



**HAL**  
open science

**Rôle du complexe protéique  
NPHP1/NPHP4/RPGRIP1L impliqué dans la  
néphronophtise et les ciliopathies associées, dans la  
morphogenèse épithéliale, la polarité cellulaire et la  
ciliogenèse**

Helori-Mael Gaudé

► **To cite this version:**

Helori-Mael Gaudé. Rôle du complexe protéique NPHP1/NPHP4/RPGRIP1L impliqué dans la néphronophtise et les ciliopathies associées, dans la morphogenèse épithéliale, la polarité cellulaire et la ciliogenèse. Sciences agricoles. Université René Descartes - Paris V, 2012. Français. NNT : 2012PA05T048 . tel-00839849

**HAL Id: tel-00839849**

**<https://theses.hal.science/tel-00839849>**

Submitted on 3 Jul 2013

**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 PARIS DESCARTES

FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS DESCARTES - SITE COCHIN

---

**THÈSE**

**pour l'obtention du grade de DOCTEUR**

**Biologie Moléculaire et Cellulaire**

**Ecole Doctorale : GC2ID**

**Discipline : Génétique humaine**

présentée et soutenue publiquement par

**Helori-Mael GAUDÉ**

le 28 Novembre 2012

Sujet :

**Rôle du complexe protéique NPHP1/NPHP4/RPGRIP1L impliqué dans la néphronophtise et les ciliopathies associées, dans la morphogénèse épithéliale, la polarité cellulaire et la ciliogénèse**

**Membres du Jury**

**Dr Tania ATTIE-BITACH**

**Président**

**Dr Sophie SAUNIER**

**Directeur de thèse**

**Pr Bénédicte DURAND**

**Rapporteur**

**Dr Laurent KODJABACHIAN**

**Rapporteur**

**Dr Philippe BASTIN**

**Examineur**



## Résumé

La néphronophtise (NPH) est une néphropathie tubulo-interstitielle chronique de transmission autosomique récessive. Elle représente la cause génétique la plus fréquente des insuffisances rénales terminales de l'enfant et du jeune adulte (5 à 10%). Elle se caractérise au niveau histologique par des anomalies des membranes basales tubulaires, une fibrose interstitielle massive et par l'apparition tardive de kystes à la jonction cortico-médullaire. Dans 40% des cas, la NPH est associée à des atteintes extra-rénales, notamment oculaires, cérébelleuses ou osseuses, définissant de nombreux syndromes (Senior Løken, Joubert, Jeune, etc). Sur la quinzaine de gènes responsables de la maladie, sept ont été identifiés au laboratoire : *NPHP1*, *NPHP4*, *NPHP8/RPGRIP1L*, *NPHP11/MKS3*, *NPHP12/TTC21B*, *NPHP13/WDR19* et *IFT140*. Les protéines codées par ces gènes forment des complexes moléculaires principalement localisés au niveau des jonctions cellulaires et du cil primaire des cellules épithéliales rénales, classifiant la NPH et les syndromes associés dans le groupe des "ciliopathies".

Mes travaux de thèse se sont intégrés au projet de recherche de l'équipe, centré sur l'étude des mécanismes pathophysiologiques à l'origine des lésions observées dans la NPH. Pour cela, nous avons développé des modèles de cellules tubulaires rénales (MDCK, IMCD et HEK293), et des modèles animaux (souris et poisson zèbre en collaboration avec l'équipe de Sylvie Schneider-Maunoury UMR7622). Je me suis particulièrement intéressé à l'analyse des phénotypes cellulaires et à la caractérisation des voies de signalisation perturbées dans les cellules épithéliales rénales invalidées pour les gènes *NPHP1*, *NPHP4* et *NPHP8/RPGRIP1L*. Les protéines codées par ces gènes forment un complexe au niveau du cil primaire et des jonctions cellulaires. J'ai participé à définir le rôle crucial de ces protéines dans l'établissement des jonctions serrées par leur interaction avec les protéines de polarité, la morphogénèse épithéliale en culture 3D et la ciliogenèse. De plus, j'ai mis en évidence que l'absence de ces protéines entraîne des anomalies de migration et d'adhésion cellulaires s'accompagnant d'une activation anormale des protéines Rho GTPases (Cdc42, Rac1 et RhoA) et d'une réorganisation du cytosquelette d'actine. J'ai par ailleurs montré que le complexe *NPHP4/inversine/RPGRIP1L* régule finement l'expression et la localisation de Dishevelled, élément clé des voies Wnt canonique et Wnt/PCP, dans les cellules rénales. Ceci est en accord avec les défauts de polarité planaire observés dans le pronéphros du poisson zèbre et dans le rein de la souris, après invalidation des gènes *Nphp4* ou *Rpgrip1l*.

L'ensemble de ces résultats a permis de mieux comprendre le rôle moléculaire et cellulaire des néphrocystines et les mécanismes pathophysiologiques aboutissant aux altérations retrouvées chez les patients telles que la fibrose interstitielle rénale et la formation de kystes.



# TABLE DES MATIERES

|  |    |
|--|----|
| INTRODUCTION.....  | 5  |
| REVUE DE LA LITTERATURE.....   | 9  |
| 1-Aspects cliniques de la néphronophtise .....   | 11 |
| 1-1 Généralités .....  | 11 |
| 1-2 Symptômes cliniques et aspects histologiques.....  | 11 |
| 1-2-1 La néphronophtise juvénile et de l'adolescent. ....  | 12 |
| 1-2-2 La néphronophtise infantile .....  | 13 |
| 1-3 Atteintes extra-rénales associées à la NPH.....  | 14 |
| 1-3-1 La dégénérescence rétinienne (Syndrome de Senior-Løken (SLS)).....                                 | 15 |
| 1-3-2 L'aplasie du vermis cérébelleux (Syndrome de Joubert (JBTS)) .....                                 | 15 |
| 1-3-3 L'apraxie oculomotrice de type syndrome de Cogan .....   | 16 |
| 1-3-4 La fibrose hépatique (syndrome de Boïchis) .....   | 17 |
| 1-3-5 Les défauts cardiaques et le <i>situs inversus</i> .....   | 17 |
| 1-3-6 Les anomalies du squelette .....   | 17 |
| 1-4 La NPH et les syndromes associés sont des ciliopathies. ....   | 18 |
| 1-4-1 Définition des ciliopathies .....  | 18 |
| 1-4-2 Structure du cil.....  | 20 |
| 1-5 Ciliopathies associées à des atteintes rénales apparentées à la NPH .....                            | 22 |
| 1-5-1 Le syndrome de Meckel-Gruber (MKS).....  | 22 |
| 1-5-2 Le syndrome de Bardet-Biedl.....   | 22 |
| 1-5-3 Le syndrome d'Alström.....   | 23 |
| 2-Génétique de la NPH.....   | 24 |
| 2-1 Les gènes responsables de la NPH.....  | 26 |
| 2-2 Variabilité du phénotype lié à la nature de la mutation.....   | 29 |
| 2-3 Gènes modificateurs.....   | 30 |
| 2-4 Banques de données des composants du cil = des outils pour identifier des nouveaux gènes de NPH..... | 31 |

|  |    |
|--|----|
| 3- Fonction des néphrocystines (NPHP) .....  | 32 |
| 3-1 Fonction ciliaire des néphrocystines .....   | 32 |
| 3-1-1 Rôle de "gatekeeper" à la zone de transition (TZ) .....  | 32 |
| 3-1-2 Rôle dans l'adressage des protéines au cil primaire .....  | 37 |
| 3-1-3 Rôle spécialisé du cil dans différent tissus .....   | 39 |
| 3-1-4 Cil primaire et cycle cellulaire .....   | 44 |
| 3-1-5 Le poisson zèbre modèle d'étude de la fonction ciliaire .....  | 45 |
| 3-2 Fonction non ciliaire des néphrocystines. ....   | 49 |
| 3-2-1 Localisation des néphrocystines aux jonctions cellulaires .....  | 49 |
| 3-2-2 Interaction des NPHP avec les protéines des jonctions cellulaires .....  | 49 |
| 3-2-3 Mise en place de la polarité apico-basale .....  | 50 |
| 3-3 Voies de signalisation impliquant les néphrocystines .....   | 52 |
| 3-3-1 La voie Hedgehog (Hh) .....  | 52 |
| 3-3-2 Les voies Wnt .....  | 55 |
| 3-3-3 La voie Hippo .....  | 61 |
| 3-3-4 La réparation de l'ADN .....   | 63 |
| EXPOSÉ DES RÉSULTATS .....   | 65 |
| PARTIE I .....   | 67 |
| NPHP1, NPHP4 et RPGRIP1L sont impliquées dans la polarité apico-basale et la morphogénèse épithéliale des cellules MDCK en culture tridimensionnelle ..... | 68 |
| Position du problème : .....   | 68 |
| Résultats : .....  | 68 |
| Conclusion .....   | 71 |
| ARTICLE 1 .....  | 73 |
| PARTIE II .....  | 75 |
| NPHP4 régule les voies Wnt et la morphogénèse du pronéphros chez le poisson zèbre. ....  | 77 |
| Position du problème : .....   | 77 |
| Résultats : .....  | 78 |

|  |     |
|--|-----|
| Conclusion : .....   | 80  |
| ARTICLE 2 .....  | 81  |
| PARTIE III .....   | 83  |
| La stabilisation de Dishevelled à la base du cil par Rpgrip11 est essentielle pour la polarité planaire.<br>.....  | 85  |
| Position du problème : .....   | 85  |
| Résultats : .....  | 86  |
| Conclusion : .....   | 87  |
| ARTICLE 3 .....  | 89  |
| PARTIE IV .....  | 91  |
| NPHP1 et NPHP4 régulent les voies de signalisation des GTPases Rho et de leurs effecteurs en aval<br>de Dishevelled pour garantir l'intégrité de l'épithélium rénal..... | 93  |
| Position du problème : .....   | 93  |
| Résultats : .....  | 94  |
| Discussion : .....   | 96  |
| ARTICLE 4, en préparation .....  | 99  |
| DISCUSSION-CONCLUSION .....  | 121 |
| I Fonction des néphrocystines au cil primaire .....  | 123 |
| II Rôle des néphrocystines aux jonctions cellulaires .....   | 125 |
| III Rôles des néphrocystines dans la polarité planaire .....   | 127 |
| BIBLIOGRAPHIE .....  | 133 |



# TABLE DES ILLUSTRATIONS

**Figure 1 :** Aspects histologiques de la néphronophtise.

**Figure 2 :** Les patients atteints de NPH infantile peuvent présenter une histologie de NPH type « juvénile » et /ou « infantile ».

**Figure 3 :** Photographie d'un fond d'œil d'un patient avec un syndrome de Senior-Løken.

**Figure 4 :** Caractéristique du signe de la "Dent molaire" dans le syndrome de Joubert.

**Figure 5 :** Syndromes associés à la NPH

**Figure 6 :** Structure du cil mobile et du cil primaire.

**Figure 7 :** Proportion des mutations des gènes impliqués dans la NPH dans la cohorte de l'Hôpital Necker.

**Tableau 1:** Gènes mutés dans la NPH isolée et les ciliopathies associées

**Figure 8 :** Le spectre des ciliopathies associées à la néphronophtise (NPH).

**Figure 9 :** Structure protéique des néphrocystines et des IFTAs.

**Figure 10 :** Les néphrocystines au cil primaire.

**Figure 11 :** Le cil connecteur du photorécepteur est un cil primaire spécialisé

**Figure 12:** Modèles de l'établissement de l'asymétrie gauche-droite au niveau du noeud embryonnaire.

**Figure 13 :** Les néphrocystines et le désassemblage du cil.

**Tableau 2 :** Gènes et fonctions des protéines impliquées dans les maladies associées à la NPH et phénotypes des modèles animaux.

**Figure 14 :** Comparaison de l'unité de filtration chez les mammifères et le poisson zèbre.

**Figure 15 :** Mise en place des complexes de polarité cellulaire.

**Figure 16 :** La voie de signalisation Shh.

**Figure 17 :** Représentation schématique de la voie de signalisation Wnt.

**Figure 18 :** Cycle de régulation des GTPases Rho.

**Figure 19 :** La voie de signalisation Hippo.

**Figure 20 :** Rôle de RPGRIP1L dans la polarité apico-basale et la morphogénèse épithéliale en culture 3D

**Figure 21 :** Rôles intégratifs du complexe NPHP1-NPHP4- RPGRIP1L dans le maintien de l'intégrité de l'épithélium rénal.

# **INTRODUCTION**



# INTRODUCTION

La néphronophytose (NPH) est une néphropathie tubulo-interstitielle chronique de transmission autosomique récessive. Elle représente la cause génétique la plus fréquente des insuffisances rénales terminales de l'enfant et du jeune adulte (5 à 10%). Elle se caractérise au niveau histologique par des anomalies des membranes basales tubulaires, une fibrose interstitielle massive et par l'apparition tardive de kystes à la jonction cortico-médullaire. Elle présente une hétérogénéité à la fois clinique et génétique. En effet, elle est associée dans 40% des cas (cohorte de Necker), à des atteintes extra-rénales notamment oculaires, cérébelleuses ou osseuses, définissant de nombreux syndromes (Senior Løken, Joubert, Jeune, ...). Parmi les 15 gènes connus à ce jour pour être responsables de la maladie, sept ont été identifiés au laboratoire : *NPHP1*, *NPHP4*, *NPHP8/RPGRIP1L*, *NPHP11/MKS3*, *NPHP12/TTC21B*, *NPHP13/WDR19* et *IFT140*. Les protéines codées par ces gènes forment des complexes moléculaires principalement localisés au niveau des jonctions cellulaires et du cil primaire, classifiant la NPH et les syndromes associés dans le groupe des "ciliopathies".

Mes travaux de thèse se sont intégrés au projet de recherche de l'équipe, centré sur l'étude des mécanismes pathophysiologiques à l'origine des lésions observées dans la NPH. Pour cela, nous avons développé des modèles de cellules tubulaires rénales (MDCK, IMCD et HEK293), et des modèles animaux (souris et poisson zèbre en collaboration avec l'équipe de Sylvie Schneider-Maunoury UMR7622). Je me suis particulièrement intéressé à l'analyse des phénotypes cellulaires et à la caractérisation des voies de signalisation perturbées dans les cellules épithéliales rénales MDCK invalidées pour les gènes *NPHP1*, *NPHP4* et *NPHP8/RPGRIP1L*. Les protéines codées par ces gènes forment un complexe au niveau du cil primaire et des jonctions cellulaires. J'ai participé à définir le rôle crucial de ces protéines dans l'établissement des jonctions serrées par leur interaction avec les protéines de polarité, la morphogénèse épithéliale en culture 3D et la ciliogenèse. De plus, j'ai montré que l'absence de ces protéines entraîne des anomalies de migration et d'adhésion cellulaires s'accompagnant d'une activation anormale des protéines GTPases Rho (Cdc42, Rac1 et RhoA) et d'une réorganisation du cytosquelette d'actine. J'ai par ailleurs démontré que le complexe *NPHP4/inversine/RPGRIP1L* régule finement l'expression et la localisation de Dishevelled, élément clé des voies Wnt canonique et Wnt/PCP, dans les cellules rénales. En effet, *NPHP4* favorise la dégradation de Dishevelled par le protéasome, inhibant ainsi la voie Wnt canonique. En revanche, *RPGRIP1L* stabilise l'expression et la localisation de Dishevelled au niveau du corps basal, régulant ainsi la voie Wnt/PCP et la ciliogenèse. Ces résultats sont en accord avec les défauts de polarité

planaires observés dans le pronéphros du poisson zèbre et dans le rein de la souris, après invalidation des gènes *Nphp4* ou *Rpgrip1l*.

L'ensemble de ces résultats a permis de mieux comprendre le rôle moléculaire et les signalisations cellulaires de NPHP1, NPHP4 et RPGRIP1L et les mécanismes pathophysiologiques aboutissant aux altérations retrouvées chez les patients telles que la fibrose interstitielle rénale et la formation de kystes.

Après une revue de la littérature, cette thèse exposera l'étude des phénotypes associés à l'absence des protéines NPHP1, NPHP4 et RPGRIP1L dans les cellules MDCK et la régulation des voies de polarité apico-basale et polarité planaire par ces mêmes néphrocystines.

# **REVUE DE LA LITTERATURE**



# **1-Aspects cliniques de la néphronophytise**

## ***1-1 Généralités***

La néphronophytise (NPH) fut initialement décrite en 1945 par Smith et Graham qui parlèrent de maladie kystique de la médullaire (MCKD pour Medullary Cystic Kidney Disease) (Smith et Graham, 1945). Six ans plus tard, Fanconi introduisit le terme de « néphronophytise familiale juvénile » (Fanconi et al, 1951). Le terme néphronophytise vient du grec et signifie « désintégration du néphron », un des aspects histopathologiques de la maladie. La NPH et les maladies kystiques de la médullaire regroupent les néphropathies tubulo-interstitielles chroniques qui se caractérisent par des lésions des membranes basales tubulaires et par la formation de kystes à la jonction cortico-médullaire, évoluant vers l'insuffisance rénale terminale (IRT). Plus tard, la génétique a permis de les différencier et de montrer que la MCKD est une maladie kystique rénale de l'adulte de transmission autosomique dominante alors que la NPH regroupe les formes récessives. Une classification plus détaillée de la NPH a ensuite été établie prenant en compte l'âge du début de l'apparition de l'IRT. Trois formes ont ainsi été définies: la NPH infantile avec un âge moyen d'apparition de l'IRT avant 3 ans, la NPH juvénile avec une IRT en moyenne vers l'âge de 13 ans et la NPH de l'adolescent ou du jeune adulte avec une IRT en moyenne à 19 ans. Une forme de l'adulte n'est pas à exclure car plusieurs cas de NPH avec une IRT tardive (> 62 ans) ont été décrits. Plus récemment, la NPH a été classée dans le groupe des « ciliopathies », comprenant l'ensemble des maladies dont les mutations des gènes codent pour des protéines localisées au cil primaire ou au centrosome et impliquées dans la fonction ciliaire.

