat, d'une amorce 3' dessinée grâce à la séquence obtenue en simple hybride et contenant un site de restriction, et à une reverse transcriptase, permettra d'obtenir le brin d'ADNc. Une queue poly(dG), ou poly(dA) sera liguée à cet ADNc pour permettre la synthèse du brin complémentaire (Frohman, Dush et al. 1988). Par la suite, un second cycle d'amplification par PCR avec l'amorce 3' précédente et une seconde amorce 5' contenant un site de restriction est réalisé afin d'amplifier l'ADNc de manière plus spécifique qu'avec la seule première amorce. Par la suite, les trois séquences, correspondant à l'extrémité 5', 3' ainsi qu'à la séquence identifiée en simple hybride sont « réunies » pour former le fragment complet en vue des expériences ultérieures.

Pour chacune des protéines identifiées, la séquence complète de l'ADNc est alors utilisée pour vérifier que ladite protéine présente, dans les cellules de mammifère, le même rôle que celui observé dans les levures. En effet, de par leur complexité et leurs différences avec les levures, une protéine peut avoir un effet dans celle-ci et n'en avoir aucun dans les cellules de mammifère. De plus, dans les cellules de mammifère, les protéines sont dans un « environnement » favorable et donc la probabilité qu'elles acquièrent leurs conformations « naturelles » et qu'elles subissent les modifications post-traductionnelles adéquates est plus élevée. Par conséquent, cet environnement naturel peut révéler de manière plus significative les interactions ADN-protéine. Pour ce faire, nous pouvons utiliser un système de co-transfection permettant de « forcer » la surexpression de la protéine d'intérêt. Deux lots de chaque lignée cellulaire, par exemple les cellules de tubule collecteur et les fibroblastes (servant de témoins négatifs), seront, pour l'un, transfecté avec le vecteur contenant la séquence de liaison, en l'occurrence DE15, et le gène rapporteur de la luciférase seul (permettant donc de fixer le niveau de base de l'expression du gène), et pour le second, transfecté avec ce même vecteur d'expression et un vecteur contenant la séquence complète de l'ADNc de la protéine d'intérêt afin de voir si sa surexpression entraîne bien une augmentation de l'expression du gène rapporteur.

Par la suite, nous pouvons confirmer l'interaction de la protéine d'intérêt avec la séquence d'ADN *in vitro* par une expérience de retard sur gel: la séquence d'ADN sauvage et une forme mutée sont mises en présence de la protéine découverte produite à partir d'extraits nucléaires de médullaire rénale de rat et/ou de cellules transfectées par le vecteur contenant la séquence de la protéine. Cependant, cette dernière expérience impose une transcription ainsi qu'une traduction *in vitro* de la protéine d'intérêt (Wei, Angerer et al. 1999). Ces expériences de retard sur gel peuvent également être réalisées en compétition avec, comme il est habituel de le faire, une version de la séquence d'ADN de liaison non marquée (Liu, Bramblett et al. 1997) ainsi qu'avec un fragment d'ADN de liaison autre que

notre DE15, par exemple le motif « E-box/dyad » liant des protéines régulatrices impliquées dans la différenciation neuronale (Kiefer, Chatail-Hermitte et al. 2005). De la même manière, dans l'hypothèse où des anticorps sont disponibles, ou en les créant, il est également possible de réaliser des analyses d'immunoprécipitation conventionnelle (Durfee, Becherer et al. 1993) ou de la chromatine, ChIP (« **chromatin immunoprecipitation** ») sur des extraits nucléaires de cellules de médullaire, papille et cortex rénaux.

## 10. Séquence homologue à TonEBP

Comme mentionné dans la partie « Matériel et méthodes », une séquence similaire, bien que non identique, à TonEBP se trouve à proximité de la délétion de 102 pb. TonEBP est une protéine régulatrice dont l'expression est stimulée en réponse à une hypertonicité de l'environnement extracellulaire de la médullaire rénale (Cha, Woo et al. 2001; Jeon, Han et al. 2007) et, en retour, active la transcription de différents gènes (Woo, Lee et al. 2002). Parmi ceux-ci nous pouvons citer les gènes de l'*AQP2*, du co-transporteur sodium-myoinositol (*SMIT* ou « sodium myo-inositol transporter »), de l'aldolase réductase (*AR*), de la protéine de choc thermique 70 (*HSP70* ou « heat shock protein 70 »), du co-transporteur sodium-chlorure-bétaine (*BGT1* ou « bétaine GABA transport 1 ») et enfin du transporteur de l'urée régulé par la vasopressine (*UT-A* ou « urea transporter-A ») (pour revue, voir (Burg, Kwon et al. 1997)). L'élément de réponse à TonEBP a été mis en évidence dans les régions flanquantes 5' de chacun de ces gènes et en particulier de l'*AQP2* (**Figure 53**) (Storm, Klussmann et al. 2003).

```

tcagccgccccaggttgactccatcaccaaggccagggtcccagtgccccaggctctaggagctgctgt
ttggctggggctcccaggagaaggtgaagcttaagtattatgggtgattagctgcaagaatgcaagcaca
gaagacacaaacctttatgccttggaaatttgtcacaagccaaccagttgttttccatccctgtgaagcag
TonEBP
gaataattggaggtctgacagaagaacttcccagttaccagaaggagcagcactcatgttctctcttagtt
ttgtgtgaggtgttgccccctgccttggtcaacagtttgagtcagagagatgggggcccgggcacaatccccca
ccagacgttcccattcacaagacctgtgggggctgggagacgcctggggcagcagccctggggtaacca
aggaacaaacacggaaaaccaggagcgtcagtccttctgagctcattaaatggggaacattagtcag
ctgtgaagccaagataggtgataggcctgtgggtgggctgggatgggcatgggggcagagggccgcat
ggaggagaagaggtattggcctcaacgactccacctccccgccacgtgccagatccgggatggaaggacc
ctataaatgccacaaccagcctccccagaggccttgaGaaagagagcgatagagtgcgagagcgagtgcc
ccggagcatcctggcctgagacagctgggccagccccgcagggtctgcagcATGtgggagctccgctcc
atagccttc...tcatttgccaat

```

**Figure 53. Séquence du promoteur et du gène de l'*AQP2*.**

tggaaatttgt: séquence de liaison potentielle de TonEBP.

G: Site d'initiation de la transcription.

ATG: Site d'initiation de la traduction.

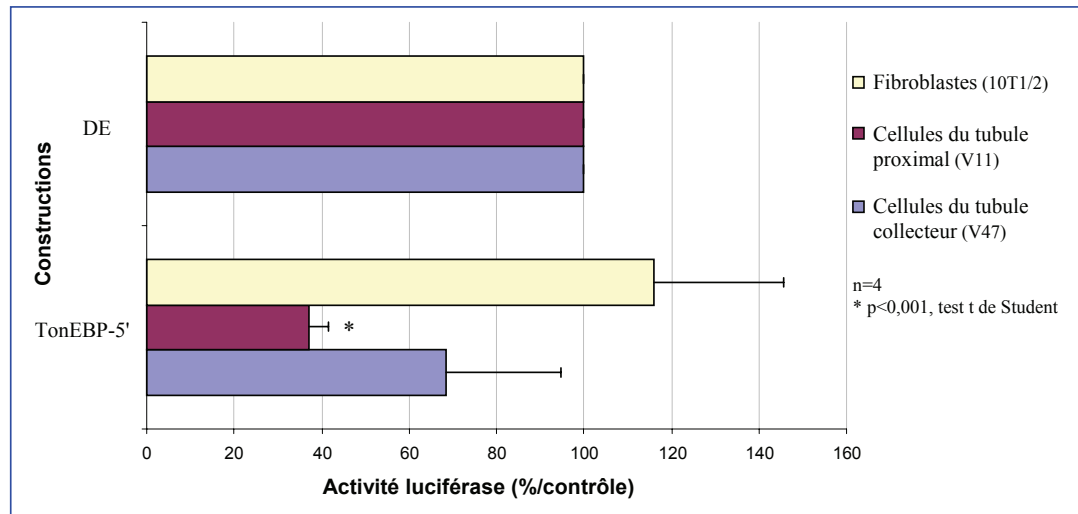
ATGtggg.....ccaat: gène de l'*AQP2* jusqu'au codon stop.

NB: Ce schéma ayant pour seul but de localiser la séquence de liaison de TonEBP en amont de l'*AQP2*, le promoteur complet ainsi que le gène en lui-même n'ont été représentés que de manière simplifiée.

Bien que le taux d'homologie de notre séquence « TonEBP », dénommée par la suite TonEBP5' en raison de sa localisation en amont du point de cassure 5' de la délétion, ne soit que partiel et ne comporte pas les nucléotides semblant être les plus importants pour la liaison de l'élément, nous avons tout de même voulu étudier son rôle éventuel sur l'expression de l'*AVPR2*. Cette séquence, dont le taux d'homologie est de 7 nucléotides sur 11 (séquence consensus TonEBP: TGGAAANN(C/T)N(C/T) (Stroud, Lopez-Rodriguez et al. 2002); séquence localisée à proximité de la délétion: **TGGAGGGGGTA**), est clonée une nouvelle fois en amont du promoteur de l'*AVPR2* et du gène rapporteur. Cet intérêt nous est apparu d'autant plus important que TonEBP régule en particulier l'expression de l'*AQP2*. Par la suite, et dans la mesure où l'ensemble des gènes régulés par TonEBP présentent au niveau de leurs régions flanquantes 5' un site de liaison de cet élément, nous avons étudié l'effet de la modification de la tonicité sur l'expression de l'*AVPR2* en présence du « promoteur minimal » de ce gène.

### 10.1. Étude de l'effet de TonEBP5'

Cette série d'expériences a visé, comme la plupart, à vérifier si la séquence TonEBP5' permettait ou non une expression du gène rapporteur. Pour ce faire, nous avons tout d'abord comparé l'effet du DE dans sa forme sauvage mais comportant en plus la séquence TonEBP5' avec le DE précédé de cette même séquence mais cette fois-ci mutée. Il faut noter que cette séquence est mitoyenne au DE. Les résultats d'expression dans chacune des trois lignées cellulaires (tubule collecteur, tubule proximal et fibroblastes) sont présentés ci-dessous (**Figure 54**, page 190).



**Figure 54. Effet de la séquence TonEBP5' sur le gène rapporteur de la luciférase.**

Une nouvelle fois, les résultats sont présentés par rapport au contrôle (ici, le DE sauvage avec, clonée en amont, la séquence similaire à TonEBP). La séquence TonEBP5' est entièrement mutée afin d'empêcher la liaison de la protéine potentielle.

La construction utilisée a fait appel, non pas au fragment de 4.6 kb, mais à celui de 1.4, c'est à dire ne comportant que le promoteur minimal de l'*AVPR2*, sans CSE1 ni CIE1.

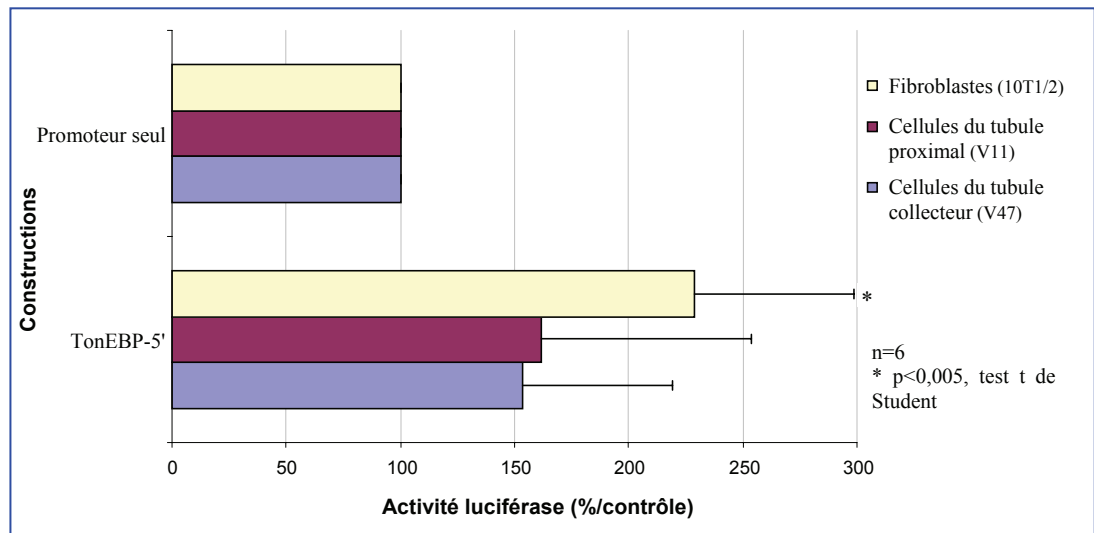
Les moyennes +/- SD ont été obtenues sur quatre séries d'expériences indépendantes réalisées en triplicata.

D'après ces résultats, nous pouvons voir que le fait de muter la séquence TonEBP5', mais en conservant le reste de la séquence normale, entraîne une diminution du niveau d'expression à la fois dans les cellules du tubule collecteur (30% de moins que le contrôle) et dans les cellules du tubule proximal (63%) alors que dans les fibroblastes ces mutations ne présentent aucun effet (16% d'expression en plus par rapport au contrôle). Cependant, nous pouvons également relever que l'effet semble une nouvelle fois plus important dans la lignée proximale que dans la lignée du tubule collecteur (30 contre 63%) ; ceci est d'autant plus vrai que la déviation standard dans les cellules du tubule collecteur est très importante (30%).

À première vue, il semblerait qu'effectivement la séquence TonEBP joue un rôle dans l'expression du gène rapporteur et donc de l'*AVPR2*. Cependant, du fait que lors



d'expériences précédentes, nous avons localisé d'autres zones à l'intérieur du DE comme paraissant responsables de l'effet « tissu spécifique » du DE et que lors de cette expérience l'ensemble de la séquence du DE était dans sa forme sauvage, nous ne pouvons attribuer de manière formelle l'effet observé à cette seule séquence. Nous nous sommes donc attachés à étudier l'effet de la séquence TonEBP5' seule, indépendamment du reste du DE. À cette fin, nous avons cloné cette séquence directement en amont du promoteur minimal de l'*AVPR2* et transfecté une nouvelle fois chaque lignée cellulaire (**Figure 55**).



**Figure 55. Comparaison de l'effet de la séquence TonEBP5' seule.**

Il est important de noter que les niveaux d'expression de base du contrôle (ne comportant que le promoteur de l'*AVPR2*) en unités arbitraires sont très faibles.

Les 11 pb de la séquence TonEBP ont été clonées directement en amont du promoteur (fragment de 1.4 kb).

Les moyennes +/- SD ont été obtenues sur six séries d'expériences indépendantes réalisées en triplicata.

D'après ces résultats, et bien que les déviations standards soient relativement élevées, nous pouvons dire que la séquence TonEBP5' mutée seule ne semble pas empêcher l'activation du gène rapporteur. Au contraire, il apparaît même que le niveau d'expression soit augmenté et ce quelque soit la lignée cellulaire étudiée. Par conséquent, il semblerait que cette séquence n'influe pas sur l'expression de l'*AVPR2*.

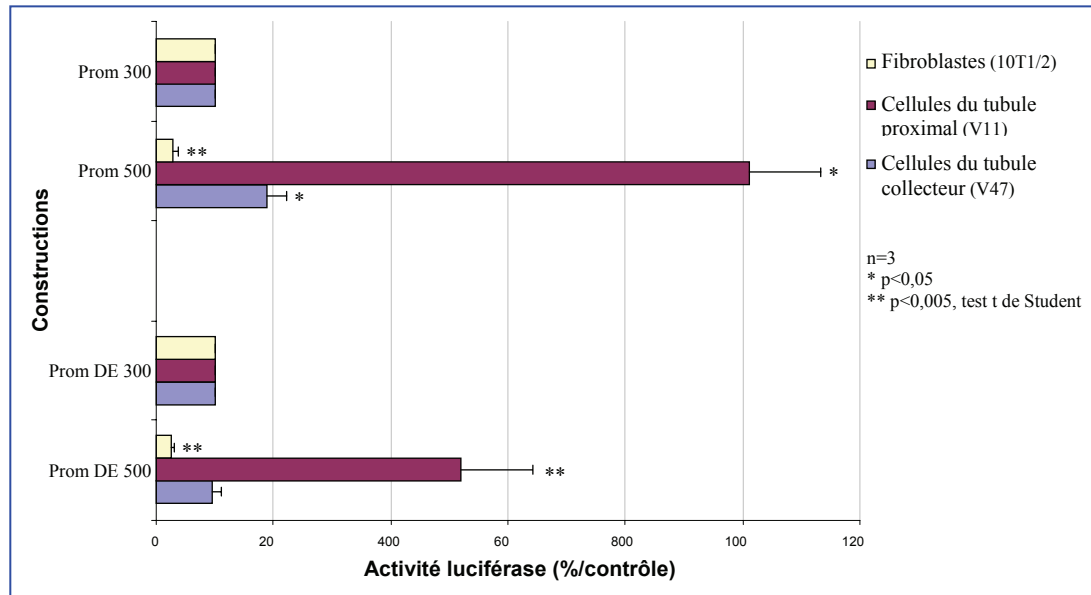
Malgré ces résultats pour le moins décourageants, certainement dûs au fait que le fragment utilisé, cassette de 30 pb comportant les 11 pb de la séquence similaire à TonEBP, ne comporte pas suffisamment de nucléotides de part et d'autre de cette séquence, nous avons tout de même voulu, à la fois, éliminer définitivement le rôle de cette séquence et étudier l'effet de la modification de la tonicité extracellulaire sur l'expression de l'*AVPR2* en changeant les conditions de culture (isotonique vs. hypertonique).

## **10.2. Effet de la modification de la tonicité des cellules**

Il a été démontré que TonEBP activait l'expression de l'*AQP2* en condition d'hypertonie du milieu extracellulaire (Hasler, Jeon et al. 2006). Par conséquent, nous avons donc réalisé une nouvelle série d'expériences mais cette fois-ci en jouant sur les conditions de tonicité. Nous avons débuté notre investigation avec la séquence génomique amont de l'*AVPR2* semblant jouer le rôle de promoteur minimal (fragment de 1.4 kb). Par la suite, nous avons réalisé la même expérience mais cette fois-ci avec le fragment complet jouant sur l'expression de l'*AVPR2* tel que démontré par A. Calmont et al., soit 4.6 kb (Calmont, Reichwald et al. 2000).

### **10.2.1. Effet basal de l'hypertonie**

Devant le fait que la séquence TonEBP5' semblait jouer un rôle dans l'activation du gène rapporteur uniquement lorsqu'elle est associée au DE (**Figure 54**, page 190), nous avons réalisé les mesures d'expression en modifiant la tonicité extracellulaire (ajout dans le milieu de culture de NaCl 5M pour obtenir une hypertonicité de 500 mOsmol) avec une construction contenant à la fois cette dernière dans sa forme sauvage et le DE cloné en amont du fragment de 1.4 kb du promoteur de l'*AVPR2* jouant le rôle de « promoteur minimal » de ce gène (**Figure 56**, page 193).



**Figure 56. Effet de la modification de la tonicité sur l'expression du gène rapporteur.**

Chacune des constructions utilisées comporte le fragment du « promoteur minimal » de l'*AVPR2*, soit 1.4 kb (« Prom » sur la figure). Les résultats sont donnés en pourcentage par rapport au contrôle, soit le promoteur seul.

L'isotonicité est à 300 mOsmol et l'hypertonécité à 500, respectivement « 300 » et « 500 » sur le graphique.

Les moyennes +/- SD ont été obtenues sur trois séries d'expériences indépendantes réalisées en triplicata.

De prime abord il faut noter que les résultats en unités arbitraires en condition d'isotonécité, bien qu'étant plus élevés que ceux obtenus lors de l'étude de la séquence TonEBP5' seule, se sont tout de même révélés relativement faibles. Ensuite, nous pouvons voir sur ce graphique que le fait de modifier les conditions extracellulaires (hypertonécité à 500 mOsmol) entraîne une augmentation très importante de l'expression du gène rapporteur dans les cellules du tubule proximal (900% d'augmentation) lorsque seul le promoteur de l'*AVPR2* est présent (Prom 500, histogramme rouge). De la même manière, le seul promoteur permet également une augmentation d'expression dans les cellules du tubule collecteur quoique bien inférieure (90%, Prom 500, histogramme bleu). À contrario, dans les fibroblastes le niveau d'expression est grandement réduit puisque le niveau d'expression

n'est que de moins de 30% (Prom 500, histogramme jaune); ceci permet de dire, si besoin en était, que les fibroblastes, au contraire des cellules rénales régulant les échanges hydriques et donc étant constamment dans des situations d'hyper ou d'isotonicité, ne supportent pas du tout les modifications osmotiques de leur environnement.

Point plus intéressant, il semblerait que non seulement le fait d'ajouter l'ensemble du DE (avec la séquence TonEBP5') augmente le niveau d'expression dans les cellules du tubule proximal en conditions hypertoniques (Prom DE 500, histogramme rouge) mais que cette augmentation est beaucoup moins importante, 400% au lieu de 900. De la même manière, cette même construction DE/séquence TonEBP5', ne présente, non seulement, aucune augmentation du niveau d'expression dans les cellules du tubule collecteur, mais entraîne même une légère diminution en condition d'hypertonie (95%, histogramme bleu Prom DE 500). Dans les fibroblastes, la même analyse que dans le cas du promoteur seul a lieu, nous pouvons constater une nouvelle fois une chute drastique du niveau d'expression (moins de 30%, histogramme jaune Prom DE 500) traduisant une forte mortalité des cellules suite à la modification de la tonicité du milieu.

Ces résultats s'avèrent par conséquent particulièrement intéressants puisqu'ils permettent de voir que le promoteur seul (fragment de 1.4 kb mitoyen au gène de l'*AVPR2*) semble répondre aux variations de la tonicité extracellulaire. Nous avons donc entrepris une analyse détaillée de la séquence de ce fragment et il ressort que celui-ci contiendrait effectivement une séquence potentielle de liaison de TonEBP puisque l'homologie de séquence est de 9 nucléotides sur les 11 de la séquence consensus.

Bien que la séquence identifiée, localisée à 849 pb en amont du SIT, ne présente pas une homologie parfaite (9 nucléotides sur les 11 de la séquence consensus), celle-ci contient, contrairement à celle localisée en amont de la délétion, TonEBP5', les 6 premiers qui sont invariables, soit TGGAAA (**Figure 57**, page 195).

```

gaggaggccttggccgCgggcccgaacttgggcctgggtccgtgaggtggttttgggtctctggcttcacaggcaacagagaa
gacagacaaaacaggaagaaagcagctgccttgggctgggctgggctgggctggcctcggctgagccaagccaggcctggg
tgccgggggagtggaagagaaactactgggatggggctggagggggtgtgggactcgggaaggagagaggtgttgggg
TonEBP
Gagggaggaggagggtcaggtacaggggaaggtgcgtccatactcatggtatgttcaagaacatgagcgcgagcgtctctgt
gttgtgtgtttgtggctgtgtggctgtatcatgtgaggttgtgtgtgggtgggagggagcccgtgagcacacggaggtccc
cagccccctcttcttaggacaggtagtgtgcaggtggggcaggaggaagaggtgggggtgtccctggatctcacaggggtt
cgtgaagcctggcttggccccctgccccactcctcccttctctgtccctcgtctccggccaactgggcccactgggggag
gaggaggggctgcgtgggctgggaggggcccagcgaaggtgttttacccttcttgcctgggcccagcggaggagca
ggaggaccccacttgggaagggggcgtgaagctcccatgaaaaagcagcgcagtcctgggcccagaccacgcctctctg
gcctcagtttccccacttataaaatgggaatgctgaactaagtgaacctccagagcactgccaaccagacaatccaacc
agggggcgctggttagggtgaggtgggctggaggctatggcagtgaggaggaggagtcctgggcccgggaccagggagggc
cctggggaaggaagggaaacaggaggccaggggagggcctgggggaaaggggagggggaggaagtcctcctggccag
gtcactcccagaggctgggctgggccagggcagccgatggagagcagatctgagcAcccagccacctcacgcca
BRE Inr
ccgcccagctgcccaggagcccagccaggttaaggggctgcgcctgcctgccccctgcccagtcctccagccctcggatgg
DPE
tggcctctctcggcctcgggttggggcaggggagttctgcgtgtctgtctggggtgccactcccaaaccgggactcatg
ggctgcctgggggatcctgggttctgtgcacccgtctgtctgacctccctctcaatcttccctgccaggactggccat
actgccaccgacacgtgcacacacgccaacaggcatctgccatgctggcatctctataagggctccagtcagagaccct
gggccattgaaacttgcctcctcaggcagaggctgagtcgcacatcacctccaggccctcagaacacctgcccagcccc
ccATGctcat...tcgtga

```

**Figure 57. Localisation de la séquence TonEBP potentielle dans le promoteur de l'AVPR2.**

C: début de la séquence de 1.4 kb (appelée promoteur de l'AVPR2).

tggaagagaa: Séquence similaire à TonEBP.

A: Site d'initiation de la transcription.

ATG: Site d'initiation de la traduction.

ATGctca...tcgtga: schématisation du gène de l'AVPR2.

NB: les éléments précédemment identifiés, voir **Figure 21** page 54, BRE, Inr, DPE ont été ajoutés.

Une seconde conclusion peut être dégagée de ces résultats de mesures en conditions hypertoniques, à savoir que le fait d'ajouter le DE semble limiter la capacité de réponse des cellules, aussi bien proximales que du tubule collecteur: augmentation du niveau d'expression de 900% avec le promoteur seul, et « seulement » de 400%, soit une chute de plus de 55%, lorsque le DE est présent, pour les cellules proximales; et 200% avec le promoteur seul et 95% lorsque le DE est ajouté, soit une diminution de plus de 52%, dans les cellules du tube collecteur. Ce qui semble indiquer que le DE pourrait contenir un élément limitant la réponse aux modifications de la tonicité extracellulaire.

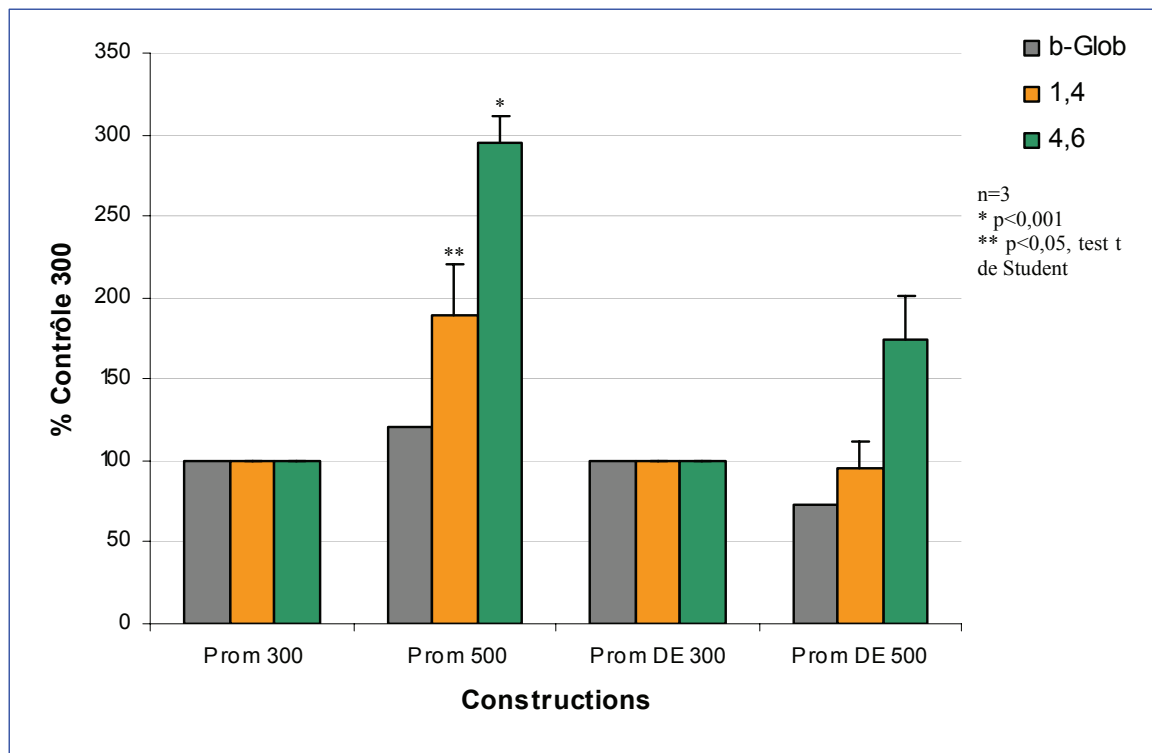
Devant cette constatation nous avons voulu vérifier si le fait d'avoir, non plus cette fois-ci le fragment « minimal » du promoteur, soit 1.4 kb, mais le fragment de 4.6 kb, incluant

les éléments activateurs et inhibiteurs précédemment identifiés par A. Calmont et al. (Calmont, Reichwald et al. 2000), celui-ci pouvait jouer un rôle sur l'expression du gène en conditions hypertoniques.

### **10.2.2. Comparaison de l'effet de la tonicité cellulaire en fonction du promoteur**

Dans cette série d'expériences, les constructions utilisées sont de deux types. Tout d'abord le vecteur d'expression de la luciférase ne contient que les fragments de 1.4 ou 4.6 kb et les mesures sont réalisées en conditions isotoniques (300 mOsmol) ou hypertoniques (500 mOsmol). Un second vecteur est créé, toujours en contenant l'un ou l'autre de ces fragments, en clonant en plus le DE en amont de ceux-ci et les lignées cellulaires subissent des conditions, soit isotoniques, soit hypertoniques. Un contrôle négatif, représenté par un troisième vecteur ne contenant que le promoteur de la  $\beta$ -globine, puisque celui-ci ne contient pas d'élément de liaison de TonEBP, est également utilisé.

Les résultats sont présentés successivement pour les cellules du tubule collecteur (**Figure 58**, page 197), pour les cellules du tubule proximal (**Figure 59**, page 199) et pour les fibroblastes (**Figure 60**, page 202). Il est important de noter que, comme dans l'ensemble des expériences de transfection des cellules du tubule collecteur, celles-ci, du fait d'une croissance plus lente, présentaient, de fait, des niveaux d'expression toujours plus faibles que les cellules du tubule proximal et à fortiori, que les fibroblastes. C'est également pour cette raison que les résultats sont présentés en pourcentage par rapport aux contrôles.



**Figure 58. Effet de la modification de la tonicité extracellulaire dans les cellules du tubule collecteur.**

Les résultats sont donnés en pourcentage par rapport au contrôle, représenté par les conditions de culture isotoniques (« 300 »), soit avec le DE, « Prom DE 300 », soit sans, « Prom 300 ».

Les moyennes +/-SD sont obtenues sur trois expériences indépendantes réalisées en triplicata.

NB: b-glob représente la construction contenant le promoteur de la  $\beta$ -globine, 1.4 le « promoteur minimal » de l'*AVPR2* (1.4 kb) et 4.6, le fragment comportant les éléments activateurs et inhibiteurs identifiés par A. Calmont (4.6 kb).