La NPH peut être isolée ou syndromique. Les formes syndromiques sont considérées comme des entités cliniques distinctes présentant des chevauchements phénotypiques, génétiques et moléculaires. Comme nous le verrons plus loin, les mutations d'un gène peuvent aboutir à différents phénotypes et plusieurs gènes peuvent être impliqués dans le développement d'un syndrome. Ainsi, le spectre des ciliopathies associées à la NPH est large, allant de formes dégénératives, les moins sévères, jusqu'aux formes développementales et létales les plus sévères comme le syndrome de Meckel-Gruber.

## ***1-2 Symptômes cliniques et aspects histologiques***

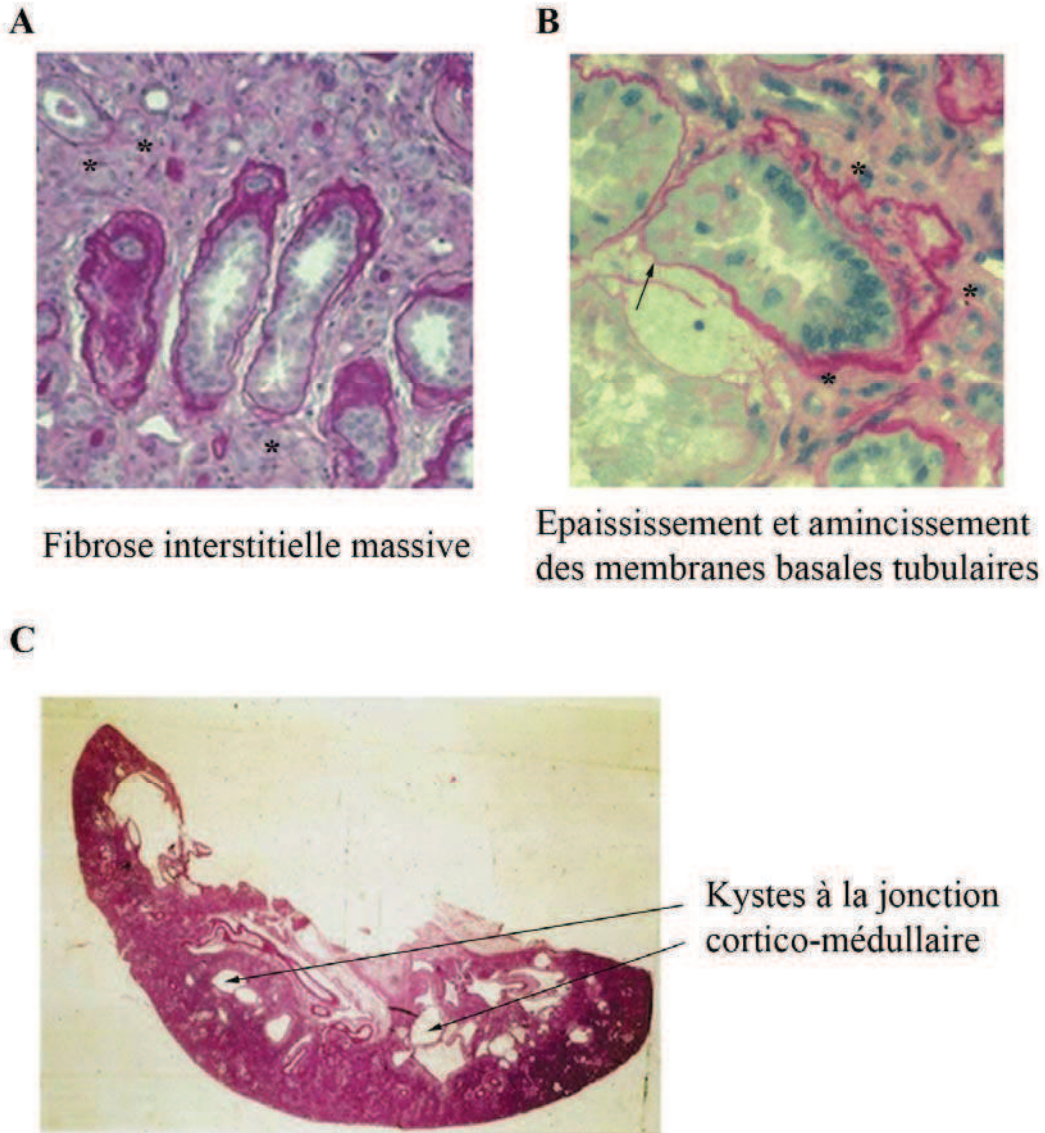
Bien que ce soit une maladie rare, la NPH est considérée comme la première cause génétique d'insuffisance rénale terminale chez l'enfant (5 à 10%) (Brunner 1988 ; Lewis et al, 2007 ; Warady et al, 1997). Son incidence varie de 1 pour 50 000 à 1 pour 900 000 naissances (Potter et al, 1980 ;



Waldherr et al, 1982 ; Ala-Mello et al, 1999). Cette incidence est sûrement sous-estimée car des tests moléculaires ont permis de diagnostiquer la NPH chez des adultes présentant une maladie rénale chronique avancée (Bollée et al, 2006; Hoefele et al, 2011).

### **1-2-1 La néphronophytose juvénile et de l'adolescent.**

La NPH juvénile isolée représente 42% des patients dans la cohorte de l'Hôpital Necker. Les premiers symptômes de la maladie commencent à apparaître entre 4 et 6 ans et sont une polyurie (sécrétion d'urine en quantité abondante) et une polydipsie (soif excessive), des symptômes secondaires comme l'énurésie (incontinence nocturne), le retard de croissance, l'anémie, sont plus tardifs. Ces symptômes sont la conséquence d'une perte des sels et d'une incapacité à concentrer les urines (< 400 mosm/kg dans l'urine matinale) (Salomon et al, 2009). La maladie évolue avec l'apparition progressive d'une insuffisance rénale, qui s'aggrave et aboutit à l'IRT. Chez les patients, l'âge d'apparition de l'IRT est variable, en moyenne vers l'âge de 13 ans pour la forme juvénile et de 19 ans pour la forme de l'adolescent, ou plus tardive encore avec des cas d'IRT à l'âge adulte. L'échographie des reins au stade initial de la maladie révèle une taille normale ou légèrement diminuée avec une perte de la différenciation de la jonction entre le cortex et la médullaire (Blowey et al, 1996). À un stade plus tardif au cours de l'évolution de la maladie, des kystes commencent à apparaître au niveau de cette jonction (Garel et al, 1984). Du point de vue histologique la néphronophytose juvénile et celle de l'adolescent sont similaires. Elles se caractérisent par la présence à la fois de tubules atrophiés et de tubules dilatés. Les membranes basales tubulaires sont épaissies avec une structure lamellaire et un aspect feuilleté, et selon les endroits du tubule la membrane basale peut aussi être amincie ou avoir disparu (Figure 1). Une fibrose interstitielle importante existe entre les tubules atrophiés avec une infiltration cellulaire focale modérée. Les kystes apparaissent au niveau de l'anse de Henlé, du tube distal et du tube collecteur (Herdman 1967) (Figure 1).

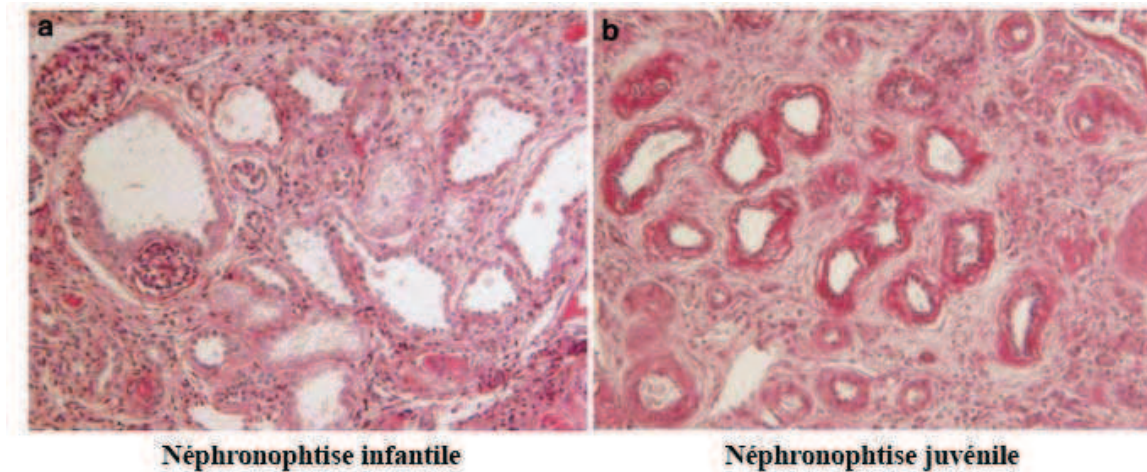


**Figure 1 : Aspects histologiques de la néphronophtise.** Coloration au Periodic Acid Schiff (PAS) de coupes de reins de patients atteints de néphronophtise. A) L'observation microscopique des coupes de reins de patients révèle la présence de tubes dilatés et la présence de fibrose interstitielle (astérisque). B) Certains tubules présentent à la fois un épaississement en aspects feuilletés (astérisques) et un amincissement (flèche) de la membrane basale qui les entoure. C) Coupe sagittale d'un rein de patient au stade terminal. Le rein présente une taille normale, avec la présence de nombreux kystes à la jonction cortico-médullaire et une fibrose interstitielle massive. Adapté de (Salomon, 2009)

### 1-2-2 La néphronophtise infantile

La forme infantile de la NPH est moins fréquente (~13%) et l'IRT est atteinte avant 3 ans. Elle se caractérise au niveau histologique par une fibrose interstitielle similaire à celle de la NPH juvénile, par l'augmentation de la taille des reins, la présence de kystes corticaux, l'absence d'épaississement des

membranes basales tubulaires et l'association fréquente d'une fibrose hépatique. Cependant, certains patients présentent une NPH infantile avec les caractéristiques histologiques de la NPH juvénile (Tory et al, 2009) (Figure 2).



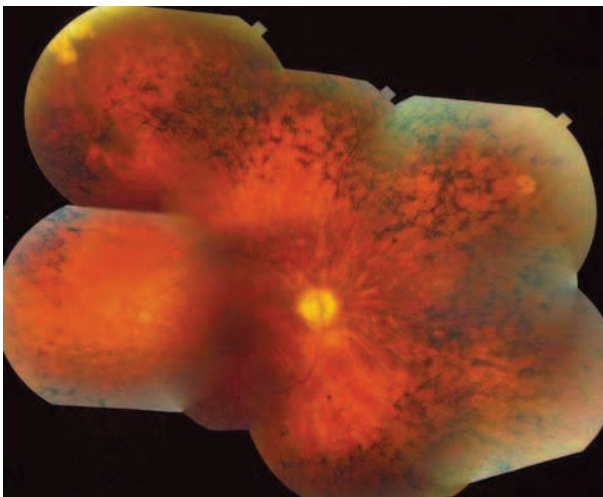
**Figure 2 : Les patients atteints de NPH infantile peuvent présenter une histologie de NPH type « juvénile » et /ou « infantile ».** (a) Microscopie optique présentant les caractéristiques du cortex rénal de la NPH infantile avec des dilatations irrégulières microkystiques des tubules corticaux, une absence d'épaississements important de la membrane basale tubulaire et des glomérules normaux (coloration PAS, x250). (b) Microscopie optique présentant les caractéristiques du cortex rénal de la NPH juvénile avec la plupart des membranes basales tubulaires épaissies et laminées, des tubules entourés par une fibrose interstitielle marquée avec une infiltration de cellules focales et modérées (coloration PAS, x280). Adapté de (Tory et al, 2009)

### ***1-3 Atteintes extra-rénales associées à la NPH***

Des atteintes extra-rénales sont associées à la NPH dans 15 à 40% des cas (Hildebrandt et Zhou, 2007, cohorte Hôpital-Necker). Dans la cohorte de l'hôpital Necker, les atteintes extra-rénales les plus fréquentes sont la dystrophie rétinienne avec rétinite pigmentaire (~13%) et l'ataxie cérébelleuse (~15%). Des anomalies osseuses (~4%) et hépatiques (~3%) sont également associées à la NPH. Les différentes atteintes des organes et l'association de certaines d'entre-elles au sein d'un même patient définissent des syndromes. La variabilité de leur sévérité aboutit à une hétérogénéité clinique plus complexe. (Figure 5 p.17 et Tableau 1 p.25).

### 1-3-1 La dégénérescence rétinienne (Syndrome de Senior-Løken (SLS))

L'atteinte oculaire chez les patients présentant une NPH est variable. Elle peut être sévère de type amaurose congénitale de Leber (LCA) mais elle est souvent modérée voir asymptomatique, et sa fréquence varie selon le gène muté (Salomon et al, 2009). Le syndrome de Senior-Løken (SLS) est l'association d'une dégénérescence rétinienne telle qu'une rétinite pigmentaire (RP) ou une LCA, avec une maladie rénale de type NPH (Contreras et Espinoza, 1960 ; Loken et al, 1961; Senior et al, 1961). La RP est une dégénérescence des photorécepteurs (Hartong et al, 2006). Les symptômes cliniques de la RP sont la cécité nocturne et la progression vers une vision en tunnel due à une réduction significative du champ visuel périphérique. L'examen du fond d'œil chez les patients révèle une pigmentation de la rétine, une atrophie rétinienne périphérique et une atténuation des vaisseaux (Figure 3). La LCA survient dans l'enfance et s'accompagne d'une perte précoce de la vision, de nystagmus (mouvement d'oscillation involontaire et saccadé du globe oculaire), de réflexes pupillaires diminués et d'une atrophie et une pigmentation rétinienne variable (Leber, 1869). L'électrorétinogramme des patients est plat ou sévèrement réduit.

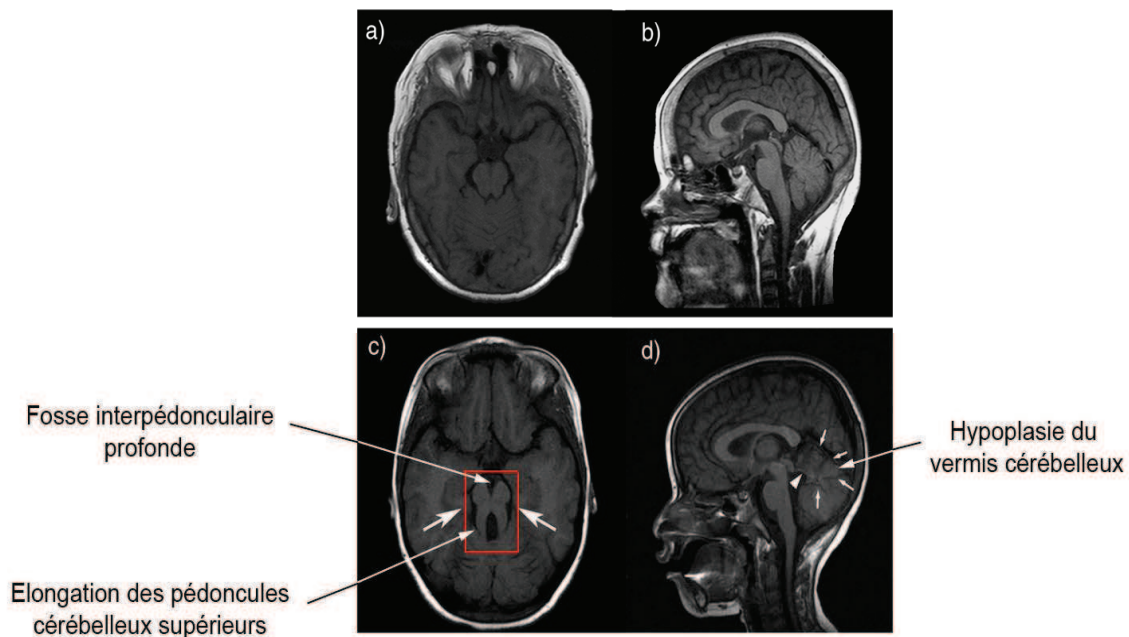


**Figure 3 : Photographie d'un fond d'œil d'un patient avec un syndrome de Senior-Løken.** L'examen de la rétine présente les éléments classiques de la rétinite pigmentaire (RP) : une pigmentation de la rétine, une atrophie rétinienne périphérique et une atténuation des vaisseaux

### 1-3-2 L'aplasie du vermis cérébelleux (Syndrome de Joubert (JBTS))

Décrit initialement par Marie Joubert, le syndrome de Joubert est une combinaison de phénotypes qui comprend des troubles cognitifs, une ataxie cérébelleuse, une tachypnée et des anomalies des mouvements oculaires (Joubert et al, 1969). L'hypoplasie du vermis cérébelleux est une malformation qui se révèle à l'IRM par le signe caractéristique de "la dent molaire" (MTS pour Molar

Tooth Sign) (Figure 4) (Parisi et al, 2009). Des altérations touchant d'autres organes sont associées au syndrome de Joubert. Les phénotypes oculaires, incluant des nystagmus quasi présent dès la naissance, le colobome rétinien, la LCA ou l'atteinte oculaire plus tardive, et les atteintes rénales de type NPH définissent le syndrome *cerebello-oculo-renal* (CORS) (Satran et al, 1999) ou syndrome de Joubert type B (JBTS-B) (Hildebrandt et al, 1992). La fibrose hépatique et les défauts squelettiques associés aux atteintes cérébelleuses définissent le syndrome de COACH (pour Cerebellar hypoplasia, Oligophrenia, Ataxia, Coloboma, Hepatic fibrosis) et OFDVI (pour Oro-Facial-Digital syndrome VI) respectivement (revue dans Sattar et al, 2011).



**Figure 4 : Caractéristique du signe de la "Dent molaire" dans le syndrome de Joubert.** Images IRM du cerveau d'un individu sain (A-B) et d'un patient avec un syndrome de Joubert (C-D). Le signe de la dent molaire se caractérise par une hypoplasie du vermis cérébelleux, une fosse interpédonculaire profonde et des pédoncules cérébelleux supérieurs allongés. Ces défauts sont visibles en sections axiales (A-C) et en sections sagittales médianes (B-D). Adapté de (Parisi, 2009)

### 1-3-3 L'apraxie oculomotrice de type syndrome de Cogan

L'apraxie oculomotrice de type syndrome de Cogan se caractérise par une diminution des mouvements oculaires horizontaux et un nystagmus, qui conduit les patients à avoir des mouvements de tête saccadés pour suivre les objets (Cogan 1972). L'association du syndrome de Cogan avec un NPH est rare et a été décrite pour une dizaine de patients NPH (Saunier et al, 1997 ; Betz et al, 2000).

### **1-3-4 La fibrose hépatique (syndrome de Boïchis)**

Une atteinte hépatique est associée à la NPH. Les patients développent une hépatomégalie (augmentation de la taille du foie) et une fibrose portale modérée avec une prolifération canaliculaire légère (Boïchis et al, 1973). Ceci diffère de la fibrose hépatique congénitale classique où la dysgénésie biliaire est prédominante, et des atteintes hépatiques de la polykystose rénale autosomique récessive, du syndrome Arima (syndrome cérébro-oculo-hépatorenal) et du syndrome de Meckel où la prolifération canaliculaire y est importante (Hildebrandt et al, 2009).

### **1-3-5 Les défauts cardiaques et le *situs inversus***

Des défauts cardiaques (défauts d'alignement du septum interventriculaire et rétrécissement des vaisseaux cardiaques) et de *situs inversus* qui est l'inversion totale ou partielle de la place des viscères, ont été décrits chez quelques patients présentant une NPH. (Bergman et al, 2008; Otto et al, 2003). Ces défauts, dus à une altération de la mise en place de la latéralité (détermination gauche-droite) sont associés le plus souvent avec les formes de NPH infantiles.

### **1-3-6 Les anomalies du squelette**

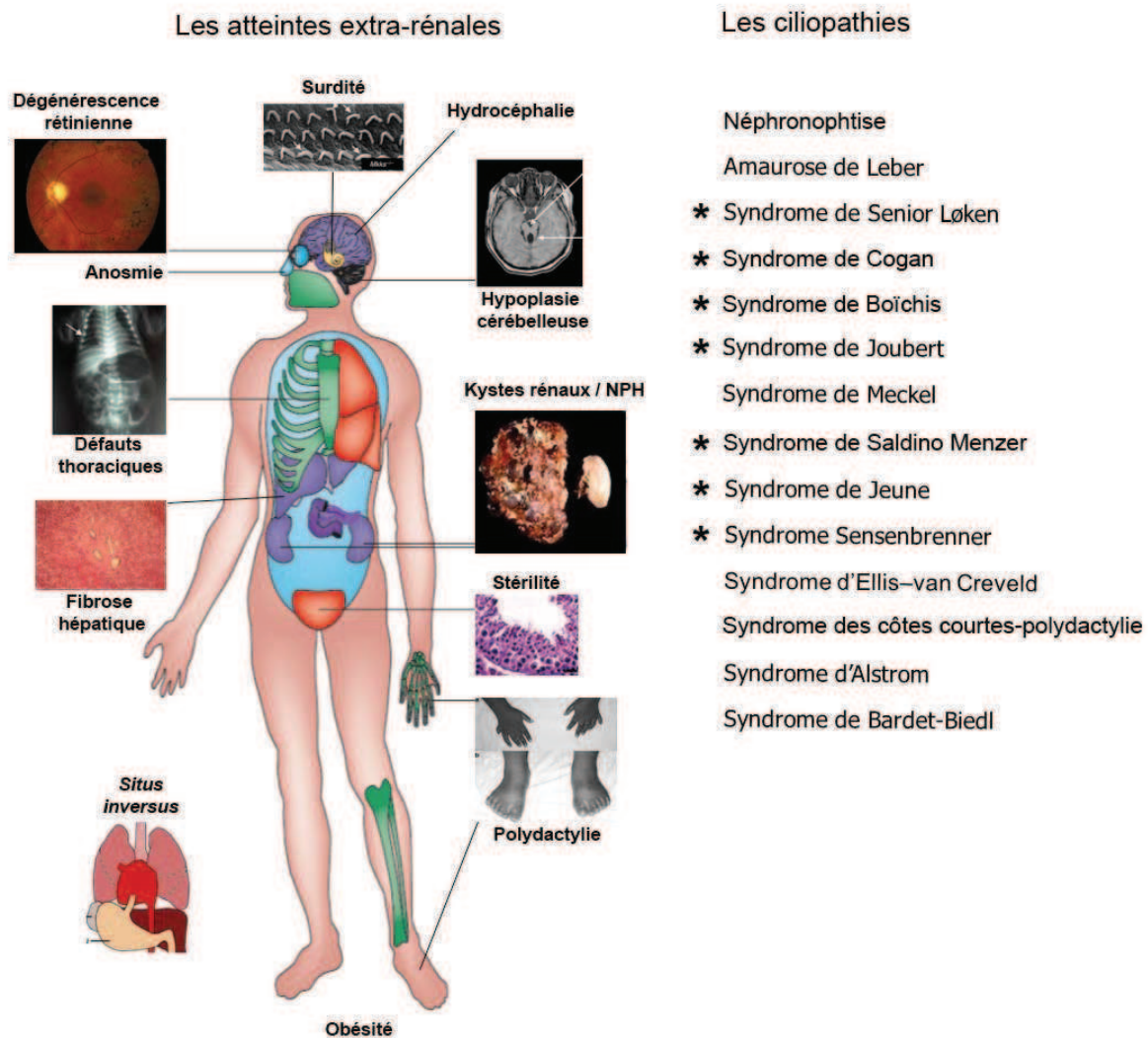
Différentes anomalies osseuses telles que des anomalies des phalanges (épiphyses en cône) dues à un défaut d'ossification enchondrale, une cage thoracique étroite, une polydactylie, une craniosténose ont été rapportées associées à une NPH. L'association d'une ou plusieurs de ces anomalies osseuses sont décrites dans différents syndromes : le syndrome de Saldino-Mainzer (ou syndrome cono-rénal) (Mainzer et al, 1970), le syndrome de Jeune (dystrophie thoracique asphyxiante) (Jeune et al, 1955), le syndrome Ellis van Creveld (Moudgil et al, 1998), le syndrome de RHYNS (Rétinite pigmentaire, hypopituitarisme, NPH, dysplasie squelettique) (Di Rocco et al, 1997); le syndrome de Joubert (revue dans (Parisi et al, 2009)) et le Syndrome de Sensenbrenner (dysplasie cranioectodermale) (Sensenbrenner et al, 1975 ; Costet et al, 2000). Chez certains patients, on retrouve associées aux anomalies osseuses et rénales, une dégénérescence rétinienne, une ataxie cérébelleuse ou une fibrose hépatique (Beals et al, 2007 ; Tsimaratos et al, 1998), suggérant que ces syndromes partagent une même étiologie.

## ***1-4 La NPH et les syndromes associés sont des ciliopathies.***

### **1-4-1 Définition des ciliopathies**

Les syndromes décrits précédemment sont des ciliopathies (Figure 5). Le terme ciliopathie regroupe un très grand nombre de maladies génétiques hétérogènes caractérisées par une dysfonction de la structure ou de la fonction des cils mobiles et non-mobiles. La plupart des protéines qui sont altérées dans les ciliopathies fonctionnent au niveau du complexe centrosome/cil. Ce complexe est un système universel conservé à travers l'évolution. Le cil est présent dans la plupart des cellules chez les vertébrés. Le rôle important que joue le complexe centrosome/cil dans le fonctionnement normal des tissus explique l'implication des multiples organes dans les ciliopathies (Figure 5). La dyskésie ciliaire primaire (PCD), fut la première ciliopathie décrite en 1976 (Afzelius et al, 1976). Elle résulte généralement d'une anomalie de structure des cils mobiles entraînant leur incapacité à générer un flux au niveau des cellules du nœud embryonnaire, à l'origine d'un *situs inversus*. Le *situs inversus* associé à la PCD définit le syndrome de Kartagener (Afzelius et al, 1976).

Le lien entre le cil et les maladies kystiques rénales fut en premier lieu évoqué par l'étude de la souris mutante *orpk* ou *tgt737*, un modèle murin de polykystose rénale autosomique récessive (ARPKD), dans lequel la protéine IFT88 est mutée (Pazour et al, 2000). En effet, la mutation hypomorphe du gène *Ift88* cause chez la souris un retard de croissance, une polydactylie et le développement de kystes corticaux au niveau des reins (Pazour et al, 2000). Les anomalies de structure et de fonction des cils de la souris *orpk*, ont permis de considérer les maladies kystiques rénales comme des ciliopathies. Chez l'homme, les formes de PKD sont transmises selon un mode autosomique dominant (ADPKD) ou autosomique récessif (ADPKD). L'ARPKD est une forme sévère et précoce de PKD due aux mutations du gène *PKHD1* qui code pour la fibrocystine, protéine localisée au cil primaire des cellules épithéliales rénales (Onuchic et al, 2002; Ward et al, 2002 et 2003; Xiong et al, 2002 ; Lin et al, 2004). L'ADPKD est fréquente (prévalence de 1/1000) et elle est due aux mutations des gènes *PKD1* et *PKD2* qui codent pour les protéines polycystines-1 et -2 (PC1/PC2) (The European Polycystic Kidney Disease Consortium, 1994 ; Mochizuki et al, 1996). Le complexe PC1/PC2 forme un canal calcique localisé au cil primaire où il jouerait le rôle de mécanosenseur du flux urinaire en favorisant l'entrée de calcium intracellulaire et régulerait également la prolifération cellulaire (Babich et al, 2004 ; Yoder et al, 2002, Nauli et al, 2003 ; Bhunia et al, 2002).



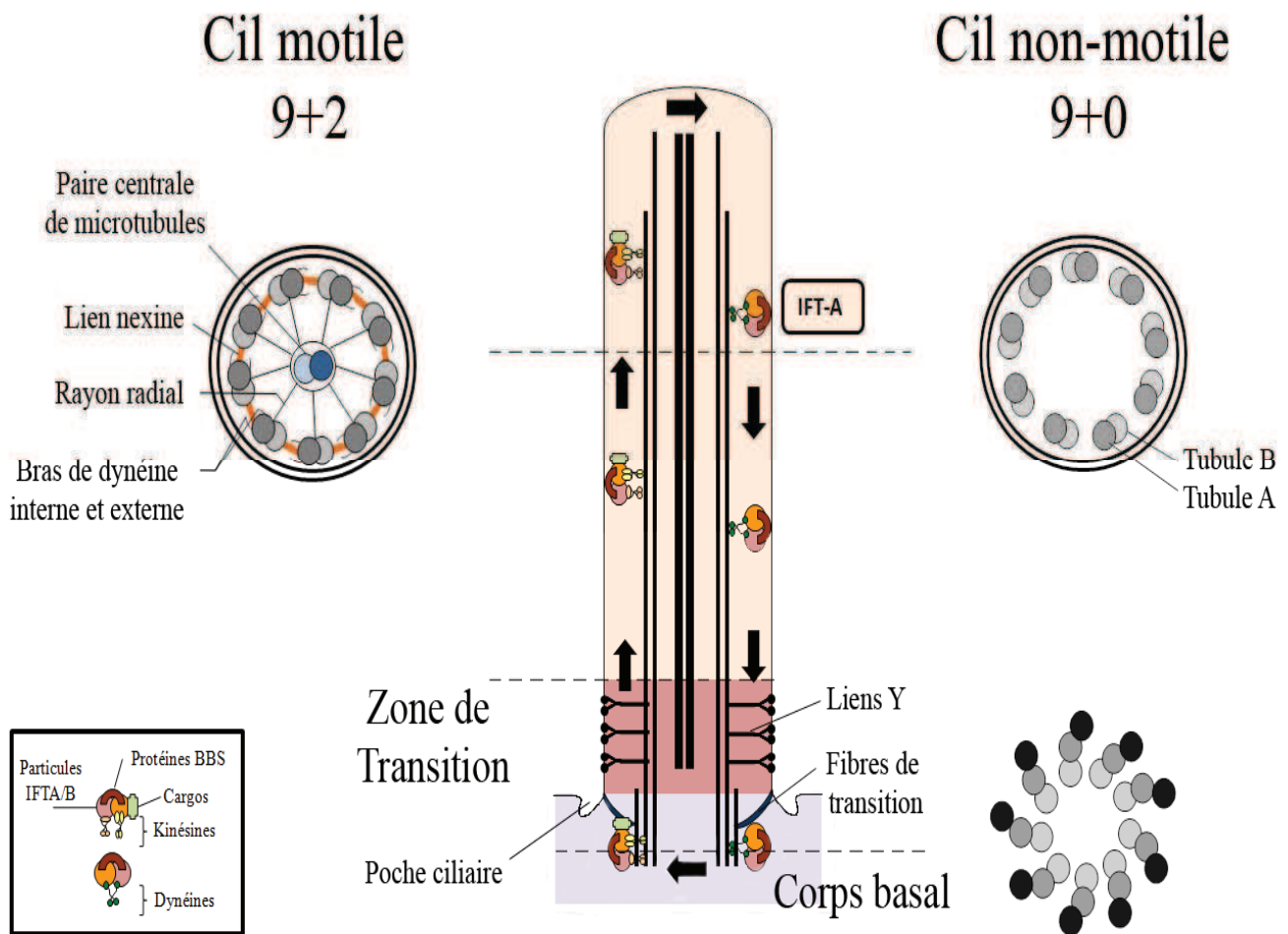
**Figure 5 : Syndromes associés à la NPH (astérisque).** Représentation schématique des atteintes des différents organes dans les ciliopathies associées à la NPH. Le cil primaire est présent sur la majorité des cellules des vertébrés et son dysfonctionnement entraine des altérations de nombreux organes. Adapté de (Goetz et Anderson, 2010).



### 1-4-2 Structure du cil.

Le cil est un organelle qui se projette telle une antenne depuis la surface de la membrane apicale de la cellule dans le milieu extra-cellulaire. La majorité des cellules quiescentes des vertébrés présente un ou plusieurs cils, mobiles ou non-mobiles. Le cil mobile diffère du non-mobile car ses neuf doublets de microtubules sont agencés en cercle autour d'un doublet central (9+2) que ne possède pas le cil non-mobile (9+0) (Figure 6). Les cils mobiles et les flagelles sont restreints à une poignée de tissus humains, dans lesquelles ils permettent la propulsion des spermatozoïdes, la détermination embryonnaire gauche-droite, l'excrétion du mucus des voies aériennes, et la progression du fluide céphalo-rachidien (revue Bloodgood et al, 2010). Dans les organismes pluricellulaires, la plupart des cils primaires se sont spécialisés, agissent comme senseurs du milieu extra-cellulaire et transduisent des signaux permettant la prolifération, la polarité cellulaire, la différenciation et la maintenance des tissus. Ce sont des plateformes dans lesquelles les protéines sont impliquées dans le transport intraflagellaire (IFT), dans la régulation de voies de signalisation et de transduction de signaux (Shh, Wnt, Notch, PDGFR $\alpha$ , etc...). Il existe des exceptions où les cils 9+2 sont non-mobiles comme les cils des neurones olfactifs (Menco 1994), le kinocil des cellules internes de la cochlée (Sobkowitz et al, 1995) et où les cils 9+0 sont mobiles comme les cils des cellules du nœud embryonnaire (Nonaka, tanaka et al, 1998).

L'axonème du cil primaire, constitué de microtubules, s'allonge à partir du centriole père. Les deux centrioles de la cellule forment le corps basal. Dans la partie proximale du cil à partir du corps basal, la zone de transition forme une barrière de filtration régulant l'entrée et la sortie des protéines ciliaires et où les fibres de transitions délimitent le compartiment ciliaire du reste de la cellule (Figure 6). Ces éléments sont entourés d'une membrane en continuité avec la membrane plasmique mais dont la composition lipidique et protéique diffère du reste de la cellule. Le cil se désassemble avant la mitose et se reforme lors de l'entrée de la cellule en phase G1 (revue Kobayashi et al, 2011). (Figure 6). Du fait de l'absence de synthèse protéique dans le cil, le transport intraflagellaire (IFT) doit fournir les composants ciliaires à la pointe de l'axonème pour son assemblage (Rosenbaum et Child, 1967). Le transport intraflagellaire est un système de transport antérograde et rétrograde le long de l'axonème, dépendant de moteurs moléculaires (kinésines et dynéines) associés à deux sous-complexes protéiques, IFT-A et IFT-B (Pedersen et Rosenbaum, 2008). Des perturbations dans l'un ou l'autre des complexes aboutissent à des défauts de structure et/ou de fonction du cil (Marszalek et al, 1999; Huangfu et al, 2003; Huangfu et Anderson, 2005; May et al, 2005; Pedersen et Rosenbaum, 2008; Tran et al, 2008; Ocbina et al, 2011; Qin et al, 2011). Les protéines IFTs sont aussi présentes au niveau des fibres de transition où elles interagissent fonctionnellement avec les composants de la zone de transition pour charger les protéines cargos du cil nécessaire à la ciliogenèse (Figure 6) (Deane et al, 2001; Ishikawa et al, 2005; Graser et al, 2007; Singla et al, 2010).