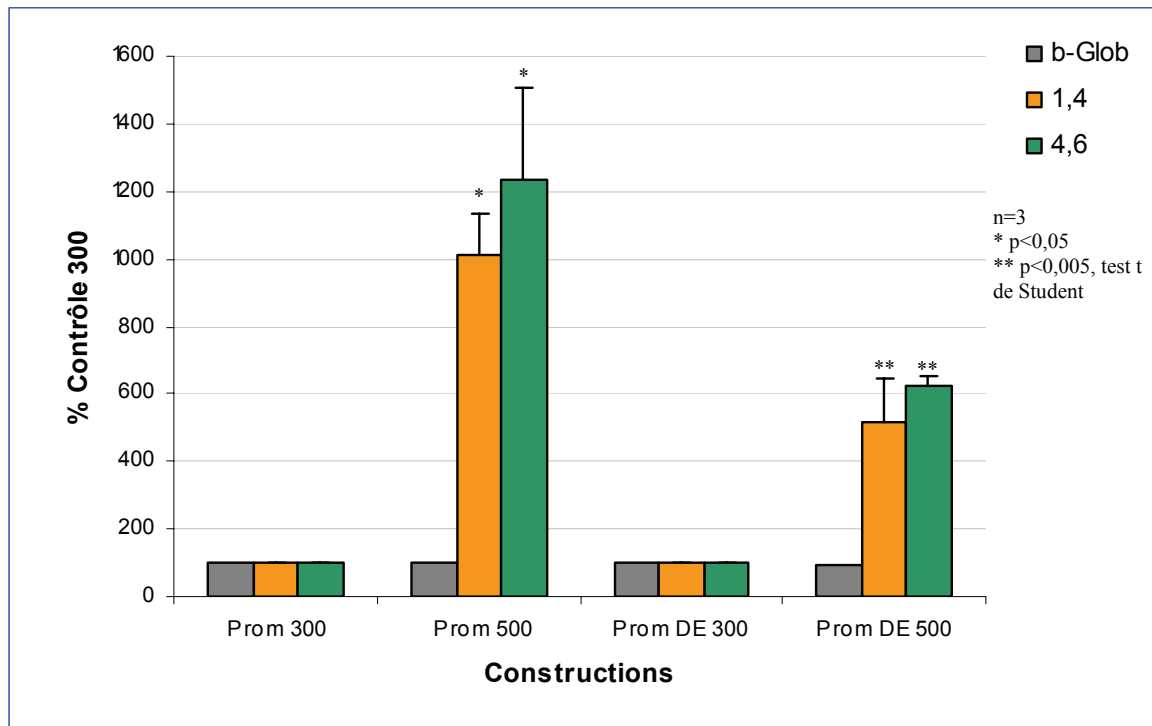
Tout d'abord, nous pouvons voir sur le graphique que les résultats observés précédemment en conditions hypertoniques avec le fragment 1.4 kb dans les cellules du tubule collecteur sont retrouvés à l'identique, environ 90% d'augmentation dans les deux cas, Prom 500 histogramme bleu (**Figure 56**, page 193) et Prom 500 histogramme orange ci-dessus. Ensuite, le fait d'avoir le fragment de 4.6 kb seul engendre une augmentation encore plus importante du niveau d'expression, quasiment 200% (histogramme vert, Prom 500).

Le fait d'ajouter le DE entraîne, une nouvelle fois, une chute du niveau d'expression lorsque le fragment cloné en aval est le 1.4 kb (histogramme orange, Prom DE 500). Lorsque le fragment complet de 4.6 kb est présent, une augmentation, bien que légère, environ 70%, est observée (histogramme vert, Prom DE 500). Cependant, nous pouvons tout de même remarquer que dans ce cas, le niveau d'expression est tout de même bien inférieur à celui observé dans les mêmes conditions mais sans le DE: 200% d'augmentation sans le DE contre 70% lorsque celui-ci est présent, histogrammes verts, Prom 500 et Prom DE 500, respectivement.

L'ensemble de ces observations paraît confirmer le fait que le DE et ce, quelque soit le fragment cloné en aval, 1.4 ou 4.6 kb, semble limiter le niveau d'expression du gène en conditions hypertoniques, bien que cette limitation soit moindre avec le fragment complet (pour rappel, contenant les éléments activateur et inhibiteur, CSE1 et CIE1 respectivement) qu'avec le promoteur seul de 1.4 kb ne contenant ni CSE1, ni CIE1. De plus, lorsque nous comparons les niveaux d'expression, en conditions hypertoniques, de la construction 1.4 (contenant une séquence potentielle TonEBP, voir **Figure 57**, page 195) avec la construction 4.6 contenant le DE, nous pouvons remarquer que ceux-ci sont identiques: environ 70% d'augmentation par rapport au contrôle dans les deux cas (histogramme orange, Prom 500 et histogramme vert, Prom DE 500).

Concernant les résultats obtenus avec la construction contenant le seul promoteur de la  $\beta$ -globine, et bien que ceux-ci soient limités en comparaison avec ceux observés avec les séquences 1.4 et 4.6 kb, il faut noter qu'ils n'ont été obtenus que sur une seule série de mesures. Cependant nous pouvons tout de même remarquer une absence de réponse des cellules quelque soit les conditions de culture.





**Figure 59. Effet de la modification de la tonicité extracellulaire dans les cellules du tubule proximal.**

Les résultats sont donnés en pourcentage par rapport au contrôle, qui est représenté par les conditions de culture isotoniques (« 300 »), soit avec le DE, « Prom DE 300 », soit sans, « Prom 300 ».

Les moyennes +/-SD sont obtenues sur trois expériences indépendantes réalisées en triplicata.

NB: les abréviations sont les mêmes que celles utilisées à la figure 58.

Au niveau des cellules du tubule proximal, nous retrouvons également les résultats précédemment obtenus avec l'utilisation du seul promoteur 1.4 kb en conditions hypertoniques, à savoir une très forte augmentation d'expression de l'ordre de 900% (histogramme rouge, Prom 500, voir **Figure 56**, page 193, et histogramme orange, Prom 500 ci-dessus). Le fait d'ajouter le DE entraîne une nouvelle fois une chute du niveau d'expression, bien que celui-ci soit toujours largement supérieur au contrôle (environ 400%, histogramme orange, Prom DE 500).

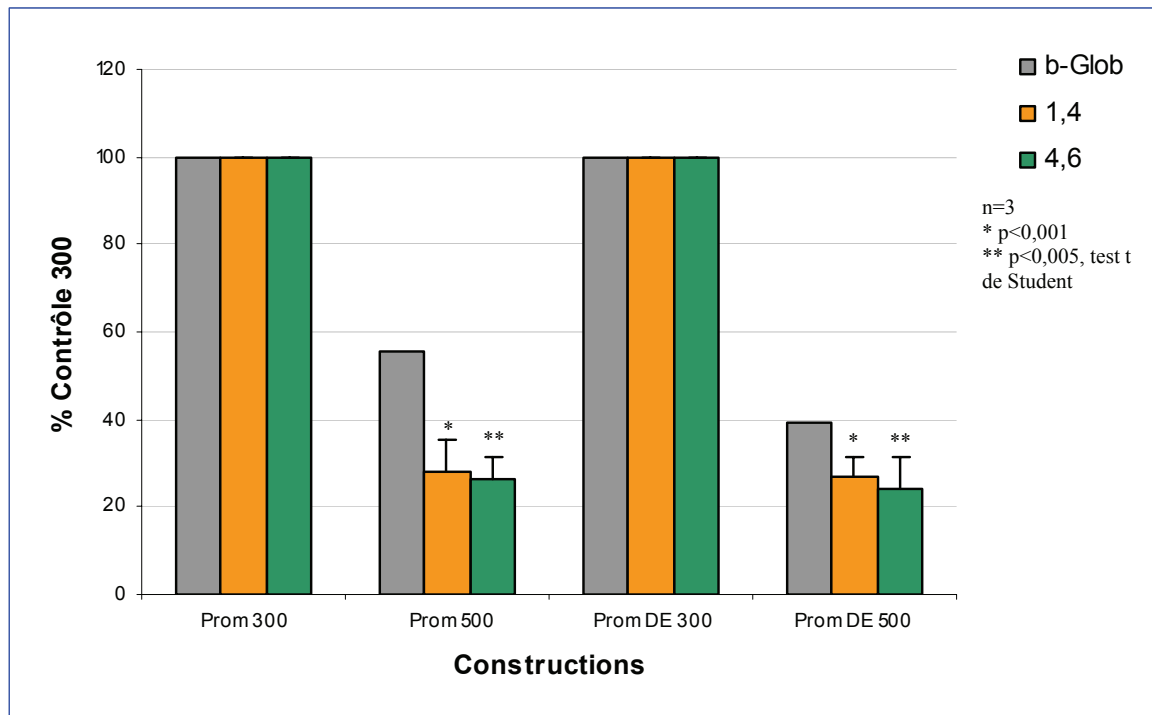
Le fait d'augmenter la tonicité extracellulaire à 500 mOsmol des cellules n'ayant été transfectées qu'avec la construction contenant le fragment de 4.6 kb, engendre également un niveau d'expression beaucoup plus élevé que le contrôle, plus de 1000% (histogramme vert, Prom 500). Cette augmentation, bien que largement supérieure à celle observée, dans les mêmes conditions et pour la même construction, dans les cellules du tubule collecteur (plus de 1000% contre 200%, voir histogramme vert, Prom 500, **Figure 58**, page 197), présente la même différence avec la construction contenant le fragment de 1.4 kb: 1000% et 900% respectivement pour les constructions 4.6 et 1.4 kb dans les cellules du tubule proximal, 200% et 90% respectivement dans les cellules du tubule collecteur, soit une différence d'environ « 100% » dans chacun des cas. Ceci semble confirmer, une nouvelle fois, un rôle protecteur de la séquence TonEBP potentielle, localisée au niveau du promoteur de l'*AVPR2*, des cellules rénales lors de la modification de la tonicité extracellulaire afin de les empêcher d'entrer en plasmolyse (**Figure 57**, page 195).

Lorsque le DE est ajouté aux constructions (1.4 ou 4.6 kb), le même effet « inhibiteur », en conditions hypertoniques, est retrouvé par rapport aux cellules du tubule collecteur bien que celui-ci paraît moins prononcé avec la construction 4.6: une augmentation du niveau d'expression de 500% est tout de même observée (histogramme vert, Prom DE 500) alors que celle-ci n'était que de 70% dans les cellules du tubule collecteur (histogramme vert, Prom DE 500, voir **Figure 56**, page 193). Cette observation peut légitimement nous laisser penser que le DE exercerait son effet « inhibiteur » en conditions hypertoniques préférentiellement dans les cellules du tubule collecteur. Cependant, et de manière pour le moins surprenante, eu égard à l'observation faite dans le cas des cellules du tubule collecteur démontrant que le fragment 4.6 contenant le DE (histogramme vert, Prom DE 500, voir **Figure 58**, page 197) et le fragment 1.4 kb seul (histogramme orange, Prom 500, voir **Figure 58**) en conditions hypertoniques présentaient les mêmes niveaux d'expression, cette constatation ne peut être faite dans les cellules de tubule proximal. En effet, et bien que le niveau d'expression de la construction 4.6 DE soit plus élevé que le contrôle

(histogramme vert, Prom DE 500), celui-ci n'atteint pas le niveau d'expression obtenu avec la construction 1.4 kb seule (histogramme orange, Prom 500).

L'ensemble de ces observations semble indiquer que le DE, bien que paraissant limiter les effets « protecteurs » du promoteur, via la séquence TonEBP potentielle (**Figure 57**, page 195), voit son action contrecarrée par un élément présent uniquement au niveau de la séquence de 4.6 kb et agissant préférentiellement dans les cellules du tubule collecteur. Cette observation semble étayée par le fait que dans les conditions hypertoniques pour chacune des constructions, 1.4 kb seul ou 4.6 avec le DE, au niveau des cellules du tubule collecteur, le niveau d'expression est identique alors que dans le cas des cellules proximales, le fait d'avoir le fragment de 4.6 kb ne semble pas en mesure d'empêcher l'effet « inhibiteur » du DE, pas assez en tout cas pour permettre d'atteindre des niveaux d'expression proches de ceux obtenus avec le promoteur seul.

Cet effet serait-il dû à l'élément CSE1 identifié par A. Calmont et al. dans la mesure où celui-ci, plutôt que d'activer directement la transcription de l'*AVPR2*, lèverait l'inhibition de l'inhibiteur CIE1 (voir **Figure 22**, page 56 pour rappel)?



**Figure 60. Effet de la modification de la tonicité extracellulaire dans les fibroblastes.**

Les résultats sont donnés en pourcentage par rapport au contrôle, qui est représenté par les conditions de culture isotoniques (« 300 »), soit avec le DE, « Prom DE 300 », soit sans, « Prom 300 ».

Les moyennes +/-SD sont obtenues sur trois expériences indépendantes réalisées en triplicata.

NB: les abréviations sont les mêmes que celles utilisées à la figure 58.

Au niveau des fibroblastes, nous pouvons une nouvelle fois constater que ces derniers ne résistent pas aux conditions hypertoniques puisque, d'une part, la mortalité des cellules lors des expériences était très élevée et d'autre part, parce que les niveaux d'expression sont considérablement diminués quelque soit la construction utilisée.

En conclusion générale de ces expériences de quantification de l'expression du gène en fonction des conditions de tonicité, nous pouvons dire que les résultats obtenus dans des conditions hypertoniques, semblent aller à l'encontre de ceux observés au préalable dans les conditions isotoniques ayant démontré une action directe et positive du DE sur la

transcription du gène de l'*AVPR2* (voir **Figures 46 à 49**, pages 163 à 168, et (Debrand 2004)). Cependant, il apparaît tout de même évident que dans les conditions isotoniques, le DE exerce une action positive sur l'activation du gène puisque les niveaux d'expression sont tout de même largement plus élevés que les contrôles. Ceci pourrait légitimement laisser croire à un double rôle du DE en fonction des conditions de tonicité environnantes, activateur lorsque le milieu est isotonique, et inhibiteur lorsque celui-ci est hypertonique. Cette conclusion implique, par conséquent, un rôle du DE ainsi qu'une modulation de l'expression de l'*AVPR2* beaucoup plus complexe que se limitant au seul effet du DE, ainsi qu'aux éléments CSE1 et CIE1. En effet, lors des études en conditions isotoniques, le DE semblait agir indépendamment de chacune de ces deux séquences alors qu'en conditions hypertoniques, un phénomène de coopération semble évident.

Ceci nous permet donc de dire que la régulation de l'expression adéquate de l'*AVPR2* ferait appel, comme pour de nombreux gènes, à différents éléments régulateurs ainsi qu'à une combinaison de diverses protéines chargées, en fonction des conditions environnantes, d'activer l'expression de ce gène. L'observation *in vivo* du rôle du DE dans les souris transgéniques permettra, peut être, d'éclaircir cette situation pour le moins contradictoire.

## 11. Modèle murin

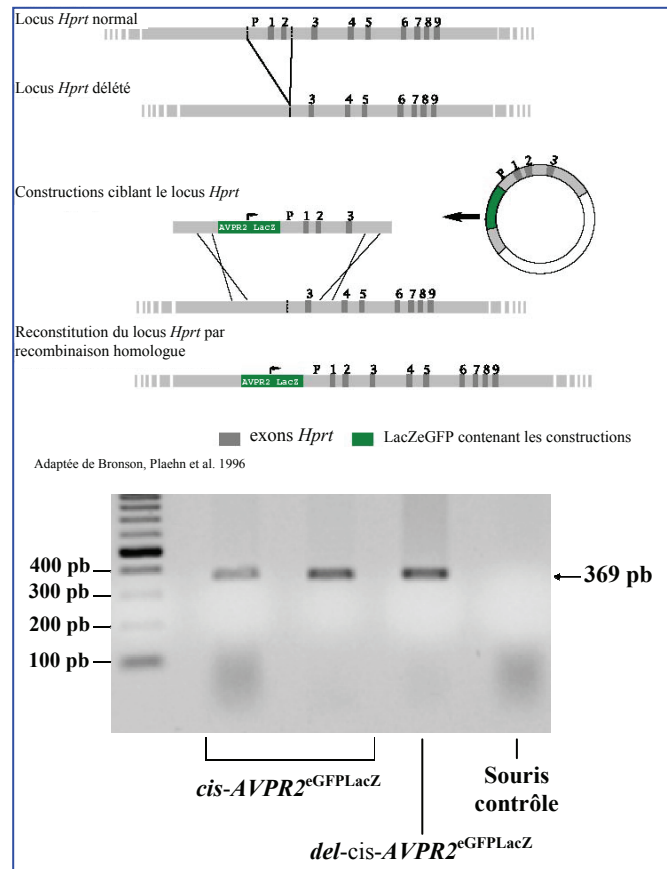
Après avoir démontré, dans un système de culture cellulaire, le rôle de la délétion dans l'expression de l'*AVPR2* au niveau rénal, nous nous sommes attachés à vérifier ces résultats *in vivo*. Le modèle murin utilisé, en plus de confirmer le rôle du DE, permet d'étudier l'expression spatio-temporelle de l'*AVPR2* sous la dépendance de cet élément. Ces expériences ont lieu dans le système *Hprt* dans une structure chromatinienne ouverte due à l'expression ubiquitaire de ce gène.

Cependant, lors de ces expériences, il est important de noter que le fragment étudié ne se limite pas à la délétion de 102 pb, mais inclut également le polymorphisme (pour rappel, celui-ci consiste en une substitution d'une guanine par une adénine plus de 220 pb en aval de la délétion). Par conséquent, la construction ne fait plus 120 pb mais 429. De plus, le promoteur utilisé correspond au fragment de 4.6 kb identifié par A. Calmont et al. comportant les éléments CSE1 et CIE1, respectivement activateur et inhibiteur de l'*AVPR2*.

### 11.1. Reconstitution du locus *Hprt* dans les cellules ES

Cette reconstitution consiste à vérifier, à la fois la présence ainsi que l'orientation de l'ensemble des séquences incorporées au site *Hprt*. La première vérification consiste à s'assurer que les cellules ES ont bien incorporé et donc bien reconstitué le locus *Hprt*. Pour rappel, ces cellules comportent une délétion du locus *Hprt* englobant le promoteur ainsi que les deux premiers exons du gène *Hprt*. Le vecteur de destination comporte, quant à lui, en plus de nos séquences d'intérêt DE-4.6 et du gène *eGFP-LacZ*, le promoteur et le premier exon humain du locus *Hprt* suivi de la séquence de la souris de ce même gène (exons 2 à 9) (**Figures 38 et 61**, pages 149 et 205). Par conséquent, lorsque le locus sera reconstitué, il comportera, dans le sens 5'-3', le DE, le fragment de 4.6 kb, le gène *eGFP-LacZ*, le

promoteur du gène *Hprt* et le premier exon humain suivi de la séquence *Hprt* complète de la souris. Cette vérification se fait par amplification par PCR consistant à amplifier, grâce à deux amorces spécifiques, l'une de l'extrémité 5' de la séquence humaine et la seconde de l'extrémité 3' du brin complémentaire de la séquence de souris, l'extrémité 5' du gène *Hprt* reconstitué humain/souris (**Figure 61**).



**Figure 61. Reconstitution du locus *Hprt* dans les cellules ES.**

La lignée ES de souris comporte une délétion du promoteur et des deux premiers exons (« locus *Hprt* délété »). Le vecteur cible, « constructions ciblant le locus *Hprt* », présente le fragment d'intérêt (constructions *cis-AVPR2* et *Del-cis-AVPR2*) en amont des gènes rapporteurs *LacZeGFP*, ainsi que le promoteur et l'exon 1 du gène *Hprt* humain suivi de la séquence de la souris de ce même gène. La recombinaison homologue avec le locus endogène est rendue possible par la présence de séquences homologues respectivement en amont et en aval du fragment d'intérêt et de l'exon 3 de la séquence *Hprt* murine.

L'obtention d'un fragment de 369 pb par amplification par PCR, grâce à une amorce sens, en 5', correspondant à la séquence humaine, et à une amorce antisens murine, en 3', permet de confirmer la présence du vecteur cible dans les cellules ES injectées par la construction.

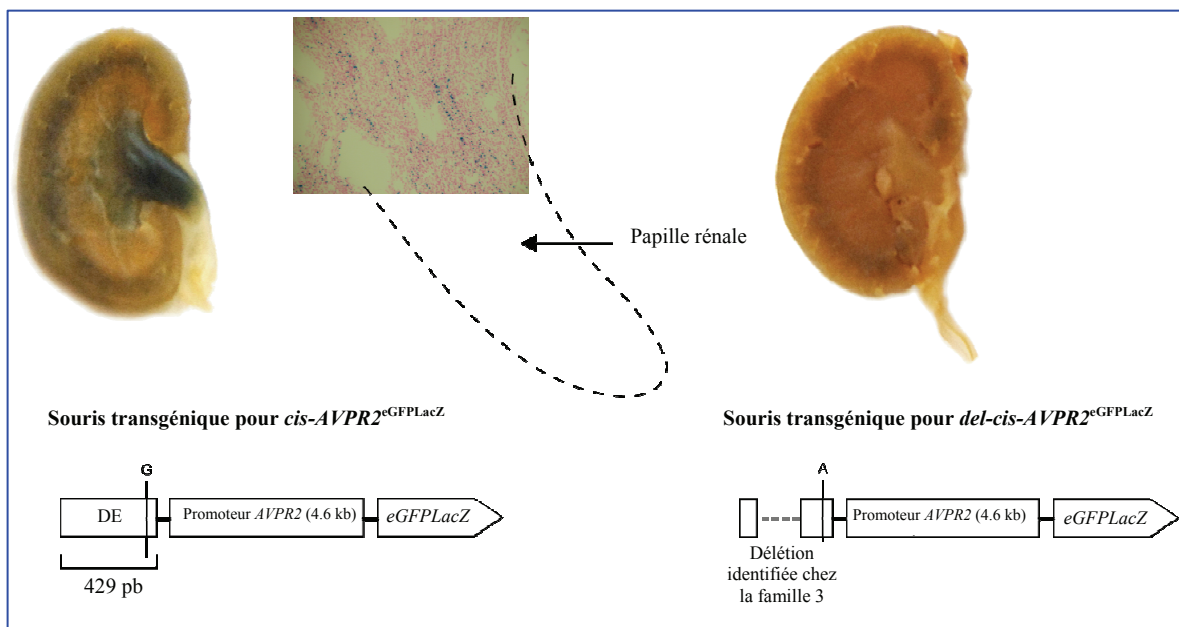
Par la suite, les cellules sont mises en culture sur milieu HAT afin de vérifier que le locus a été restauré et que le transgène est intégré au site délété *Hprt*.

Par la suite, d'autres PCR, quatre au total, permettent de s'assurer que les différents éléments, DE, fragment de 4.6 kb, gène *eGFP-LacZ*, et séquence humaine et murine du gène *Hprt* sont bien présents et dans la bonne orientation grâce à l'emploi de différents couples d'amorces spécifiques des extrémités 3' et 5' de chacun des fragments de part et d'autre des points de jonction de ceux-ci (résultats non présentés).

## 11.2. Etude de l'expression du gène rapporteur sous la dépendance de l'élément distal dans différents endothéliums

### 11.2.1. Dans les glomérules rénaux

La première série d'expériences a consisté à vérifier, grâce à une construction contenant la séquence sauvage, ou complète, *cis-AVPR2<sup>eGFP-LacZ</sup>*, et à une seconde « contenant » la délétion et le polymorphisme, *del-cis-AVPR2<sup>eGFP-LacZ</sup>*, que la séquence DE permettait bel et bien une expression au niveau rénal (**Figure 62**).



**Figure 62.** Marquage des reins de souris transgéniques avec (gauche) et sans DE+polymorphisme (droite).

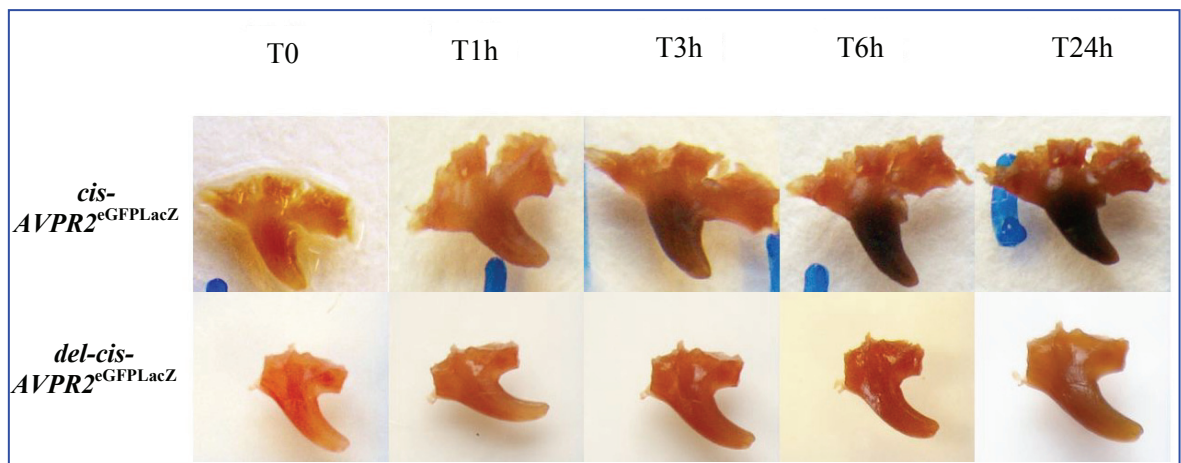


Les constructions utilisées pour générer les deux lignées de souris transgéniques sont représentées sous chaque rein. L'insert représente l'identification histologique de l'expression de la construction *cis-AVPR2<sup>eGFPLacZ</sup>* dans la médullaire rénale; celle-ci présente une localisation typique des tubules collecteurs.

NB: Ceci est une des premières images obtenues et a été confirmée par de nombreuses expériences décrites plus loin.

Comme nous pouvons le voir sur la figure 62, le fait d'insérer la construction complète du fragment (forme sauvage sans polymorphisme, *cis-AVPR2<sup>eGFPLacZ</sup>*) engendre une expression de  $\beta$ -galactosidase (coloration bleutée) au niveau des tubules collecteurs (construction et photo de gauche). À l'opposé, le fait de déléter la zone de 102 pb associée au polymorphisme, *del-cis-AVPR2<sup>eGFPLacZ</sup>*, n'entraîne aucune expression (construction et photo de droite). Ceci confirme le fait que la délétion comporte un ou plusieurs éléments impliqués dans l'activation de l'expression du gène.

Une seconde série d'expériences, visant à mesurer la sensibilité de la technique du marquage à la  $\beta$ -galactosidase au niveau de la papille, a été réalisée. Les prélèvements rénaux ont été effectués et le marquage par le substrat est mesuré après différentes durées d'exposition (comprises entre T0 et T24h) avec chacune des deux précédentes constructions (**Figure 63**).

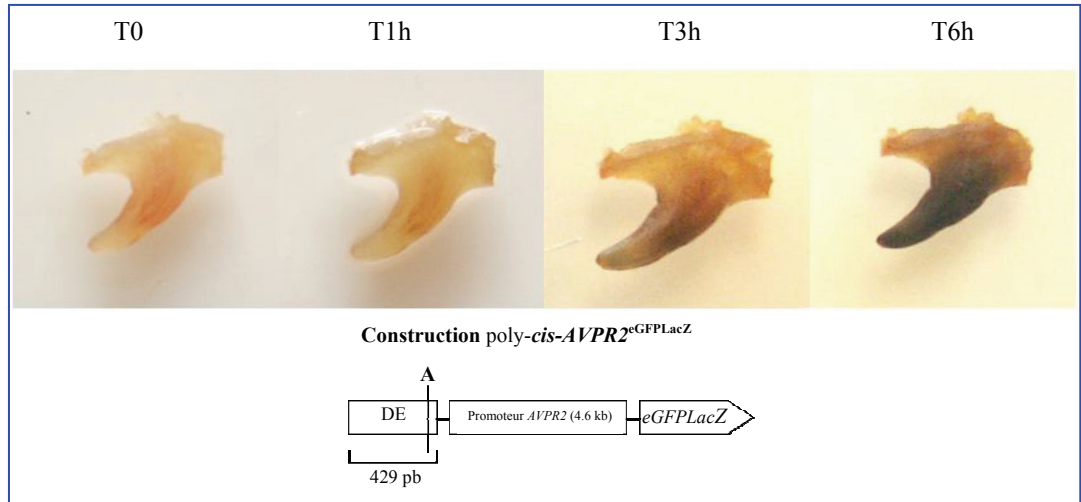


**Figure 63. Etude de la sensibilité au marquage par la  $\beta$ -galactosidase.**

Les reins sont mis en présence du substrat du gène *LacZ* pendant différents temps afin de déterminer la durée d'exposition suffisante à l'observation de l'expression du gène rapporteur.

D'un point de vue général, il ressort de ces résultats que le fait de conjuguer la délétion avec le polymorphisme, *del-cis-AVPR2<sup>eGFPLacZ</sup>*, n'entraîne aucune expression du gène rapporteur alors que le fait d'avoir le fragment complet, *cis-AVPR2<sup>eGFPLacZ</sup>*, engendre une forte expression de celui-ci au niveau de la papille rénale. De plus, nous pouvons noter que l'expression semble débiter à partir de la première heure jusqu'à atteindre son maximum à 6h. Ce qui, d'une part, confirme une nouvelle fois le fait que l'ensemble délétion/polymorphisme est nécessaire à l'expression « rénale spécifique » du gène rapporteur et d'autre part, que le marquage à la  $\beta$ -galactosidase est une technique très sensible.

Cependant, ces expériences ne permettent pas de distinguer si l'effet observé est dû majoritairement à la délétion ou au polymorphisme. Pour répondre à cette question, et bien que les résultats obtenus dans un système en culture ne se sont pas révélés probants (le polymorphisme seul n'entraînant qu'une faible diminution du niveau d'expression, résultats non présentés), nous avons mesuré l'effet du seul polymorphisme. Pour ce faire, nous avons comparé les niveaux de marquage entre les deux premières constructions utilisées (contenant respectivement le fragment sauvage de 429 pb, *cis-AVPR2<sup>eGFPLacZ</sup>*, et ce même fragment porteur de la délétion et du polymorphisme, *del-cis-AVPR2<sup>eGFPLacZ</sup>*) avec une troisième construction comportant le fragment sauvage (429 pb) mais porteur du seul polymorphisme, *poly-cis-AVPR2<sup>eGFPLacZ</sup>* (**Figure 64**, page 209).



**Figure 64. Effet du seul polymorphisme sur l'expression du gène rapporteur.**

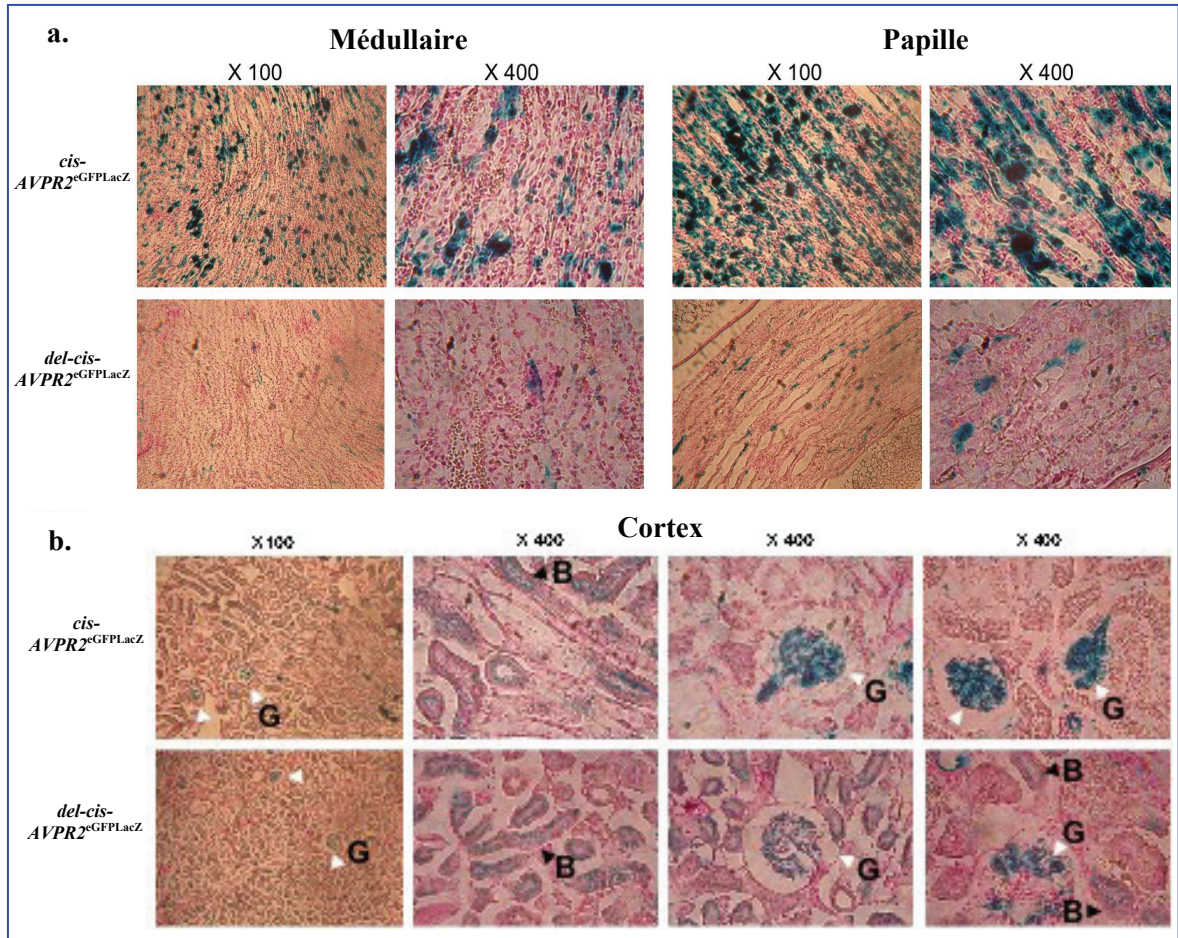
La construction poly-*cis-AVPR2*<sup>eGFPLacZ</sup> employée vise à étudier l'effet au niveau rénal du polymorphisme indépendamment de la délétion.