**Figure 6 : Structure du cil mobile et du cil primaire.** La structure du cil primaire est divisée en plusieurs parties: la pointe, le corps du cil (rose pale), la zone de transition (saumon) et le corps basal (mauve clair). L'axonème des cils mobiles/flagelles se compose d'une paire centrale de microtubules entourés de neuf doublets de microtubules (9+2) reliés entre eux par des bras de dynéines qui permettent la mobilité. Les cils non-mobiles ne possèdent pas cette paire centrale de microtubules (9+0). L'axonème se prolonge à partir d'une structure constituée de triplet de microtubule: le corps basal. La zone de transition débute lorsque les neuf triplets de microtubules du corps basal deviennent des doublets et se caractérise par les liaisons Y, structures en forme de verres à champagne qui relient chaque doublet à la membrane qui les entoure (Gilula et Satir, 1972). Le transport antérograde et rétrograde à l'intérieur du cil est réalisé par des moteurs moléculaires kinésines et dynéines, des complexes IFT-A et IFT-B. Les IFTs et les moteurs moléculaires s'assemblent au niveau des fibres de transition de la zone de transition pour acheminer les cargos protéiques le long du cil. La zone de transition joue le rôle de barrière à la base du cil et régule la fonction et la composition du cil primaire. Adapté de (Inglis et al, 2006)

## ***1-5 Ciliopathies associées à des atteintes rénales apparentées à la NPH***

Parmi les ciliopathies, certaines peuvent présentées des atteintes rénales, soit sévère (dysplasie kystique rénale dans le syndrome de Meckel) ou plus modérée s'apparentant à la NPH (syndrome BBS, syndrome d'Alström).

### **1-5-1 Le syndrome de Meckel-Gruber (MKS)**

Le syndrome de Meckel est une maladie développementale sévère avec une mortalité pré- ou périnatale. Le MKS se caractérise par une encéphalocèle occipitale, une dysplasie kystique rénale, une fibrose hépatique. D'autres défauts associés aux ciliopathies sont également rapportés dans certains cas : des défauts de fermeture du tube neural, une polydactylie, une hydrocéphalie, des défauts de latéralité, des défauts cardiaques, des malformations de la fente labio-palatine, et des organes génitaux masculins sous-développés (revue dans Logan et al, 2011). Chez l'homme, 10 loci ont été trouvés et les protéines codées par les gènes identifiés à ce jour sont toutes impliquées dans la fonction ciliaire.

### **1-5-2 Le syndrome de Bardet-Biedl**

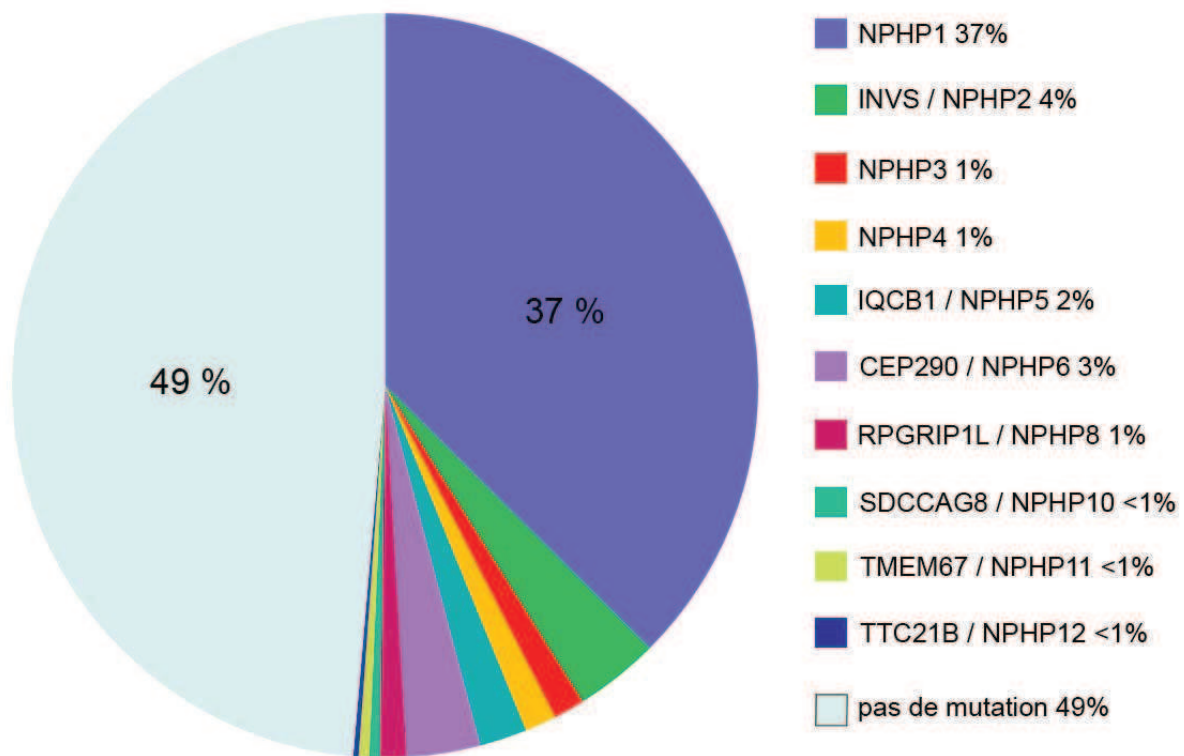
En 1920, le pédiatre français Dr Georges Louis Bardet, puis 2 ans plus tard le Professeur Arthur Biedl, furent les premiers à décrire le syndrome de Bardet-Biedl (BBS). Le BBS est une maladie rare d'une prévalence de 1/160 000 en Europe (Klein et al, 1969). Les principales caractéristiques phénotypiques de ce syndrome sont la dystrophie rétinienne, l'obésité, la polydactylie, l'hypogonadisme, des troubles cognitifs et des anomalies rénales. Des phénotypes secondaires ont été rapportés chez les patients et comprennent : une anosmie, un diabète, des anomalies cardiaques, une fibrose hépatique, une brachydactylie et une maladie de Hirschprung (Mockel et al, 2011). Chez les patients BBS, l'atteinte rénale est variable, souvent asymptomatique et n'est parfois détectée qu'au moment de l'insuffisance rénale. Longtemps ignorée, son incidence élevée en fait une caractéristique centrale et une cause majeure de mortalité chez les patients BBS. 25 % des patients BBS développent une insuffisance rénale chronique aux alentours de 50 ans et alors que seulement 10 % développent une IRT dans l'enfance ou l'adolescence (O'Dea et al, 1996). La polyurie/polydipsie due à un défaut de concentration des urines est rapportée dans environ un tiers des patients et témoigne de l'atteinte tubulaire précoce à l'instar de ce qui est retrouvé dans la NPH. Les reins peuvent présenter une réduction de taille, des contours irréguliers, une déformation des calyces, des lésions tubulointerstitielles associées ou non à des kystes médullaires et corticaux (Revue dans (Putoux et al, 2012).

### **1-5-3 Le syndrome d'Alström**

Le syndrome d'Alström (ALSM) se caractérise par une RP précoce, des troubles auditifs et des défauts métaboliques aboutissant à une hyper-insulinémie, un diabète de type 2 et une obésité (Alström et al, 1959). D'autres phénotypes ont été rapportés chez les patients ALMS comme une cardiomyopathie, une insuffisance hépatique et rénale progressive et un hypogonadisme (Marshall et al, 2005). Chez les patients adultes une néphropathie avec fibrose interstitielle est observée (Marshall et al, 2005). Un gène, *ALMS1*, a été identifié chez les patients (Collin et al, 2002) et code pour une protéine localisée à la base du cil primaire des cellules épithéliales du pancréas, du foie, du rein et du cerveau (Hearn et al, 2005).

## 2-Génétique de la NPH

La NPH présente une hétérogénéité à la fois sur le plan clinique mais aussi sur le plan génétique (Figure 7). En effet, jusqu'à présent plus d'une quinzaine sont connus pour être responsables de la NPH et des différents syndromes associés (listés dans le Tableau 1 p.25). Les premiers gènes ont été identifiés grâce à des études génétiques qui alliaient approche par clonage positionnel et séquençage de gènes candidats. Depuis ces dernières années, plusieurs gènes responsables de la NPH ont été découverts par des approches de séquençage haut débit d'exome entier, d'exome ciblé pour des gènes candidats ciliaires (*ZNF423* et *CEP164* (Chaki et al, 2012)) ou encore par des approches d'analyses protéomiques (*ATXN10* (Sang et al, 2011)). L'ensemble des mutations retrouvées dans la quinzaine de gènes impliqués dans la NPH représentent 30 à 51 % des patients selon les différentes cohortes (Hildebrant et al, 2009 et cohorte de l'Hôpital Necker) (Figure 7).



**Figure 7 : Proportion des mutations des gènes impliqués dans la NPH dans la cohorte de l'Hôpital Necker.**

**Tableau 1: Gènes mutés dans la NPH isolée et les ciliopathies associées**

| Gène                        | Protéine                                      | NPH isolée       | NPH infantile   | Ciliopathies associées à la NPH |                |                   |                |                 |                |      |    |                 | autres ciliopathies sans NPH |      |      |       |     |       |
|-----------------------------|---|------------------|-----------------|---------------------------------|----------------|-------------------|----------------|-----------------|----------------|------|----|-----------------|------------------------------|------|------|-------|-----|-------|
|                             |   |                  |                 | fibrose hépatique               | situs inversus | défauts cardiaque | SLS            | JBTS-B          | MSS            | JATD | SS | BBS-like        | LCA                          | JATD | JBTS | COACH | MKS |       |
| <i>NPHP1</i>                | Néphrocystine-1                               | ✓✓               |                 |                                 |                |                   | ✓              | ✓               |                |      |    |                 |                              |      |      | ✓     |     |       |
| <i>INVS/NPHP2</i>           | Inversine / néphrocystine-2                   | ✓ <sup>54</sup>  | ✓✓              | ✓                               | ✓✓             | ✓                 |                |                 |                |      |    |                 |                              |      |      |       |     |       |
| <i>NPHP3</i>                | Néphrocystine-3                               | ✓                | ✓(tr)           | ✓(hyp)                          | ✓              | ✓                 | ✓              |                 |                |      |    |                 |                              |      |      |       |     | ✓(tr) |
| <i>NPHP4</i>                | Néphrocystine-4                               | ✓                |                 |                                 |                |                   | ✓              | ✓               |                |      |    |                 |                              |      |      |       |     |       |
| <i>IQCB1/NPHP5</i>          | Néphrocystine-5 / IQ-motif containing protein |                  |                 |                                 |                |                   | ✓✓             |                 |                |      |    |                 |                              |      |      |       |     |       |
| <i>CEP290/NPHP6</i>         | Centrosomal protein 290                       |                  |                 |                                 |                |                   | ✓              | ✓✓              |                |      |    |                 | ✓                            | ✓✓   |      |       |     | ✓     |
| <i>GLIS7/NPHP7</i>          | GLI similar 2                                 | ✓                |                 |                                 |                |                   |                |                 |                |      |    |                 |                              |      |      |       |     |       |
| <i>RPGRIP1L/NPHP8/MKS5</i>  | RPGRIP1-like                                  |                  |                 |                                 |                |                   |                | ✓(hyp)          |                |      |    |                 |                              |      |      |       | ✓   | ✓(tr) |
| <i>NEK8/NPHP9</i>           | NIMA-related kinase 8                         | ✓                | ✓               |                                 |                |                   |                |                 |                |      |    |                 |                              |      |      |       |     |       |
| <i>SDCCAG8/NPHP10/SLSN7</i> | Serologically defined colon cancer antigen 8  |                  |                 |                                 |                |                   | ✓              |                 |                |      |    |                 | ✓ <sup>55</sup>              |      |      |       |     |       |
| <i>TMEM67/MKS3/NPHP11</i>   | Transmembrane protein 67                      |                  |                 | ✓(hyp)                          |                |                   |                | ✓(tr)           |                |      |    |                 | ✓                            |      |      |       | ✓   | ✓(tr) |
| <i>TTC21B/NPHP12</i>        | IFT139  | ✓ <sup>9</sup>   | ✓               |                                 |                |                   |                |                 |                |      | ✓  |                 |                              |      | ✓    |       |     |       |
| <i>WDR19/NPHP13</i>         | IFT144  | ✓                |                 |                                 |                |                   |                |                 |                |      | ✓  | ✓ <sup>10</sup> |                              |      |      |       |     |       |
| <i>CEP164/NPHP15</i>        | Centrosomal protein 164                       |                  |                 |                                 |                |                   | ✓ <sup>6</sup> |                 |                |      |    |                 |                              | ✓    |      |       |     |       |
| <i>TMEM216/MKS2/JBTS2</i>   | Transmembrane protein 216                     |                  |                 |                                 |                |                   |                | ✓ <sup>56</sup> |                |      |    |                 |                              |      |      | ✓     |     | ✓     |
| <i>ATXN10</i>               | Ataxin 10                                     |                  | ✓ <sup>5</sup>  | ✓                               |                |                   |                |                 |                |      |    |                 |                              |      |      |       |     |       |
| <i>IFT140</i>               | IFT140  |                  |                 |                                 |                |                   |                |                 | ✓ <sup>7</sup> | ✓    |    |                 |                              |      |      |       |     |       |
| <i>AHI1</i>                 | Joubérine                                     | ✓+ <sup>57</sup> |                 |                                 |                |                   |                | ✓               |                |      |    |                 |                              |      |      |       | ✓   |       |
| <i>CC2D2A/MKS6</i>          | Coiled coil and C2 domain containing 2A       | ✓+ <sup>57</sup> | ✓ <sup>57</sup> |                                 |                |                   |                |                 |                |      |    |                 |                              |      |      |       | ✓   | ✓     |
| <i>ZNF423/NPHP14</i>        | ZNF423  |                  | ✓ <sup>6</sup>  |                                 |                |                   |                |                 |                |      |    |                 |                              |      |      |       |     |       |

✓ : implication ; ✓✓ : très impliqué ; + : néphronoptise avec symptômes extrarénaux; hyp, mutation hypomorphe; tr, mutation tronquante; NPH, néphronoptise ; SLS, Syndrome de Senior-Løken; JBTS-B, Syndrome de Joubert type B ; MKS, Syndrome de Meckel-Gruber; COACH, hypoplasie/aplasie du vermis Cérébelleux, Oligophrénie, Ataxie, Colobome and fibrose Hépatique; MSS, Syndrome de Saldino-Mainzer; JATD, dystrophie thoracique asphyxiante de Jeune; SS, Syndrome de Sensenbrenner; BBS, Syndrome de Bardet-Biedl.

## **2-1 Les gènes responsables de la NPH**

Les gènes *NPHP* sont parfois préférentiellement associés à des caractéristiques cliniques spécifiques de la NPH ou à l'atteinte spécifique de certains organes, facilitant ainsi le diagnostic.

*NPHP1* est le premier gène identifié et principalement muté dans la NPH isolé (40% des cas de la cohorte de l'Hôpital Necker) (Saunier et al, 1997; Hildebrandt et al, 1997) (Figure 7). La principale mutation du gène *NPHP1* consiste en une large délétion homozygote de 290 kb due à une recombinaison homologue inégale entre des régions répétées qui entourent le gène (Saunier et al, 1997 et 2000). Une délétion hétérozygote associée à des mutations ponctuelles sur le second allèle est retrouvée dans 6% des patients (Salomon et al, 2009). La détection de la délétion par des méthodes de PCR multiplex fluorescentes semi-quantitatives permet un diagnostic rapide et précis de la maladie. De même que *NPHP1*, le gène *NPHP4* est généralement impliqué dans la NPH isolée. Les mutations des gènes *NPHP2/inversine*, *NPHP3* et *NPHP9/Nek8* ont, quant à elles, été retrouvées chez des patients avec néphronophtise infantile (Tory et al, 2009; Otto et al, 2008). Les mutations du gène *INVS/NPHP2* sont retrouvées dans 50% des cas de NPH infantiles (Figure 7).

D'autre part, les mutations du gène *IQCB1/NPHP5* sont systématiquement associées à une NPH avec atteinte oculaire (syndrome de Senior- Løken (SLS)) (Otto et al, 2005). Les mutations du gène *IQCB1/NPHP5* et du gène *CEP290/NPHP6* (Perrault et al, 2007) sont souvent liées aux formes sévères de RP, alors que l'âge d'apparition des symptômes rénaux est très variable. On retrouve également des mutations du gène *NPHP10/SDCCAG8* associées au SLS. Les mutations des gènes *NPHP1*, *NPHP4* sont parfois associées à l'atteinte oculaire (SLS et apraxie oculomotrice de type syndrome de Cogan) (Mollet et al, 2002; Hoefele et al, 2005) (Tableau 1 p.25). Des mutations des gènes *CEP290/NPHP6*, *RPGRIP1L/NPHP8*, *TMEM67/NPHP11* sont retrouvées chez des patients avec un syndrome de Joubert et une NPH (Sayer et al, 2006 ; Delous et al, 2007 ; Baala et al, 2007) (Tableau 1 p.25). Les anomalies cérébelleuses de type syndrome de Joubert, sont retrouvées dans 20% des patients avec une délétion *NPHP1*. Les malformations du cervelet des patients présentant un syndrome de Joubert et une délétion de *NPHP1* sont moins sévères et aboutissent à une légère MTS (Molar Tooth Sign) chez la plupart des patients (Caridi et al, 2006).

Plus récemment les gènes impliqués dans le transport rétrograde du cil ont été mis en cause dans la NPH. En effet, les mutations des gènes des IFTAs *TTC21B*, *IFT140* et *WDR19* sont retrouvées chez des patients présentant une NPH isolée ou une NPH associée à des atteintes osseuses (Tableau 1 p.25) (Davis et al, 2011 ; Perrault et al, 2012 ; Bredrup et al, 2011). Les autres gènes codant les protéines, *IFT122*, *IFT43* et *WDR35*, sont aussi impliqués dans des ciliopathies avec anomalies du

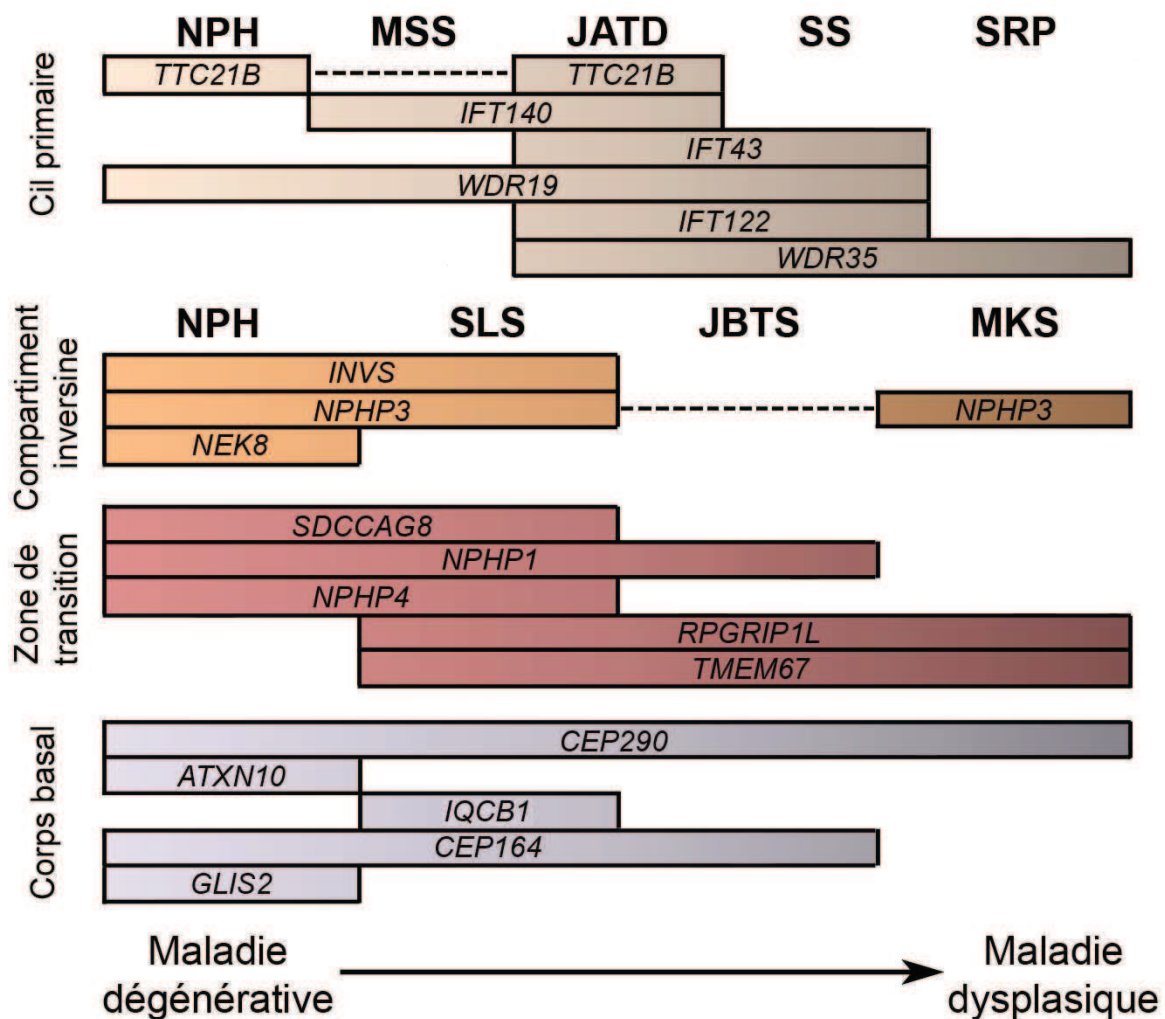
squelette et des insuffisances rénales chroniques de type NPH (revue dans (Huber et Cormier-Daire, 2012) et données du laboratoire).

Certains gènes sont mutés que dans très peu de familles (*Glis2*, *Nek8*, *ATXN10*)(Figure 7). Ainsi, les mutations du gène *NPHP7/GLIS2* ont été retrouvées dans une famille (Attanasio et al, 2007). Trois mutations faux-sens du gène *NPHP9/Nek8* ont quant à elles été identifiées chez trois individus différents (Otto et al, 2008). Trois individus sont également mutés pour le gène *ATXN10* (Sang et al, 2011).

Enfin, des gènes codant pour des protéines impliquées dans d'autres voies de signalisation que la fonction du cil primaire ont été identifiés mutés chez des patients avec NPH. Le gène *XPNPEP3/NPHP1L* est muté chez deux patients avec NPH associée à une cardiomyopathie et une hypertension. C'est le premier gène impliqué dans le NPH qui code pour une protéine, X-propyl aminopeptidase 3, qui ne se localise pas au niveau du cil mais au niveau de la mitochondrie. Cependant les auteurs émettent la possibilité que cette protéine joue un rôle dans la fonction du cil en favorisant le clivage de certaines protéines ciliaires (O'Toole et al, 2010). Enfin, deux gènes ont récemment été identifiés chez des patients avec un syndrome de Senior-Løken (SLS), *CEP164/NPHP15*, ou présentant une NPH infantile, *ZNF423/NPHP14* (Chaki et al, 2012) (Tableau 1 p.25). Ces gènes codent pour des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN ce qui suggère un nouveau mécanisme physiopathologique impliqué dans les ciliopathies.



## Spectre des ciliopathies associées à la NPH



**Figure 8 : Le spectre des ciliopathies associées à la néphronoptise (NPH).** Les maladies associées aux mutations des gènes responsables de la NPH représentent un spectre de phénotypes variable allant des maladies dégénératives aux formes extrêmement graves et létales des maladies dysplasiques. Des mutations d'un même gène sont retrouvées dans différentes entités cliniques avec une variabilité de la gravité des atteintes des organes. A l'inverse des mutations dans différents gènes peuvent être responsables d'une même entité clinique. NPH: Néphronoptise, MSS: syndrome de Saldino-Mainzer, JATD: Dystrophie thoracique asphyxiante de Jeune ou syndrome de Jeune, SS: syndrome de Sensenbrenner, SRP: Syndrome du groupe des côtes courtes-polydactylie, SLS : syndrome de Senior-Løken, JBTS: syndrome de Joubert, MKS : syndrome de Meckel-Gruber.

## ***2-2 Variabilité du phénotype lié à la nature de la mutation***

La nature même des mutations des gènes responsables de la NPH influence le phénotype retrouvé chez les patients et aboutit à une grande variabilité des atteintes rénales associées ainsi que de l'âge d'apparition du phénotype rénal (Figure 8). C'est en particulier le cas pour les gènes *NPHP3*, *TMEM67/NPHP11/MKS3* et *RPGRIP1L/NPHP8*. L'identification du gène *RPGRIP1L* fut une des premières démonstrations de la variabilité phénotypique associée aux mutations des gènes *NPHP*. En effet, alors que les fœtus MKS sont porteurs de deux mutations tronquantes, une seule mutation tronquante et/ou des mutations hypomorphes ont été identifiées chez les patients JBTS (Delous et al 2007). Par ailleurs, les mutations du gène *NPHP3* entraînent un large spectre de NPH isolées ou syndromiques : NPH infantile, juvénile ou de l'adolescent, avec fibrose hépatique, rétinite pigmentaire ou syndrome de Meckel, en fonction du type de mutations (Bergmann et al, 2008; Olbrich et al, 2003; Tory et al, 2009). De même, les mutations dans le gène *TMEM67* aboutissent à un large spectre de NPH syndromiques allant de la NPH avec fibrose hépatique, aux syndromes de Joubert et de Meckel (Otto et al, 2009; Dawe et al, 2007). Ainsi, les mutations hypomorphes des gènes *TMEM67* ou *NPHP3* aboutissent à une NPH juvénile avec une atteinte limitée des organes, alors que des mutations tronquantes aboutissent aux défauts sévères de développement retrouvés dans le syndrome de Meckel-Gruber. Cette corrélation est également retrouvée chez les souris mutantes pour *Nphp3*. En effet, la souris *pcy* porteuse d'une mutation hypomorphe du gène *Nphp3*, présente des défauts rénaux similaires à la NPH avec une atrophie et des dilatations tubulaires, une infiltration de cellule mononucléaire et une fibrose interstitielle diffuse (Omran et al, 2001), alors que la perte de fonction de *Nphp3* dans les souris « knockout » aboutit à une létalité embryonnaire et un phénotype rappelant le syndrome de Meckel (Tableau 2 p.47).

De la même façon, la nature des mutations retrouvées dans les gènes codant pour les IFT-A semble corrélée avec la gravité des atteintes osseuses et oculaires, la NPH isolée étant le phénotype moins sévère associé aux mutations hypomorphes des gènes *TTC21B* et *WDR19* alors que des mutations tronquantes de *WDR19* aboutissent au phénotype sévère du syndrome de Sensenbrenner (Perrault et al, 2012; Bredrup et al, 2011; Davis et al, 2010). En accord avec ceci, l'analyse fonctionnelle des cils dans les fibroblastes des patients et les tissus de souris mutantes pour ces IFT-A, a révélé de légères anomalies associées aux allèles hypomorphes, tandis que les mutations perte de fonction affectent considérablement la structure des cils et dérègle les voies de signalisation en aval comme la voie de signalisation Shh (Jonassen et al, 2012; Perrault et al, 2012; Liem et al, 2012).

## 2-3 Gènes modificateurs

Dans certains cas, le type de mutation ne peut pas toujours expliquer la corrélation génotype/phénotype. Ainsi, dans le gène *CEP290/NPHP6*, une même mutation est associée à un large spectre phénotypique, allant d'une amaurose congénitale de Leber isolée à un syndrome de Meckel-Gruber ou à un BBS (Coppieters et al, 2010). Ceci suggère la présence de gènes modificateurs qui pourraient moduler l'expression phénotypique des mutations des gènes responsables de la NPH. Cette idée est particulièrement intéressante pour les ciliopathies car les protéines codées par ces gènes sont impliquées dans des complexes protéiques. De façon intéressante, la présence de gènes modificateurs a été décrite dans le syndrome BBS. Le syndrome BBS présente aussi une hétérogénéité génétique avec 16 gènes ayant été identifiés comme responsable de 80% des cas de la maladie. Les gènes *BBS1* et *BBS10* sont les deux gènes majeurs du BBS et sont chacun responsables de 20% des cas. L'implication des autres gènes *BBS* va d'une seule famille à un faible pourcentage de familles mutées. Une étude a montré qu'un individu porteur de deux mutations faux-sens hétérozygote du gène *BBS2* ne développait pas la maladie alors que son frère porteur des mêmes mutations et d'une troisième mutation tronquante du gène *BBS6* développait le syndrome (Katsanis et al, 2001). De plus, plusieurs gènes *BBS* sont aussi impliqués dans d'autres ciliopathies, c'est le cas de *BBS13* (ou *MKS1*), et *BBS14* (ou *CEP290/NPHP6*). Des mutations du gène *BBS15* ont été retrouvées dans des cas de BBS et MKS (Kim et al, 2010). Au laboratoire, des mutations de *SDCCAG8/NPHP10* ont été identifiées chez des patients atteints de SLS ou de BBS-like (Otto et al, 2010). Ces données impliquent une variabilité des phénotypes associés aux mutations des gènes BBS et démontrent le chevauchement génétique entre les ciliopathies.

Des mutations hétérozygotes délétères de *TTC21B* ont récemment été décrites comme enrichies chez les patients atteints de ciliopathies telles que la NPH, le JBTS, le JATD, le BBS et le MKS (~5%) (Davis et al, 2011), suggérant qu'elles peuvent jouer un rôle modificateur à travers le spectre des ciliopathies en plus de leur rôle causal chez les patients avec NPH et JATD. De plus, au laboratoire Kalman Tory a montré que le variant R830W du gène *AH11* (JBTS), était enrichi chez des patients porteurs d'une délétion homozygote du gène *NPHP1* associé à des atteintes neurologiques (Tory et al, 2007). Ce même variant est également enrichi chez les patients avec une NPH et des atteintes oculaires (Louie et al, 2010). La prédisposition des patients *NPHP1* aux atteintes neurologiques en présence du variant du gène *AH11*, suggèrent que la joubérine produit du gène *AH11* et la néphrocytine-1 (*NPHP1*), connus pour être associés, agissent probablement dans une même voie de signalisation (Eley et al, 2008). Par ailleurs, le polymorphisme A229T de *RPGRIP1L* est également enrichi chez les patients atteints d'une ciliopathie associée à une dégénérescence rétinienne (Khanna et al, 2009).

## ***2-4 Banques de données des composants du cil = des outils pour identifier des nouveaux gènes de NPH***

Au sein de la cohorte de l'Hôpital Necker, 49 % des patients ne sont pas associés à un locus connu, d'autres gènes responsables de la NPH restent donc à identifier. Notre l'équipe utilise de nouvelles approches couplant analyse de liaison et séquençage haut débit (SoliD5500x, Pateforme Imagine). Pour cela, une librairie de capture « ciliome » ciblant 18997 exons de 1210 gènes ciliaires a été développée et optimisée (technologie SureSelect Agilent) grâce à l'utilisation des différentes banques de données regroupant les protéines ciliaires.

Les bases de données telles que Cildb (Arnaiz et al, 2009), Centrosomedb (Nogales-Cadenas et al, 2009) ou encore le « ciliary proteome » (Gherman et al, 2006), regroupent l'ensemble des données obtenues par différentes études cherchant à établir l'ensemble des protéines exprimées au niveau du cil et du centrosome. Ces études ont été réalisées par des approches protéomiques variées telles que la spectrométrie de masse, la comparaison de génome, ou par l'étude de profils transcriptionnels. Certaines approches comme la comparaison de génome peuvent être limitées par le fait que tous les gènes de ciliopathies ne sont pas conservés entre les espèces. Toutefois le complexe cil/centrosome est lui conservé à travers l'évolution et le nombre important d'études et la diversité des organismes utilisés (*Homo sapiens*, *C. elegans*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Drosophila*, *Mus musculus* ou *Trypanosoma*), permettent de palier ces limites (Ostrowski et al, 2002; Andersen et al, 2003; Avidor-Reiss, 2004; Li et al, 2004; Blacque et al, 2005; Efimenko et al, 2005; Keller et al, 2005; Pazour et al, 2005; Stolc et al, 2005; Broadhead et al, 2006). La base de données Cildb regroupe l'ensemble des protéines ciliaires et centrosomales de 33 espèces différentes (Arnaiz et al, 2009).

Ces bases de données se sont révélées être des outils dans la recherche de gènes candidats impliqués dans les ciliopathies (*cc2d2a* : Gorden et al, 2008; *ofdl* : Coene et al, 2009). La comparaison génomique de l'organisme cilié *Chlamydomonas* et le non cilié *Arabidopsis*, a permis l'identification des gènes *BBS3* et *BBS5* (Chiang et al, 2004 ; Li et al, 2004). Ainsi, au sein du laboratoire, l'approche couplant analyse de liaison et séquençage haut débit de gènes ciliaires a récemment permis d'identifier des mutations dans plusieurs gènes des IFTA chez des patients avec NPH (Otto et al, 2010; Perrault et al, 2012).

### **3- Fonction des néphrocystines (NPHP)**

Les gènes mutés dans la NPH codent pour deux classes de familles de protéines, les néphrocystines et les IFTA:

- les néphrocystines : ce sont des protéines ubiquitaires exprimées au niveau du rein, en particulier dans les tubes distaux et collecteurs, au niveau de la rétine, du cerveau, des organes génitaux et du foie. Leur localisation corrèle avec la variabilité des atteintes extra-rénales observées chez les patients NPH. La plupart de ces protéines sont cytosoliques (une seule est membranaire TMEM67) et forment des réseaux protéiques au niveau des jonctions cellulaires et du cil primaire des cellules épithéliales rénales. Les domaines protéiques des néphrocystines sont nombreux et variés. Ce sont très souvent des domaines permettant les interactions entre protéines favorisant ainsi l'assemblage de complexe macromoléculaire (Figure 9).

- les IFTAs : ce sont des protéines ubiquitaires exprimées dans les cils des cellules où elles sont impliquées dans le transport rétrograde des protéines ciliaires. Elles présentent des domaines protéiques communs (répétition WD40 et domaine tétratricoptide) qui favorisent les interactions protéine-protéine et l'assemblage de complexes multiprotéiques (Figure 9).