NB: Le fragment complet, représentant la séquence de la molécule d'ADN englobant la délétion identifiée dans la famille 3 et le polymorphisme a une longueur totale de 429 pb. Par conséquent, dans cette construction, le fragment d'ADN a une longueur de 429 pb mais ne contient que le seul polymorphisme (substitution d'une guanine par une adénine).

À première vue, le fait de substituer la guanine par une adénine, semble ne pas empêcher l'expression du gène rapporteur au niveau de la papille. Cependant, nous pouvons noter que le niveau d'expression, suivant une simple quantification visuelle, se situe à « mi-chemin » entre celui observé avec la construction contenant le fragment complet, *cis-AVPR2*<sup>eGFPLacZ</sup>, et celui obtenu avec la construction contenant l'ensemble délétion/polymorphisme, *del-cis-AVPR2*<sup>eGFPLacZ</sup>, (**Figures 62 et 63**, pages 206 et 207).

Par la suite, nous avons voulu confirmer ces résultats « macroscopiques » au niveau microscopique. Pour ce faire, nous avons réalisé des coupes histologiques des différents segments rénaux. La coupe histologique de la médullaire (**Figure 62**, page 206) confirme le fait que la coloration, et donc l'expression, se localise au niveau des cellules du tubule collecteur. Cette distribution du marquage est confirmée par la comparaison des coupes

histologiques des papilles, médullaires et cortex rénaux de chacune des constructions (Figure 65).



**Figure 65. Coupes histologiques des segments médullaires, papillaires et corticaux de reins de souris transgéniques.**

**a.** La construction *cis-AVPR2<sup>eGFPLacZ</sup>* entraîne une expression « organisée » en rangées du gène rapporteur dans la papille alors que dans la médullaire celle-ci est, en plus d'être moins importante, plus « anarchique ». La construction comportant la délétion et le polymorphisme n'engendre, quant à elle, qu'une très faible expression.

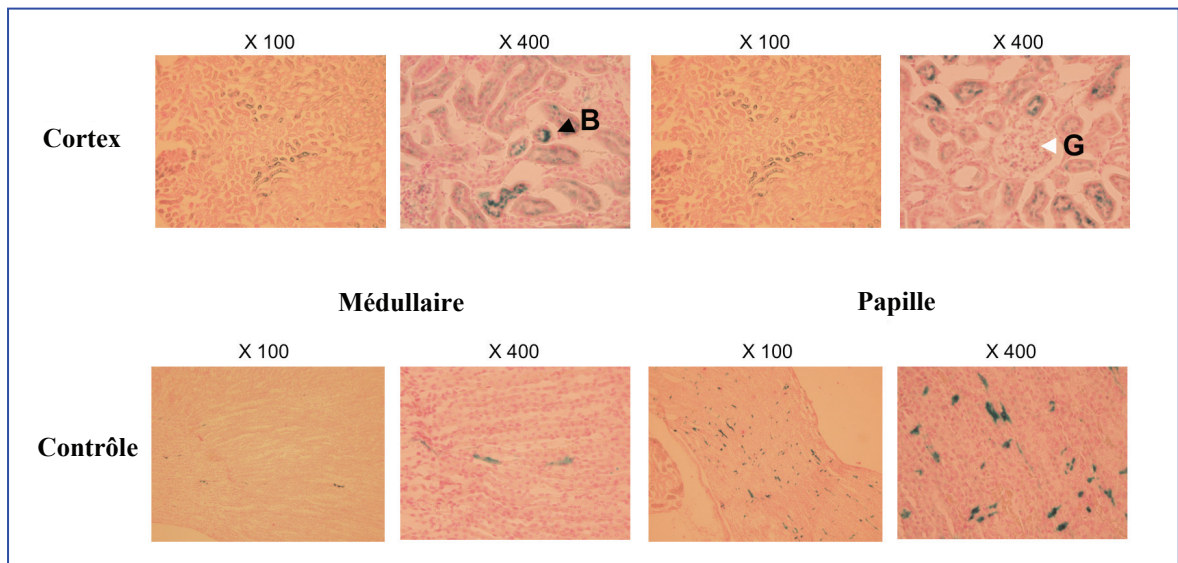
**b.** Au niveau cortical, une expression du marqueur est observée et ce, quelque soit la construction utilisée. Cependant, l'observation détaillée permet de distinguer que cette expression se localise préférentiellement au niveau des cellules endothéliales glomérulaires (marquées « G » sur les photos).

NB: L'expression observée au niveau des tubules proximaux corticaux (« B » sur les photos) semble correspondre au bruit de fond et par conséquent être non-spécifique.

Plusieurs points peuvent être notés par rapport à ces résultats. D'une part, le marquage des cellules du tubule collecteur au niveau de la papille est à nouveau présent avec la construction complète *cis-AVPR2<sup>eGFP<sup>LacZ</sup></sup>* (**a**). L'intensité de la coloration permet, de plus, de distinguer une organisation linéaire de l'expression, au contraire de ce qui est observé au niveau de la médullaire. D'autre part, nous pouvons observer une absence de marquage avec l'emploi de la construction « comportant » la délétion et le polymorphisme, *del-cis-AVPR2<sup>eGFP<sup>LacZ</sup></sup>*, tant au niveau de la médullaire que de la papille (**a**). Enfin, le marquage au niveau du cortex révèle que le fragment de 4.6 kb seul (construction « portant » la délétion et le polymorphisme, construction *del-cis-AVPR2<sup>eGFP<sup>LacZ</sup></sup>*) peut engendrer une expression au niveau des cellules endothéliales et en particulier des cellules glomérulaires (**b**). De plus, un marquage est également détecté au niveau cortical, correspondant aux tubules proximaux et ce, avec l'une ou l'autre des constructions utilisées (**b**).

Ceci semble confirmer les effets du DE obtenus lors des expériences *in vitro* où le DE présentait un effet dans les deux lignées rénales. Cependant, ces observations posent également la question de la spécificité de la technique et du marquage en particulier. En effet, bien que le marquage de la construction complète soit plus important dans la papille que dans la médullaire et le cortex, où il ne devrait pas y en avoir, une expression est tout de même détectée. Pour répondre à cette interrogation, nous avons « fabriqué » une autre lignée de souris mais ne comportant plus, cette fois-ci, l'élément supposé régulateur de l'*AVPR2* ainsi que son promoteur, mais le promoteur d'un gène exprimé de manière spécifique au niveau des cellules gliales et des progéniteurs neuronaux produisant une protéine régulatrice de type bHLH, Olig2 (Buffo 2007) (**Figure 66**, page 212).





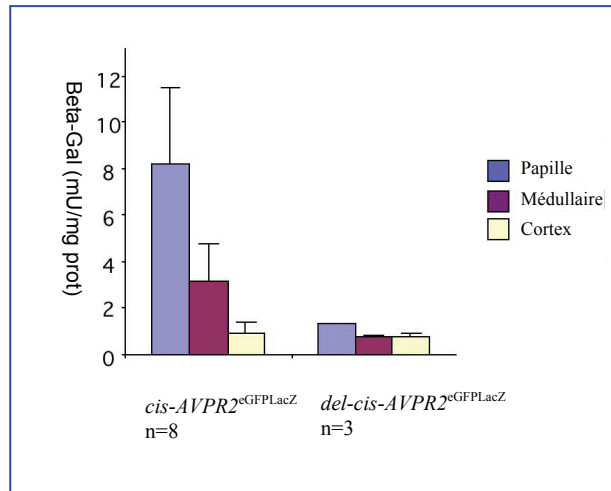
**Figure 66. Expression d'un marqueur non spécifique au tissu rénal.**

L'Olig2 est une protéine régulatrice spécifique des cellules gliales et neuronales permettant de démontrer que le bruit de fond observé dans les différents segments rénaux étudiés, en particulier les tubules proximaux, est non spécifique.

NB: Aucune expression n'est observée au niveau des cellules endothéliales glomérulaires (« G » sur la photo) ce qui tend à penser que le marquage obtenu avec la construction *del-cis-AVPR2*<sup>eGFP<sub>LacZ</sub></sup> est spécifique.

Le marquage du niveau d'expression de l'Oligo2 au niveau des cortex, médullaire et papille rénaux, révèle une expression, bien qu'inférieure en intensité à celle observée lors du marquage des médullaires et cortex rénaux, relativement faible. Ceci traduit, d'une part que le marquage des constructions utilisées pour mesurer l'effet de la région sauvage ou son équivalent délété (**Figure 63**, page 207), traduit bel et bien une expression « tissu spécifique », et d'autre part que le bruit de fond peut être considéré comme négligeable. Par conséquent, nous pouvons conclure que les niveaux d'expression dans ces trois segments rénaux reflètent le niveau d'expression de l'*AVPR2* dans chacun des segments étudiés. Et ce, aussi bien au niveau des cellules du tubule collecteur qu'au niveau des cellules endothéliales glomérulaires et des tubules proximaux. Ces résultats sont confirmés par des

mesures de dosage des activités  $\beta$ -gal pour chacune des constructions dans les trois segments rénaux (**Figure 67**).



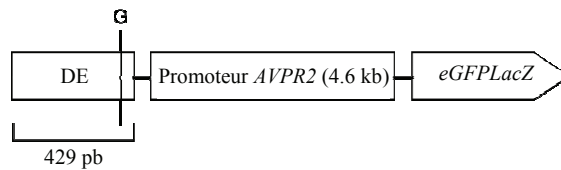
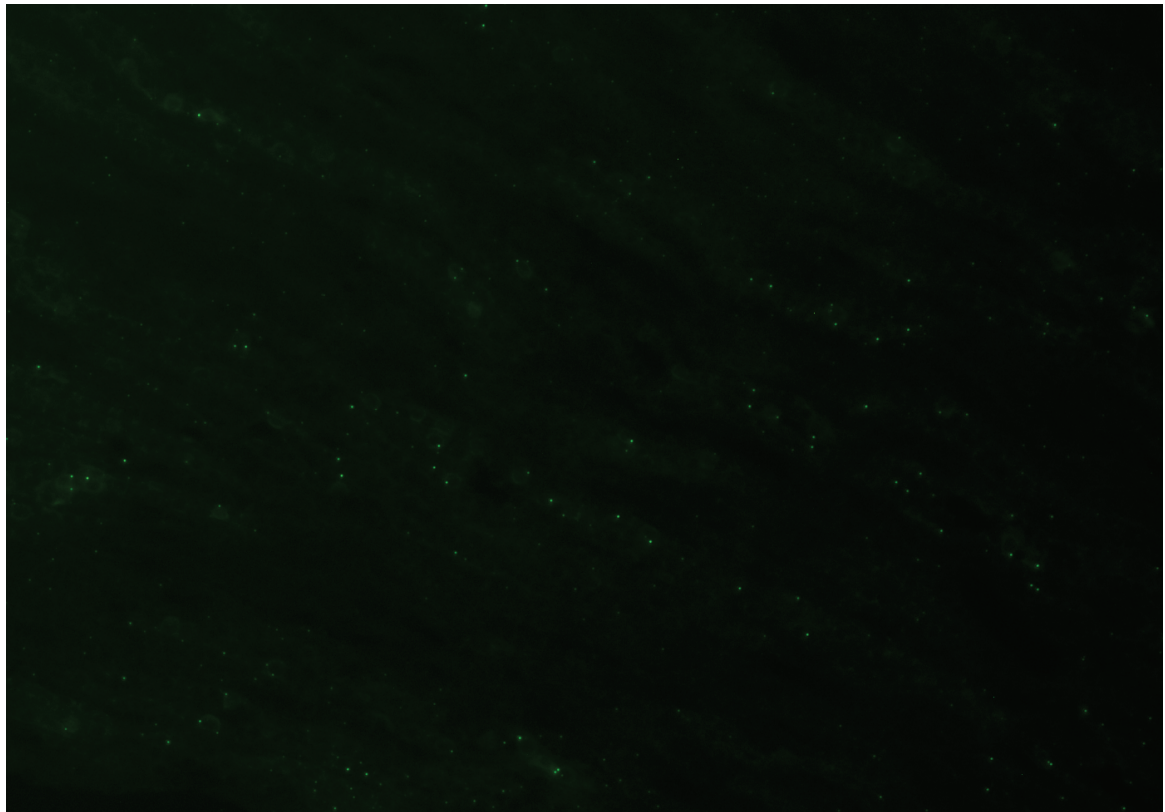
**Figure 67. Dosage protéique de la  $\beta$ -galactosidase.**

Des extraits protéiques totaux de chacun des 3 segments rénaux précédents (papille, médullaire et cortex) ont été utilisés pour quantifier l'activité de la  $\beta$ -galactosidase.

D'après ces résultats, nous pouvons voir que pour la construction comportant le fragment complet, *cis-AVPR2<sup>eGFPLacZ</sup>*, le niveau de protéines est très élevé dans la papille, un taux moyennement élevé dans la médullaire et enfin, une quantité relativement faible dans le cortex. Concernant le fragment portant la délétion, les quantités de protéines sont très faibles, quelque soit le segment rénal étudié.

Dans la mesure où les constructions utilisées, en plus de contenir le gène rapporteur *LacZ*, comportent le gène de la *GFP* nous avons mesuré les niveaux d'expression de ce second rapporteur avec la construction complète *cis-AVPR2<sup>eGFPLacZ</sup>*, afin de voir si les taux d'expression obtenus en GFP étaient identiques à ceux observés avec la  $\beta$ -gal au niveau de la médullaire et de la papille (**Figures 68 et 69**, pages 214 et 215). Il faut également noter que le marquage à la GFP, bien qu'étant moins sensible, est beaucoup plus spécifique que

le marquage avec la  $\beta$ -gal. Dans la mesure où les impressions des photographies d'expression de la GFP ne sont pas de bonne qualité, l'ensemble de celles-ci est regroupé dans le compact disc accompagnant ce manuscrit.

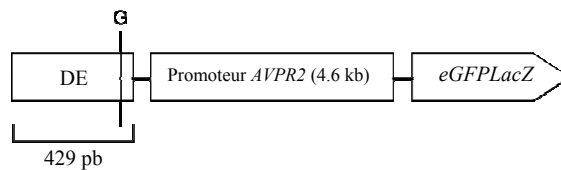
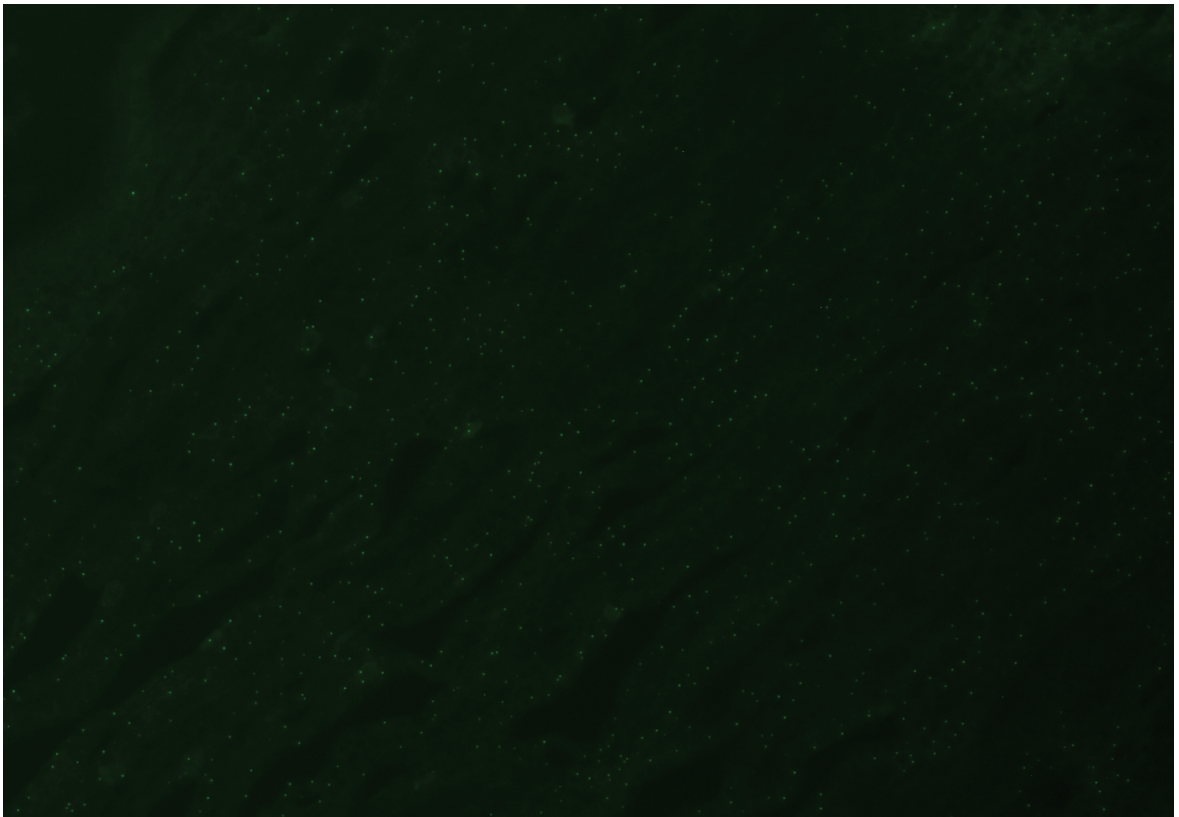


**Figure 68. Marquage à la GFP d'une coupe longitudinale de la médulla rénale avec la construction *cis-AVPR2*<sup>eGFP</sup>LacZ** (correspondant à la séquence normale comportant à la fois le fragment de 4.6 kb et l'ensemble DE/polymorphisme sauvage).

Le niveau d'expression (matérialisé par les signaux ponctuels fluorescents) dans la médulla semble relativement limité et beaucoup moins organisé que dans la papille (**Figure 69**, page 215). Ceci est donc en accord avec ce qui avait été observé avec le



marquage avec la  $\beta$ -gal, où, malgré la plus grande sensibilité et la moins grande spécificité de la technique, l'expression dans la médullaire était limitée et semblait plus « anarchique » (Figure 65, page 210).

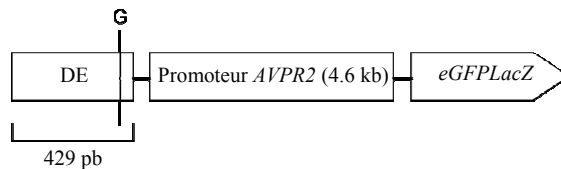
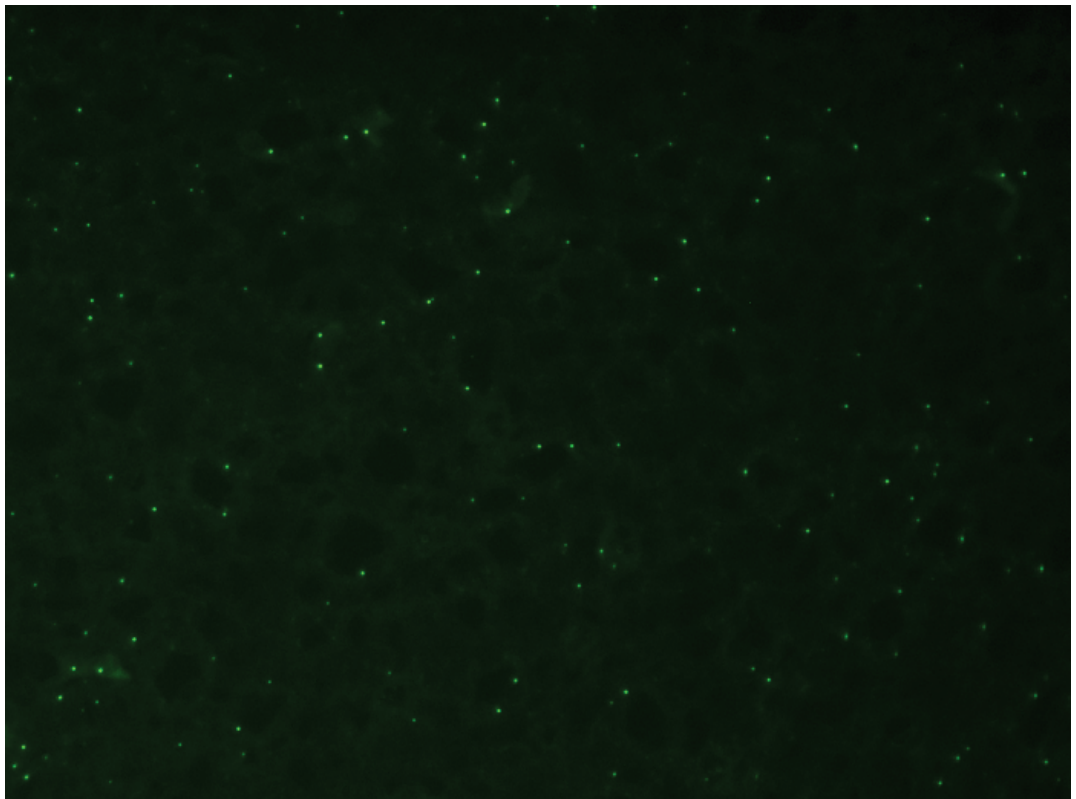


**Figure 69. Marquage à la GFP d'une coupe longitudinale de la papille rénale avec la construction *cis-AVPR2<sup>eGFP</sup>LacZ*** (correspondant à la séquence normale comportant à la fois le fragment de 4.6 kb et l'ensemble DE/polymorphisme sauvage).

L'expression de la GFP, et donc de l'*AVPR2*, avec la construction complète au niveau de la papille, est beaucoup plus importante que dans la médullaire. De plus, nous retrouvons ici, les différences, à la fois, dans l'intensité d'expression médullaire/papille,

que dans l'organisation dans l'espace de cette expression que ce que l'on pouvait observer en  $\beta$ -gal (**Figure 65**, page 210). À savoir, un niveau d'expression beaucoup plus élevé ainsi qu'une organisation linéaire (due à la disposition linéaire des tubules) des récepteurs dans la papille comparativement à ce qui est observé dans la médulla où celle-ci paraissait beaucoup plus « anarchique ».

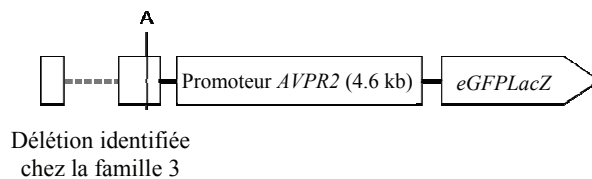
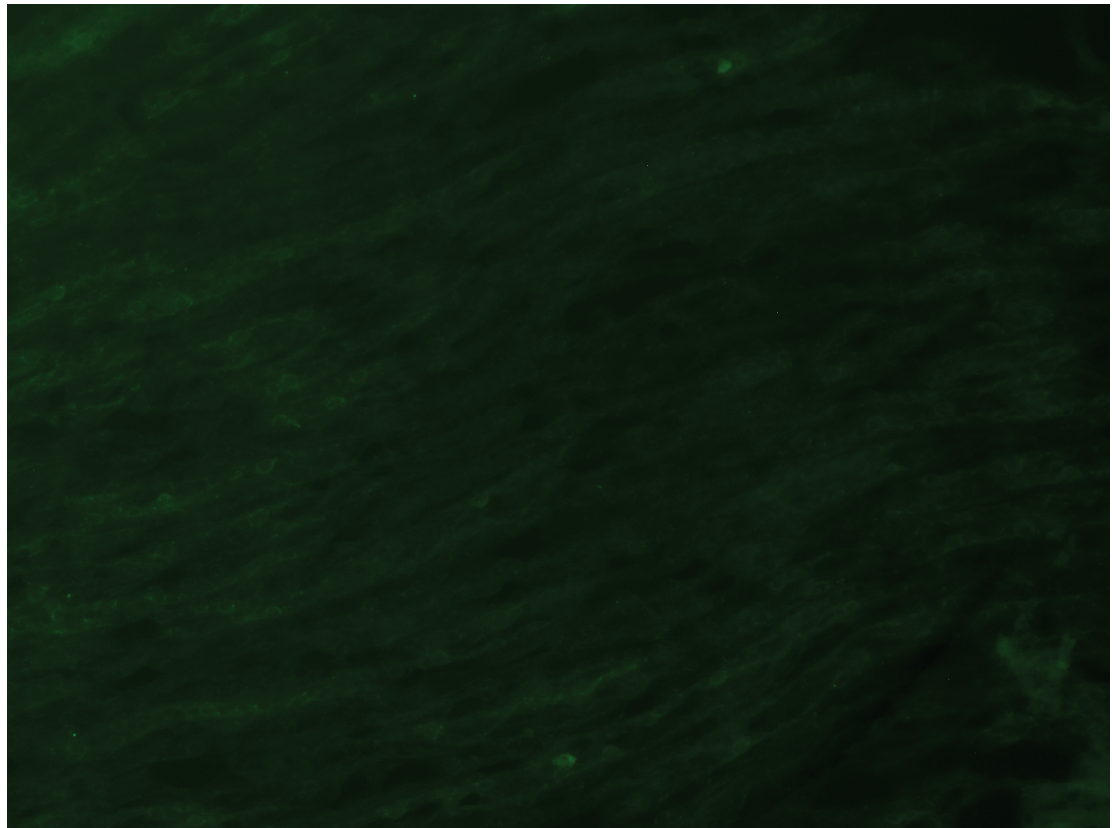
Les deux clichés précédents représentaient des coupes longitudinales de médulla. Une coupe transversale est présentée ci-dessous afin de mieux distinguer l'expression du gène de la *GFP* au niveau des cellules du tubule collecteur (**Figure 70**).



**Figure 70.** Marquage à la GFP d'une coupe transversale de la papille rénale avec la construction *cis-AVPR2<sup>eGFP-LacZ</sup>* (correspondant à la séquence normale comportant à la fois le fragment de 4.6 kb et l'ensemble DE/polymorphisme sauvage).

Cette coupe histologique, en plus de confirmer l'expression du gène d'expression sous la dépendance du DE au niveau de la papille, nous permet de localiser celle-ci au niveau des cellules du tubule collecteur. L'expression semble être intracellulaire, ceci est confirmé par l'intensité des signaux ponctuels plus importante que ce qui est observé avec les coupes longitudinales (**Figures 68 et 69**, pages 214 et 215).

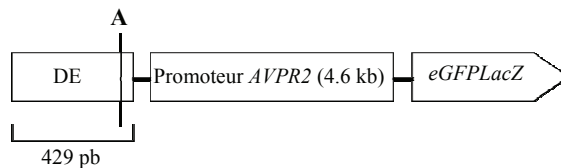
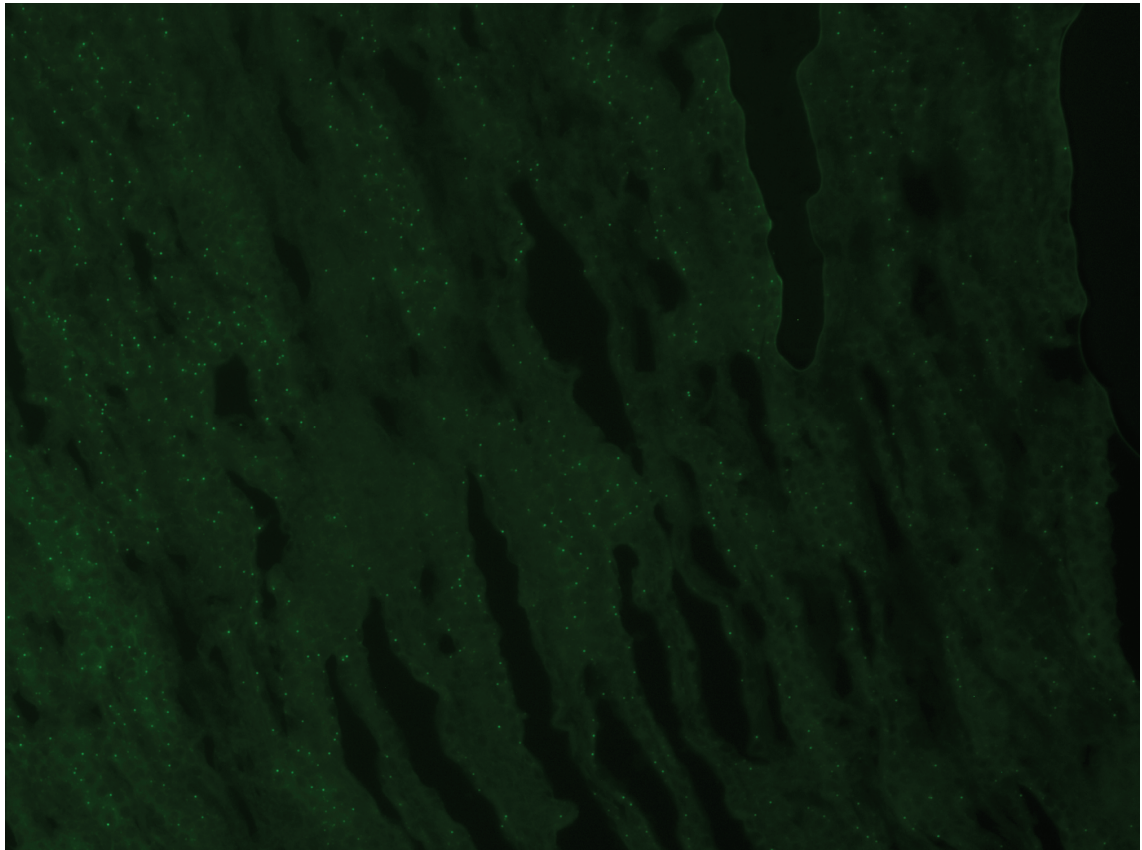
Afin de confirmer ces résultats de l'expression en GFP de la construction complète dans la médullaire, nous avons voulu vérifier que l'ensemble DE/polymorphisme (comme ce qui est observé dans la famille 3) empêchait l'expression du gène de la *GFP* (**Figure 71**).



**Figure 71. Marquage à la GFP d'une coupe longitudinale de la médullaire rénale avec la construction *del-cis-AVPR2<sup>eGFP LacZ</sup>* (correspondant à la séquence déletée associée au polymorphisme observée dans la famille 3 clonée en amont du fragment de 4.6 kb).**

Une nouvelle fois, le fait de déléter la zone correspondant au DE, en lui associant le polymorphisme, n'entraîne aucune expression du gène rapporteur au niveau de la médullaire.

De la même manière que lors de l'étude de l'expression du gène *LacZ*, la construction ne comportant que le polymorphisme (substitution d'une guanine par une adénine 222 pb en aval du segment délété DE), nous avons mesuré le niveau d'expression de GFP que la construction *poly-cis-AVPR2<sup>eGFPLacZ</sup>* pouvait entraîner sur une coupe longitudinale de papille (Figure 72).