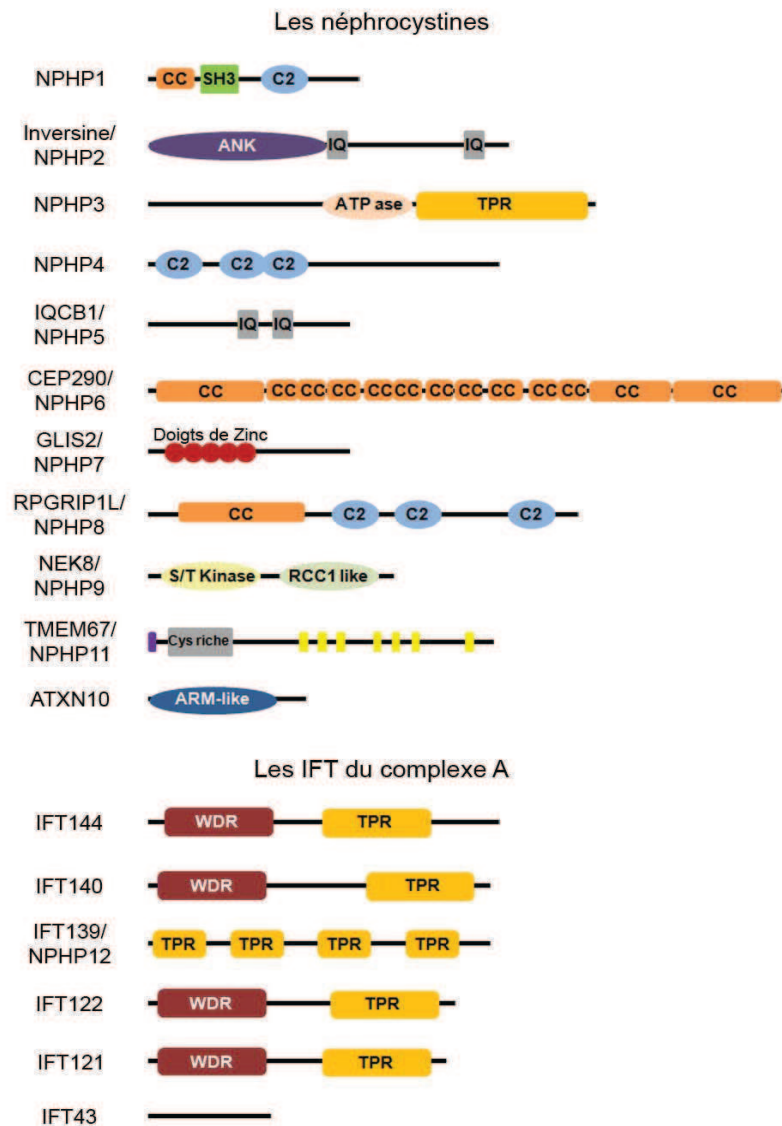
#### ***3-1 Fonction ciliaire des néphrocystines***

##### **3-1-1 Rôle de "gatekeeper" à la zone de transition (TZ)**

###### **A) Les différents complexes protéiques à la base du cil**

Des approches de co-immunoprécipitation et d'immuno-histochimie avaient montré l'association de différentes néphrocystines entre elles. Une étude récente a utilisé une technique de purification par affinité en tandem couplée à une approche protéomique de spectrométrie de masse, pour identifier le réseau d'interaction des protéines impliquées dans la NPH (NPHP), le syndrome de Joubert (JBTS) et le syndrome de Meckel (MKS). Dans ce crible, 850 partenaires des néphrocystines, de MKS1 et d'AH11/Joubérine, ont été co-purifiés. En plus de l'analyse protéomique, leurs effets sur la ciliogenèse ou la morphogenèse épithéliale en culture 3D ont été testés dans des cellules IMCD3 et RPE1 (Retinal pigmented epithelial cell) invalidées pour les différents gènes. L'analyse de leurs résultats a mis en lumière un important réseau protéique et révélé l'existence de plusieurs modules distincts de protéines NPHP à la base du cil primaire : le module "NPHP1-NPHP4-RPGRIP1L" localisé à la TZ, le module "NPHP6-NPHP5" localisé au centrosome, le module "inversine-NPHP3-NEK8" localisé au

compartiment inversine et le module "MKS", lié à la voie de signalisation Hedgehog (Sang et al, 2011) (Figure 10).



**Figure 9 : Structure protéique des néphrocystines et des IFTAs.** Les néphrocystines et les IFTA partagent de nombreux domaines protéiques permettant les interactions protéine-protéines et la formation de complexes macromoléculaires. Parmi ces domaines, le domaine **coiled-coil (CC)** permet l'oligomérisation des protéines, le **domaine SH3** (pour Src Homology 3) reconnaît et interagit avec les régions riches en prolines des protéines (séquence consensus : PxxP), le **domaine C2** et le **domaine IQ** sont des domaines liés à la signalisation calcique impliquée dans de différents processus cellulaires. Des motifs répétés sont présents dans les différentes protéines de la NPH : le **domaine tétratricopeptide (TPR)** et le **motif Ankyrine (ANK)** sont importants dans les interactions protéine-protéine et l'assemblage de complexes multiprotéiques, les **répétitions WD40 (WDR)** sont souvent présentes dans des protéines impliquées dans des processus cellulaires variés (cycle cellulaire, apoptose, régulation des gènes), les **domaines transmembranaires (TMEM)** sont des structures protéiques tridimensionnelles thermodynamiquement stables à l'intérieur des membranes. ARM-like: répétition de motifs Armadillo. Adapté de (Garcia-Gonzalo et Reiter, 2012; Taschner et al, 2012)

#### - Le module NPHP1-NPHP4-RPGRIP1L à la TZ

L'association des protéines NPHP1-NPHP4-RPGRIP1L fut initialement décrit par notre équipe dans les cellules rénales suite à leur identification (Mollet et al, 2005 ; Delous et al, 2007). Ainsi, par des expériences de co-immunoprécipitation, il a été montré que la partie C-terminale de NPHP1 est requise pour interagir avec NPHP4 (Mollet et al, 2005). De plus, les mutations faux-sens T615P et T677I situés dans le domaine C2 de RPGRIP1L, identifiées chez les patients avec un syndrome de Joubert, diminuent l'interaction avec NPHP4 (Delous et al, 2007). Ceci suggère qu'un défaut d'interaction entre ces protéines pourrait participer à l'apparition des phénotypes chez les patients. Ceci, corrèle avec l'analyse fonctionnelle des simples et doubles mutants des orthologues de ces protéines chez *C elegans*. En effet, dans ce modèle il a été montré que RPGRIP1L est nécessaire à la localisation de NPHP4 à la zone de transition (TZ) des cils sensoriels des cellules neuronales. De plus, NPHP4 est lui-même requis à la localisation de NPHP1 à la zone de transition (Williams et al, 2008 et 2011 ; Wintelbauer et al, 2005). Chez *C elegans*, l'inactivation de ces gènes *NPHP* associée à l'inactivation de certains gènes *MKS/JBTS*, a été montré que les protéines NPHP1-NPHP4-RPGRIP1L participent à la stabilité de la TZ et à la localisation spécifique de composants ciliaires (Huang et al, 2011 ; Jauregui et al, 2008).

#### - Le compartiment inversine

Le compartiment inversine dont la fonction n'est pas clairement établie, se situe au niveau de la région proximale du cil juste au dessus de la zone de transition (Shiba et al, 2009) et sa longueur, d'à peu près 2  $\mu\text{m}$ , est définie par le pattern d'expression de l'inversine indépendamment de la taille du cil. Présents au compartiment en plus de l'inversine, on retrouve NPHP3 et NEK8/NPHP9 (Shiba et al, 2010; Sang et al, 2011). Cependant, la perte de l'inversine dans ce compartiment aboutit à une délocalisation de ses partenaires NPHP3 et NEK8 au cil, suggérant que l'inversine sert d'ancrage moléculaire pour ces deux protéines (Shiba et al, 2010). De façon intéressante, les rares cas de défauts cardiaques et de situs inversus associés à la NPH ont été décrits chez des patients mutés pour *INVS* et *NPHP3* et les souris invalidées pour ces gènes (Bergman et al, 2008; Otto et al, 2003) (Tableau 2 p.47). Par ailleurs, une mutation faux sens (G448V) du gène *Nek8* dans la souris *jck* située dans le domaine RCC1 de la protéine (Figure 9), entraîne une maladie kystique rénale (Liu et al, 2002 et Tableau 2 p.47). Dans les cellules IMCD, l'étude de l'expression des protéines possédant les trois mutations du gène *NEK8* retrouvées chez les patients NPH, montre des défauts de localisation de NEK8 au centrosome et au cil primaire (Otto et al, 2008). De plus, NEK8 interagit et régule l'expression et la phosphorylation de la polycystine-2 (Sohara et al, 2008) suggérant un rôle de Nek8 dans la signalisation ciliaire.

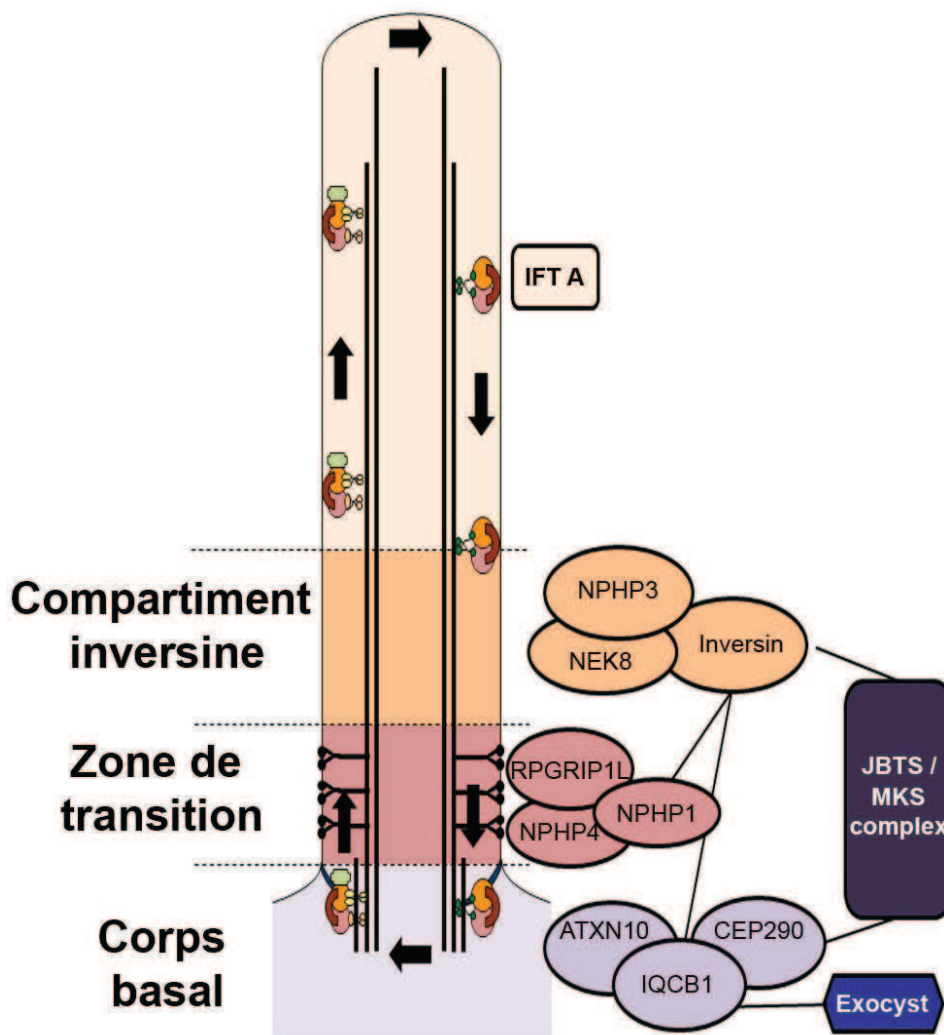
## - Le complexe JBTS/MKS

En plus des néphrocystines, la zone de transition se compose des protéines impliquées dans le syndrome de Joubert (JBTS) et le syndrome de Meckel (MKS). Par des approches protéomiques de purification par affinité en tandem et de spectrométrie de masse, deux autres études ont identifié les autres composants de la zone de transition. Ainsi, plus de 150 partenaires potentiels de Tectonic1, protéine codée par un gène muté chez des patients avec un syndrome de Joubert, ont été co-purifiés dans les cellules NIH3T3, notamment les protéines CEP290 et TMEM67 (Garcia-Gonzalo et al, 2011). La seconde étude réalisée dans les cellules IMCD3 a mis en évidence un complexe plus restreint de neuf protéines de la TZ (B9D1, B9D2, Tectonic 1 et 2 (TCTN1 et 2), MKS1, AHI1, CC2D2A, TMEM231, TMEM17), elles aussi codées par des gènes mutés chez des patients présentant des syndromes JBTS ou MKS (Chih et al, 2012). De façon intéressante, RPGRIP1L (Williams et al, 2011), inversine (Sang et al, 2011) et CEP290 (Garcia-Gonzalo et al, 2011) sont co-purifiés à la fois avec les protéines du complexe NPHP et du complexe MKS/JBTS, suggérant un lien étroit entre ces complexes à la TZ.

### **B) Ces complexes régulent la composition du cil**

Le complexe NPHP, en association avec le complexe MKS/JBTS, jouerait à la zone de transition un rôle de « gatekeeper » ou barrière de filtration qui contrôlerait l'entrée et/ou la sortie des protéines dans le cil. En effet, l'absence des protéines NPHP (NPHP1-NPHP4-CEP290-RPGRIP1L) ou des protéines JBTS/MKS (TCTN1 et 2, CC2D2A, B9D1, TMEM231) dans différents modèles tels que *Chlamydomonas*, la souris ou *C elegans*, change la composition protéique du cil. Ceci entraîne par exemple la perte de récepteurs tels que Somatostatin receptor 3 (SSTR-3), ARL13B, Adénylate cyclase III (ACIII), polycystine-2 (Craig et al, 2010; Williams et al, 2008,2010 et 2011; Garcia-gonzalo et al, 2011 ; Chih et al, 2012), ainsi qu'une réduction de la présence de protéines membranaires telles que PC2 et des IFT au niveau des flagelles chez *Chlamydomonas* (Craig et al, 2010). La présence au cil primaire de ces protéines membranaires est nécessaire à l'activation de voies de signalisation spécifiques (Bishop et al, 2007, Choi et al, 2011; Larkins et al, 2011). Ainsi, une réduction d'ACIII au cil primaire chez les souris porteuses d'une mutation hypomorphe de *Ift144* entraîne des défauts de la voie Shh (Liem et al, 2012) et l'absence du récepteur de la vasopressine 2 (VPR2) au cil primaire des cellules épithéliales rénales invalidées pour des protéines BBS altère la réponse cellulaire à la vasopressine et la réabsorption de l'eau (Marion et al, 2011). En effet, les cellules épithéliales du canal collecteur concentre l'urine en réponse à la vasopressine, qui se lie à VPR2. Ce récepteur est couplé à une adénylyl cyclase qui permet l'augmentation de l'AMP cyclique intracellulaire et entraîne la phosphorylation de l'aquaporine2 permettant la réabsorption de l'eau (Krishnan et al, 2008).





**Figure 10 : Les néphrocystines au cil primaire.** Les protéines codées par les gènes impliqués dans la néphronoptose partagent une localisation commune à la base du cil primaire où elles s'assemblent pour former différents modules: ATXN10/CEP290/IQCB1 au corps basal (gris), NPHP1/NPHP4/RPGRIP1L à la zone de transition (brun), et inversine/NPHP3/NEK8 au compartiment inversine (orange). Ces trois modules avec le complexe JBTS/MKS (violet) établissent une barrière qui sélectionne les cargos ciliaires et les assemblent aux IFTs pour les transporter dans le cil afin d'assurer la fonction et la maintenance du cil primaire. Les protéines de la seconde famille impliquée dans la NPH sont les protéines du complexe A des IFTs, nécessaire au transport rétrograde (orange). La composition protéique de la membrane ciliaire est contrôlée en partie par les complexes de protéines NPH et MKS et semble tissu-spécifique suggérant la variabilité des organes touchés dans la NPH. JBTS: syndrome de Joubert, MKS : syndrome de Meckel-Gruber.

Les défauts de taille ou de structure du cil primaire dus à l'absence des protéines NPHP semblent variable selon la protéine impliquée, le type cellulaire ou le tissu analysé (Sang et al, 2011; Shiba et al, 2009). Cette variabilité existe également pour les protéines des complexes MKS-JBTS (B9D1, TCTN1) et IFTA. De façon intéressante, chez *C. elegans*, la double invalidation des composants de la TZ tels que B9D1, B9D2, MKS1 ou MKS3 avec NPHP1, NPHP4 ou RPGRIP1L, entraîne des altérations de la TZ plus sévères que leur simple invalidation. L'ensemble de ces données suggère une redondance d'activité entre les complexes NPHP et JBTS/MKS ou entre les différentes protéines qui composent ces complexes (Chih et al, 2012; Garcia-gonzalo et al, 2011 ; Williams et al, 2008, 2010, 2011; Huang et al, 2011; Warburton-Pitt et al, 2012). On peut ainsi imaginer que chez l'homme, un mécanisme similaire entraîne l'atteinte variable des organes altérés.

### **3-1-2 Rôle dans l'adressage des protéines au cil primaire**

L'adressage contrôlé des protéines au cil est essentiel à sa fonction. Ainsi, la TZ agissant comme barrière de filtration, la majorité des protéines ne peut pas rentrer dans le cil par simple diffusion. Plusieurs modèles d'adressage des protéines au cil primaire ont été décrits.

Le principal modèle impliqué dans ce processus est le mécanisme d'exocytose des vésicules de l'appareil de Golgi vers la base du cil (Rosenbaum et Witman, 2002; Pazour et Bloodgood, 2008). Les études d'ultrastructure en microscopie (Bouck, 1971), couplées aux études de "Pulse-Chase" de la rhodopsine dans le photorécepteur de la grenouille (Papermaster et al, 1985), supportent ce modèle. Ce trafic vésiculaire requiert des éléments clés tels que la GTPase Rab8, le facteur d'échange GDP/GTP Rabin8 et le complexe de l'exocyste (Deretic et al, 1995; Huber et al, 1993) pour permettre aux vésicules post-Golgi de s'ancrer et de fusionner à la base du cil. En effet, l'absence de Rab8 dans les photorécepteurs de grenouille aboutit à une accumulation des vésicules transportant la rhodopsine à la base du cil connecteur (Moritz et al, 2001). De plus, la forme activée de Rab8 (Rab8-GTP) est nécessaire à la formation du cil des cellules RPE1 et un dominant actif de Rab8 entraîne la formation de cils plus longs (Nachury et al, 2007 Yoshimura et al, 2007). Le complexe protéique de l'exocyste est très conservé au cours de l'évolution et se compose de huit protéines (Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70, Exo84) initialement identifiées chez *Saccharomyces cerevisiae* (Novick et al, 1980). L'exocyste est un complexe dynamique formé de sous-unités associées à la membrane plasmique et de sous-unités associées aux vésicules, qui fonctionnent ensemble pour adresser et attacher les vésicules à des sites spécifiques de la membrane plasmique (He et Guo, 2009). L'exocyste se localise au niveau du cil primaire (Rogers et al, 2004), est nécessaire à la ciliogenèse (Zuo et al, 2009) et interagit génétiquement et biochimiquement avec la polycystine-2 et les IFTs (Fogelgren et al, 2011). Des études réalisées chez la levure ont également impliqué les GTPases Rho dans la

fonction de l'exocyste (Guo et al, 2001) et notamment Cdc42 dans la régulation de l'exocytose polarisée, par son interaction avec des composant de l'exocyste (Zhang et al, 2001). Par ailleurs, certaines néphrocystines telles que IQCB1/NPHP5 interagissent avec Sec3, Sec8 et Sec10, ce qui pourrait aider à son recrutement au niveau de la base du cil et favoriser le trafic membranaire à travers le cil (Sang et al, 2011).