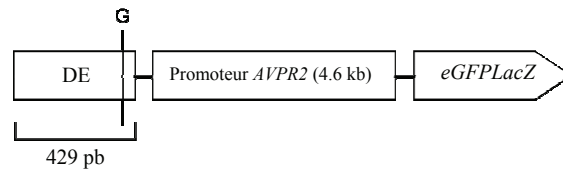
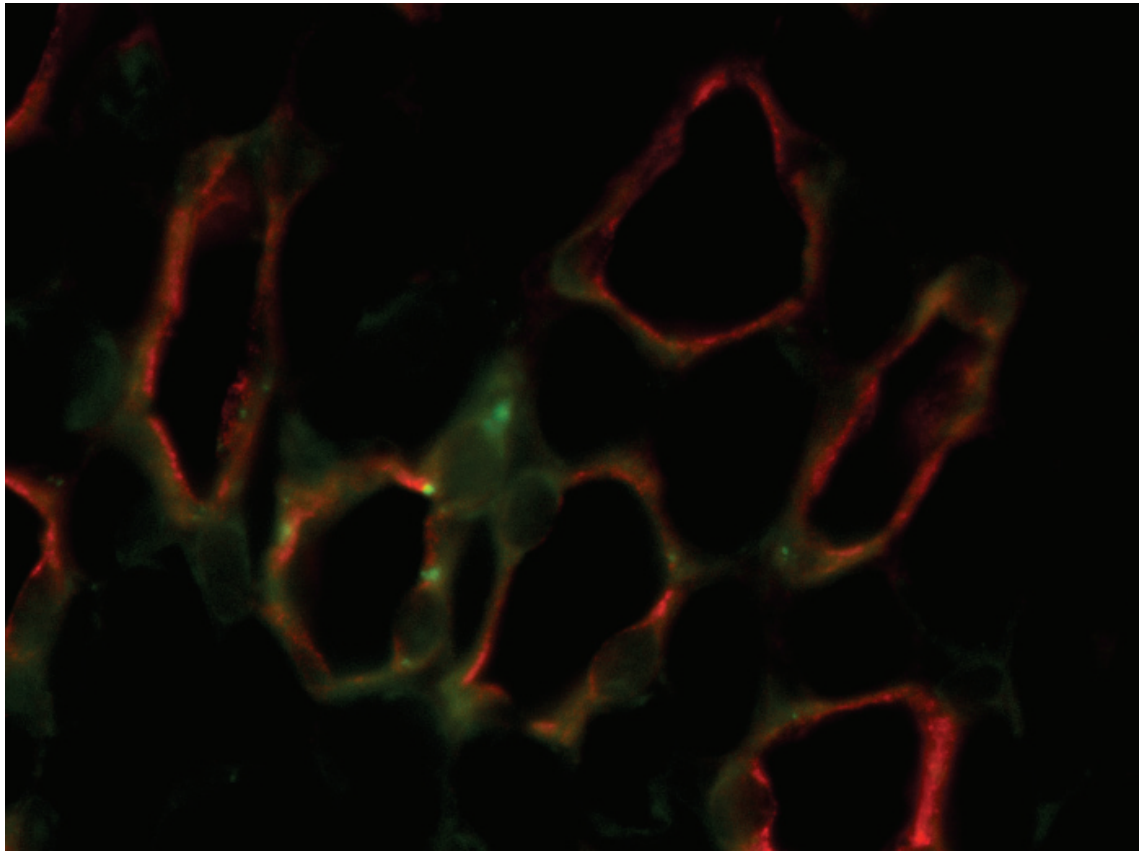
**Figure 72. Marquage à la GFP d'une coupe longitudinale de la papille rénale avec la construction *poly-cis-AVPR2<sup>eGFPLacZ</sup>*** (correspondant à la séquence normale comportant à la fois le fragment de 4.6 kb et le DE sauvage mais avec le polymorphisme, substitution d'une guanine par une adénine).

Ici encore, le seul polymorphisme ne semble pas en mesure d'empêcher l'expression du gène au niveau de la papille. Ceci semble une nouvelle fois confirmer le fait que ce polymorphisme, bien que pouvant jouer un rôle dans l'activation de l'*AVPR2*, ne paraît pas être directement impliqué dans celle-ci. Cependant, il n'est pas interdit de penser, qu'une, ou plusieurs séquences, localisées, soit dans le fragment de 4.6 kb, soit dans le fragment de la construction comportant le DE (les 429 pb clonées en amont de fragment de 4.6 kb), pourrait limiter les effets « inhibiteurs » du polymorphisme, si tant est que celui-ci en ait un, en se comportant comme un activateur plus puissant, par exemple.

L'ensemble de ces expériences en GFP confirme donc les résultats précédents obtenus par le marquage à la  $\beta$ -gal, à savoir que l'ensemble DE/fragment 4.6 kb, permet l'expression de l'*AVPR2* dans le tissu rénal d'une part, et d'autre part, que le polymorphisme seul ne semble pas impliqué directement dans cette expression tissu spécifique.

Comme il a été mentionné lors de l'introduction, le fait de stimuler les récepteurs V2 entraîne l'expression de molécules d'AQP2 à la membrane luminale des cellules du tubule collecteur en vue de favoriser la réabsorption hydrique. Par conséquent, nous avons également voulu vérifier la concomitance d'expression de l'*AVPR2*, via l'expression de la GFP et d'AQP2 par l'emploi de l'anticorps anti-AQP2 au niveau des cellules du tubule collecteur papillaire. Dans la mesure où nous voulions exprimer l'*AVPR2*, nous avons utilisé la construction *cis-AVPR2*<sup>eGFP<sub>LacZ</sub></sup> (**Figure 73**, page 220).





**Figure 73. Coupe transversale de la papille rénale avec la construction *cis-AVPR2*<sup>eGFP-LacZ</sup>** (correspondant à la séquence normale comportant à la fois le fragment de 4.6 kb et l'ensemble DE/polymorphisme sauvage).

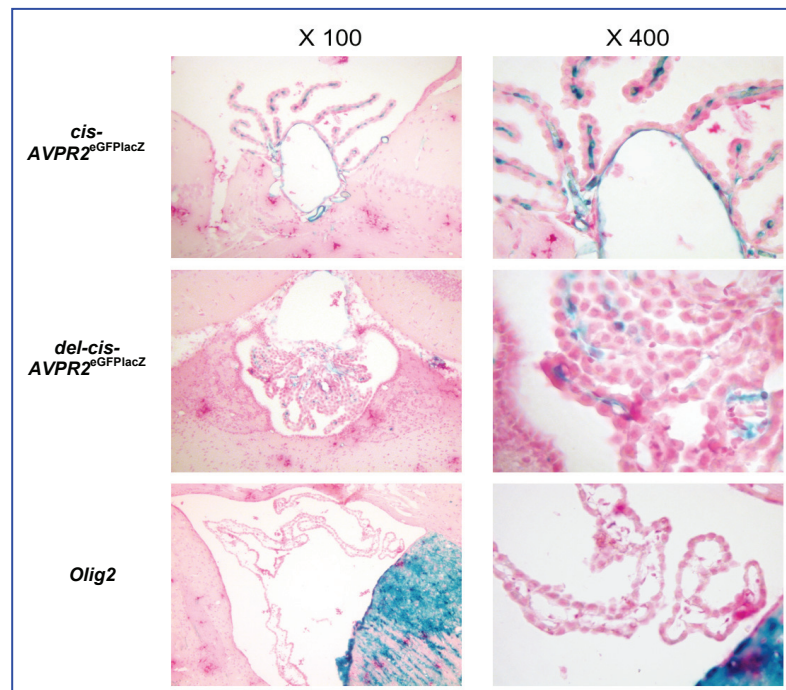
Les molécules d'AVPR2 sont matérialisées par l'expression de la GFP, signaux ponctuels, et les molécules d'AQP2 apparaissent en rouge.

Cette coupe transversale permet, comme sur le cliché représentant l'expression de la GFP sous la dépendance des séquences sauvages (correspondant à l'ensemble DE/polymorphisme et 4.6 kb complets), de distinguer les tubules collecteurs entourés par les cellules principales (**Figure 70**, page 216). Au niveau de la surface luminale, nous pouvons voir une très forte présence de molécules d'AQP2 (en rouge). Certaines cellules

présentent également, bien que celle-ci soit très faible, une expression de la GFP, traduisant une expression de l'*AVPR2*.

### 11.2.2. Au niveau du plexus choroïde

Devant les résultats de marquage observés au niveau cortical, et en particulier des cellules endothéliales, que ce soit avec le fragment complet, *cis-AVPR2*<sup>eGFPLacZ</sup>, ou porteur de l'ensemble délétion/polymorphisme avec le fragment de 4.6 kb, *del-cis-AVPR2*<sup>eGFPLacZ</sup>, (Figures 37 et 65, pages 148 et 210), nous nous sommes demandés si de tels résultats pouvaient, ou non, se retrouver dans d'autres cellules endothéliales. De plus, dans la mesure où les tests au dDAVP réalisés sur les patients atteints de DIN dû à des mutations du gène de l'*AVPR2*, révèlent la présence de ce récepteur au niveau extrarénal, nous avons étudié le marquage au niveau d'autres tissus et en particulier du plexus choroïde (Figure 74).



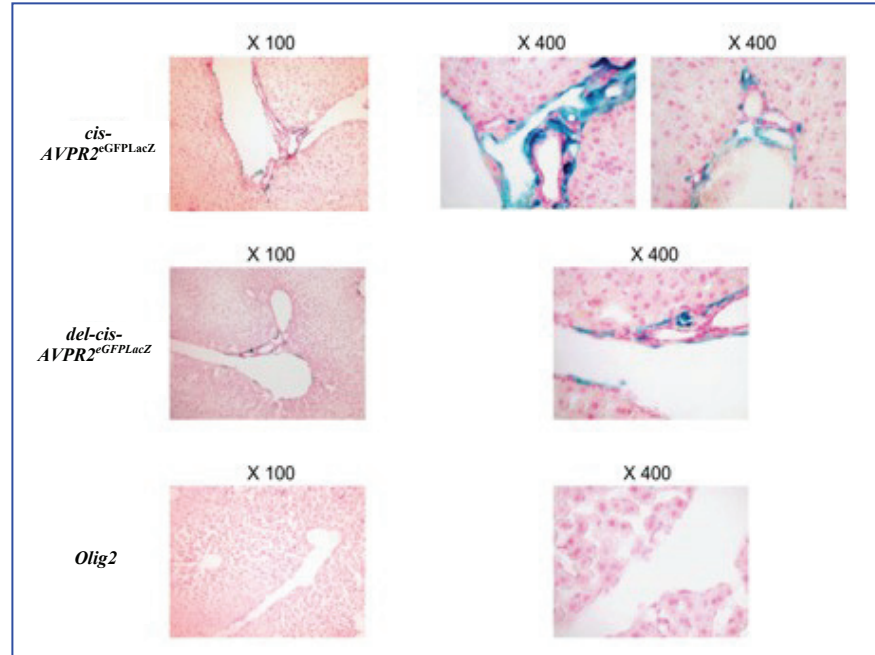
**Figure 74. Coupes histologiques de cerveaux de souris porteuses des constructions *cis-AVPR2*<sup>eGFPLacZ</sup> et *del-cis-AVPR2*<sup>eGFPLacZ</sup>.**

Le marquage des coupes de cerveau à l'Olig2, sert de témoin négatif pour l'expression au niveau du plexus choroïde. La très forte intensité de marquage observée avec cette protéine (bas à droite de chaque photo), correspond aux éléments neuronaux.

Les coupes histologiques des cellules endothéliales vasculaires du plexus choroïde révèlent un marquage relativement important de chacune des constructions, bien que celui-ci soit plus prononcé dans le cas de la construction complète *cis-AVPR2<sup>eGFP/LacZ</sup>*. Le contrôle négatif, marquage de l'Oligo2, quant à lui, ne démontre aucune expression mis à part au niveau des éléments neuronaux. Ces résultats semblent donc confirmer ceux obtenus au niveau rénal, à savoir que l'ensemble délétion/polymorphisme n'empêche en aucun cas une expression du gène rapporteur au niveau endothélial cérébral (plexus choroïde) lorsque le fragment de 4.6 kb du promoteur de l'*AVPR2* est présent.

### 11.2.3. Au niveau des cellules vasculaires hépatiques

De la même manière que dans le cas de l'étude du marquage du plexus choroïde, des coupes histologiques ont été réalisées à partir de cellules endothéliales hépatiques (**Figure 75**).



**Figure 75.** Coupes histologiques de foie de souris porteuses des constructions *cis-AVPR2<sup>eGFP/LacZ</sup>* et *del-cis-AVPR2<sup>eGFP/LacZ</sup>*.

Le marquage des coupes hépatiques à l'Olig2, sert une nouvelle fois de témoin négatif. L'absence d'expression de ce marqueur, confirme son patron d'expression exclusif des cellules progénitrices neuronales.

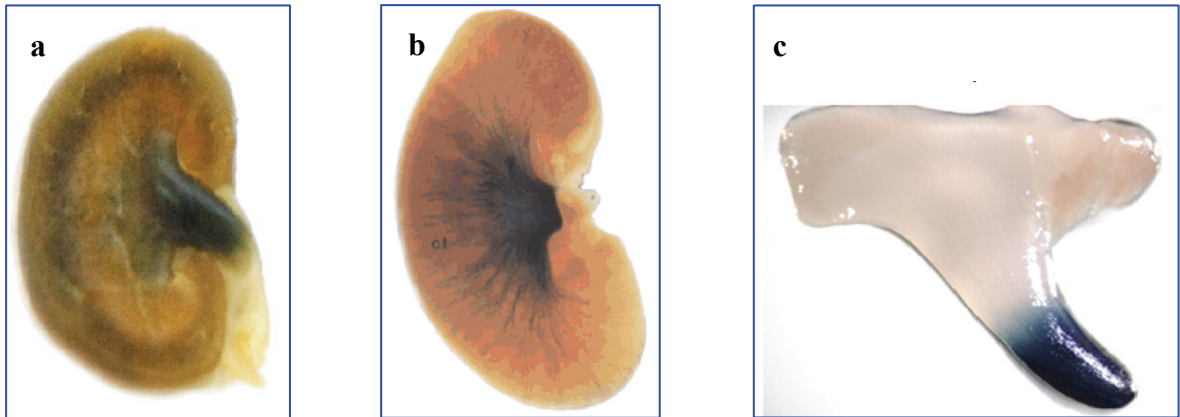


Une nouvelle fois, un marquage du gène rapporteur est observé avec l'une ou l'autre des constructions utilisées, malgré le fait que le niveau d'expression soit plus important avec le fragment complet, mais aucun avec le contrôle négatif. Ce qui tend à confirmer le fait que l'expression du gène rapporteur, et donc de l'*AVPR2*, au niveau extrarénal ne dépend absolument pas ni de la délétion, ni du polymorphisme mais bel et bien du fragment de 4.6 kb du promoteur identifié précédemment.

### **11.3. Comparaison du marquage du vecteur d'expression de l'*AVPR2* et de deux autres gènes exprimés au niveau rénal**

Les premiers résultats présentés ont permis d'une part, de confirmer l'expression du gène rapporteur sous la dépendance de l'élément supposé activateur (représenté par la construction complète *cis-AVPR2*<sup>eGFP<sub>LacZ</sub></sup>) et d'autre part, que cette expression était bel et bien « rénale spécifique ». De plus, les coupes histologiques ont révélé que ce marquage, dans le cas de la construction complète, se localisait de manière irréfutable au niveau des cellules du tubule collecteur.

Cette constatation est confirmée par la comparaison du marquage obtenu au niveau rénal par la construction *cis-AVPR2*<sup>eGFP<sub>LacZ</sub></sup> et l'étude de l'expression de deux transgènes exprimés à différents endroits du rein. Le premier est le transgène *Hox-B7-LacZ* et le second, un transgène régulé par une séquence promotrice du récepteur UT-A (**Figure 76**, page 224). En effet, le gène *Hox-B7*, anciennement appelé *Hox-2.3*, est un marqueur spécifique des cellules du tubule collecteur (Kress, Vogels et al. 1990), alors que la séquence promotrice du gène du récepteur UT-A permet une localisation d'expression spécifique aux tubules collecteurs de la médullaire interne (Fenton, Shodeinde et al. 2006).



**Figure 76. Comparaison de l'expression du gène rapporteur sous la dépendance de l'élément activateur de l'*AVPR2*, d'un marqueur spécifique des tubules collecteurs ainsi que d'un transporteur spécifique de la médullaire interne.**

- a.** Marquage du rein complet avec la construction *cis-AVPR2*<sup>eGFP<sub>LacZ</sub></sup>: expression intense au niveau des pelvis et tubules collecteur rénaux.
- b.** Expression du gène *Hox-B7*, marqueur spécifique des tubules collecteurs rénaux. Cliché tiré de (Kress, Vogels et al. 1990).
- c.** Expression d'un marqueur spécifique des tubules collecteurs de la médullaire interne, le transporteur d'urée UT-A $\alpha$ . Cliché tiré de (Fenton, Shodeinde et al. 2006).

Comme nous pouvons le voir sur ce cliché, la comparaison de l'expression de notre construction complète (fragment 4.6 kb et l'ensemble zone délétée dans la famille 3/sans polymorphisme) révèle un patron d'expression identique à celui obtenu avec le marqueur spécifique des tubules collecteurs, le gène *Hox-B7* (comparaison **a** et **b**). À contrario, lorsque l'on compare l'expression de notre construction avec le marqueur spécifique des tubules collecteurs mais de la médullaire interne cette fois-ci, nous pouvons noter une énorme différence: la coloration de notre construction se limite à la médullaire externe alors que le marquage du transporteur à l'urée UT-A $\alpha$  se concentre exclusivement au niveau de la médullaire interne (comparaison **a** et **c**).

# **Discussion**

Dans cette étude, nous avons tenté de démontrer un rôle important dans l'activation « tissu spécifique » du gène de l'*AVPR2* d'une zone localisée très en amont de celui-ci. Cette zone, correspondant à une délétion, identifiée chez des personnes atteintes de DIN lié à l'X sans mutation de la séquence codante de l'*AVPR2*, présente la particularité d'entraîner en cas de test au dDAVP des réponses hémodynamiques et coagulantes tout à fait normales. Celles-ci sont similaires à celles observées chez des sujets sains, et donc, à l'opposé de celles remarquées chez les patients atteints de DIN lié à l'X provoqué par des mutations de l'*AVPR2*: diminution de la pression sanguine, augmentation de l'activité de la rénine plasmatique ainsi que du facteur de von Willebrand. Ce composé est un analogue de l'AVP et les patients souffrant de DIN lié à l'X, n'exprimant pas le récepteur pour cause de mutations du gène, ne répondent pas au dDAVP. Ceci semble indiquer que, chez les personnes porteuses de la délétion mais comportant une séquence codante normale, les *AVPR2* ne sont pas exprimés au niveau du rein, mais le sont bel et bien au niveau extrarénal. Cette observation permet de tirer deux conclusions: d'une part, elle permet de confirmer, malgré la controverse persistante, l'existence d'*AVPR2* extrarénaux, en particulier au niveau vasculaire, et, d'autre part, que la zone délétée pourrait comporter un ou plusieurs éléments régulateurs responsables de l'expression « rénale spécifique » des *AVPR2*, et donc responsable(s) du DIN lié à l'X chez ces personnes, mais laissant intactes les régions impliquées dans l'expression de ces récepteurs au niveau vasculaire entraînant les réponses hémodynamiques et coagulantes normales.

Afin de vérifier cette dernière hypothèse, nos investigations ont porté, d'une part, sur des modèles *in vitro*, système de cellules en culture, et d'autre part, sur un modèle *in vivo*, par génération de souris transgéniques porteuses ou non de ladite délétion. Les résultats obtenus nous permettent d'ores et déjà d'apporter quelques points intéressants concernant cette activation « rénale spécifique ».

En premier lieu, les expériences menées *in vitro* nous permettent de dire que la délétion identifiée, DE, commune à l'ensemble des autres grandes délétions, semble effectivement jouer un rôle dans l'activation du gène localisé à plus de 10 kb en aval. Or, il semblerait que ce rôle varie en fonction, à la fois de la nature des cellules rénales, de la tonicité de l'environnement extracellulaire et, contrairement à ce qui avait été précédemment décrit, du fragment appartenant au « promoteur » de l'*AVPR2* qui lui est associé.

En effet, les premières expériences de transfection dans les trois lignées cellulaires nous ont permis d'observer un effet positif de la séquence délétée sur l'expression du gène rapporteur dans les cellules rénales contrairement aux fibroblastes. Cependant, et de manière pour le moins surprenante, cet effet activateur paraît plus important dans les cellules du tubule proximal, où les *AVPR2* sont physiologiquement absents, que dans les cellules principales du tubule collecteur où ceux-ci sont exprimés et responsables de la réabsorption hydrique. En outre, le rôle purement activateur, ou « enhancer », de cette zone ainsi que son effet au niveau du tissu rénal traduisant une abondance du partenaire protéique le liant, présent de manière spécifique au niveau du rein, sont confirmés respectivement par les expériences utilisant un promoteur hétérologue et le DE sous forme multimérisée. Une fois encore, les cellules rénales transfectées avec le DE démontrent une expression plus importante que celles ne le contenant pas, alors que la lignée fibroblastique se montre totalement insensible, à la fois à l'effet de la délétion et de sa multimérisation. Ces séries d'expériences permettent de conclure que les cellules rénales, quelles qu'elles soient, sont sensibles à la présence de cet élément sans que, toutefois, celui-ci puisse à lui seul engendrer l'expression de manière spécifique de l'*AVPR2*. Ce qui peut légitimement laisser penser que le DE, malgré le contexte du système en culture, et donc dans lequel l'expression du gène rapporteur a lieu dans un contexte génomique particulier puisque n'étant pas intégré au génome de la cellule, requiert d'autres régions liant des partenaires protéiques, qui eux, ne seraient présents que dans les cellules du tubule collecteur. Ce schéma impliquerait obligatoirement que le DE lie une protéine, retrouvée abondamment

dans l'ensemble des cellules rénales et servant de « pont protéique » entre, au minimum, une protéine X propre aux cellules du tubule collecteur et une des composante du complexe de pré démarrage ou alors que la fixation de la protéine sur le DE soit rendue possible suite à la liaison d'une ou plusieurs protéines déstructurant la chromatine.

Se posent alors deux questions. La première: une de ces protéines pourrait-elle correspondre à celle, non identifiée à l'heure actuelle, se liant sur la région CSE1 et/ou CIE1 précédemment caractérisées ? Eu égard au fait que l'activation de l'AVPR2 par l'AVP, en plus de permettre la translocation des molécules d'AQP2 à la membrane luminale des cellules principales du tubule collecteur engendrant une forte réabsorption hydrique au niveau de ce segment, entraîne une régulation à long terme de l'expression de l'AQP2 (hypothèse admise bien que pour l'instant le mécanisme exact ne soit pas caractérisé). Ceci conjugué au fait que l'expression d'AQP2 est sous-jacente à une modification de la tonicité extracellulaire, via TonEBP, la seconde interrogation qui se pose est donc: est-ce que l'expression de l'AVPR2 pourrait être corrélée à celle de l'AQP2 et donc être sensible aux modifications de tonicité ? Pour répondre à ces questions, nous avons testé l'effet du DE avec différentes parties du « promoteur » de l'AVPR2, soit un fragment de 4.6 kb ou 1.4 kb, en jouant sur la tonicité des cellules en culture après avoir localisé une séquence similaire, bien que non identique, à TonEBP, au niveau du « promoteur minimal » du gène.

Ces diverses expériences ont permis d'observer un rôle pour le moins ambigu du DE en fonction, à la fois, de la nature des cellules, des conditions de tonicité ainsi qu'en fonction du fragment du « promoteur » qui lui est associé. En effet, il semblerait que lorsque les conditions sont isotoniques, et que le « promoteur minimal » de l'AVPR2, soit le fragment de 1.4 kb (comportant potentiellement la séquence similaire à TonEBP), lui est associé, le DE présente un rôle activateur plus important dans les cellules du tubule proximal que dans les cellules du tubule collecteur. Par contre, et de manière pour le moins surprenante,

lorsque les conditions deviennent hypertoniques et que le DE, toujours associé au « promoteur minimal », est présent, celui-ci semble « perdre » sa puissance d'activation dans les cellules du tubule proximal et du tubule collecteur. Dans ces conditions d'hypertonie, le DE semble plus avoir un rôle « inhibiteur », qu'activateur sur l'expression du gène: la présence de cet élément entraîne une chute importante de l'expression par rapport au niveau observé avec le « promoteur minimal » seul (contenant potentiellement une séquence de réponse à la tonicité TonEBP). Or, lorsque le fragment de 4.6 kb, et non plus 1.4, du « promoteur » de l'*AVPR2* est présent, cet effet « inhibiteur » semble anéanti, comme si ce long fragment comportait un, ou plusieurs, éléments empêchant le DE de remplir son action « limitante » en conditions d'hypertonie. De plus, l'effet « protecteur » du fragment de 4.6 kb semble agir préférentiellement dans les cellules du tubule collecteur. Par conséquent, nous pouvons nous poser légitimement la question de savoir si ce rôle protecteur ne peut pas être imputé à CSE1 caractérisé initialement comme étant un « inhibiteur d'inhibiteur » de l'*AVPR2* plutôt que se comportant comme un activateur « pur » de ce gène dans les cellules du tubule collecteur.

Parallèlement à ces expériences, d'autres manipulations *in vitro*, par analyse de mutations en série, ont permis de distinguer deux régions à l'intérieur de ce DE comme étant responsables, pour l'une, de l'expression « rénale spécifique » de l'*AVPR2*, et pour la seconde pouvant expliquer le rôle « cellule spécifique » de cette séquence dans cette expression. L'une de ces régions a fait, par la suite, l'objet d'études dans le but de caractériser la protéine la liant et permettant d'expliquer l'expression « rénale spécifique ».

La tentative de caractérisation des protéines liant l'extrémité 5' du DE, nous a permis de mettre en évidence 5 protéines potentielles dont l'une, Cut-like 1, semble particulièrement intéressante dans la mesure où les nombreuses études dont elle a fait l'objet indiquent plusieurs points. D'une part, cette protéine a été localisée dans le rein de souris. D'autre part, elle est répertoriée comme étant une protéine régulatrice, activant ou

réprimant l'expression de gènes impliqués dans la différenciation des cellules rénales au moment de la néphrogénèse. Elle pourrait, via l'interaction avec d'autres protéines et/ou complexes protéiques, exercer différents rôles dans divers tissus. Et enfin, elle semble jouer un rôle important dans le développement d'une pathologie génétique rénale caractérisée par le développement de kystes, l'AKPKD. Ce dernier point est particulièrement attrayant dans la mesure où il est avéré que l'apparition des kystes est consécutive à une surexpression des gènes de l'*AVPR2* et de l'*AQP2* ainsi qu'à une surproduction d'AMPc. De la même manière, et eu égard aux résultats pour le moins paradoxaux des quantifications d'expression en conditions hypertoniques versus isotoniques, cette protéine semble être un candidat pour le moins privilégié pour jouer un rôle de premier plan dans l'expression de l'*AVPR2*. En effet, nous pouvons légitimement penser, qu'en conditions isotoniques, l'isoforme identifié, soit p110, permettrait l'activation de l'*AVPR2* dans un contexte « rénal spécifique », c'est-à-dire ne nécessitant pas l'action d'autres partenaires et donc jouant un rôle d'activateur transcriptionnel général du rein. Alors que dans un contexte hypertonique, Cut-like 1 remplirait plutôt un rôle « inhibiteur » commun aux cellules rénales à moins que celle-ci ne soit associée avec des protéines liant d'autres régions (comme par exemple le fragment de 4.6kb du « promoteur » de l'*AVPR2*) qui, de manière spécifique aux cellules du tubule collecteur, conditionneraient son action et donc limiteraient son effet inhibiteur dans l'expression de l'*AVPR2*. Cette dernière remarque, par conséquent, ne fait, d'une part, que confirmer l'idée suivant laquelle le DE ne peut activer seul l'*AVPR2*, et d'autre part que l'un, au moins, des partenaires protéiques lie une séquence du fragment de 4.6 kb. Concernant les 4 autres protéines potentielles, malgré le fait que leurs spécificités de liaison aient été confirmées, le peu d'informations disponibles et le manque de temps pour mener à bien les études nécessaires, ne nous permettent pas de conclure sur leurs rôles effectifs. Cependant, eu égard au peu d'informations disponibles (SKP1 et clone 8.2), à leurs homologies structurales (HP1-BP74) ainsi qu'à la localisation de certains ARNm (clone 34.1), il semble que chacune d'entre elles soit exprimée au niveau rénal et/ou joue le rôle de



protéine régulatrice. Les expériences proposées devraient permettre d'éclaircir les zones d'ombre entourant ces protéines.

Les études menées *in vivo* par souris transgéniques dans le système *Hprt*, nous a permis une nouvelle fois, de mettre en évidence, d'une part, un rôle activateur principalement au niveau rénal, et plus particulièrement au niveau de la papille, de l'élément délété associé au polymorphisme et d'autre part, un effet au niveau extrarénal (cellules endothéliales vasculaires et du plexus choroïde). Ceci est particulièrement intéressant dans la mesure où ces expériences sont les premières à démontrer de manière formelle l'existence de récepteurs V2 extrarénaux. En outre, le fait que le marquage extrarénal soit observé avec l'une ou l'autre des constructions, avec ou sans le DE, confirme que l'expression de l'*AVPR2* au niveau de ces épithéliums fait appel à des mécanismes régulateurs distincts via d'autres zones régulatrices. Cependant, en se référant aux résultats obtenus *in vitro* en conditions isotoniques versus hypertoniques, l'utilisation du fragment complet du « promoteur » de l'*AVPR2* (4.6 kb) dans les constructions ne permet pas de distinguer le rôle exact de la seule délétion associée au polymorphisme au niveau du rein. L'ensemble de ces observations, nous conforte dans l'idée que, malgré un rôle activateur évident sur le gène de l'*AVPR2*, l'ensemble délétion/polymorphisme ne porte pas à lui seul l'expression « rénal spécifique » de ce gène et qu'au contraire, il pourrait nécessiter la coopération de diverses protéines jouant le rôle soit de « ponts protéiques » (co activateur), soit de protéines déstructurant la chromatine afin de faciliter la liaison des protéines activatrices en elles-mêmes.

L'ensemble de ces constatations nous pousse à penser que les éléments appartenant à ce DE lieraient une ou des protéines qui agiraient de concert avec d'autres complexes protéiques, liant le « promoteur » de l'*AVPR2* (TonEBP au niveau du promoteur proximal et/ou CIE1 au niveau du fragment de 4.6 kb), ou d'autres séquences jusqu'alors non identifiées. La liaison de ces protéines aurait lieu en fonction, soit des conditions

environnementales, soit du stade de développement du rein, soit de la nature des cellules, par exemple.

**Conclusions**  
**et**  
**Perspectives**

L'ensemble des expériences menées, suite à l'identification, chez des patient atteints de DIN lié à l'X mais présentant des gènes *AVPR2* et *AQP2* normaux, de zones délétées très en amont du gène, nous a permis de débiter l'étude de l'activation « tissu spécifique » du gène de l'*AVPR2*. Cependant, eu égard à la complexité de la régulation transcriptionnelle spatio-temporelle des gènes, ce travail, et par voie de conséquence ces résultats, ne représentent que le commencement des études à mener afin d'élucider l'activation du gène de l'*AVPR2*.

L'essentiel des investigations futures entourant l'étude de l'activation de l'*AVPR2* auront lieu *in vivo* chez la souris. La raison principale à cela est que, d'une part, les protéines identifiées par simple hybride, tout comme le DE d'ailleurs, ne semblent pas responsables à elles seules de l'activation du gène et que, d'autre part, le modèle *in vivo*, bien que ne permettant pas de réaliser toutes les conditions d'études nécessaires du fait de la complexité des manipulations, présente l'énorme avantage d'autoriser l'analyse de l'effet de différents paramètres pouvant influencer sur l'expression de l'*AVPR2*. Entre autre, le modèle murin nous permettra d'étudier l'expression de l'*AVPR2* à différents moments de la néphrogénèse, en conditions de déshydratation, d'hypertonie ou suite à l'administration de dDAVP ainsi que d'étudier le lien éventuel entre sa surexpression et le développement de l'AKPKD.

En effet, ces questions n'ont, pour l'heure, pas fait l'objet d'études exhaustives du fait du manque d'outils spécifiques à cette étude (absence d'anticorps spécifiques jusqu'à récemment (Fenton, Brond et al. 2007)): la distribution des récepteurs V2 au niveau du rein a uniquement été étudiée par des expériences de liaison de radio-ligands et de localisations segmentaires de l'ARNm de ces récepteurs (Carmosino, Brooks et al. 2007). De plus, une étude, toujours portant sur l'expression des ARNm mais cette fois-ci pendant la néphrogénèse, a démontré que la présence de ces ARNm débutait au 16<sup>ième</sup> jour de gestation au niveau des tubules collecteurs corticaux et médullaires en développement (Ostrowski, Young II et al. 1993). En outre, chez les patients atteints de DIN lié à l'X, les

épisodes de déshydratation se manifestent dès les premiers jours de vie, comme si des récepteurs V2 fonctionnels étaient requis très tôt lors du développement rénal. Par conséquent, la construction *cis-AVPR2<sup>eGFPLacZ</sup>* devrait permettre, en étudiant le marquage du transgène à différents stades du développement rénal et/ou en condition de déshydratation, de préciser à quel moment et à quel endroit précis l'*AVPR2* est exprimé lors de la néphrogénèse ainsi que d'une éventuelle influence de la déshydratation.

De la même manière, Lee et al ont démontré que lors du développement du rein, un co-transporteur sodium/potassium/chlore de type 2 (NKCC2) exprimé aussi précocement qu'au stade foetal de 14 jours (F14), permettait, en créant une hypertonicité médullaire, d'activer TonEBP au stade embryonnaire E14 (correspondant au quatorzième jour de développement) (Lee, Kim et al. 2007). Celui-ci, en retour, active la transcription de l'AR, à E15, et de l'UT-A entre E16 et E18 (voir « Séquence homologue à TonEBP », page 188). Dans la mesure où diverses séquences potentielles de liaison de TonEBP se trouvent en amont de l'*AVPR2*, entre autre au niveau du « promoteur » minimal de 1.4 kb (voir **Figure 57**, page 195), il serait intéressant d'utiliser la construction *cis-AVPR2<sup>eGFPLacZ</sup>*, non plus seulement avec le fragment de 4.6 kb mais également avec celui de 1.4 kb, afin d'étudier son expression à différents stades foetaux et embryonnaires (entre E13 et E19), à différents âges postnatals (souriceaux âgés de 1 à 21 jours, P1 à P21) et enfin chez des animaux adultes, à la fois en conditions isotoniques et hypertoniques. L'utilisation d'Ac dirigés contre NKCC2, TonEBP, l'AR et de l'UT-A, sur les cellules des souris générées avec la construction *cis-AVPR2<sup>eGFPLacZ</sup>* serviraient de marqueurs de la maturation du rein et permettraient d'évaluer, et/ou de confirmer, à différents moments (E13 à E19, P1 à P21 et chez les souris adultes) la production de l'ensemble de ces protéines ainsi que celle de l'*AVPR2*, via l'expression du transgène.

Par la suite, l'utilisation de la PCR en temps réel effectuée à partir de différents segments rénaux (papille, médullaire et cortex) des souris générées, bien que ne permettant pas d'affirmer de manière irréfutable la production des protéines correspondantes, du fait de

la quantification des messagers, permettrait de voir si l'expression de l'*AVPR2* a lieu de manière concomitante à celle des gènes mentionnés ci-dessus. Ceci, en plus de confirmer le patron d'expression de l'*AVPR2*, permettrait de déterminer d'éventuels phénomènes d'activation croisée de l'*AVPR2* et des gènes activés par NKCC2 et TonEBP.

Tel que démontré par Torres et al., et bien que le lien précis ne soit pour l'heure pas clair, les récepteurs V2 sont surexprimés dans tous les modèles de polykystose rénale (Torres and Harris 2006) Par conséquent, l'obtention de souris  $Pkd2^{-/tm1Som}$  (Torres, Wang et al. 2004) porteuses de la construction *cis-AVPR2*<sup>eGFPLacZ</sup> (obtenues en injectant la construction dans les cellules ES de la souris  $Pkd2^{-/tm1Som}$ ) permettrait de déterminer quelles cellules du tissu kystique expriment le transgène et si celui-ci est surrégulé antérieurement à la formation des kystes. Si cette relation entre la surexpression de l'*AVPR2*, via notre séquence DE, et la formation des kystes pouvait être confirmée *in vivo*, les implications cliniques pour le traitement de l'AKPKD pourraient être très importantes. En effet, l'utilisation d'un antagoniste non peptidique du V2R chez des patients atteints d'AKPKD est en cours d'essais cliniques de phase 2.

D'un point de vue plus général, le modèle de souris généré, porteur de la construction *cis-AVPR2*<sup>eGFPLacZ</sup>, sera un outil d'investigation très puissant pour étudier divers désordres du métabolisme de l'eau, allant de la rétention d'eau, aux déficits hydriques en passant par la surexpression de l'*AVPR2* dans la polykystose rénale.

À plus long terme, la compréhension globale du mécanisme d'activation de l'*AVPR2* au niveau des cellules du tubule collecteur, et en particulier l'identification des protéines impliquées dans ce processus, permettra de traiter les diabètes insipides, centraux et néphrogéniques, par thérapie génique.

# **Bibliographie**

- Aasland, R. and A. F. Stewart (1995). "The chromo shadow domain, a second chromo domain in heterochromatin-binding protein 1, HP1." Nucleic Acids Res **23**(16): 3168-73.
- Abel, A., N. Wittau, et al. (2000). "Cell cycle-dependent coupling of the vasopressin V1a receptor to different G proteins." J Biol Chem **275**(42): 32543-51.
- Abrami, L., F. Tacnet, et al. (1995). "Evidence for a glycerol pathway through aquaporin 1 (CHIP28) channels." Pflugers Arch **430**(3): 447-58.
- Abramowicz, M. J., L. Duprez, et al. (1997). "Familial congenital hypothyroidism due to inactivating mutation of the thyrotropin receptor causing profound hypoplasia of the thyroid gland." J Clin Invest **99**(12): 3018-3024.
- Acher, R., J. Chauvet, et al. (1995). "Man and the chimaera. Selective versus neutral oxytocin evolution." Adv Exp Med Biol **395**: 615-27.
- Adra, C. N., J. L. Donato, et al. (2000). "SMARCD1, a novel human helicase family-defining member associated with genetic instability: cloning, expression, and mapping to 4q22-q23, a band rich in breakpoints and deletion mutants involved in several human diseases." Genomics **69**(2): 162-73.
- Agre, P. (2004). "Aquaporin water channels (Nobel Lecture)." Angew Chem Int Ed Engl **43**(33): 4278-90.
- Agre, P. (2006). "The aquaporin water channels." Proc Am Thorac Soc **3**(1): 5-13.
- Aiyar, N., P. Nambi, et al. (1986). "Vascular vasopressin receptors mediate phosphatidylinositol turnover and calcium efflux in an established smooth muscle cell line." Life Sci **39**(1): 37-45.
- Ala, Y., D. Morin, et al. (1998). "Functional studies of twelve mutant V2 vasopressin receptors related to nephrogenic diabetes insipidus: molecular basis of a mild clinical phenotype." J Am Soc Nephrol **9**: 1861-1872.
- Alenxandre, C., D. A. Grueneberg, et al. (1993). "Studying heterologous transcription factors in yeast." METHODS: A Companion to Methods in Enzymology **5**(2): 187.
- Altschul, S. F., W. Gish, et al. (1990). "Basic local alignment search tool." J Mol Biol **215**(3): 403-10.



- Ammar, A., S. Roseau, et al. (1992). "Postnatal ontogenesis of vasopressin receptors in the rat collecting duct." Mol Cell Endocrinol **86**(3): 193-203.
- Amr, S., C. Heisey, et al. (2007). "A homozygous mutation in a novel zinc-finger protein, ERIS, is responsible for Wolfram syndrome 2." Am J Hum Genet **81**(4): 673-83.
- Andres, V., M. D. Chiara, et al. (1994). "A new bipartite DNA-binding domain: cooperative interaction between the cut repeat and homeo domain of the cut homeo proteins." Genes Dev **8**(2): 245-57.
- Angers, S., A. Salahpour, et al. (2002). "Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function." Annu Rev Pharmacol Toxicol **42**: 409-35.
- Angers, S., A. Salahpour, et al. (2000). "Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET)." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3684-9.
- Arthus, M.-F., M. Lonergan, et al. (2000). "Report of 33 novel *AVPR2* mutations and analysis of 117 families with X-linked nephrogenic diabetes insipidus." J Am Soc Nephrol **11**: 1044-1054.
- Arthus, M.-F., M. Lonergan, et al. (2002). "Thirteen large deletions/rearrangements of the *AVPR2* gene causing X-linked nephrogenic diabetes insipidus." J Am Soc Nephrol **13**(Abstract no SA-PO201): 305A.
- Asaoka, Y., S. Nakamura, et al. (1992). "Protein kinase C, calcium and phospholipid degradation." Trends Biochem Sci **17**(10): 414-7.
- Aso, T., K. Yamazaki, et al. (2000). "Identification and characterization of Elongin A2, a new member of the Elongin family of transcription elongation factors, specifically expressed in the testis." J Biol Chem **275**(9): 6546-52.
- Aufiero, B., E. J. Neufeld, et al. (1994). "Sequence-specific DNA binding of individual cut repeats of the human CCAAT displacement/cut homeodomain protein." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(16): 7757-61.
- Awrey, D. E., R. G. Weilbaecher, et al. (1997). "Transcription elongation through DNA arrest sites. A multistep process involving both RNA polymerase II subunit RPB9 and TFIIS." J Biol Chem **272**(23): 14747-54.

- Bai, C., P. Sen, et al. (1996). "SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box." Cell **86**(2): 263-74.
- Bai, M. (2004). "Dimerization of G-protein-coupled receptors: roles in signal transduction." Cell Signal **16**(2): 175-86.
- Bai, M. (2004). "Structure-function relationship of the extracellular calcium-sensing receptor." Cell Calcium **35**(3): 197-207.
- Baldwin, J. M. (1993). "The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors." Embo J **12**(4): 1693-703.
- Ballesteros, J. A., A. D. Jensen, et al. (2001). "Activation of the beta 2-adrenergic receptor involves disruption of an ionic lock between the cytoplasmic ends of transmembrane segments 3 and 6." J Biol Chem **276**(31): 29171-7.
- Banerji, J., S. Rusconi and W. Schaffner (1981). "Expression of a beta-globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences." Cell **27** (2 Pt 1): 299-308.
- Bankir, L. (2001). "Antidiuretic action of vasopressin: quantitative aspects and interaction between V1a and V2 receptor-mediated effects." Cardiovasc Res **51**(3): 372-90.
- Bannister, A. J., P. Zegerman, et al. (2001). "Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain." Nature **410**(6824): 120-4.
- Barabino, S. M., W. Hubner, et al. (1997). "The 30-kD subunit of mammalian cleavage and polyadenylation specificity factor and its yeast homolog are RNA-binding zinc finger proteins." Genes Dev **11**(13): 1703-16.
- Barberis, C., B. Mouillac, et al. (1998). "Structural bases of vasopressin/oxytocin receptor function." J Endocrinol **156**(2): 223-9.
- Bedell, M. A., D. A. Largaespada, et al. (1997). "Mouse models of human disease. Part II: recent progress and future directions." Genes Dev **11**(1): 11-43.
- Beelman, C. A. and R. Parker (1995). "Degradation of mRNA in eukaryotes." Cell **81**(2): 179-83.
- Beelman, C. A., A. Stevens, et al. (1996). "An essential component of the decapping enzyme required for normal rates of mRNA turnover." Nature **382**(6592): 642-6.

- Bell, S. D., P. L. Kosa, et al. (1999). "Orientation of the transcription preinitiation complex in archaea." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(24): 13662-7.
- Belotserkovskaya, R., S. Oh, et al. (2003). "FACT facilitates transcription-dependent nucleosome alteration." Science **301**(5636): 1090-3.
- Bengal, E., O. Flores, et al. (1991). "Role of the mammalian transcription factors IIF, IIS, and IIX during elongation by RNA polymerase II." Mol Cell Biol **11**(3): 1195-206.
- Benovic, J. L., L. J. Pike, et al. (1985). "Phosphorylation of the mammalian beta-adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. Regulation of the rate of receptor phosphorylation and dephosphorylation by agonist occupancy and effects on coupling of the receptor to the stimulatory guanine nucleotide regulatory protein." J Biol Chem **260**(11): 7094-101.
- Berg, J. M. (1986). "Potential metal-binding domains in nucleic acid binding proteins." Science **232**(4749): 485-7.
- Berg, J. M. (1990). "Zinc finger domains: hypotheses and current knowledge." Annu Rev Biophys Chem **19**: 405-21.
- Berg, J. M., J. L. Tymoczko, et al. (2002). The molecular design of life. Biochemistry. J. M. Berg, J. L. Tymoczko and L. Stryer. New York, W. H. Freeman and Company. **fifth edition**: 25.
- Berl, T. and G. L. Robertson (2000). Pathophysiology of water metabolism. Brenner and Rector's The Kidney. B. M. Brenner. Philadelphia, W. B Saunders Company. **1**: 866-924.
- Bernier, V., M. Lagace, et al. (2004). "Functional rescue of the constitutively internalized V2 vasopressin receptor mutant R137H by the pharmacological chaperone action of SR49059." Mol Endocrinol **18**(8): 2074-84.
- Bernier, V., J. P. Morello, et al. (2006). "Pharmacologic chaperones as a potential treatment for X-linked nephrogenic diabetes insipidus." J Am Soc Nephrol **17**(1): 232-43.
- Bernstein, P. and J. Ross (1989). "Poly(A), poly(A) binding protein and the regulation of mRNA stability." Trends Biochem Sci **14**(9): 373-7.
- Biben, C., B.J. Kirschbaum, et al. (1994). "Novel muscle-specific enhancer sequences upstream of the cardiac actin gene." Mol Cell Biol **14** (5) : 3504-13.

- Bichet, D. (2006). Diabète insipides néphrogéniques. Néphrologie et Thérapeutique. Elsevier. **2**: 387.
- Bichet, D. G. (1992). Nephrogenic diabetes insipidus. Oxford Textbook of Clinical Nephrology. J. S. Cameron, A. M. Davison, J. P. Grünfeld, D. N. S. Kerr and E. Ritz. New York, Oxford University Press: 789-800.
- Bichet, D. G. (2001). Nephrogenic and central diabetes insipidus. Diseases of the Kidney and Urinary Tract. R. W. Schrier. Philadelphia, PA, Lippincott Williams & Wilkins. **III**: 2549-2576.
- Bichet, D. G., M.-F. Arthus, et al. (1993). "X-linked nephrogenic diabetes insipidus mutations in North America and the Hopewell hypothesis." J Clin Invest **92**: 1262-1268.
- Bichet, D. G., M. Birnbaumer, et al. (1994). "Nature and recurrence of AVPR2 mutations in X-linked nephrogenic diabetes insipidus." Am J Hum Genet **55**: 278-286.
- Bichet, D. G. and T. M. Fujiwara (2001). Nephrogenic diabetes insipidus. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Slyet al. New York, McGraw-Hill. **3**: 4181-4204.
- Bichet, D. G., G. N. Hendy, et al. (1992). "X-linked nephrogenic diabetes insipidus: From the ship Hopewell to restriction fragment length polymorphism studies." Am J Hum Genet **51**: 1089-1102.
- Bichet, D. G., M. Lonergan, et al. (1998). "The spectrum of nephrogenic diabetes insipidus mutations and importance of early recognition and treatment." J Am Soc Nephrol **9**(Abstract no. A1971): 386A.
- Bichet, D. G., M. Razi, et al. (1989). "Epinephrine and dDAVP administration in patients with congenital nephrogenic diabetes insipidus. Evidence for a pre-cyclic AMP V2 receptor defective mechanism." Kidney Int **36**(5): 859-66.
- Bichet, D. G., M. Razi, et al. (1988). "Hemodynamic and coagulation responses to 1-desamino[8-D-arginine]vasopressin (dDAVP) infusion in patients with congenital nephrogenic diabetes insipidus." N Engl J Med **318**: 881-887.
- Bird, G., D. A. Zorio, et al. (2004). "RNA polymerase II carboxy-terminal domain phosphorylation is required for cotranscriptional pre-mRNA splicing and 3'-end formation." Mol Cell Biol **24**(20): 8963-9.

- Birnbaumer, L., J. Abramowitz, et al. (1990). "Receptor-effector coupling by G proteins." Biochim Biophys Acta **1031**(2): 163-224.
- Birnbaumer, M. (1995). "Mutations and diseases of G protein coupled receptors." J Recept Signal Transduct Res **15**(1-4): 131-60.
- Birnbaumer, M., A. Seibold, et al. (1992). "Molecular cloning of the receptor for human antidiuretic hormone." Nature **357**: 333-335.
- Blochlinger, K., R. Bodmer, et al. (1988). "Primary structure and expression of a product from cut, a locus involved in specifying sensory organ identity in *Drosophila*." Nature **333**(6174): 629-35.
- Blochlinger, K., L. Y. Jan, et al. (1991). "Transformation of sensory organ identity by ectopic expression of Cut in *Drosophila*." Genes Dev **5**(7): 1124-35.
- Bloemendal, H., A. Zweers, et al. (1972). "The plasma membranes of eye lens fibres. Biochemical and structural characterization." Cell Differ **1**(2): 91-106.
- Bockaert, J. and J. P. Pin (1999). "Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success." Embo J **18**(7): 1723-9.
- Bode, H. H. and J. D. Crawford (1969). "Nephrogenic diabetes insipidus in North America. The Hopewell hypothesis." N Engl J Med **280**(14): 750-4.
- Bohm, S. K., E. F. Grady, et al. (1997). "Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors." Biochem J **322** ( Pt 1): 1-18.
- Bok, D., J. Dockstader, et al. (1982). "Immunocytochemical localization of the lens main intrinsic polypeptide (MIP26) in communicating junctions." J Cell Biol **92**(1): 213-20.
- Borgnia, M., S. Nielsen, et al. (1999). "Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels." Annu Rev Biochem **68**: 425-58.
- Boube, M., L. Joulia, et al. (2002). "Evidence for a mediator of RNA polymerase II transcriptional regulation conserved from yeast to man." Cell **110**(2): 143-51.
- Bourbon, H. M., A. Aguilera, et al. (2004). "A unified nomenclature for protein subunits of mediator complexes linking transcriptional regulators to RNA polymerase II." Mol Cell **14**(5): 553-7.

- Bourne, H. R., D. A. Sanders, et al. (1991). "The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism." Nature **349**(6305): 117-27.
- Bourque, C. W. and S. H. R. Oliet (1997). "Osmoreceptors in the central nervous system." Annu Rev Physiol **59**: 601-619.
- Bourque, C. W., S. H. R. Oliet, et al. (1994). "Osmoreceptors, osmoreception, and osmoregulation." Front Neuroendocrinol **15**: 231-274.
- Bousquet-Antonelli, C., C. Presutti, et al. (2000). "Identification of a regulated pathway for nuclear pre-mRNA turnover." Cell **102**(6): 765-75.
- Bouvier, M. (2001). "Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors." Nat Rev Neurosci **2**(4): 274-86.
- Bouvier, M., W. P. Hausdorff, et al. (1988). "Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization." Nature **333**(6171): 370-3.
- Bradsher, J. N., K. W. Jackson, et al. (1993). "RNA polymerase II transcription factor SIII. I. Identification, purification, and properties." J Biol Chem **268**(34): 25587-93.
- Bradsher, J. N., S. Tan, et al. (1993). "RNA polymerase II transcription factor SIII. II. Functional properties and role in RNA chain elongation." J Biol Chem **268**(34): 25594-603.
- Brady, A. E. and L. E. Limbird (2002). "G protein-coupled receptor interacting proteins: emerging roles in localization and signal transduction." Cell Signal **14**(4): 297-309.
- Brenner, B., U. Seligsohn, et al. (1988). "Normal response of factor VIII and von Willebrand factor to 1-deamino- 8D-arginine vasopressin in nephrogenic diabetes insipidus." J Clin Endocrinol Metab **67**(1): 191-193.
- Briand, J. F., F. Navarro, et al. (2001). "Partners of Rpb8p, a small subunit shared by yeast RNA polymerases I, II and III." Mol Cell Biol **21**(17): 6056-65.
- Bronson, S. K., E. G. Plaehn, et al. (1996). "Single-copy transgenic mice with chosen-site integration." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(17): 9067-72.
- Brown, S. A., A. N. Imbalzano, et al. (1996). "Activator-dependent regulation of transcriptional pausing on nucleosomal templates." Genes Dev **10**(12): 1479-90.

- Brownstein, M. J., J. T. Russell, et al. (1980). "Synthesis, transport, and release of posterior pituitary hormones." Science **207**(4429): 373-8.
- Bucher, P. (1990). "Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences." J Mol Biol **212**(4): 563-78.
- Buffo, A. (2007). "Fate determinant expression in the lesioned brain: Olig2 induction and its implications for neuronal repair." Neurodegener Dis **4**(4): 328-32.
- Buratowski, S. (1994). "The basics of basal transcription by RNA polymerase II." Cell **77**(1): 1-3.
- Buratowski, S. (2005). "Connections between mRNA 3' end processing and transcription termination." Curr Opin Cell Biol **17**(3): 257-61.
- Buratowski, S., S. Hahn, et al. (1989). "Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II." Cell **56**(4): 549-61.
- Buratowski, S., S. Hahn, et al. (1988). "Function of a yeast TATA element-binding protein in a mammalian transcription system." Nature **334**(6177): 37-42.
- Burg, M. B., E. D. Kwon, et al. (1997). "Regulation of gene expression by hypertonicity." Annu Rev Physiol **59**: 437-55.
- Burke, T. W. and J. T. Kadonaga (1996). "Drosophila TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters." Genes Dev **10**(6): 711-24.
- Burke, T. W. and J. T. Kadonaga (1997). "The downstream core promoter element, DPE, is conserved from Drosophila to humans and is recognized by TAFII60 of Drosophila." Genes Dev **11**(22): 3020-31.
- Bushnell, D. A., C. Bamdad, et al. (1996). "A minimal set of RNA polymerase II transcription protein interactions." J Biol Chem **271**(33): 20170-4.
- Butler, J. E. and J. T. Kadonaga (2002). "The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression." Genes Dev **16**(20): 2583-92.
- Butler, J. S. (2002). "The yin and yang of the exosome." Trends Cell Biol **12**(2): 90-6.

- Cabrejos, M. E., C. C. Allende, et al. (2004). "Effects of phosphorylation by protein kinase CK2 on the human basal components of the RNA polymerase II transcription machinery." J Cell Biochem **93**(1): 2-10.
- Cadieux, C., R. Harada, et al. (2008). "Polycystic kidneys caused by sustained expression of Cux1 isoform p75." J Biol Chem **283**(20): 13817-24.
- Calamita, G., A. Mazzone, et al. (2001). "Expression and immunolocalization of the aquaporin-8 water channel in rat gastrointestinal tract." Eur J Cell Biol **80**(11): 711-9.
- Calamita, G., A. Mazzone, et al. (2001). "Expression and localization of the aquaporin-8 water channel in rat testis." Biol Reprod **64**(6): 1660-6.
- Calmont, A., K. Reichwald, et al. (2000). "Identification of a short cis-acting element in the human vasopressin type 2 receptor gene which confers high-level expression of a reporter gene specifically in collecting duct cells." Mol Endocrinol **14**(10): 1682-1695.
- Carmosino, M., H. L. Brooks, et al. (2007). "Axial heterogeneity of vasopressin-receptor subtypes along the human and mouse collecting duct." Am J Physiol Renal Physiol **292**(1): F351-60.
- Cavusoglu, N., M. Brand, et al. (2003). "Novel subunits of the TATA binding protein free TAFII-containing transcription complex identified by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry following one-dimensional gel electrophoresis." Proteomics **3**(2): 217-23.
- Cerf, C., G. Lippens, et al. (1993). "Homo- and heteronuclear two-dimensional NMR studies of the globular domain of histone H1: sequential assignment and secondary structure." Biochemistry **32**(42): 11345-51.
- Cha, J. H., S. K. Woo, et al. (2001). "Hydration status affects nuclear distribution of transcription factor tonicity responsive enhancer binding protein in rat kidney." J Am Soc Nephrol **12**(11): 2221-30.
- Chabardes, D., D. Firsov, et al. (1996). "Localization of mRNAs encoding Ca<sup>2+</sup>-inhibitable adenylyl cyclases along the renal tubule. Functional consequences for regulation of the cAMP content." J Biol Chem **271**(32): 19264-71.



- Chalkley, G. E. and C. P. Verrijzer (1999). "DNA binding site selection by RNA polymerase II TAFs: a TAF(II)250-TAF(II)150 complex recognizes the initiator." Embo J **18**(17): 4835-45.
- Chambers, R. S. and M. E. Dahmus (1994). "Purification and characterization of a phosphatase from HeLa cells which dephosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II." J Biol Chem **269**(42): 26243-8.
- Champ, P. C., S. Maurice, et al. (2004). "Distributions of Z-DNA and nuclear factor I in human chromosome 22: a model for coupled transcriptional regulation." Nucleic Acids Res **32**(22): 6501-10.
- Chavez, S. and A. Aguilera (1997). "The yeast HPR1 gene has a functional role in transcriptional elongation that uncovers a novel source of genome instability." Genes Dev **11**(24): 3459-70.
- Chavez, S., T. Beilharz, et al. (2000). "A protein complex containing Tho2, Hpr1, Mft1 and a novel protein, Thp2, connects transcription elongation with mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*." EMBO J **19**(21): 5824-34.
- Chen, H. T. and S. Hahn (2003). "Binding of TFIIB to RNA polymerase II: Mapping the binding site for the TFIIB zinc ribbon domain within the preinitiation complex." Mol Cell **12**(2): 437-47.
- Cheong, J. H., M. Yi, et al. (1995). "Human RPB5, a subunit shared by eukaryotic nuclear RNA polymerases, binds human hepatitis B virus X protein and may play a role in X transactivation." Embo J **14**(1): 143-50.
- Cherezov, V., D. M. Rosenbaum, et al. (2007). "High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor." Science **318**(5854): 1258-65.
- Chini, B., B. Mouillac, et al. (1995). "Tyr 115 is the key residue for determining agonist selectivity in the V1a vasopressin receptor." EMBO J **14**: 2176-2182.
- Chou, C. L., B. M. Christensen, et al. (2004). "Non-muscle myosin II and myosin light chain kinase are downstream targets for vasopressin signaling in the renal collecting duct." J Biol Chem **279**(47): 49026-35.

- Chowdrey, H. S. and S. L. Lightman (1993). "Role of central amino acids and peptide-mediated pathways in neurohypophysial hormone release." Ann N Y Acad Sci **689**: 183-93.
- Christensen, B. M., M. Zelenina, et al. (2000). "Localization and regulation of PKA-phosphorylated AQP2 in response to V(2)-receptor agonist/antagonist treatment." Am J Physiol Renal Physiol **278**(1): F29-42.
- Ciura, S. and C. W. Bourque (2006). "Transient receptor potential vanilloid 1 is required for intrinsic osmoreception in organum vasculosum lamina terminalis neurons and for normal thirst responses to systemic hyperosmolality." J Neurosci **26**(35): 9069-75.
- Cobb, B. S., S. Morales-Alcelay, et al. (2000). "Targeting of Ikaros to pericentromeric heterochromatin by direct DNA binding." Genes Dev **14**(17): 2146-60.
- Cocklin, R. R. and M. Wang (2003). "Identification of methylation and acetylation sites on mouse histone H3 using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight and nanoelectrospray ionization tandem mass spectrometry." J Protein Chem **22**(4): 327-34.
- Cole, C. N. and J. J. Scarcelli (2006). "Transport of messenger RNA from the nucleus to the cytoplasm." Curr Opin Cell Biol **18**(3): 299-306.
- Conaway, R. C., S. Sato, et al. (2005). "The mammalian Mediator complex and its role in transcriptional regulation." Trends Biochem Sci **30**(5): 250-5.
- Connelly, S. and J. L. Manley (1988). "A functional mRNA polyadenylation signal is required for transcription termination by RNA polymerase II." Genes Dev **2**(4): 440-52.
- Cooper, D. N., M. Krawczak, et al. (1995). The nature and mechanisms of human gene mutation. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly and D. Valle. New York, McGraw-Hill, Inc. **I**: 259-291.
- Cooper, D. N. and H. Youssoufian (1988). "The CpG dinucleotide and human genetic disease." Hum Genet **78**(2): 151-5.
- Coppola, J. A., A. S. Field, et al. (1983). "Promoter-proximal pausing by RNA polymerase II in vitro: transcripts shorter than 20 nucleotides are not capped." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(5): 1251-5.

- Coqueret, O., G. Berube, et al. (1998). "The mammalian Cut homeodomain protein functions as a cell-cycle-dependent transcriptional repressor which downmodulates p21WAF1/CIP1/SDI1 in S phase." EMBO J **17**(16): 4680-94.
- Cosgrove, M. S., J. D. Boeke, et al. (2004). "Regulated nucleosome mobility and the histone code." Nat Struct Mol Biol **11**(11): 1037-43.
- Cosma, M. P. (2002). "Ordered recruitment: gene-specific mechanism of transcription activation." Mol Cell **10**(2): 227-36.
- Cox, J. M., M. M. Hayward, et al. (1997). "Bidirectional binding of the TATA box binding protein to the TATA box." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(25): 13475-80.
- Cramer, P., D. A. Bushnell, et al. (2000). "Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism." Science **288**(5466): 640-9.
- Cramer, P., D. A. Bushnell, et al. (2001). "Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution." Science **292**(5523): 1863-76.
- Davison, B. L., J. M. Egly, et al. (1983). "Formation of stable preinitiation complexes between eukaryotic class B transcription factors and promoter sequences." Nature **301**(5902): 680-6.
- de Groot, B. L. and H. Grubmuller (2001). "Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF." Science **294**(5550): 2353-7.
- de Keyzer, Y., C. Auzan, et al. (1994). "Cloning and characterization of the human V3 pituitary vasopressin receptor." FEBS Letters **356**: 215-220.
- de Keyzer, Y., F. Lenne, et al. (1996). "The pituitary V3 vasopressin receptor and the corticotroph phenotype in ectopic ACTH syndrome." J Clin Invest **97**(5): 1311-8.
- Debiec, H., E. I. Christensen, et al. (1998). "The cell adhesion molecule L1 is developmentally regulated in the renal epithelium and is involved in kidney branching morphogenesis." J Cell Biol **143**: 2067-2079.
- Debrand, J. (1974). Le diabète insipide néphrogénique héréditaire, incidence dans le sexe féminin. Faculté de Médecine et de Pharmacie. BESANCON, Franche-Comté. **MD**.

- Debrand, N. (2004). Régulation transcriptionnelle à très grande distance du gène codant le récepteur à la vasopressine de type 2. Sciences Biomédicales. Montréal, Université de Montréal. **M. Sc.**
- Deen, P. M. T., H. Croes, et al. (1995). "Water channels encoded by mutant aquaporin-2 genes in nephrogenic diabetes insipidus are impaired in their cellular routing." J Clin Invest **95**: 2291-2296.
- Deen, P. M. T., M. A. J. Verdijk, et al. (1994). "Requirement of human renal water channel aquaporin-2 for vasopressin-dependent concentration of urine." Science **264**: 92-95.
- Deng, W. and S. G. Roberts (2005). "A core promoter element downstream of the TATA box that is recognized by TFIIB." Genes Dev **19**(20): 2418-23.
- Deng, W. and S. G. Roberts (2006). "Core promoter elements recognized by transcription factor IIB." Biochem Soc Trans **34**(Pt 6): 1051-3.
- Denker, B. M., B. L. Smith, et al. (1988). "Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules." J Biol Chem **263**(30): 15634-42.
- DePina, A. S. and G. M. Langford (1999). "Vesicle transport: the role of actin filaments and myosin motors." Microsc Res Tech **47**(2): 93-106.
- Deplancke, B., D. Dupuy, et al. (2004). "A gateway-compatible yeast one-hybrid system." Genome Res **14**(10B): 2093-101.
- Devost, D. and H. H. Zingg (2004). "Homo- and hetero-dimeric complex formations of the human oxytocin receptor." J Neuroendocrinol **16**(4): 372-7.
- Devreotes, P. N. (1994). "G protein-linked signaling pathways control the developmental program of Dictyostelium." Neuron **12**(2): 235-41.
- Dieci, G., S. Hermann-Le Denmat, et al. (1995). "A universally conserved region of the largest subunit participates in the active site of RNA polymerase III." Embo J **14**(15): 3766-76.
- DiGiovanni, S. R., S. Nielsen, et al. (1994). "Regulation of collecting duct water channel expression by vasopressin in Brattleboro rat." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(19): 8984-8.