Un autre acteur du trafic vésiculaire vers le cil primaire est le BBSome (Nachury et al, 2007). En effet, ce complexe protéique situé à la base du cil primaire interagit via BBS1 avec Rabin8, activant la GTPase Rab8 (Hattula, et al, 2002). Ainsi, Le BBSome est requis pour l'adressage de récepteurs ciliaire tels que SSTR3 ou MCHR1 (melanin-concentrating hormone receptor 1) dans les neurones (Berbari et al, 2008). Par ailleurs, le BBSome semble servir d'adaptateur entre les cargos protéiques et les protéines IFTs afin de garantir un transport sélectif de protéines dans le cil primaire. Une étude chez *C. elegans* a démontré que les protéines orthologues de BBS7 et BBS8 sont présents tout le long de l'axonème et sont essentielles à la cohésion des complexes IFTA et IFTB (Ou et al, 2005). Par ailleurs, trois des protéines BBS (BBS6, 10 et 12), ne faisant pas partie du BBSome, jouent un rôle de protéines chaperonnes en interagissant avec les protéines du complexe CCT (chaperonin containing TCP1) (CCT1, 2, 3, 4, 5 et 8), afin de favoriser l'assemblage du BBSome (Seo et al, 2010).

Un autre mode d'adressage des protéines à l'intérieur du cil primaire, serait la diffusion latérale. Ainsi, les protéines rejoignant d'abord la membrane plasmique, diffuserait latéralement à travers la barrière de filtration pour entrer dans le cil. Cette possibilité a été suggérée par l'étude de Hunnicutt et collaborateurs, montrant que dans le flagelle des gamètes de *Chlamidomonas* le renouvellement de l'agglutinine nécessaire au maintien de l'adhésion du flagelle, se fait à partir des molécules présentes à la membrane plasmique et qui entrent dans le cil en traversant la barrière de filtration (Hunnicutt et al, 1990).

La compréhension des mécanismes moléculaires d'adressage des protéines au cil primaire nécessite l'identification des signaux d'adressage au cil (CTS pour ciliary targeting signals) dans les séquences des protéines. Ainsi quelques CTS ont été identifiés dans des protéines telles que la rhodopsine, la cystine, la polycystine-2, la fibrocystine ou encore SSTR3 (Revue dans (Nachury et al, 2010). Récemment, il a été montré que la myristoylation de NPHP3 sur le résidu Glycine en position 2 de la séquence protéique permet son interaction avec la protéine UNC119B. Ce complexe est ensuite adressé au cil primaire où la GTPase Arl3 activée interagit avec UNC119B, permettant le relargage de NPHP3 dans le cil primaire. Enfin, la protéine GAP RP2 (Retinitis Pigmentosa 2) favorise l'hydrolyse d'ARL3 GTP, libérant ainsi UNC119B qui peut alors être recyclé (Wright et al, 2011).

### 3-1-3 Rôle spécialisé du cil dans différent tissus

Le cil primaire est une antenne spécialisée dans la détection et la réponse à l'environnement extracellulaire, c'est pourquoi certains organes sensoriels utilisent des structures dérivées du cil primaire. Ces structures ciliaires sont ainsi capables de photosensation, de chémosensation, de mécanosensation d'osmosensation, de thermosensation, de sensations hormonales et olfactives.

#### A) Le cil primaire mécano-senseur du flux urinaire

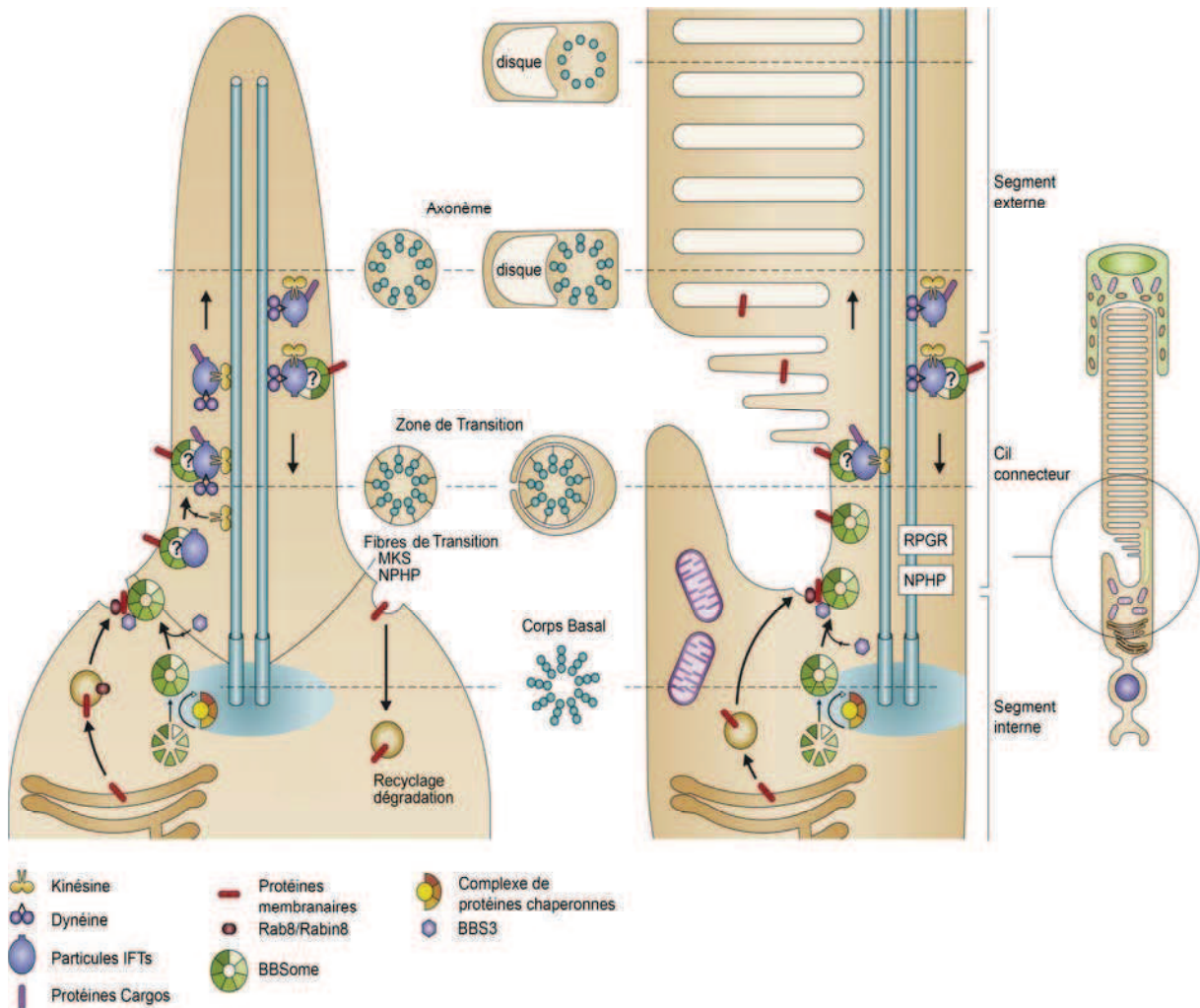
Au niveau des tubules du rein, la flexion du cil en réponse à l'écoulement urinaire génère un flux calcique intracellulaire (Praetorius et al, 2001). Ce phénomène dépend de la formation du complexe polycystine-1/polycystine-2 (PC1/PC2) qui forme un canal calcique à la membrane du cil primaire (Nauli et al, 2003). Cette entrée de calcium extracellulaire libère le calcium intracellulaire retenu au niveau du reticulum endoplasmique, augmentant la concentration calcique intracellulaire, permettant de réguler les voies de signalisation liées à la régulation du cycle cellulaire. L'absence de PC1 ou PC2 ou de la protéine PKHD1 (dont le gène est muté dans l'ARPKD) interrompt la signalisation calcique, ce qui aboutit à des défauts entraînant l'apoptose ou la prolifération cellulaire (Wang et al, 2007). La néphrocystine NEK8 interagit avec PC2, régule son expression et sa phosphorylation et semble ainsi fonctionner en complexe avec PC1/PC2 (Sohara et al, 2008). D'autre part, IQCB1 et inversine possèdent des domaines IQ (Figure 9 p.31) et pourraient jouer un rôle dans la signalisation calcique en s'associant avec des protéines sensibles aux ions  $Ca^{2+}$  comme la calmoduline (Yasuhiko et al, 2001; Morgan et al, 2002, Otto et al, 2005). De façon intéressante, le complexe inversine/calmoduline se dissocie en présence d'une forte concentration de  $Ca^{2+}$  intracellulaire (Yasuhiko et al, 2001) suggérant que l'activité de l'inversine est modulée par le flux calcique. En effet, la flexion du cil sous l'effet du flux augmente le niveau d'expression de l'inversine ce qui pourrait réguler le "switch" entre les voies Wnt canonique et Wnt/PCP (Simons et al, 2005). Cependant, les cils des cellules rénales de la souris *inv/inv* ne présentent pas de défauts dans la flexion du cil et l'entrée du flux calcique, suggérant une activité de l'inversine en aval de l'entrée de calcium (Shiba et al, 2005).

#### B) Le photorécepteur

Le photorécepteur des vertébrés est un neurone sensoriel polarisé composé d'un segment interne et d'un segment externe reliés par un cil primaire (9+0) très spécialisé: le cil connecteur (Figure 11). La synthèse du matériel nécessaire à la formation, la maintenance et la fonction du segment externe, est réalisée dans le segment interne du photorécepteur. En conséquence, les IFT sont indispensables au transport des protéines "cargos" tels que l'opsine, la rhodopsine ou l'arrestine à travers le cil connecteur et essentiels à la survie du photorécepteur (Marszalek et al, 2000 ; Pazour et al, 2002). En effet, les souris mutantes pour *Ift88*, *Kif3a* ou *Tulp1* (gène muté chez les patients avec rétinite pigmentaire dont la protéine est impliquée dans le transport des protéines du segment interne

vers le segment externe du photorécepteur), présentent une accumulation des protéines "cargos" dans le segment interne, aboutissant à l'augmentation de la mort des photorécepteurs par apoptose caractéristique de la dégénérescence rétinienne (Adams et al, 2007; Marszalek et al, 2000 ; Pazour et al, 2002; Hagstrom et al, 2012).

A la base du cil connecteur, le BBSome et les protéines des complexes NPHP-MKS-JBTS, joueraient un rôle d'adaptateur entre les IFTs et les protéines cargos cytoplasmiques et membranaires (Figure 11). En effet, de nombreuses néphrocystines (NPHP1, NPHP4, IQCB1, CEP290 et SDCCAG8) sont localisées au niveau du cil connecteur et du segment externe des photorécepteurs (Roepman et al, 2005 ; Fliegauf et al, 2006 ; Otto et al, 2005 ; Chang et al, 2006 ; Otto et al, 2010) où elles interagissent avec d'autres protéines mutées dans la rétinite pigmentaire (RP3-RPGR-RPGRIP1) (Dryja et al, 2001; Roepman et al, 2000 et 2005 ; Boylan et al, 2000; Otto et al, 2005 et 2010; Chang et al, 2006 ). Ensemble, elles participent au trafic vésiculaire dépendant de Rab8 et du BBSome pour l'adressage de la Rhodopsine et de l'opsine (entre autre) à la base du cil connecteur et son transport vers le segment externe (Figure 11) (Kim et al, 2008 ; Tsang et al, 2008; Deretic et al, 1995; Khanna et al, 2009). Chez le *Xénope*, l'utilisation d'un dominant négatif de Rab8 (T22N) empêche l'ancrage et la fusion des vésicules transportant la rhodopsine, entraînant la mort cellulaire (Moritz et al, 2001). De même, plusieurs souris mutantes pour les néphrocystines présentent des dégénérescences rétiniennes (Tableau 2 p45). Ces données démontrent un mécanisme moléculaire à l'origine de la dégénérescence rétinienne que l'on retrouve associée dans 15% à une NPH.

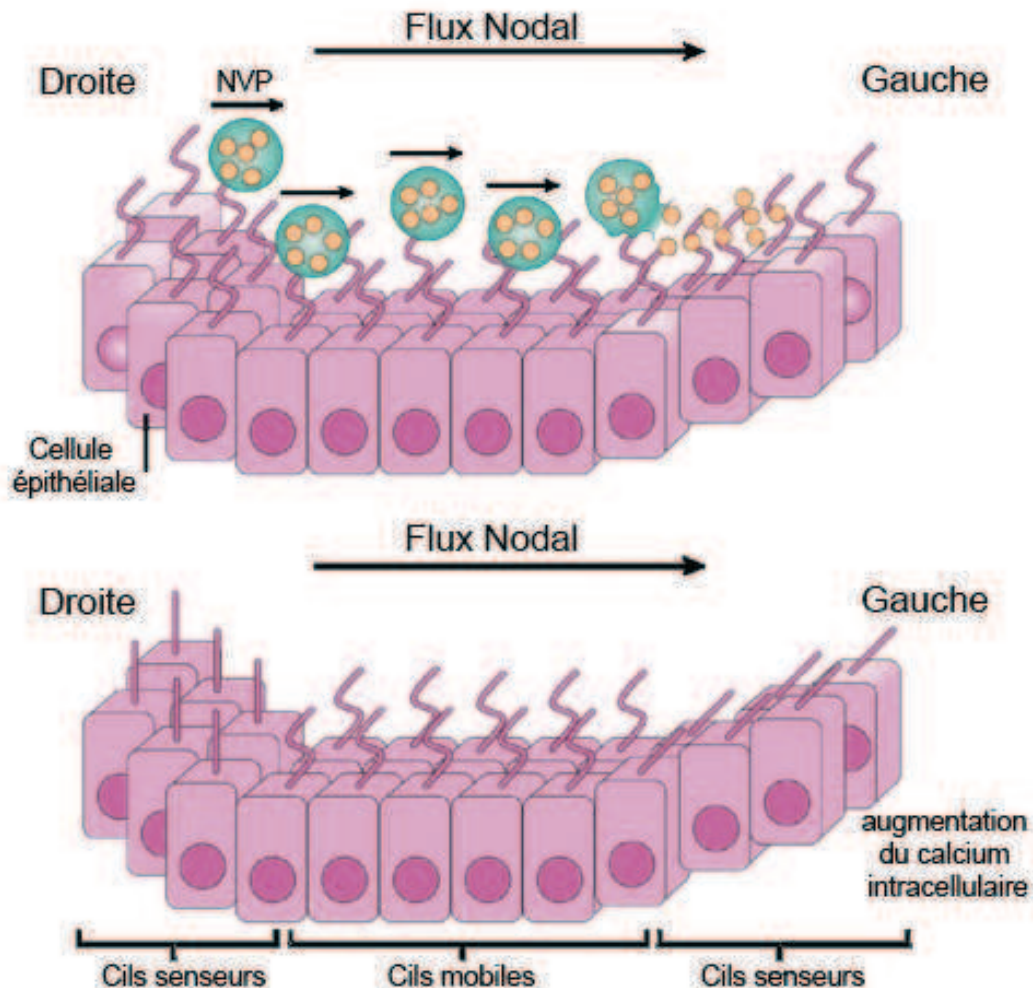


**Figure 11 : Le cil connecteur du photorécepteur est un cil primaire spécialisé.** Le cil connecteur du photorécepteur présente une structure comparable au cil primaire classique. Le corps basal est localisé dans la partie distale du segment externe et est entouré de la région péricentriolaire. L'axonème s'allonge à partir du corps basal au niveau de la zone de transition dont les liens-Y font le lien entre les microtubules et la membrane plasmique comme pour une TZ classique. La TZ s'étend jusque dans la région formée de disques du segment externe du photorécepteur (Arikawa et Williams, 1993 ; De Robertis et al, 1956 ; Rohlich et al, 1975). L'axonème est constitué de doublet de microtubules disposés en 9+0, mais dans la partie terminale distale les doublets de microtubules perdent les sous-unités  $\beta$  et ne forment plus que des simplets (Roof et al, 1991; Steinberg and Wood, 1975). L'axonème de 9 simplets s'étend sur toute la longueur du segment externe dans les cônes alors qu'il ne s'étend que sur la moitié de la hauteur du segment externe des bâtonnets. Des protéines dédiées à la fonction et au trafic vers le cil connecteur sont localisées à la membrane dans la poche ciliaire. Adapté de (Mockel et al, 2011)

### C) La détermination de la latéralité.

Le *situs inversus* (inversement des organes) est retrouvé chez plusieurs patients mutés pour *INVS* et *NPHP3* et dans les modèles murins invalidés pour *inv* ou *Nphp3* (Gagnadoux et al, 1989, Bergman et al, 2008; Yokoyama et al, 1993). D'autres mutants de protéines ciliaires présentent également des *situs inversus* tels que les IFTs (Ift88, Ift172), les moteurs moléculaires Kif3A/B et les dynéines ou encore la polycystine 2 (Revue dans Norris et Grimes, 2012). De plus, la moitié des patients avec une dyskinésie ciliaire primitive présentent un *situs inversus* (Afzélius, 1976). Ainsi il existe un lien entre des défauts de fonction et de mobilité du cil et les défauts d'établissement de l'asymétrie gauche-droite. Dans le nœud embryonnaire, les cils des cellules décrivent un mouvement circulaire dans le sens des aiguilles d'une montre, engendrant un flux asymétrique vers la gauche qui aboutit à l'expression asymétrique de gènes autour du nœud embryonnaire, établissant le positionnement et la morphogenèse des organes (revue dans Nakamura et Hamada, 2012). Le mécanisme précis par lequel le flux aboutit à une rupture de la symétrie est inconnu. Cependant, il a été suggéré que le flux transporte vers la gauche de l'embryon des morphogènes tels que Shh ou Nodal, libres ou dans de petites vésicules (Nonaka et al, 1998; Okada et al, 1999; Hirokawa et al, 2006). Une autre théorie propose que deux types de cils, mobiles et non-mobiles, sont présents dans le nœud embryonnaire et que le flux engendré par les premiers exerce une pression mécanique sur la paroi gauche qui est ressentie par les seconds (McGrath et al, 2003; Tabin et Vogan, 2003) (Figure 12). De façon intéressante, le positionnement des cils des cellules du nœud embryonnaire dépend de la polarité planaire (PCP) (Maisonneuve et al, 2009; Song et al, 2010; Hashimoto et al, 2010 ; Antic et al, 2010) et des protéines de la voie Wnt/PCP tels que Dishevelled, Prickle2 (Hashimoto et al, 2010 ; Antic et al, 2010).