- Dixon, R. A., I. S. Sigal, et al. (1987). "Structural features required for ligand binding to the beta-adrenergic receptor." Embo J **6**(11): 3269-75.
- Doetschman, T., R. G. Gregg, et al. (1987). "Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells." Nature **330**(6148): 576-8.
- Dohlman, H. G., M. G. Caron, et al. (1990). "Role of extracellular disulfide-bonded cysteines in the ligand binding function of the beta 2-adrenergic receptor." Biochemistry **29**(9): 2335-42.
- Dohlman, H. G., J. Thorner, et al. (1991). "Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors." Annu Rev Biochem **60**: 653-88.
- Dorjsuren, D., Y. Lin, et al. (1998). "RMP, a novel RNA polymerase II subunit 5-interacting protein, counteracts transactivation by hepatitis B virus X protein." Mol Cell Biol **18**(12): 7546-55.
- Douziech, M., F. Coin, et al. (2000). "Mechanism of promoter melting by the xeroderma pigmentosum complementation group B helicase of transcription factor IIIH revealed by protein-DNA photo-cross-linking." Mol Cell Biol **20**(21): 8168-77.
- Durfee, T., K. Becherer, et al. (1993). "The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit." Genes Dev **7**(4): 555-69.
- Dynan, W. S. and R. Tjian (1985). "Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence-specific DNA-binding proteins." Nature **316**(6031): 774-8.
- Ecelbarger, C. A., J. Terris, et al. (1995). "Aquaporin-3 water channel localization and regulation in rat kidney." Am J Physiol **269**(5 Pt 2): F663-72.
- Edwards, J. B., J. Delort, et al. (1991). "Oligodeoxyribonucleotide ligation to single-stranded cDNAs: a new tool for cloning 5' ends of mRNAs and for constructing cDNA libraries by in vitro amplification." Nucleic Acids Res **19**(19): 5227-32.
- Edwards, R. M., B. A. Jackson, et al. (1981). "ADH-sensitive cAMP system in papillary collecting duct: effect of osmolality and PGE2." Am J Physiol **240**(4): F311-8.
- Egyhazi, E., A. Ossoinak, et al. (1996). "Phosphorylation dependence of the initiation of productive transcription of Balbiani ring 2 genes in living cells." Chromosoma **104**(6): 422-33.

- Eissenberg, J. C. and S. C. Elgin (2000). "The HP1 protein family: getting a grip on chromatin." Curr Opin Genet Dev **10**(2): 204-10.
- Elsby, L. M. and S. G. Roberts (2004). "The role of TFIIB conformation in transcriptional regulation." Biochem Soc Trans **32**(Pt 6): 1098-9.
- Emami, K. H., T. W. Burke, et al. (1998). "Sp1 activation of a TATA-less promoter requires a species-specific interaction involving transcription factor IID." Nucleic Acids Res **26**(3): 839-46.
- Endoh, M., W. Zhu, et al. (2004). "Human Spt6 stimulates transcription elongation by RNA polymerase II in vitro." Mol Cell Biol **24**(8): 3324-36.
- Enriquez-Harris, P., N. Levitt, et al. (1991). "A pause site for RNA polymerase II is associated with termination of transcription." EMBO J **10**(7): 1833-42.
- Eskeland, R., A. Eberharter, et al. (2007). "HP1 binding to chromatin methylated at H3K9 is enhanced by auxiliary factors." Mol Cell Biol **27**(2): 453-65.
- Evans, R., J. A. Fairley, et al. (2001). "Activator-mediated disruption of sequence-specific DNA contacts by the general transcription factor TFIIB." Genes Dev **15**(22): 2945-9.
- Fairley, J. A., R. Evans, et al. (2002). "Core promoter-dependent TFIIB conformation and a role for TFIIB conformation in transcription start site selection." Mol Cell Biol **22**(19): 6697-705.
- Fan, X., H. Shi, et al. (2004). "Probing TBP interactions in transcription initiation and reinitiation with RNA aptamers that act in distinct modes." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(18): 6934-9.
- Fath, K. R. and D. R. Burgess (1993). "Golgi-derived vesicles from developing epithelial cells bind actin filaments and possess myosin-I as a cytoplasmically oriented peripheral membrane protein." J Cell Biol **120**(1): 117-27.
- Fay, M. J., J. Du, et al. (1996). "Evidence for expression of vasopressin V2 receptor mRNA in human lung." Peptides **17**(3): 477-81.
- Fenton, R. A., L. Brond, et al. (2007). "Cellular and subcellular distribution of the type-2 vasopressin receptor in the kidney." Am J Physiol Renal Physiol **293**(3): F748-60.

- Fenton, R. A., A. Shodeinde, et al. (2006). "UT-A urea transporter promoter, UT-Aalpha, targets principal cells of the renal inner medullary collecting duct." Am J Physiol Renal Physiol **290**(1): F188-95.
- Ferguson, S. S., L. Menard, et al. (1995). "Role of phosphorylation in agonist-promoted beta 2-adrenergic receptor sequestration. Rescue of a sequestration-defective mutant receptor by beta ARK1." J Biol Chem **270**(42): 24782-9.
- Fields, S. and O. Song (1989). "A novel genetic system to detect protein-protein interactions." Nature **340**(6230): 245-6.
- Finch, J. T. and A. Klug (1976). "Solenoidal model for superstructure in chromatin." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(6): 1897-901.
- Fire, A., M. Samuels, et al. (1984). "Interactions between RNA polymerase II, factors, and template leading to accurate transcription." J Biol Chem **259**(4): 2509-16.
- Firsov, D., B. Mandon, et al. (1994). "Molecular analysis of vasopressin receptors in the rat nephron. Evidence for alternative splicing of the V2 receptor." Pflugers Arch **429**(1): 79-89.
- Fotiadis, D., Y. Liang, et al. (2003). "Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes." Nature **421**(6919): 127-8.
- Franchini, K. G. and A. W. Cowley, Jr. (1996). "Renal cortical and medullary blood flow responses during water restriction: role of vasopressin." Am J Physiol **270**(6 Pt 2): R1257-64.
- Franchini, K. G. and A. W. Cowley, Jr. (1996). "Sensitivity of the renal medullary circulation to plasma vasopressin." Am J Physiol **271**(3 Pt 2): R647-53.
- Franchini, K. G., D. L. Mattson, et al. (1997). "Vasopressin modulation of medullary blood flow and pressure-natriuresis-diuresis in the decerebrated rat." Am J Physiol **272**(5 Pt 2): R1472-9.
- Freed, E., K. R. Lacey, et al. (1999). "Components of an SCF ubiquitin ligase localize to the centrosome and regulate the centrosome duplication cycle." Genes Dev **13**(17): 2242-57.

- Freitas, M. A., A. R. Sklenar, et al. (2004). "Application of mass spectrometry to the identification and quantification of histone post-translational modifications." J Cell Biochem **92**(4): 691-700.
- Frohman, M. A., M. K. Dush, et al. (1988). "Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(23): 8998-9002.
- Furuichi, Y., A. LaFiandra, et al. (1977). "5'-Terminal structure and mRNA stability." Nature **266**(5599): 235-9.
- Furuichi, Y. and A. J. Shatkin (2000). "Viral and cellular mRNA capping: past and prospects." Adv Virus Res **55**: 135-84.
- Fushimi, K., S. Sasaki, et al. (1994). "Functional characterization and cell immunolocalization of AQP-CD water channel in kidney collecting duct." Am J Physiol **267**(4 Pt 2): F573-82.
- Fushimi, K., S. Uchida, et al. (1993). "Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule." Nature **361**(6412): 549-52.
- Gadal, O., G. V. Shpakovski, et al. (1999). "Mutants in ABC10beta, a conserved subunit shared by all three yeast RNA polymerases, specifically affect RNA polymerase I assembly." J Biol Chem **274**(13): 8421-7.
- Ge, H. and R. G. Roeder (1994). "Purification, cloning, and characterization of a human coactivator, PC4, that mediates transcriptional activation of class II genes." Cell **78**(3): 513-23.
- Ge, H., Y. Zhao, et al. (1994). "Phosphorylation negatively regulates the function of coactivator PC4." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(26): 12691-5.
- Gehring, W. J., M. Muller, et al. (1990). "The structure of the homeodomain and its functional implications." Trends Genet **6**(10): 323-9.
- George, S. R., T. Fan, et al. (2000). "Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties." J Biol Chem **275**(34): 26128-35.
- George, S. T., M. Berrios, et al. (1988). "Receptor density and cAMP accumulation: analysis in CHO cells exhibiting stable expression of a cDNA that encodes the beta 2-adrenergic receptor." Biochem Biophys Res Commun **150**(2): 665-72.



- Gershenson, N. I. and I. P. Ioshikhes (2005). "Synergy of human Pol II core promoter elements revealed by statistical sequence analysis." Bioinformatics **21**(8): 1295-300.
- Gether, U. (2000). "Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors." Endocr Rev **21**(1): 90-113.
- Ghavidel, A., D. J. Hockman, et al. (1999). "A review of progress towards elucidating the role of protein kinase CK2 in polymerase III transcription: regulation of the TATA binding protein." Mol Cell Biochem **191**(1-2): 143-8.
- Ghavidel, A. and M. C. Schultz (2001). "TATA binding protein-associated CK2 transduces DNA damage signals to the RNA polymerase III transcriptional machinery." Cell **106**(5): 575-84.
- Ghosh, S., M. J. Selby, et al. (1993). "Synergism between Tat and VP16 in trans-activation of HIV-1 LTR." J Mol Biol **234**(3): 610-9.
- Gietz, D., A. St Jean, et al. (1992). "Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells." Nucleic Acids Res **20**(6): 1425.
- Gilman, A. G. (1987). "G proteins: transducers of receptor-generated signals." Annu Rev Biochem **56**: 615-49.
- Gimpl, G. and F. Fahrenholz (2001). "The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation." Physiol Rev **81**(2): 629-83.
- Gingras, A. C., B. Raught, et al. (1999). "eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation." Annu Rev Biochem **68**: 913-63.
- Goldberg, H., T. Helaakoski, et al. (1992). "Tissue-specific expression of the mouse alpha 2(I) collagen promoter. Studies in transgenic mice and in tissue culture cells." J Biol Chem **267**(27): 19622-30.
- Goldberg, M. (1979). Sequence analysis of Drosophila histone genes. Stanford, CA, Stanford University. **Ph.D.**
- Goll, M. G. and T. H. Bestor (2002). "Histone modification and replacement in chromatin activation." Genes Dev **16**(14): 1739-42.

- Goodman, O. B., Jr., J. G. Krupnick, et al. (1996). "Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor." Nature **383**(6599): 447-50.
- Gorin, M. B., S. B. Yancey, et al. (1984). "The major intrinsic protein (MIP) of the bovine lens fiber membrane: characterization and structure based on cDNA cloning." Cell **39**(1): 49-59.
- Goulet, B., A. Baruch, et al. (2004). "A cathepsin L isoform that is devoid of a signal peptide localizes to the nucleus in S phase and processes the CDP/Cux transcription factor." Mol Cell **14**(2): 207-19.
- Goulet, B., M. Truscott, et al. (2006). "A novel proteolytically processed CDP/Cux isoform of 90 kDa is generated by cathepsin L." Biol Chem **387**(9): 1285-93.
- Goulet, B., P. Watson, et al. (2002). "Characterization of a tissue-specific CDP/Cux isoform, p75, activated in breast tumor cells." Cancer Res **62**(22): 6625-33.
- Grazzini, E., A. M. Lodboerer, et al. (1996). "Molecular and functional characterization of V1b vasopressin receptor in rat adrenal medulla." Endocrinol **137**: 3906-3914.
- Greil, F., I. van der Kraan, et al. (2003). "Distinct HP1 and Su(var)3-9 complexes bind to sets of developmentally coexpressed genes depending on chromosomal location." Genes Dev **17**(22): 2825-38.
- Grosveld, F., G. B. van Assendelft, et al. (1987). "Position-independent, high-level expression of the human beta-globin gene in transgenic mice." Cell **51**(6): 975-985.
- Guillot, P. V., J. Guan, et al. (1999). "A vascular bed-specific pathway." J Clin Invest **103**(6): 799-805.
- Gurevich, V. V., S. B. Dion, et al. (1995). "Arrestin interactions with G protein-coupled receptors. Direct binding studies of wild type and mutant arrestins with rhodopsin, beta 2-adrenergic, and m2 muscarinic cholinergic receptors." J Biol Chem **270**(2): 720-31.
- Guyton, A. and J. Hall (2000). The kidney and body fluids. Unit 5. Textbook of medical physiology. Philadelphia, WB Saunders company: 280-379.
- Hammell, C. M., S. Gross, et al. (2002). "Coupling of termination, 3' processing, and mRNA export." Mol Cell Biol **22**(18): 6441-57.

- Hampsey, M. (1998). "Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery." Microbiol Mol Biol Rev **62**(2): 465-503.
- Hansen, J. L. and S. P. Sheikh (2004). "Functional consequences of 7TM receptor dimerization." Eur J Pharm Sci **23**(4-5): 301-17.
- Hara-Chikuma, M. and A. S. Verkman (2005). "Aquaporin-3 functions as a glycerol transporter in mammalian skin." Biol Cell **97**(7): 479-86.
- Harada, R., G. Berube, et al. (1995). "DNA-binding specificity of the cut repeats from the human cut-like protein." Mol Cell Biol **15**(1): 129-40.
- Harada, R., D. Dufort, et al. (1994). "Conserved cut repeats in the human cut homeodomain protein function as DNA binding domains." J Biol Chem **269**(3): 2062-7.
- Hardy, S., M. Brand, et al. (2002). "TATA-binding protein-free TAF-containing complex (TFTC) and p300 are both required for efficient transcriptional activation." J Biol Chem **277**(36): 32875-82.
- Harper, J. W., G. R. Adami, et al. (1993). "The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases." Cell **75**(4): 805-16.
- Harrison, S. C. (1991). "A structural taxonomy of DNA-binding domains." Nature **353**(6346): 715-9.
- Harrison, S. C. and A. K. Aggarwal (1990). "DNA recognition by proteins with the helix-turn-helix motif." Annu Rev Biochem **59**: 933-69.
- Hartzog, G. A., T. Wada, et al. (1998). "Evidence that Spt4, Spt5, and Spt6 control transcription elongation by RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*." Genes Dev **12**(3): 357-69.
- Hasler, U., U. S. Jeon, et al. (2006). "Tonicity-responsive enhancer binding protein is an essential regulator of aquaporin-2 expression in renal collecting duct principal cells." J Am Soc Nephrol **17**(6): 1521-31.
- Hausdorff, W. P., M. Bouvier, et al. (1989). "Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization." J Biol Chem **264**(21): 12657-65.

- Hebert, T. E. and M. Bouvier (1998). "Structural and functional aspects of G protein-coupled receptor oligomerization." Biochem Cell Biol **76**(1): 1-11.
- Henikoff, S. (2008). "Nucleosome destabilization in the epigenetic regulation of gene expression." Nat Rev Genet **9**(1): 15-26.
- Henikoff, S. and K. Ahmad (2005). "Assembly of variant histones into chromatin." Annu Rev Cell Dev Biol **21**: 133-53.
- Henikoff, S., T. Furuyama, et al. (2004). "Histone variants, nucleosome assembly and epigenetic inheritance." Trends Genet **20**(7): 320-6.
- Herbert, A. and A. Rich (1999). "Left-handed Z-DNA: structure and function." Genetica **106**(1-2): 37-47.
- Hermosilla, R. and R. Schulein (2001). "Sorting functions of the individual cytoplasmic domains of the G protein-coupled vasopressin V(2) receptor in Madin Darby canine kidney epithelial cells." Mol Pharmacol **60**(5): 1031-9.
- Herr, A. J., M. B. Jensen, et al. (2005). "RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA." Science **308**(5718): 118-20.
- Hirose, Y. and J. L. Manley (2000). "RNA polymerase II and the integration of nuclear events." Genes Dev **14**(12): 1415-29.
- Hirose, Y. and Y. Ohkuma (2007). "Phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II plays central roles in the integrated events of eucaryotic gene expression." J Biochem **141**(5): 601-8.
- Holstege, F. C., U. Fiedler, et al. (1997). "Three transitions in the RNA polymerase II transcription complex during initiation." EMBO J **16**(24): 7468-80.
- Holtzman, E. J., L. F. Kolakowski, et al. (1993). "A null mutation in the vasopressin V2 receptor gene (AVPR2) associated with nephrogenic diabetes insipidus in the Hopewell kindred." Hum Mol Genet **2**: 1201-1204.
- Hozawa, S., E. J. Holtzman, et al. (1996). "cAMP motifs regulating transcription in the aquaporin 2 gene." Am J Physiol **270**(6 Pt 1): C1695-702.

- Hu, J., A. Banerjee, et al. (2005). "Assembly of b/HLH/z proteins c-Myc, Max, and Mad1 with cognate DNA: importance of protein-protein and protein-DNA interactions." Biochemistry **44**(35): 11855-63.
- Hughes, J., C. J. Ward, et al. (1995). "The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains." Nat Genet **10**(2): 151-60.
- Ikeda, M., E. Beitz, et al. (2002). "Characterization of aquaporin-6 as a nitrate channel in mammalian cells. Requirement of pore-lining residue threonine 63." J Biol Chem **277**(42): 39873-9.
- Imbalzano, A. N., H. Kwon, et al. (1994). "Facilitated binding of TATA-binding protein to nucleosomal DNA." Nature **370**(6489): 481-5.
- Inoue, H., Y. Tanizawa, et al. (1998). "A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome)." Nat Genet **20**(2): 143-8.
- Ishibashi, K., M. Imai, et al. (2000). "Cellular localization of aquaporin 7 in the rat kidney." Exp Nephrol **8**(4-5): 252-7.
- Ishibashi, K., M. Kuwahara, et al. (1997). "Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol, and urea." J Biol Chem **272**(33): 20782-6.
- Ishibashi, K., M. Kuwahara, et al. (1998). "Cloning and functional expression of a new aquaporin (AQP9) abundantly expressed in the peripheral leukocytes permeable to water and urea, but not to glycerol." Biochem Biophys Res Commun **244**(1): 268-74.
- Ishibashi, K., M. Kuwahara, et al. (2000). "Molecular biology of aquaporins." Rev Physiol Biochem Pharmacol **141**: 1-32.
- Ishibashi, K., T. Morinaga, et al. (2002). "Cloning and identification of a new member of water channel (AQP10) as an aquaglyceroporin." Biochim Biophys Acta **1576**(3): 335-40.
- Ishibashi, K., S. Sasaki, et al. (1994). "Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water

- expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(14): 6269-73.
- Ishibashi, K., S. Sasaki, et al. (1997). "Immunolocalization and effect of dehydration on AQP3, a basolateral water channel of kidney collecting ducts." Am J Physiol **272**(2 Pt 2): F235-41.
- Ishibashi, K., S. Sasaki, et al. (1995). "Structure and chromosomal localization of a human water channel (AQP3) gene [published erratum appears in Genomics 1995 Dec 10;30(3):633]." Genomics **27**(2): 352-4.
- Izaurralde, E., J. Lewis, et al. (1994). "A nuclear cap binding protein complex involved in pre-mRNA splicing." Cell **78**(4): 657-68.
- Izban, M. G. and D. S. Luse (1991). "Transcription on nucleosomal templates by RNA polymerase II in vitro: inhibition of elongation with enhancement of sequence-specific pausing." Genes Dev **5**(4): 683-96.
- Izban, M. G. and D. S. Luse (1992). "Factor-stimulated RNA polymerase II transcribes at physiological elongation rates on naked DNA but very poorly on chromatin templates." J Biol Chem **267**(19): 13647-55.
- Izban, M. G. and D. S. Luse (1992). "The RNA polymerase II ternary complex cleaves the nascent transcript in a 3'----5' direction in the presence of elongation factor SII." Genes Dev **6**(7): 1342-56.
- Jakobsson, B. and U. Berg (1994). "Effect of hydrochlorothiazide and indomethacin treatment on renal function in nephrogenic diabetes insipidus." Acta Paediatr **83**(5): 522-5.
- Jan, L. Y. and Y. N. Jan (1997). "Receptor-regulated ion channels." Curr Opin Cell Biol **9**(2): 155-60.
- Jard, S., J. Elands, et al. (1988). Vasopressin and oxytocin receptors : an overview. Progress in Endocrinology. H. Imura and K. Shizume. Amsterdam, Elsevier Science Publishers B.V.: 1183-1188.
- Jensen, T. H., K. Dower, et al. (2003). "Early formation of mRNP: license for export or quality control?" Mol Cell **11**(5): 1129-38.
- Jenuwein, T. and C. D. Allis (2001). "Translating the histone code." Science **293**(5532): 1074-80.

- Jeon, U. S., K. H. Han, et al. (2007). "Downregulation of renal TonEBP in hypokalemic rats." Am J Physiol Renal Physiol **293**(1): F408-15.
- Jiang, Y., M. Liu, et al. (2004). "Involvement of transcription termination factor 2 in mitotic repression of transcription elongation." Mol Cell **14**(3): 375-85.
- Johnson, C. A., L. P. O'Neill, et al. (1998). "Distinctive patterns of histone H4 acetylation are associated with defined sequence elements within both heterochromatic and euchromatic regions of the human genome." Nucleic Acids Res **26**(4): 994-1001.
- Jurica, M. S. and M. J. Moore (2003). "Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins." Mol Cell **12**(1): 5-14.
- Juven-Gershon, T., S. Cheng, et al. (2006). "Rational design of a super core promoter that enhances gene expression." Nat Methods **3**(11): 917-22.
- Juven-Gershon, T., J. Y. Hsu, et al. (2006). "Perspectives on the RNA polymerase II core promoter." Biochem Soc Trans **34**(Pt 6): 1047-50.
- Kalogeras, K. T., L. N. Nieman, et al. (1996). "Inferior petrosal sinus sampling in healthy human subjects reveals a unilateral corticotropin-releasing hormone-induced arginine vasopressin release associated with ipsilateral adrenocorticotropin secretion." J Clin Invest **97**: 2045-2050.
- Kamakaka, R. T. and S. Biggins (2005). "Histone variants: deviants?" Genes Dev **19**(3): 295-310.
- Kambouris, M., S. R. Dlouhy, et al. (1988). "Localization of the gene for X-linked nephrogenic diabetes insipidus to Xq28." Am J Med Genet **29**: 239-246.
- Kanai, A., T. Kuzuhara, et al. (1991). "Heterogeneity and tissue-specific expression of eukaryotic transcription factor S-II-related protein mRNA." J Biochem (Tokyo) **109**(5): 674-7.
- Kanno, T., B. Huettel, et al. (2005). "Atypical RNA polymerase subunits required for RNA-directed DNA methylation." Nat Genet **37**(7): 761-5.
- Kato, Y., N. Igarashi, et al. (1995). "Distribution and developmental changes in vasopressin V2 receptor mRNA in rat brain." Differentiation **59**(3): 163-9.

- Katragadda, M., M. W. Maciejewski, et al. (2004). "Structural studies of the putative helix 8 in the human beta(2) adrenergic receptor: an NMR study." Biochim Biophys Acta **1663**(1-2): 74-81.
- Kaufmann, J. E., A. Oksche, et al. (2000). "Vasopressin-induced von Willebrand factor secretion from endothelial cells involves V2 receptors and cAMP." J Clin Invest **106**(1): 107-116.
- Kawai, J., A. Shinagawa, et al. (2001). "Functional annotation of a full-length mouse cDNA collection." Nature **409**(6821): 685-90.
- Kennedy, M. E. and L. E. Limbird (1993). "Mutations of the alpha 2A-adrenergic receptor that eliminate detectable palmitoylation do not perturb receptor-G-protein coupling." J Biol Chem **268**(11): 8003-11.
- Kiefer, H., F. Chatail-Hermitte, et al. (2005). "ZENON, a novel POZ Kruppel-like DNA binding protein associated with differentiation and/or survival of late postmitotic neurons." Mol Cell Biol **25**(5): 1713-29.
- Kim, J. H., W. S. Lane, et al. (2002). "Human Elongator facilitates RNA polymerase II transcription through chromatin." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(3): 1241-6.
- Kim, J. L., D. B. Nikolov, et al. (1993). "Co-crystal structure of TBP recognizing the minor groove of a TATA element." Nature **365**(6446): 520-7.
- Kim, K. S., C. H. Kim, et al. (2003). "Orphan nuclear receptor Nurr1 directly transactivates the promoter activity of the tyrosine hydroxylase gene in a cell-specific manner." J Neurochem **85**(3): 622-34.
- Kim, Y. J., S. Bjorklund, et al. (1994). "A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II." Cell **77**(4): 599-608.
- Kim, Y. J. and J. T. Lis (2005). "Interactions between subunits of Drosophila Mediator and activator proteins." Trends Biochem Sci **30**(5): 245-9.
- Kimura, T., O. Tanizawa, et al. (1992). "Structure and expression of a human oxytocin receptor." Nature **356**: 526-529.
- Kingston, R. E. and G. J. Narlikar (1999). "ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity." Genes Dev **13**(18): 2339-52.



- Kioussis, D., E. Vanin, et al. (1983). "Beta-globin gene inactivation by DNA translocation in gamma-beta-thalassaemia." Nature **306**: 662-666.
- Kishore, G. M. and D. M. Shah (1988). "Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides." Annu Rev Biochem **57**: 627-63.
- Klug, A. and D. Rhodes (1987). "Zinc fingers: a novel protein fold for nucleic acid recognition." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **52**: 473-82.
- Knepper, M. A. (1997). "Molecular physiology of urinary concentrating mechanism: regulation of aquaporin water channels by vasopressin." Am J Physiol **272**(1 Pt 2): F3-12.
- Knoers, N. and L. A. Monnens (1991). "A variant of nephrogenic diabetes insipidus: V2 receptor abnormality restricted to the kidney." Eur J Pediatr **150**(5): 370-3.
- Knoers, N., H. van der Heyden, et al. (1989). "Three-point linkage analysis using multiple DNA polymorphic markers in families with X-linked nephrogenic diabetes insipidus." Genomics **4**: 434-437.
- Knoers, N., H. van der Heyden, et al. (1988). "Nephrogenic diabetes insipidus: close linkage with markers from the distal long arm of the human X chromosome." Hum Genet **80**(1): 31-8.
- Kobilka, B. K. and X. Deupi (2007). "Conformational complexity of G-protein-coupled receptors." Trends Pharmacol Sci **28**(8): 397-406.
- Koleske, A. J. and R. A. Young (1994). "An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators." Nature **368**(6470): 466-9.
- Komarnitsky, P., E. J. Cho, et al. (2000). "Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription." Genes Dev **14**(19): 2452-60.
- Komissarova, N. and M. Kashlev (1997). "RNA polymerase switches between inactivated and activated states By translocating back and forth along the DNA and the RNA." J Biol Chem **272**(24): 15329-38.
- Kornberg, R. D. (1974). "Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA." Science **184**(139): 868-71.

- Kornberg, R. D. and J. O. Thomas (1974). "Chromatin structure; oligomers of the histones." Science **184**(139): 865-8.
- Koyama, N., K. Ishibashi, et al. (1998). "Cloning and functional expression of human aquaporin8 cDNA and analysis of its gene." Genomics **54**(1): 169-72.
- Kravchenko, J. E., I. B. Rogozin, et al. (2005). "Transcription of mammalian messenger RNAs by a nuclear RNA polymerase of mitochondrial origin." Nature **436**(7051): 735-9.
- Kress, C., R. Vogels, et al. (1990). "Hox-2.3 upstream sequences mediate lacZ expression in intermediate mesoderm derivatives of transgenic mice." Development **109**(4): 775-86.
- Kretschmar, M., K. Kaiser, et al. (1994). "A novel mediator of class II gene transcription with homology to viral immediate-early transcriptional regulators." Cell **78**(3): 525-34.
- Krishnamurthy, S., X. He, et al. (2004). "Ssu72 Is an RNA polymerase II CTD phosphatase." Mol Cell **14**(3): 387-94.
- Krogan, N. J., J. Dover, et al. (2003). "The Paf1 complex is required for histone H3 methylation by COMPASS and Dot1p: linking transcriptional elongation to histone methylation." Mol Cell **11**(3): 721-9.
- Krogan, N. J., M. Kim, et al. (2003). "Methylation of histone H3 by Set2 in *Saccharomyces cerevisiae* is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II." Mol Cell Biol **23**(12): 4207-18.
- Ku, C. Y., A. Qian, et al. (1995). "Oxytocin stimulates myometrial guanosine triphosphatase and phospholipase-C activities via coupling to G alpha q/11." Endocrinology **136**(4): 1509-15.
- Kuehn, M. R., A. Bradley, et al. (1987). "A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice." Nature **326**(6110): 295-8.
- Kulish, D. and K. Struhl (2001). "TFIIS enhances transcriptional elongation through an artificial arrest site in vivo." Mol Cell Biol **21**(13): 4162-8.

- Kulpa, D., R. Topping, et al. (1997). "Determination of the site of first strand transfer during Moloney murine leukemia virus reverse transcription and identification of strand transfer-associated reverse transcriptase errors." Embo J **16**(4): 856-65.
- Kurokawa, K. and S. G. Massry (1973). "Interaction between catecholamines and vasopressin on renal medullary cyclic AMP of rat." Am J Physiol **225**(4): 825-9.
- Kutach, A. K. and J. T. Kadonaga (2000). "The downstream promoter element DPE appears to be as widely used as the TATA box in Drosophila core promoters." Mol Cell Biol **20**(13): 4754-64.
- Kuwahara, M., K. Iwai, et al. (2001). "Three families with autosomal dominant nephrogenic diabetes insipidus caused by aquaporin-2 mutations in the C-terminus." Am J Hum Genet **69**(4): 738-48.
- Kwek, K. Y., S. Murphy, et al. (2002). "U1 snRNA associates with TFIID and regulates transcriptional initiation." Nat Struct Biol **9**(11): 800-5.
- Kwon, H., A. N. Imbalzano, et al. (1994). "Nucleosome disruption and enhancement of activator binding by a human SW1/SNF complex." Nature **370**(6489): 477-81.
- Lachner, M., D. O'Carroll, et al. (2001). "Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins." Nature **410**(6824): 116-20.
- Lacombe, U. L. (1841). *De la polydipsie*. Paris, Imprimerie et Fonderie de Rignoux: 87.
- LaGrandeur, T. E. and R. Parker (1996). "mRNA decapping activities and their biological roles." Biochimie **78**(11-12): 1049-55.
- Lagrange, T., A. N. Kapanidis, et al. (1998). "New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB." Genes Dev **12**(1): 34-44.
- Landschulz, W. H., P. F. Johnson, et al. (1988). "The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins." Science **240**(4860): 1759-64.
- Langelier, M., V. Trinh, et al. (2002). "Gros plan sur l'ARN polymérase II." Medecine/Sciences **18**(2): 210-216.

- Langley, J. M., J. W. Balfe, et al. (1991). "Autosomal recessive inheritance of vasopressin-resistant diabetes insipidus." Am J Med Genet **38**(1): 90-4.
- Laugwitz, K. L., A. Allgeier, et al. (1996). "The human thyrotropin receptor: a heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(1): 116-20.
- Le Douarin, B., A. L. Nielsen, et al. (1996). "A possible involvement of TIF1 alpha and TIF1 beta in the epigenetic control of transcription by nuclear receptors." EMBO J **15**(23): 6701-15.
- Lee, D. H., N. Gershenzon, et al. (2005). "Functional characterization of core promoter elements: the downstream core element is recognized by TAF1." Mol Cell Biol **25**(21): 9674-86.
- Lee, H. W., W. Y. Kim, et al. (2007). "Sequential expression of NKCC2, TonEBP, aldose reductase, and urea transporter-A in developing mouse kidney." Am J Physiol Renal Physiol **292**(1): F269-77.
- Lee, J. M. and A. L. Greenleaf (1997). "Modulation of RNA polymerase II elongation efficiency by C-terminal heptapeptide repeat domain kinase I." J Biol Chem **272**(17): 10990-3.
- Lee, Y., A. J. Song, et al. (2000). "Jumonji, a nuclear protein that is necessary for normal heart development." Circ Res **86**(9): 932-8.
- Lehming, N., D. Thanos, et al. (1994). "An HMG-like protein that can switch a transcriptional activator to a repressor." Nature **371**(6493): 175-9.
- Lescure, A., Y. Lutz, et al. (1994). "The N-terminal domain of the human TATA-binding protein plays a role in transcription from TATA-containing RNA polymerase II and III promoters." EMBO J **13**(5): 1166-75.
- Levings, P. P. and J. Bungert (2002). "The human beta-globin locus region. A center of attraction." Eur J Biochem **269**: 1589-1599.
- Lewis, B. A., T. K. Kim, et al. (2000). "A downstream element in the human beta-globin promoter: evidence of extended sequence-specific transcription factor IID contacts." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(13): 7172-7.

- Lewis, B. A. and D. Reinberg (2003). "The mediator coactivator complex: functional and physical roles in transcriptional regulation." J Cell Sci **116**(Pt 18): 3667-75.
- Lewis, B. A., R. J. Sims, 3rd, et al. (2005). "Functional characterization of core promoter elements: DPE-specific transcription requires the protein kinase CK2 and the PC4 coactivator." Mol Cell **18**(4): 471-81.
- Lewis, J. D., S. I. Gunderson, et al. (1995). "The influence of 5' and 3' end structures on pre-mRNA metabolism." J Cell Sci Suppl **19**: 13-9.
- Lewis, J. D., E. Izaurralde, et al. (1996). "A nuclear cap-binding complex facilitates association of U1 snRNP with the cap-proximal 5' splice site." Genes Dev **10**(13): 1683-98.
- Li, B., M. Carey, et al. (2007). "The role of chromatin during transcription." Cell **128**(4): 707-19.
- Li, J. J. and I. Herskowitz (1993). "Isolation of ORC6, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system." Science **262**(5141): 1870-4.
- Li, Q., Z. Li, et al. (2002). "Identification of transcripts expressed under functional differentiation in primary culture of cerebral cortical neurons." Neurochem Res **27**(1-2): 147-54.
- Libri, D., K. Dower, et al. (2002). "Interactions between mRNA export commitment, 3'-end quality control, and nuclear degradation." Mol Cell Biol **22**(23): 8254-66.
- Lievens, P. M., C. Tufarelli, et al. (1997). "CASP, a novel, highly conserved alternative-splicing product of the CDP/cut/cux gene, lacks cut-repeat and homeo DNA-binding domains, and interacts with full-length CDP in vitro." Gene **197**(1-2): 73-81.
- Lim, C. Y., B. Santoso, et al. (2004). "The MTE, a new core promoter element for transcription by RNA polymerase II." Genes Dev **18**(13): 1606-17.
- Lin, Y., T. Nomura, et al. (1997). "Hepatitis B virus X protein is a transcriptional modulator that communicates with transcription factor IIB and the RNA polymerase II subunit 5." J Biol Chem **272**(11): 7132-9.
- Lindell, T. J., F. Weinberg, et al. (1970). "Specific inhibition of nuclear RNA polymerase II by alpha-amanitin." Science **170**(956): 447-9.

- Lindstrom, D. L. and G. A. Hartzog (2001). "Genetic interactions of Spt4-Spt5 and TFIIS with the RNA polymerase II CTD and CTD modifying enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*." Genetics **159**(2): 487-97.
- Lindstrom, D. L., S. L. Squazzo, et al. (2003). "Dual roles for Spt5 in pre-mRNA processing and transcription elongation revealed by identification of Spt5-associated proteins." Mol Cell Biol **23**(4): 1368-78.
- Littlefield, O., Y. Korkhin, et al. (1999). "The structural basis for the oriented assembly of a TBP/TFB/promoter complex." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(24): 13668-73.
- Liu, J., A. Barnett, et al. (1999). "Homeoproteins CDP and SATB1 interact: potential for tissue-specific regulation." Mol Cell Biol **19**(7): 4918-26.
- Liu, J., D. Bramblett, et al. (1997). "The matrix attachment region-binding protein SATB1 participates in negative regulation of tissue-specific gene expression." Mol Cell Biol **17**(9): 5275-87.
- Liu, J., T. E. Wilson, et al. (1993). "Identifying DNA-binding sites and analysing DNA-binding domains using a yeast selection system." METHODS: A Companion to Methods in Enzymology **5**(2): 187.
- Liu, R., H. Liu, et al. (2001). "Regulation of CSF1 promoter by the SWI/SNF-like BAF complex." Cell **106**(3): 309-18.
- Liu, S., E. McLeod, et al. (1991). "Four distinct regulatory regions of the cut locus and their effect on cell type specification in *Drosophila*." Genetics **127**(1): 151-9.
- Liu, X., D. Davis, et al. (1993). "Disruption of potential sites for N-linked glycosylation does not impair hormone binding to the lutropin/choriogonadotropin receptor if Asn-173 is left intact." J Biol Chem **268**(3): 1513-6.
- Lodish, H., D. Baltimore, et al. (1995). Molecular Cell Biology. New York, W.H. Freeman and Company.
- Logan, J., E. Falck-Pedersen, et al. (1987). "A poly(A) addition site and a downstream termination region are required for efficient cessation of transcription by RNA polymerase II in the mouse beta maj-globin gene." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(23): 8306-10.

- Loh, E. Y., J. F. Elliott, et al. (1989). "Polymerase chain reaction with single-sided specificity: analysis of T cell receptor delta chain." Science **243**(4888): 217-20.
- Lohman, T. M. and K. P. Bjornson (1996). "Mechanisms of helicase-catalyzed DNA unwinding." Annu Rev Biochem **65**: 169-214.
- Lohse, M. J., J. L. Benovic, et al. (1990). "beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function." Science **248**(4962): 1547-50.
- Lolait, S. J., A.-M. O'Carroll, et al. (1992). "Cloning and characterization of a vasopressin V2 receptor and possible link to nephrogenic diabetes insipidus." Nature **357**: 336-339.
- Lopez Bernal, A., S. P. Watson, et al. (1993). "Biochemistry and physiology of preterm labour and delivery." Baillieres Clin Obstet Gynaecol **7**(3): 523-52.
- Lu, H., O. Flores, et al. (1991). "The nonphosphorylated form of RNA polymerase II preferentially associates with the preinitiation complex." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(22): 10004-8.
- Lu, H., T. X. Sun, et al. (2004). "Inhibition of endocytosis causes phosphorylation (S256)-independent plasma membrane accumulation of AQP2." Am J Physiol Renal Physiol **286**(2): F233-43.
- Lu, H., L. Zawel, et al. (1992). "Human general transcription factor IIIH phosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II." Nature **358**(6388): 641-5.
- Luger, K. and T. J. Richmond (1998). "DNA binding within the nucleosome core." Curr Opin Struct Biol **8**(1): 33-40.
- Luo, Y., H. Ge, et al. (1998). "Coactivation by OCA-B: definition of critical regions and synergism with general cofactors." Mol Cell Biol **18**(7): 3803-10.
- Luse, D. S. and G. A. Jacob (1987). "Abortive initiation by RNA polymerase II in vitro at the adenovirus 2 major late promoter." J Biol Chem **262**(31): 14990-7.
- Ma, T., Y. Song, et al. (2000). "Nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking aquaporin-3 water channels." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(8): 4386-91.

- Ma, T., B. Yang, et al. (1997). "Generation and phenotype of a transgenic knockout mouse lacking the mercurial-insensitive water channel aquaporin-4." J Clin Invest **100**(5): 957-62.
- Ma, T., B. Yang, et al. (1998). "Severely impaired urinary concentrating ability in transgenic mice lacking aquaporin-1 water channels." J Biol Chem **273**(8): 4296-9.
- Ma, T., B. Yang, et al. (1997). "Cloning of a novel water and urea-permeable aquaporin from mouse expressed strongly in colon, placenta, liver, and heart." Biochem Biophys Res Commun **240**(2): 324-8.
- Mackenzie, L. W., R. A. Word, et al. (1990). "Myosin light chain phosphorylation in human myometrial smooth muscle cells." Am J Physiol **258**(1 Pt 1): C92-8.
- Maily, F., G. Berube, et al. (1996). "The human cut homeodomain protein can repress gene expression by two distinct mechanisms: active repression and competition for binding site occupancy." Mol Cell Biol **16**(10): 5346-57.
- Mandal, S. S., H. Cho, et al. (2002). "FCP1, a phosphatase specific for the heptapeptide repeat of the largest subunit of RNA polymerase II, stimulates transcription elongation." Mol Cell Biol **22**(21): 7543-52.
- Mandal, S. S., C. Chu, et al. (2004). "Functional interactions of RNA-capping enzyme with factors that positively and negatively regulate promoter escape by RNA polymerase II." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(20): 7572-7.
- Mandon, B., A. C. Bellanger, et al. (1995). "Inverse PCR-mediated cloning of the promoter for the rat vasopressin V2 receptor gene." Pflugers Arch **430**(1): 12-8.
- Maniatis, T., S. Goodbourn, et al. (1987). "Regulation of inducible and tissue-specific gene expression." Science **236**(4806): 1237-45.
- Marinissen, M. J. and J. S. Gutkind (2001). "G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms." Trends Pharmacol Sci **22**(7): 368-76.
- Marples, D., J. Frokiaer, et al. (1999). "Long-term regulation of aquaporins in the kidney." Am J Physiol **276**(3 Pt 2): F331-9.
- Marples, D., M. A. Knepper, et al. (1995). "Redistribution of aquaporin-2 water channels induced by vasopressin in rat kidney inner medullary collecting duct." Am J Physiol **269**: C655-C664.



- Marr, N., D. G. Bichet, et al. (2002). "Cell-biologic and functional analyses of five new Aquaporin-2 missense mutations that cause recessive nephrogenic diabetes insipidus." J Am Soc Nephrol **13**: 2267-2277.
- Marr, N., D. G. Bichet, et al. (2002). "Heteroligomerization of an Aquaporin-2 mutant with wild-type Aquaporin-2 and their misrouting to late endosomes/lysosomes explains dominant nephrogenic diabetes insipidus." Hum Mol Genet **11**(7): 779-789.
- Marshall, N. F., J. Peng, et al. (1996). "Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase." J Biol Chem **271**(43): 27176-83.
- Marshall, N. F. and D. H. Price (1992). "Control of formation of two distinct classes of RNA polymerase II elongation complexes." Mol Cell Biol **12**(5): 2078-90.
- Martianov, I., S. Viville, et al. (2002). "RNA polymerase II transcription in murine cells lacking the TATA binding protein." Science **298**(5595): 1036-9.
- Mathieu, H. and C. Loirat (1980). "Néphropathies tubulaires chroniques." Encycl Med Chir (Paris-France) Néphrologie-Urologie **18-052-P-50**: 1-20.
- McCracken, S., N. Fong, et al. (1997). "The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription." Nature **385**(6614): 357-61.
- Meininghaus, M., R. D. Chapman, et al. (2000). "Conditional expression of RNA polymerase II in mammalian cells. Deletion of the carboxyl-terminal domain of the large subunit affects early steps in transcription." J Biol Chem **275**(32): 24375-82.
- Meng, E. C. and H. R. Bourne (2001). "Receptor activation: what does the rhodopsin structure tell us?" Trends Pharmacol Sci **22**(11): 587-93.
- Merendino, J. J. J., A. M. Spiegel, et al. (1993). "Brief report: a mutation in the vasopressin V2-receptor gene in a kindred with X-linked nephrogenic diabetes insipidus." N Engl J Med **328**(21): 1538-1541.
- Messenguy, F. and E. Dubois (2003). "Role of MADS box proteins and their cofactors in combinatorial control of gene expression and cell development." Gene **316**: 1-21.
- Miller, T., K. Williams, et al. (2000). "Identification, cloning, expression, and biochemical characterization of the testis-specific RNA polymerase II elongation factor ELL3." J Biol Chem **275**(41): 32052-6.

- Milligan, G., D. Ramsay, et al. (2003). "GPCR dimerisation." Life Sci **74**(2-3): 181-8.
- Minakhin, L., S. Bhagat, et al. (2001). "Bacterial RNA polymerase subunit omega and eukaryotic RNA polymerase subunit RPB6 are sequence, structural, and functional homologs and promote RNA polymerase assembly." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(3): 892-7.
- Minc, E., J. C. Courvalin, et al. (2000). "HP1gamma associates with euchromatin and heterochromatin in mammalian nuclei and chromosomes." Cytogenet Cell Genet **90**(3-4): 279-84.
- Minton, J. A., L. A. Rainbow, et al. (2003). "Wolfram syndrome." Rev Endocr Metab Disord **4**(1): 53-9.
- Miyao, T. and N. A. Woychik (1998). "RNA polymerase subunit RPB5 plays a role in transcriptional activation." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15281-6.
- Molnar, M. and F. Hertelendy (1990). "Regulation of intracellular free calcium in human myometrial cells by prostaglandin F2 alpha: comparison with oxytocin." J Clin Endocrinol Metab **71**(5): 1243-50.
- Moon, N. S., P. Premdas, et al. (2001). "S phase-specific proteolytic cleavage is required to activate stable DNA binding by the CDP/Cut homeodomain protein." Mol Cell Biol **21**(18): 6332-45.
- Morel, A., A.-M. O'Carroll, et al. (1992). "Molecular cloning and expression of a rat V1a arginine vasopressin receptor." Nature **356**: 523-526.
- Morello, J.-P. and D. G. Bichet (2001). "Nephrogenic diabetes insipidus." Annu Rev Physiol **63**: 607-630.
- Morello, J.-P., M. Lonergan, et al. (2000). "Functional rescue of misfolded naturally occurring mutant V2 receptors by the non-peptide V1a vasopressin receptor antagonist SR49059." J Am Soc Nephrol **11**: 411A.
- Morello, J. P., A. Salahpour, et al. (2000). "Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants." J Clin Invest **105**: 887-895.

- Morillon, A., N. Karabetsou, et al. (2003). "Isw1 chromatin remodeling ATPase coordinates transcription elongation and termination by RNA polymerase II." Cell **115**(4): 425-35.
- Mouillac, B., B. Chini, et al. (1995). "The binding site of neuropeptide vasopressin V1a receptor. Evidence for a major localization within transmembrane regions." J Biol Chem **270**(43): 25771-7.
- Muhrad, D., C. J. Decker, et al. (1994). "Deadenylation of the unstable mRNA encoded by the yeast MFA2 gene leads to decapping followed by 5'-->3' digestion of the transcript." Genes Dev **8**(7): 855-66.
- Mulders, S. B., N. V. A. M. Knoers, et al. (1997). "New mutations in the AQP2 gene in nephrogenic diabetes insipidus resulting in functional but misrouted water channels." J Am Soc Nephrol **8**: 242-248.
- Mulders, S. M., G. M. Preston, et al. (1995). "Water channel properties of major intrinsic protein of lens." J Biol Chem **270**(15): 9010-16.
- Mullis, K., F. Faloona, et al. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1**: 263-73.
- Murata, K., K. Mitsuoka, et al. (2000). "Structural determinants of water permeation through aquaporin-1." Nature **407**(6804): 599-605.
- Murre, C., P. S. McCaw, et al. (1989). "A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins." Cell **56**(5): 777-83.
- Nakajima, N., M. Horikoshi, et al. (1988). "Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II: purification, genetic specificity, and TATA box-promoter interactions of TFIID." Mol Cell Biol **8**(10): 4028-40.
- Nakayama, J., J. C. Rice, et al. (2001). "Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly." Science **292**(5514): 110-3.
- Narlikar, G. J., H. Y. Fan, et al. (2002). "Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription." Cell **108**(4): 475-87.

- Nepveu, A. (2001). "Role of the multifunctional CDP/Cut/Cux homeodomain transcription factor in regulating differentiation, cell growth and development." Gene **270**(1-2): 1-15.
- Neufeld, E. J., D. G. Skalnik, et al. (1992). "Human CCAAT displacement protein is homologous to the Drosophila homeoprotein, cut." Nat Genet **1**(1): 50-5.
- Neves, S. R., P. T. Ram, et al. (2002). "G protein pathways." Science **296**(5573): 1636-9.
- New, D. C. and J. T. Wong (1998). "The evidence for G-protein-coupled receptors and heterotrimeric G proteins in protozoa and ancestral metazoa." Biol Signals Recept **7**(2): 98-108.
- Ng, H. H., F. Robert, et al. (2003). "Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity." Mol Cell **11**(3): 709-19.
- Nielsen, S., C.-L. Chou, et al. (1995). "Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane." Proc Natl Acad Sci USA **92**: 1013-1017.
- Nielsen, S., S. R. DiGiovanni, et al. (1993). "Cellular and subcellular immunolocalization of vasopressin-regulated water channel in rat kidney." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(24): 11663-7.
- Nielsen, S., J. Frokiaer, et al. (2002). "Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine." Physiol Rev **82**(1): 205-44.
- Nielsen, S., L. S. King, et al. (1997). "Aquaporins in complex tissues. II. Subcellular distribution in respiratory and glandular tissues of rat." Am J Physiol **273**(5 Pt 1): C1549-61.
- Nielsen, S., T. H. Kwon, et al. (2007). "Regulation and dysregulation of aquaporins in water balance disorders." J Intern Med **261**(1): 53-64.
- Nielsen, S., D. Marples, et al. (1995). "Expression of VAMP-2-like protein in kidney collecting duct intracellular vesicles. Colocalization with Aquaporin-2 water channels." J Clin Invest **96**(4): 1834-44.

- Nielsen, S., B. L. Smith, et al. (1993). "CHIP28 water channels are localized in constitutively water-permeable segments of the nephron." J Cell Biol **120**(2): 371-383.
- Nielsen, S. J., R. Schneider, et al. (2001). "Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters." Nature **412**(6846): 561-5.
- Nikolov, D. B. and S. K. Burley (1997). "RNA polymerase II transcription initiation: a structural view." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(1): 15-22.
- Nikolov, D. B., H. Chen, et al. (1995). "Crystal structure of a TFIIB-TBP-TATA-element ternary complex." Nature **377**(6545): 119-28.
- Nirodi, C., J. Hart, et al. (2001). "The role of CDP in the negative regulation of CXCL1 gene expression." J Biol Chem **276**(28): 26122-31.
- Nishimoto, G., M. Zelenina, et al. (1999). "Arginine vasopressin stimulates phosphorylation of aquaporin-2 in rat renal tissue." Am J Physiol **276**(2 Pt 2): F254-9.
- Noma, K., C. D. Allis, et al. (2001). "Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries." Science **293**(5532): 1150-5.
- Nurrish, S. J. and R. Treisman (1995). "DNA binding specificity determinants in MADS-box transcription factors." Mol Cell Biol **15**(8): 4076-85.
- O'Brien, T., S. Hardin, et al. (1994). "Phosphorylation of RNA polymerase II C-terminal domain and transcriptional elongation." Nature **370**(6484): 75-7.
- O'Dowd, B. F., M. Hnatowich, et al. (1989). "Palmitoylation of the human beta 2-adrenergic receptor. Mutation of Cys341 in the carboxyl tail leads to an uncoupled nonpalmitoylated form of the receptor." J Biol Chem **264**(13): 7564-9.
- Oh, D. B., Y. G. Kim, et al. (2002). "Z-DNA-binding proteins can act as potent effectors of gene expression in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(26): 16666-71.
- Ohler, U., G. C. Liao, et al. (2002). "Computational analysis of core promoters in the Drosophila genome." Genome Biol **3**(12): RESEARCH0087.

- Ohzeki, T., T. Igarashi, et al. (1984). "Familial cases of congenital nephrogenic diabetes insipidus type II: Remarkable increment of urinary adenosine 3',5'-monophosphate in response to antidiuretic hormone." J Pediatr **104**(4): 593-5.
- Okada, T., O. P. Ernst, et al. (2001). "Activation of rhodopsin: new insights from structural and biochemical studies." Trends Biochem Sci **26**(5): 318-24.
- Okazaki, Y., M. Furuno, et al. (2002). "Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs." Nature **420**(6915): 563-73.
- Oksche, A., A. Moller, et al. (1996). "Two novel mutations in the aquaporin-2 and the vasopressin V2 receptor genes in patients with congenital nephrogenic diabetes insipidus." Hum Genet **98**(5): 587-589.
- Onodera, Y., J. R. Haag, et al. (2005). "Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation." Cell **120**(5): 613-22.
- Orphanides, G., T. Lagrange, et al. (1996). "The general transcription factors of RNA polymerase II." Genes Dev **10**(21): 2657-83.
- Orphanides, G., G. LeRoy, et al. (1998). "FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes." Cell **92**(1): 105-16.
- Orphanides, G. and D. Reinberg (2002). "A unified theory of gene expression." Cell **108**(4): 439-51.
- Orphanides, G., W. H. Wu, et al. (1999). "The chromatin-specific transcription elongation factor FACT comprises human SPT16 and SSRP1 proteins." Nature **400**(6741): 284-8.
- Osman, A. A., M. Saito, et al. (2003). "Wolframin expression induces novel ion channel activity in endoplasmic reticulum membranes and increases intracellular calcium." J Biol Chem **278**(52): 52755-62.
- Ostrowski, N. L., S. J. Lolait, et al. (1992). "Distribution of V1a and V2 vasopressin receptor messenger ribonucleic acids in rat liver, kidney, pituitary and brain." Endocrinology **131**(1): 533-5.
- Ostrowski, N. L., W. S. Young II, et al. (1993). "Expression of vasopressin V1a and V2 receptor messenger ribonucleic acid in the liver and kidney of embryonic, developing, and adult rats." Endocrinol **133**: 1849-1859.

- Ota, T., Y. Suzuki, et al. (2004). "Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs." Nat Genet **36**(1): 40-5.
- Otero, G., J. Fellows, et al. (1999). "Elongator, a multisubunit component of a novel RNA polymerase II holoenzyme for transcriptional elongation." Mol Cell **3**(1): 109-18.
- Pabo, C. O. and R. T. Sauer (1992). "Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition." Annu Rev Biochem **61**: 1053-95.
- Pal, M. and D. S. Luse (2002). "Strong natural pausing by RNA polymerase II within 10 bases of transcription start may result in repeated slippage and reextension of the nascent RNA." Mol Cell Biol **22**(1): 30-40.
- Palangat, M. and R. Landick (2001). "Roles of RNA:DNA hybrid stability, RNA structure, and active site conformation in pausing by human RNA polymerase II." J Mol Biol **311**(2): 265-82.
- Palczewski, K., T. Kumasaka, et al. (2000). "Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor." Science **289**(5480): 739-45.
- Palmiter, R. D. and R. L. Brinster (1986). "Germ-line transformation of mice." Annu Rev Genet **20**: 465-99.
- Pan, Y., A. Metzenberg, et al. (1992). "Mutations in the V2 vasopressin receptor gene are associated with X-linked nephrogenic diabetes insipidus." Nat Genet **2**(2): 103-106.
- Pan, Y., P. Wilson, et al. (1994). "The effect of eight V2 vasopressin receptor mutations on stimulation of adenylyl cyclase and binding to vasopressin." J Biol Chem **269**(50): 31933-31937.
- Papac, D. I., K. R. Thornburg, et al. (1992). "Palmitoylation of a G-protein coupled receptor. Direct analysis by tandem mass spectrometry." J Biol Chem **267**(24): 16889-94.
- Park, F., D. L. Mattson, et al. (1997). "Localization of the vasopressin V1a and V2 receptors within the renal cortical and medullary circulation." Am J Physiol **273**(1 Pt 2): R243-51.
- Park, P. S., S. Filipek, et al. (2004). "Oligomerization of G protein-coupled receptors: past, present, and future." Biochemistry **43**(50): 15643-56.

- Parvin, J. D. and R. A. Young (1998). "Regulatory targets in the RNA polymerase II holoenzyme." Curr Opin Genet Dev **8**(5): 565-70.
- Payne, J. M., P. J. Laybourn, et al. (1989). "The transition of RNA polymerase II from initiation to elongation is associated with phosphorylation of the carboxyl-terminal domain of subunit IIa." J Biol Chem **264**(33): 19621-9.
- Pei, Y. and S. Shuman (2002). "Interactions between fission yeast mRNA capping enzymes and elongation factor Spt5." J Biol Chem **277**(22): 19639-48.
- Pemberton, L. F., G. Blobel, et al. (1998). "Transport routes through the nuclear pore complex." Curr Opin Cell Biol **10**(3): 392-9.
- Pemberton, L. F. and B. M. Paschal (2005). "Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export." Traffic **6**(3): 187-98.
- Pennisi, E. (2007). "Working the (gene count) numbers: finally, a firm answer?" Science **316**: 1113.
- Phaneuf, S., M. P. Carrasco, et al. (1996). "Multiple G proteins and phospholipase C isoforms in human myometrial cells: implication for oxytocin action." J Clin Endocrinol Metab **81**(6): 2098-103.
- Phaneuf, S., G. N. Europe-Finner, et al. (1993). "Oxytocin-stimulated phosphoinositide hydrolysis in human myometrial cells: involvement of pertussis toxin-sensitive and -insensitive G-proteins." J Endocrinol **136**(3): 497-509.
- Phillippe, M. (1994). "Protein kinase C, an inhibitor of oxytocin-stimulated phasic myometrial contractions." Biol Reprod **50**(4): 855-9.
- Pinna, L. A. (2002). "Protein kinase CK2: a challenge to canons." J Cell Sci **115**(Pt 20): 3873-8.
- Piva, R., J. Liu, et al. (2002). "In vivo interference with Skp1 function leads to genetic instability and neoplastic transformation." Mol Cell Biol **22**(23): 8375-87.
- Plakidou-Dymock, S., D. Dymock, et al. (1998). "A higher plant seven-transmembrane receptor that influences sensitivity to cytokinins." Curr Biol **8**(6): 315-24.



- Pop, R., C. Conz, et al. (2004). "Screening of the 1 Mb SOX9 5' control region by array CGH identifies a large deletion in a case of campomelic dysplasia with XY sex reversal." J Med Genet **41**(4): e47.
- Powers, J. A. and J. C. Eissenberg (1993). "Overlapping domains of the heterochromatin-associated protein HP1 mediate nuclear localization and heterochromatin binding." J Cell Biol **120**(2): 291-9.
- Preston, G. M. and P. Agre (1991). "Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(24): 11110-4.
- Preston, G. M., T. P. Carroll, et al. (1992). "Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein." Science **256**(5055): 385-7.
- Price, D. H. (2000). "P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II." Mol Cell Biol **20**(8): 2629-34.
- Prié, D., J. C. Dussaule, et al. (1994). "Principal cell-specific antigen and hormonal regulatory network in RC.SVtsA58 cell line." Am J Physiol **266**: C1628-1638.
- Prié, D., P. M. Ronco, et al. (1991). "Activation of the simian virus 40 (SV40) genome abrogates sensitivity to AVP in a rabbit collecting tubule cell line by repressing membrane expression of AVP receptors." J Cell Biol **113**: 951-962.
- Procino, G., M. Carmosino, et al. (2003). "Ser-256 phosphorylation dynamics of Aquaporin 2 during maturation from the ER to the vesicular compartment in renal cells." Faseb J **17**(13): 1886-8.
- Proudfoot, N. (2000). "Connecting transcription to messenger RNA processing." Trends Biochem Sci **25**(6): 290-3.
- Proudfoot, N. (2004). "New perspectives on connecting messenger RNA 3' end formation to transcription." Curr Opin Cell Biol **16**(3): 272-8.
- Proudfoot, N. J., A. Furger, et al. (2002). "Integrating mRNA processing with transcription." Cell **108**(4): 501-12.
- Pugh, B. F. and R. Tjian (1991). "Transcription from a TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex." Genes Dev **5**(11): 1935-45.

- Quaggin, S. E., G. B. Heuvel, et al. (1996). "Primary structure, neural-specific expression, and chromosomal localization of Cux-2, a second murine homeobox gene related to *Drosophila cut*." J Biol Chem **271**(37): 22624-34.
- Qureshi, S. A. and S. P. Jackson (1998). "Sequence-specific DNA binding by the *S. shibatae* TFIIB homolog, TFB, and its effect on promoter strength." Mol Cell **1**(3): 389-400.
- Raina, S., G. M. Preston, et al. (1995). "Molecular cloning and characterization of an aquaporin cDNA from salivary, lacrimal, and respiratory tissues." J Biol Chem **270**(4): 1908-12.
- Ramakrishnan, V., J. T. Finch, et al. (1993). "Crystal structure of globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome binding." Nature **362**(6417): 219-23.
- Rands, E., M. R. Candelore, et al. (1990). "Mutational analysis of beta-adrenergic receptor glycosylation." J Biol Chem **265**(18): 10759-64.
- Rao, V. V., C. Loffler, et al. (1992). "The human gene for oxytocin-neurophysin I (OXT) is physically mapped to chromosome 20p13 by in situ hybridization." Cell Genet **61**: 271-273.
- Rasmussen, S. G., H. J. Choi, et al. (2007). "Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor." Nature **450**(7168): 383-7.
- Reed, R. and E. Hurt (2002). "A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing." Cell **108**(4): 523-31.
- Reinberg, D., G. Orphanides, et al. (1998). "The RNA polymerase II general transcription factors: past, present, and future." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **63**: 83-103.
- Reinberg, D. and R. G. Roeder (1987). "Factors involved in specific transcription by mammalian RNA polymerase II. Transcription factor IIS stimulates elongation of RNA chains." J Biol Chem **262**(7): 3331-7.
- Reines, D. (1992). "Elongation factor-dependent transcript shortening by template-engaged RNA polymerase II." J Biol Chem **267**(6): 3795-800.

- Reines, D., M. J. Chamberlin, et al. (1989). "Transcription elongation factor SII (TFIIS) enables RNA polymerase II to elongate through a block to transcription in a human gene in vitro." J Biol Chem **264**(18): 10799-809.
- Richards, E. J. and S. C. Elgin (2002). "Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects." Cell **108**(4): 489-500.
- Richter, D. (1988). "Molecular events in the expression of vasopressin and oxytocin and their cognate receptors." Am J Physiol **255**: F207-F219.
- Riedl, T. and J. M. Egly (2000). "Phosphorylation in transcription: the CTD and more." Gene Expr **9**(1-2): 3-13.
- Rittig, R., G. L. Robertson, et al. (1996). "Identification of 13 new mutations in the vasopressin-neurophysin II gene in 17 kindreds with familial autosomal dominant neurohypophyseal diabetes insipidus." Am J Hum Genet **58**: 107-117.
- Robertson, G. L. and T. Berl (1996). Pathophysiology of water metabolism. The Kidney. B. M. Brenner and F. C. Rector. Philadelphia, W. B Saunders Company: 873-928.
- Rodbell, M., L. Birnbaumer, et al. (1971). "The glucagon-sensitive adenyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. V. An obligatory role of guanylnucleotides in glucagon action." J Biol Chem **246**(6): 1877-82.
- Roeder, R. G. (1996). "The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II." Trends Biochem Sci **21**(9): 327-35.
- Roeder, R. G. and W. J. Rutter (1969). "Multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase in eukaryotic organisms." Nature **224**(5216): 234-7.
- Roeder, R. G. and W. J. Rutter (1970). "Specific nucleolar and nucleoplasmic RNA polymerases." Proc Natl Acad Sci U S A **65**(3): 675-82.
- Roeder, R. G., L. B. Schwartz, et al. (1976). "Function, structure, and regulation of eukaryotic nuclear RNA polymerases." Symp Soc Dev Biol(34): 29-52.
- Rogers, S. L. and V. I. Gelfand (2000). "Membrane trafficking, organelle transport, and the cytoskeleton." Curr Opin Cell Biol **12**(1): 57-62.
- Rojek, A., J. Praetorius, et al. (2008). "A current view of the mammalian aquaglyceroporins." Annu Rev Physiol **70**: 301-27.

- Rondon, A. G., S. Jimeno, et al. (2003). "Molecular evidence that the eukaryotic THO/TREX complex is required for efficient transcription elongation." J Biol Chem **278**(40): 39037-43.
- Rosenbaum, D. M., V. Cherezov, et al. (2007). "GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function." Science **318**(5854): 1266-73.
- Rosenthal, W., A. Antaramian, et al. (1993). "Nephrogenic diabetes insipidus. A V2 vasopressin receptor unable to stimulate adenylyl cyclase." J Biol Chem **268**(18): 13030-3.
- Rosenthal, W., A. Seibold, et al. (1992). "Molecular identification of the gene responsible for congenital nephrogenic diabetes insipidus." Nature **359**(6392): 233-235.
- Rosonina, E., S. Kaneko, et al. (2006). "Terminating the transcript: breaking up is hard to do." Genes Dev **20**(9): 1050-6.
- Rossert, J., H. Eberspaecher, et al. (1995). "Separate cis-acting DNA elements of the mouse pro-alpha 1(I) collagen promoter direct expression of reporter genes to different type I collagen-producing cells in transgenic mice." J Cell Biol **129**(5): 1421-32.
- Roux, B., J.-Y. Lapointe, et al. (2001). "Structure de l'aquaporine 1 ou comment bloquer un bâton de relais (le proton) qui se déplace plus vite que le coureur (l'eau) ?" Médecine/sciences **17**: 115-116.
- Rowe, J. W., A. Kilgore, et al. (1980). "Evidence in man that cigarette smoking induces vasopressin release via an airway-specific mechanism." J Clin Endocrinol Metab **51**(1): 170-2.
- Rubbi, L., S. Labarre-Mariotte, et al. (1999). "Functional characterization of ABC10alpha, an essential polypeptide shared by all three forms of eukaryotic DNA-dependent RNA polymerases." J Biol Chem **274**(44): 31485-92.
- Russell, T. A., M. Ito, et al. (2003). "A murine model of autosomal dominant neurohypophyseal diabetes insipidus reveals progressive loss of vasopressin-producing neurons." J Clin Invest **112**(11): 1697-706.
- Sabolic, I., T. Katsura, et al. (1995). "The AQP2 water channel: effect of vasopressin treatment, microtubule disruption, and distribution in neonatal rats." J Membr Biol **143**: 165-177.

- Sachs, A. B. and J. A. Deardorff (1992). "Translation initiation requires the PAB-dependent poly(A) ribonuclease in yeast." Cell **70**(6): 961-73.
- Sachs, H., P. Fawcett, et al. (1969). "Biosynthesis and release of vasopressin and neurophysin." Recent Prog Horm Res **25**: 447-91.
- Sadeghi, H. M., G. Innamorati, et al. (1998). "Processing and ligand-induced modifications of the V2 vasopressin receptor." Adv Exp Med Biol **449**: 339-46.
- Saguez, C., J. R. Olesen, et al. (2005). "Formation of export-competent mRNP: escaping nuclear destruction." Curr Opin Cell Biol **17**(3): 287-93.
- Saito, M., T. Sugimoto, et al. (1995). "Molecular cloning and characterization of rat V1b vasopressin receptor: evidence for its expression in extra-pituitary tissues." Biochem Biophys Res Commun **212**(3): 751-7.
- Salahpour, A., S. Angers, et al. (2000). "Functional significance of oligomerization of G-protein-coupled receptors." Trends Endocrinol Metab **11**(5): 163-8.
- Schiestl, R. H., P. Manivasakam, et al. (1993). "Introducing DNA into yeast by transformation." METHODS: A Companion to Methods in Enzymology **5**(2): 187.
- Schlessinger, D., J. L. Mandel, et al. (1993). "Report and abstracts of the Fourth International Workshop on Human X Chromosome Mapping 1993. St. Louis, Missouri, May 9-12, 1993." Cytogenet Cell Genet **64**(3-4): 147-94.
- Schmid, C. D., V. Praz, et al. (2004). "The Eukaryotic Promoter Database EPD: the impact of in silico primer extension." Nucleic Acids Res **32**(Database issue): D82-5.
- Schneider, T., P. Igelmund, et al. (1997). "G protein interaction with K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channels." Trends Pharmacol Sci **18**(1): 8-11.
- Schnitzler, G. R., S. Sif, et al. (1998). "A model for chromatin remodeling by the SWI/SNF family." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **63**: 535-43.
- Schöneberg, T., J. Yun, et al. (1996). "Functional rescue of mutant V2 vasopressin receptors causing nephrogenic diabetes insipidus by a coexpressed receptor polypeptide." EMBO J **15**: 1283-1291.
- Schotland, M. G., M. M. Grumbach, et al. (1963). "The effects of chlorothiazides in nephrogenic diabetes insipidus." Pediatrics **31**: 741-53.

- Schrey, M. P., A. M. Read, et al. (1986). "Oxytocin and vasopressin stimulate inositol phosphate production in human gestational myometrium and decidua cells." Biosci Rep **6**(7): 613-9.
- Schrier, R. W., T. Berl, et al. (1979). "Osmotic and nonosmotic control of vasopressin release." Am J Physiol **236**(4): F321-32.
- Schroth, G. P., P. J. Chou, et al. (1992). "Mapping Z-DNA in the human genome. Computer-aided mapping reveals a nonrandom distribution of potential Z-DNA-forming sequences in human genes." J Biol Chem **267**(17): 11846-55.
- Schultz, D. C., K. Ayyanathan, et al. (2002). "SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins." Genes Dev **16**(8): 919-32.
- Scott, M. P., J. W. Tamkun, et al. (1989). "The structure and function of the homeodomain." Biochim Biophys Acta **989**(1): 25-48.
- Seibold, A., P. Brabet, et al. (1992). "Structure and chromosomal localization of the human antidiuretic hormone receptor gene." Am J Hum Genet **51**: 1078-1083.
- Sekimizu, K., N. Kobayashi, et al. (1976). "Purification of a factor from Ehrlich ascites tumor cells specifically stimulating RNA polymerase II." Biochemistry **15**(23): 5064-70.
- Serfling, E., A. Lubbe, et al. (1985). "Metal-dependent SV40 viruses containing inducible enhancers from the upstream region of metallothionein genes." EMBO J **4**(13B): 3851-9.
- Serizawa, H., J. W. Conaway, et al. (1993). "Phosphorylation of C-terminal domain of RNA polymerase II is not required in basal transcription." Nature **363**(6427): 371-4.
- Sharif Naeni, R., M. F. Witty, et al. (2006). "An N-terminal variant of Trpv1 channel is required for osmosensory transduction." Nat Neurosci **9**(1): 93-8.
- Shatkin, A. J. and J. L. Manley (2000). "The ends of the affair: capping and polyadenylation." Nat Struct Biol **7**(10): 838-42.
- Shayakul, C., A. Steel, et al. (1996). "Molecular cloning and characterization of the vasopressin-regulated urea transporter of rat kidney collecting ducts." J Clin Invest **98**(11): 2580-2587.

- Shilatifard, A. (2004). "Transcriptional elongation control by RNA polymerase II: a new frontier." Biochim Biophys Acta **1677**(1-3): 79-86.
- Shilatifard, A., R. C. Conaway, et al. (2003). "The RNA polymerase II elongation complex." Annu Rev Biochem **72**: 693-715.
- Shilatifard, A., D. R. Duan, et al. (1997). "ELL2, a new member of an ELL family of RNA polymerase II elongation factors." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(8): 3639-43.
- Shilatifard, A., W. S. Lane, et al. (1996). "An RNA polymerase II elongation factor encoded by the human ELL gene." Science **271**(5257): 1873-6.
- Shore, P. and A. D. Sharrocks (1995). "The MADS-box family of transcription factors." Eur J Biochem **229**(1): 1-13.
- Shuman, S. (2001). "Structure, mechanism, and evolution of the mRNA capping apparatus." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **66**: 1-40.
- Sims, R. J., 3rd, R. Belotserkovskaya, et al. (2004). "Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it." Genes Dev **18**(20): 2437-68.
- Slansky, J. E. and P. J. Farnham (1996). "Introduction to the E2F family: protein structure and gene regulation." Curr Top Microbiol Immunol **208**: 1-30.
- Smale, S. T. (1997). "Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes." Biochim Biophys Acta **1351**(1-2): 73-88.
- Smale, S. T. and D. Baltimore (1989). "The "initiator" as a transcription control element." Cell **57**(1): 103-13.
- Smale, S. T. and J. T. Kadonaga (2003). "The RNA polymerase II core promoter." Annu Rev Biochem **72**: 449-79.
- Smithies, O., R. G. Gregg, et al. (1985). "Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination." Nature **317**(6034): 230-4.
- Squazzo, S. L., P. J. Costa, et al. (2002). "The Paf1 complex physically and functionally associates with transcription elongation factors in vivo." EMBO J **21**(7): 1764-74.

- Star, R. A., H. Nonoguchi, et al. (1988). "Calcium and cyclic adenosine monophosphate as second messengers for vasopressin in the rat inner medullary collecting duct." J Clin Invest **81**(6): 1879-88.
- Stegmaier, P., A. E. Kel, et al. (2004). "Systematic DNA-binding domain classification of transcription factors." Genome Inform **15**(2): 276-86.
- Stewart, M. (2007). "Ratcheting mRNA out of the nucleus." Mol Cell **25**(3): 327-30.
- Storm, R., E. Klussmann, et al. (2003). "Osmolality and solute composition are strong regulators of AQP2 expression in renal principal cells." Am J Physiol Renal Physiol **284**(1): F189-98.
- Strachan, T. and A. Read (2004). Amplifying DNA:PCR and cell-based DNA cloning. Human Molecular Genetics. T. Strachan and A. Read. New York, Garland Science, a membre of Taylor & Francis Group: 150-153.
- Strachan, T. and A. Read (2004). Human gene expression. Human Molecular genetics. T. Strachan and A. Read. New York, Garland Science, a membre of Taylor & Francis Group. **third edition**: 283-284.
- Strahl, B. D. and C. D. Allis (2000). "The language of covalent histone modifications." Nature **403**(6765): 41-5.
- Strakova, Z., J. A. Copland, et al. (1998). "ERK2 mediates oxytocin-stimulated PGE2 synthesis." Am J Physiol **274**(4 Pt 1): E634-41.
- Strakova, Z. and M. S. Soloff (1997). "Coupling of oxytocin receptor to G proteins in rat myometrium during labor: Gi receptor interaction." Am J Physiol **272**(5 Pt 1): E870-6.
- Strasser, K. and E. Hurt (2001). "Splicing factor Sub2p is required for nuclear mRNA export through its interaction with Yra1p." Nature **413**(6856): 648-52.
- Strasser, K., S. Masuda, et al. (2002). "TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export." Nature **417**(6886): 304-8.
- Strausberg, R. L., E. A. Feingold, et al. (2002). "Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(26): 16899-903.



- Strom, T. M., K. Hortnagel, et al. (1998). "Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (DIDMOAD) caused by mutations in a novel gene (wolframin) coding for a predicted transmembrane protein." Hum Mol Genet **7**(13): 2021-8.
- Stroud, J. C., C. Lopez-Rodriguez, et al. (2002). "Structure of a TonEBP-DNA complex reveals DNA encircled by a transcription factor." Nat Struct Biol **9**(2): 90-4.
- Stryer, L. (1986). "Cyclic GMP cascade of vision." Annu Rev Neurosci **9**: 87-119.
- Sullivan, E. K., C. S. Weirich, et al. (2001). "Transcriptional activation domains of human heat shock factor 1 recruit human SWI/SNF." Mol Cell Biol **21**(17): 5826-37.
- Sun, F. L., M. H. Cuaycong, et al. (2000). "The fourth chromosome of *Drosophila melanogaster*: interspersed euchromatic and heterochromatic domains." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(10): 5340-5.
- Suzuki, Y., T. Tsunoda, et al. (2001). "Identification and characterization of the potential promoter regions of 1031 kinds of human genes." Genome Res **11**(5): 677-84.
- Taira, Y., T. Kubo, et al. (1998). "Molecular cloning of cDNA and tissue-specific expression of the gene for SII-K1, a novel transcription elongation factor SII." Genes Cells **3**(5): 289-96.
- Takeda, K., H. Inoue, et al. (2001). "WFS1 (Wolfram syndrome 1) gene product: predominant subcellular localization to endoplasmic reticulum in cultured cells and neuronal expression in rat brain." Hum Mol Genet **10**(5): 477-84.
- Takeda, S., S. Kadowaki, et al. (2002). "Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence." FEBS Lett **520**(1-3): 97-101.
- Tamarappoo, B. K. and A. S. Verkman (1998). "Defective aquaporin-2 trafficking in nephrogenic diabetes insipidus and correction by chemical chaperones." J Clin Invest **101**(10): 2257-2267.
- Tan, S., T. Aso, et al. (1994). "Roles for both the RAP30 and RAP74 subunits of transcription factor IIF in transcription initiation and elongation by RNA polymerase II." J Biol Chem **269**(41): 25684-91.
- Tan, S. and T. J. Richmond (1998). "Eukaryotic transcription factors." Curr Opin Struct Biol **8**(1): 41-8.

- Tanese, N., B. F. Pugh, et al. (1991). "Coactivators for a proline-rich activator purified from the multisubunit human TFIID complex." Genes Dev **5**(12A): 2212-24.
- Tanoue, A., S. Ito, et al. (2004). "The vasopressin V1b receptor critically regulates hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity under both stress and resting conditions." J Clin Invest **113**(2): 302-9.
- Tashima, Y., Y. Kohda, et al. (2001). "Intranephron localization and regulation of the V1a vasopressin receptor during chronic metabolic acidosis and dehydration in rats." Pflugers Arch **442**(5): 652-61.
- Terrillon, S., C. Barberis, et al. (2004). "Heterodimerization of V1a and V2 vasopressin receptors determines the interaction with beta-arrestin and their trafficking patterns." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(6): 1548-53.
- Terrillon, S. and M. Bouvier (2004). "Roles of G-protein-coupled receptor dimerization." EMBO Rep **5**(1): 30-4.
- Terrillon, S., T. Durroux, et al. (2003). "Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis." Mol Endocrinol **17**(4): 677-91.
- Terris, J., C. A. Ecelbarger, et al. (1996). "Long-term regulation of four renal aquaporins in rats." Am J Physiol **271**(2 Pt 2): F414-22.
- Thibonnier, M., P. Coles, et al. (2001). "The basic and clinical pharmacology of nonpeptide vasopressin receptor antagonists." Annu Rev Pharmacol Toxicol **41**: 175-202.
- Thibonnier, M., T. Goraya, et al. (1993). "G protein coupling of human platelet V1 vascular vasopressin receptors." Am J Physiol **264**(5 Pt 1): C1336-44.
- Thibonnier, M., J. A. Preston, et al. (1997). "The human V3 pituitary vasopressin receptor: ligand binding profile and density-dependent signaling pathways." Endocrinology **138**(10): 4109-22.
- Thomas, K. R. and M. R. Capecchi (1987). "Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells." Cell **51**(3): 503-12.
- Thomas, M. C. and C. M. Chiang (2006). "The general transcription machinery and general cofactors." Crit Rev Biochem Mol Biol **41**(3): 105-78.

- Thrasher, T. N., C. J. Brown, et al. (1980). "Thirst and vasopressin release in the dog: an osmoreceptor or sodium receptor mechanism?" Am J Physiol **238**(5): R333-9.
- Tognoni, A., R. Cattaneo, et al. (1985). "A novel expression selection approach allows precise mapping of the hepatitis B virus enhancer." Nucleic Acids Res **13**(20): 7457-72.
- Tokusumi, Y., Y. Ma, et al. (2007). "The new core promoter element XCPE1 (X Core Promoter Element 1) directs activator-, mediator-, and TATA-binding protein-dependent but TFIID-independent RNA polymerase II transcription from TATA-less promoters." Mol Cell Biol **27**(5): 1844-58.
- Torres, V. E. and P. C. Harris (2006). "Mechanisms of Disease: autosomal dominant and recessive polycystic kidney diseases." Nat Clin Pract Nephrol **2**(1): 40-55; quiz 55.
- Torres, V. E., X. Wang, et al. (2004). "Effective treatment of an orthologous model of autosomal dominant polycystic kidney disease." Nat Med **10**(4): 363-4.
- Tran, E. J. and S. R. Wentz (2006). "Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge." Cell **125**(6): 1041-53.
- Tran, H. G., D. J. Steger, et al. (2000). "The chromo domain protein chd1p from budding yeast is an ATP-dependent chromatin-modifying factor." EMBO J **19**(10): 2323-31.
- Treisman, R. (1994). "Ternary complex factors: growth factor regulated transcriptional activators." Curr Opin Genet Dev **4**(1): 96-101.
- Truscott, M., L. Raynal, et al. (2003). "CDP/Cux stimulates transcription from the DNA polymerase alpha gene promoter." Mol Cell Biol **23**(8): 3013-28.
- Tsai, F. T. and P. B. Sigler (2000). "Structural basis of preinitiation complex assembly on human pol II promoters." Embo J **19**(1): 25-36.
- Tsukaguchi, H., H. Matsubara, et al. (1995). "Expression studies of two vasopressin V2 receptor gene mutations, R202C and 804insG, in nephrogenic diabetes insipidus." Kidney Int **48**(2): 554-562.
- Tsukaguchi, H., H. Matsubara, et al. (1995). "Two vasopressin type 2 receptor gene mutations R143P and delta V278 in patients with nephrogenic diabetes insipidus impair ligand binding of the receptor." Biochem Biophys Res Commun **211**(3): 967-77.

- Tsukaguchi, H., H. Matsubara, et al. (1995). "Binding-, intracellular transport-, and biosynthesis-defective mutants of vasopressin type 2 receptor in patients with X-linked nephrogenic diabetes insipidus." J Clin Invest **96**(4): 2043-50.
- Turner, B. M. (2000). "Histone acetylation and an epigenetic code." Bioessays **22**(9): 836-45.
- Turner, B. M. (2002). "Cellular memory and the histone code." Cell **111**(3): 285-91.
- Ulloa-Aguirre, A., D. Stanislaus, et al. (1999). "Structure-activity relationships of G protein-coupled receptors." Arch Med Res **30**(6): 420-35.
- Valarche, I., J. P. Tissier-Seta, et al. (1993). "The mouse homeodomain protein Phox2 regulates Ncam promoter activity in concert with Cux/CDP and is a putative determinant of neurotransmitter phenotype." Development **119**(3): 881-96.
- Valenti, G., G. Procino, et al. (2000). "The phosphatase inhibitor okadaic acid induces AQP2 translocation independently from AQP2 phosphorylation in renal collecting duct cells." J Cell Sci **113** ( Pt 11): 1985-92.
- van den Ouweland, A. M., J. C. Dreesen, et al. (1992). "Mutations in the vasopressin type 2 receptor gene (AVPR2) associated with nephrogenic diabetes insipidus." Nat Genet **2**(2): 99-102.
- van den Ouweland, A. M., M. T. Knoop, et al. (1992). "Colocalization of the gene for nephrogenic diabetes insipidus (DIR) and the vasopressin type 2 receptor gene (AVPR2) in the Xq28 region." Genomics **13**: 1350-1352.
- van der Weyden, L., D. J. Adams, et al. (2002). "Tools for targeted manipulation of the mouse genome." Physiol Genomics **11**(3): 133-64.
- van Hoek, A. N., M. L. Hom, et al. (1991). "Functional unit of 30 kDa for proximal tubule water channels as revealed by radiation inactivation." J Biol Chem **266**(25): 16633-5.
- van Koppen, C. J. and N. M. Nathanson (1991). "The cysteine residue in the carboxyl-terminal domain of the m2 muscarinic acetylcholine receptor is not required for receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase." J Neurochem **57**(6): 1873-7.

- van Lieburg, A. F., M. A. J. Verdijk, et al. (1994). "Patients with autosomal nephrogenic diabetes insipidus homozygous for mutations in the aquaporin 2 water-channel gene." Am J Hum Genet **55**: 648-652.
- van Os, C. H., P. M. Deen, et al. (1994). "Aquaporins: water selective channels in biological membranes. Molecular structure and tissue distribution." Biochim Biophys Acta **1197**(3): 291-309.
- van Wijnen, A. J., T. K. Choi, et al. (1991). "Involvement of the cell cycle-regulated nuclear factor HiNF-D in cell growth control of a human H4 histone gene during hepatic development in transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(6): 2573-7.
- van Wijnen, A. J., M. F. van Gurp, et al. (1996). "CDP/cut is the DNA-binding subunit of histone gene transcription factor HiNF-D: a mechanism for gene regulation at the G1/S phase cell cycle transition point independent of transcription factor E2F." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(21): 11516-21.
- van Wijnen, A. J., K. L. Wright, et al. (1989). "Human H4 histone gene transcription requires the proliferation-specific nuclear factor HiNF-D. Auxiliary roles for HiNF-C (Sp1-like) and HiNF-A (high mobility group-like)." J Biol Chem **264**(25): 15034-42.
- Vanden Heuvel, G. B., R. Bodmer, et al. (1996). "Expression of a cut-related homeobox gene in developing and polycystic mouse kidney." Kidney Int **50**(2): 453-61.
- Vandewalle, A., B. Lelongt, et al. (1989). "Maintenance of proximal and distal cell functions in SV40-transformed tubular cell lines derived from rabbit kidney cortex." J Cell Physiol **141**(1): 203-21.
- Varani, G. (1997). "A cap for all occasions." Structure **5**(7): 855-8.
- Vasudevan, S. and S. W. Peltz (2003). "Nuclear mRNA surveillance." Curr Opin Cell Biol **15**(3): 332-7.
- Verkman, A. S. (2005). "Novel roles of aquaporins revealed by phenotype analysis of knockout mice." Rev Physiol Biochem Pharmacol **155**: 31-55.
- Verkman, A. S. (2006). "Roles of aquaporins in kidney revealed by transgenic mice." Semin Nephrol **26**(3): 200-8.

- Verkman, A. S. and A. K. Mitra (2000). "Structure and function of aquaporin water channels." Am J Physiol Renal Physiol **278**(1): F13-F28.
- Vernier, P., B. Cardinaud, et al. (1995). "An evolutionary view of drug-receptor interaction: the bioamine receptor family." Trends Pharmacol Sci **16**(11): 375-81.
- Voronova, A. and D. Baltimore (1990). "Mutations that disrupt DNA binding and dimer formation in the E47 helix-loop-helix protein map to distinct domains." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(12): 4722-6.
- Wada, T., T. Takagi, et al. (1998). "DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs." Genes Dev **12**(3): 343-56.
- Wade, J. B., D. L. Stetson, et al. (1981). "ADH action: evidence for a membrane shuttle mechanism." Ann N Y Acad Sci **372**: 106-17.
- Wahle, E. and U. Kuhn (1997). "The mechanism of 3' cleavage and polyadenylation of eukaryotic pre-mRNA." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **57**: 41-71.
- Wall, S. M., J. S. Han, et al. (1992). "Kinetics of urea and water permeability activation by vasopressin in rat terminal IMCD." Am J Physiol **262**(6 Pt 2): F989-98.
- Walz, T., B. L. Smith, et al. (1994). "Biologically active two-dimensional crystals of aquaporin CHIP." J Biol Chem **269**(3): 1583-6.
- Wang, A. H., G. J. Quigley, et al. (1979). "Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution." Nature **282**(5740): 680-6.
- Wang, M. M. and R. R. Reed (1993). "Molecular cloning of the olfactory neuronal transcription factor Olf-1 by genetic selection in yeast." Nature **364**(6433): 121-6.
- Wang, W., M. Carey, et al. (1992). "Polymerase II promoter activation: closed complex formation and ATP-driven start site opening." Science **255**(5043): 450-3.
- Ward, D. T., T. G. Hammond, et al. (1999). "Modulation of vasopressin-elicited water transport by trafficking of aquaporin2-containing vesicles." Annu Rev Physiol **61**: 683-97.
- Warren, A. J. (2002). "Eukaryotic transcription factors." Curr Opin Struct Biol **12**(1): 107-14.

- Watanabe, Y., H. Fujimoto, et al. (2000). "Modulation of TFIID-associated kinase activity by complex formation and its relationship with CTD phosphorylation of RNA polymerase II." Genes Cells **5**(5): 407-23.
- Watson, J. D. and F. H. Crick (1953). "Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid." Nature **171**(4356): 737-8.
- Wei, W., D. Dorjsuren, et al. (2001). "Direct interaction between the subunit RAP30 of transcription factor IIF (TFIIF) and RNA polymerase subunit 5, which contributes to the association between TFIIF and RNA polymerase II." J Biol Chem **276**(15): 12266-73.
- Wei, Z., R. C. Angerer, et al. (1999). "Identification of a new sea urchin ets protein, SpEts4, by yeast one-hybrid screening with the hatching enzyme promoter." Mol Cell Biol **19**(2): 1271-8.
- Weideman, C. A., R. C. Netter, et al. (1997). "Dynamic interplay of TFIIA, TBP and TATA DNA." J Mol Biol **271**(1): 61-75.
- Weil, A. (1884). "Ueber die hereditare form des diabetes insipidus." Archives fur Pathologische Anatomie und Physiologie and fur Klinische Medicine (Virchow's Archives) **95**: 70-95.
- Weil, A. (1908). "Ueber die hereditare form des diabetes insipidus." Deutsches Archiv fur Klinische Medizin **93**: 180-290.
- Weil, P. A. and S. P. Blatti (1976). "HeLa cell deoxyribonucleic acid dependent RNA polymerases: function and properties of the class III enzymes." Biochemistry **15**(7): 1500-9.
- Wetzker, R. and F. D. Bohmer (2003). "Transactivation joins multiple tracks to the ERK/MAPK cascade." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(8): 651-7.
- Wieczorek, E., M. Brand, et al. (1998). "Function of TAF(II)-containing complex without TBP in transcription by RNA polymerase II." Nature **393**(6681): 187-91.
- Willcutts, M. D., E. Felner, et al. (1999). "Autosomal recessive familial neurohypophyseal diabetes insipidus with continued secretion of mutant weakly active vasopressin." Hum Mol Genet **8**(7): 1303-7.

- Willis, T. (1674). *Pharmaceutice rationalis sive diatriba de medicamentorum operationibus in humano corpore*. Oxford, Decourt. **Sect 4, Cap. 3: 207.**
- Willy, P. J., R. Kobayashi, et al. (2000). "A basal transcription factor that activates or represses transcription." Science **290**(5493): 982-5.
- Wind, M. and D. Reines (2000). "Transcription elongation factor SII." Bioessays **22**(4): 327-36.
- Wittig, B., S. Wolfl, et al. (1992). "Transcription of human c-myc in permeabilized nuclei is associated with formation of Z-DNA in three discrete regions of the gene." Embo J **11**(12): 4653-63.
- Wittschieben, B. O., G. Otero, et al. (1999). "A novel histone acetyltransferase is an integral subunit of elongating RNA polymerase II holoenzyme." Mol Cell **4**(1): 123-8.
- Woo, S. K., S. D. Lee, et al. (2002). "TonEBP transcriptional activator in the cellular response to increased osmolality." Pflugers Arch **444**(5): 579-85.
- Woychik, N. A. and M. Hampsey (2002). "The RNA polymerase II machinery: structure illuminates function." Cell **108**(4): 453-63.
- Wright, K. L., R. T. Dell'Orco, et al. (1992). "Multiple mechanisms regulate the proliferation-specific histone gene transcription factor HiNF-D in normal human diploid fibroblasts." Biochemistry **31**(10): 2812-8.
- Wu, S. Y. and C. M. Chiang (1998). "Properties of PC4 and an RNA polymerase II complex in directing activated and basal transcription in vitro." J Biol Chem **273**(20): 12492-8.
- Wu, S. Y., M. C. Thomas, et al. (1999). "Isolation of mouse TFIID and functional characterization of TBP and TFIID in mediating estrogen receptor and chromatin transcription." J Biol Chem **274**(33): 23480-90.
- Wu, S. Y., T. Zhou, et al. (2003). "Human mediator enhances activator-facilitated recruitment of RNA polymerase II and promoter recognition by TATA-binding protein (TBP) independently of TBP-associated factors." Mol Cell Biol **23**(17): 6229-42.



- Xu, Q., T. Nakanishi, et al. (1994). "Cloning and identification of testis-specific transcription elongation factor S-II." J Biol Chem **269**(4): 3100-3.
- Yamaguchi, Y., N. Inukai, et al. (2002). "Evidence that negative elongation factor represses transcription elongation through binding to a DRB sensitivity-inducing factor/RNA polymerase II complex and RNA." Mol Cell Biol **22**(9): 2918-27.
- Yamaguchi, Y., T. Takagi, et al. (1999). "NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation." Cell **97**(1): 41-51.
- Yamazaki, K., L. Guo, et al. (2002). "Identification and biochemical characterization of a novel transcription elongation factor, Elongin A3." J Biol Chem **277**(29): 26444-51.
- Yan, Q., R. J. Moreland, et al. (1999). "Dual roles for transcription factor IIF in promoter escape by RNA polymerase II." J Biol Chem **274**(50): 35668-75.
- Yang, B., A. Gillespie, et al. (2001). "Neonatal mortality in an aquaporin-2 knock-in mouse model of recessive nephrogenic diabetes insipidus." J Biol Chem **276**(4): 2775-2779.
- Yanovski, J. A., T. C. Friedman, et al. (1997). "Inferior petrosal sinus AVP in patients with Cushing's syndrome." Clin Endocrinol (Oxf) **47**(2): 199-206.
- Yasui, M., A. Hazama, et al. (1999). "Rapid gating and anion permeability of an intracellular aquaporin." Nature **402**(6758): 184-7.
- Yasui, M., T. H. Kwon, et al. (1999). "Aquaporin-6: An intracellular vesicle water channel protein in renal epithelia." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(10): 5808-13.
- Yasui, M., S. M. Zelenin, et al. (1997). "Adenylate cyclase-coupled vasopressin receptor activates AQP2 promoter via a dual effect on CRE and AP1 elements." Am J Physiol **272**(4 Pt 2): F443-50.
- Yip, K. P. (2002). "Coupling of vasopressin-induced intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization and apical exocytosis in perfused rat kidney collecting duct." J Physiol **538**(Pt 3): 891-9.
- Yonaha, M. and N. J. Proudfoot (1999). "Specific transcriptional pausing activates polyadenylation in a coupled in vitro system." Mol Cell **3**(5): 593-600.
- Young, R. A. (1991). "RNA polymerase II." Annu Rev Biochem **60**: 689-715.

- Yudkovsky, N., J. A. Ranish, et al. (2000). "A transcription reinitiation intermediate that is stabilized by activator." Nature **408**(6809): 225-9.
- Yun, J., T. Schoneberg, et al. (2000). "Generation and phenotype of mice harboring a nonsense mutation in the V2 vasopressin receptor gene." J Clin Invest **106**(11): 1361-71.
- Zawel, L., K. P. Kumar, et al. (1995). "Recycling of the general transcription factors during RNA polymerase II transcription." Genes Dev **9**(12): 1479-90.
- Zeidel, M. L., S. V. Ambudkar, et al. (1992). "Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein." Biochemistry **31**(33): 7436-40.
- Zenklusen, D., P. Vinciguerra, et al. (2002). "Stable mRNP formation and export require cotranscriptional recruitment of the mRNA export factors Yra1p and Sub2p by Hpr1p." Mol Cell Biol **22**(23): 8241-53.
- Zerbe, R. L. and G. L. Robertson (1984). "Disorders of ADH." Med North America **13**: 1570-1574.
- Zhang, K., H. Tang, et al. (2002). "Identification of acetylation and methylation sites of histone H3 from chicken erythrocytes by high-accuracy matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight, matrix-assisted laser desorption ionization-postsource decay, and nanoelectrospray ionization tandem mass spectrometry." Anal Biochem **306**(2): 259-69.
- Zhang, L., E. E. Eugeni, et al. (2003). "Identification of novel histone post-translational modifications by peptide mass fingerprinting." Chromosoma **112**(2): 77-86.
- Zhang, Z., J. Fu, et al. (2005). "CTD-dependent dismantling of the RNA polymerase II elongation complex by the pre-mRNA 3'-end processing factor, Pcf11." Genes Dev **19**(13): 1572-80.
- Zhao, J., L. Hyman, et al. (1999). "Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis." Microbiol Mol Biol Rev **63**(2): 405-45.
- Zhou, T. and C. M. Chiang (2001). "The intronless and TATA-less human TAF(II)55 gene contains a functional initiator and a downstream promoter element." J Biol Chem **276**(27): 25503-11.

- Zhu, H., H. Wang, et al. (1995). "The lutropin/choriogonadotropin receptor is palmitoylated at intracellular cysteine residues." Mol Endocrinol **9**(2): 141-50.
- Zhu, X., S. Gilbert, et al. (1994). "Dual signaling potential is common among Gs-coupled receptors and dependent on receptor density." Mol Pharmacol **46**(3): 460-9.
- Zhu, X. and J. Wess (1998). "Truncated V2 vasopressin receptors as negative regulators of wild-type V2 receptor function." Biochemistry **37**(45): 15773-84.
- Zhu, Y. Y., E. M. Machleder, et al. (2001). "Reverse transcriptase template switching: a SMART approach for full-length cDNA library construction." Biotechniques **30**(4): 892-7.
- Zorio, D. A. and D. L. Bentley (2004). "The link between mRNA processing and transcription: communication works both ways." Exp Cell Res **296**(1): 91-7.
- Zylber, E. A. and S. Penman (1971). "Products of RNA polymerases in HeLa cell nuclei." Proc Natl Acad Sci U S A **68**(11): 2861-5.

# Article