Des études récentes ont démontré qu'un flux calcique pourrait également jouer un rôle dans l'établissement de l'asymétrie gauche-droite. En effet, l'imagerie du calcium intracellulaire dans le nœud embryonnaire a révélé une distribution asymétrique de la signalisation calcique (McGrath et al, 2003; Tanaka et al, 2005). De plus les canaux calciques, polycystine-2 et polycystine-1 like 1 (Pkd111), sont nécessaires chez la souris pour l'expression asymétrique de Nodal dans la plaque latérale du mésoderme (Pennekamp et al, 2002; Field et al, 2011). Différentes études ont montré que l'inversine jouerait un rôle dans les mouvements corrects des cils du nœud embryonnaire (Okada et al, 1999; Watanabe et al, 2003) et qu'elle serait impliquée dans la perception du signal calcique, notamment par son interaction avec la calmoduline (Yasuhiko et al, 2001). NPHP3, quant à elle, interagit et colocalise avec l'inversine au cil primaire et est exprimée dans les cellules du nœud embryonnaire mais son implication dans la latéralisation n'est pas connue (Bergmann et al, 2008).



**Figure 12: Modèles de l'établissement de l'asymétrie gauche-droite au niveau du noeud embryonnaire.** Le premier modèle suggère que des particules vésiculaires nodales (NVP) sont sécrétées du côté droit du noeud et transportées vers la gauche par le flux généré par les cils mobiles. Ces particules transporteraient des morphogènes tels que Shh ou l'acide rétinoïque qui induirait l'activation des voies de signalisation appropriées dans les cellules du côté gauche du noeud embryonnaire. Le second modèle propose que deux types de cils sont présent dans le noeud embryonnaire. Les cils motile au centre génèreraient un flux vers la gauche qui seraient perçu par les cils non-mobile mécanosenseurs, engendrant l'augmentation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire et l'expression asymétrique de gènes. Adapté de (Fliegauf et al, 2007)



### 3-1-4 Cil primaire et cycle cellulaire

Dans les cellules en phase quiescente, le centriole père sert de plateforme pour la croissance de l'axonème. Lors de la division, les centrioles sont nécessaires à la formation des pôles du fuseau mitotique. Pour pouvoir réaliser cette fonction, le centriole doit pouvoir se détacher du cil (Pan et Snell, 2007). La ciliogenèse et le cycle cellulaire sont interdépendants. En effet, le cil s'assemble au cours de la phase G1 puis reste présent en phase G0 ou phase de quiescence, il est ensuite désassemblé avant l'entrée en mitose. Deux mécanismes qui doivent coexister permettent le désassemblage du cil. Le plus rapide est la déciliation par cassure du cil (Rasi et al, 2009 ; Parker et al, 2010). Le second mécanisme est la résorption active du cil, aboutissant à un désassemblage de l'axonème depuis la pointe jusqu'à la base du cil. Ce processus est initié par la kinase centrosomale Aurora A qui interagit avec HEF1 (enhancer of filamentation 1), entraînant la phosphorylation et l'activation de la tubuline déacétylase HDAC6 (Pugacheva et al, 2007 ; Hubbert et al, 2002). La diminution de l'acétylation de la tubuline réduit la stabilité des microtubules, favorisant le désassemblage du cil.

#### A) Régulation du cycle cellulaire par les protéines de ciliopathies

Plusieurs études ont montré le lien entre les protéines de ciliopathies, notamment les néphrocystines, et la régulation du cycle cellulaire. L'inversine, NPHP1 et NPHP4 changent de localisation en fonction du cycle cellulaire, d'abord cytosoliques puis à la base du cil primaire dans les cellules qui se polarisent, elles se localisent aux pôles du fuseau mitotique des cellules en division (Morgan et al, 2002 ; Mollet et al, 2005). CEP290 participerait à la régulation du cycle cellulaire via l'interaction et l'activation du facteur de transcription ATF4, impliqué dans des réponses au stress, la prolifération et la différenciation des os (Sayer et al, 2006; Ma et al, 2006). NEK8 fait partie de la famille des Neks, (NIMA related kinase). Les kinases Polo, Aurora et Neks sont les trois familles de kinases mitotiques impliquées dans la régulation de la progression du cycle cellulaire (O'Connell et al, 2003). De plus, NEK8 participe et régule le complexe PC1/PC2, qui joue un rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire. En effet, l'hyperprolifération cellulaire semble être le mécanisme prédominant de l'augmentation de la taille des reins chez les patients PKD (Ong et Harris, 2005). L'expression de PC1 active la voie de signalisation JAK-STAT (Janus-Associated Kinase-Signal Transducers and Activators of Transcription), surexprimant ainsi p21 (CDKN1A), un inhibiteur des kinases cyclines-dépendantes, aboutissant à l'arrêt du cycle cellulaire en G0/G1 (Bhunja et al, 2002). L'arrêt du cycle cellulaire requiert également PC2. L'implication de la régulation du cycle cellulaire dans le développement des maladies kystiques rénales a été confirmée par le fait que dans deux modèles murins de polykystose, *jck* et *cpk*, une réduction des lésions kystiques rénales est observée lorsque les animaux sont traités avec un inhibiteur des kinases cyclines-dépendantes : la roscovitine (Bukanov et al, 2006)

## **B) Désassemblage du cil par les protéines de ciliopathies**

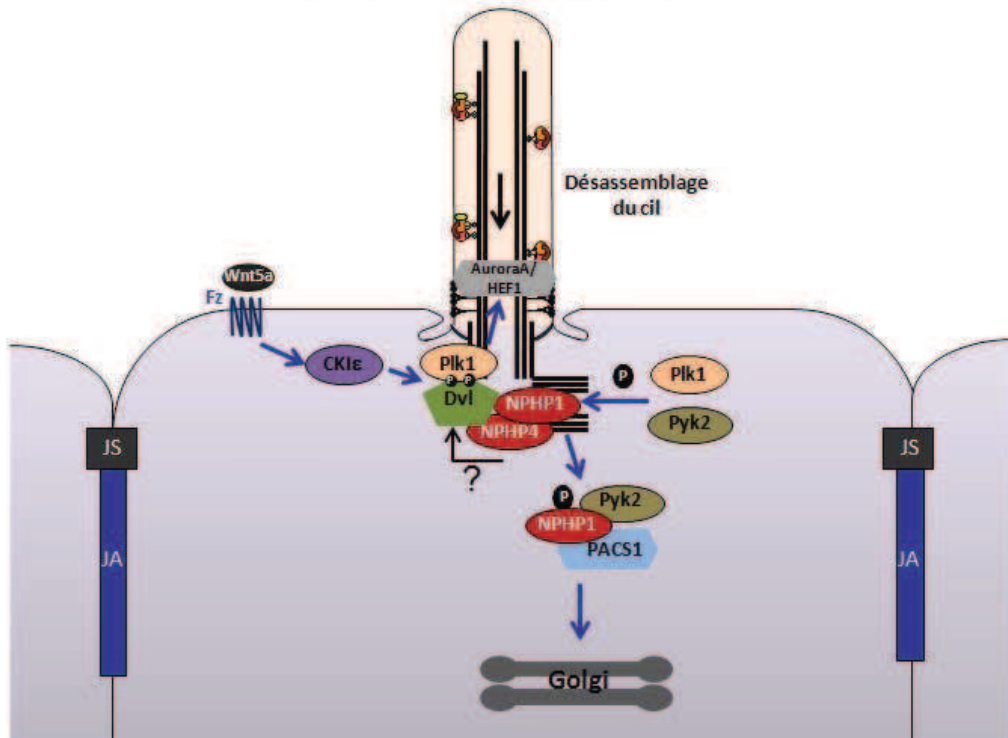
Récemment, la kinase Polo-like 1 (Plk1), connue pour être un régulateur du cycle cellulaire, a été décrite comme un lien entre la voie non canonique (Wnt/PCP) dépendante de Wnt5a-CKIε-Dvl2 et le complexe de désassemblage du cil HEF1/AuroraA (Lee et al, 2012) (Figure 13). De façon intéressante, Plk1 est localisée à la zone de transition où elle interagit et phosphoryle NPHP1 sur son résidu T87 (Seeger-Nukpezah et al, 2012). Ceci suggère que NPHP1 jouerait un rôle dans le désassemblage du cil, bien que le rôle joué par NPHP1 phosphorylée dans l'activation du complexe HEF1/AuroraA reste à déterminer. La phosphorylation de NPHP1, notamment par la tyrosine kinase Pyk2 (proline-rich tyrosine kinase 2), favorise son interaction avec la protéine de transport PACS1 (pour Phosphofurin Acidic Cluster Sorting 1) et entraîne sa délocalisation de la TZ vers le Golgi (Liebau et al, 2011) (Figure 13). De plus, HEF1, un homologue de la protéine adaptatrice des adhésions focales p130Cas, connu pour être un partenaire de NPHP1 et NPHP4, se localise au niveau de la TZ des cellules respiratoires humaines (Fliegauf et al, 2006). On peut supposer que NPHP1 et NPHP4 jouent un rôle de senseur du signal du désassemblage du cil à la TZ et que leur régulation par Plk1 et/ou Pyk2 permettrait de déclencher et de faciliter l'entrée de la cellule dans le cycle cellulaire. NPHP1 et NPHP4 pourraient également être des régulateurs négatifs de p130Cas et HEF1 à la TZ, pour garantir le maintien de la structure du cil primaire.

### **3-1-5 Le poisson zèbre modèle d'étude de la fonction ciliaire**

Le poisson zèbre est un modèle d'étude idéal pour l'analyse des gènes ciliaires. En effet, ce modèle possède de nombreux organes ciliés et il y est facile d'invalider les gènes par injection d'oligo antisens (morpholinos) au stade 1-2 cellules de l'embryon. Plusieurs phénotypes de ciliopathies peuvent y être phénocopiés tels que les anomalies de la rétine, les kystes du pronéphros, les défauts de latéralité et de mouvements de convergence/extension (CE) (Tableau 2 p45).

Les défauts de latéralité chez le poisson zèbre sont dus à la réduction de la taille des cils, à l'absence de leur mobilité ou à l'absence totale de la vésicule de Kupffer (KV). La KV est une structure transitoire constituée d'un épithélium cilié qui permet la détermination gauche-droite. Les cils motiles de la KV génèrent un fluide unidirectionnel (dans le sens contraire des aiguilles d'une montre) dans la région antéro-postérieure qui détermine l'asymétrie gauche-droite (Kreiling et al, 2007; Okabe et al, 2008).

## Les néphrocystines et le désassemblage du cil



**Figure 13 : Les néphrocystines et le désassemblage du cil.** L'activation de la voie Wnt PCP entraîne l'interaction et la phosphorylation de Dishevelled avec la kinase Polo-like 1 (Plk1). Ce complexe stimule le désassemblage du cil par le complexe AuroraA/HEF1. Les kinases Plk1 et Pyk2 phosphorylent NPHP1 ce qui entraîne sa délocalisation de la zone de transition vers le Golgi. Le rôle du complexe des néphrocystines sur la régulation du désassemblage du cil reste à déterminer.

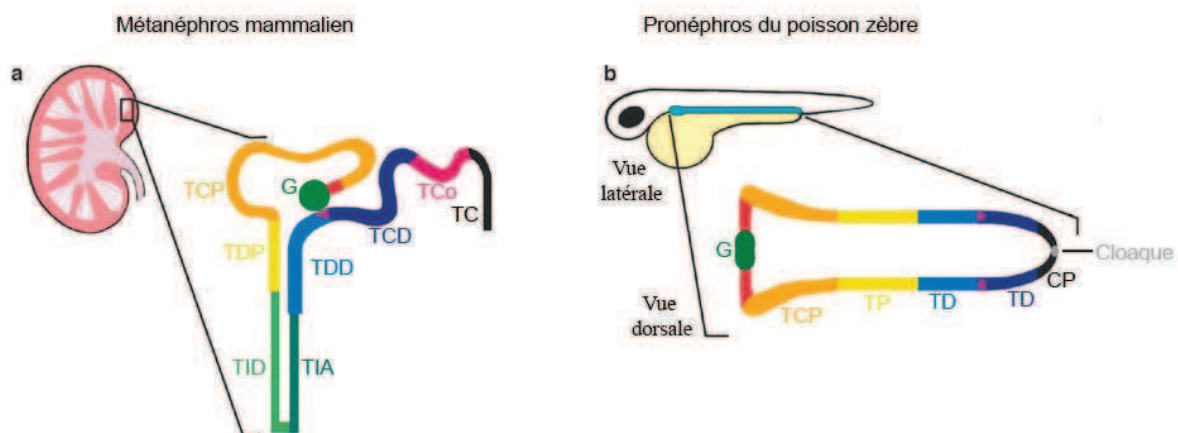
**Tableau 2 : Gènes et fonctions des protéines impliquées dans les maladies associées à la NPH et phénotypes des modèles animaux.**

| Gène            | Protéine        | Localisation subcellulaire <sup>(4,58,26)</sup> | Fonctions <sup>(4,26,35,58-60)</sup>  | Modèles  |  |
|-----------------|-----------------|---|---|--|--|
|                 |                 |   |   | Poisson zèbre  | Souris <sup>(61)</sup>   |
| <i>NPHP1</i>    | néphrocystine-1 | BB, TZ, cil, jonctions cellulaires              | Formation et fonction de TZ, régulateur jonctions cellulaires   | kystes pronéphriques, obstruction cloaque, défauts CE <sup>(42)</sup>  | dégénérescence rétinienne, stérilité des mâles ( <i>Nphp1<sup>tm1.thung</sup></i> ) ; dégénérescence rétinienne ( <i>Nphp1<sup>tm1jgg</sup></i> )          |
| <i>INVS</i>     | néphrocystine-2 | BB, compartiment Inv, membrane apical, noyau    | Ancrage de NPHP3 et NEK8, inhibiteur Wnt canonique et activateur PCP, régulateur cycle cellulaire         | kystes pronéphriques, défauts de latéralité et CE <sup>(36)</sup>  | <i>situs-inversus</i> , jaunisse, reins kystiques augmentés ( <i>invs<sup>inv</sup></i> )  |
| <i>NPHP3</i>    | néphrocystine-3 | compartiment Inv, noyau, jonctions cellulaires  | Modulateur de Wnt canonique/ Wnt PCP, fonction ciliaire   | hydrocéphalie, kystes pronéphriques, défauts de latéralité et CE <sup>(62)</sup>                                       | reins kystiques ( <i>Nphp3<sup>pcy</sup></i> ) ; défauts de latéralité, défauts du cœur, embryonnaire létalité ( <i>Nphp3<sup>tm1Cbe</sup></i> )           |
| <i>NPHP4</i>    | néphrocystine-4 | BB, TZ, cil, jonctions cellulaires              | Formation et fonction de TZ, inhibiteur Wnt canonique et activateur PCP, régulateur jonctions cellulaires | kystes pronéphriques, obstruction cloaque, défauts de latéralité et CE, anomalies rétinienne <sup>(38,42)</sup>        | stérilité des mâles, dégénérescence rétinienne ( <i>Nphp4<sup>nmf192</sup></i> )   |
| <i>IQCB1</i>    | néphrocystine-5 | BB, cil, jonctions cellulaires                  | complexe RPGR/calmoduline, ciliogenèse  | hydrocéphalie, kystes pronéphriques, défauts de latéralité et CE <sup>(63)</sup>                                       | non établi   |
| <i>CEP290</i>   | CEP290          | TZ, BB  | Formation et fonction de TZ, trafic complexe RPGR, fonction ciliaire, modulateur positif de Hh            | défauts CE, kystes pronéphriques, défauts rétiens et cérébelleux <sup>(64)</sup>                                       | anosmie, dégénérescence rétinienne ( <i>Cep290<sup>rd16</sup></i> ); hypoplasie cérébelleuse, dégénérescence rétinienne ( <i>Cep290<sup>tm1jgg</sup></i> ) |
| <i>GLIS2</i>    | GLIS2           | cil, noyau                                      | facteur de Transcription, modulateur négatif de Hh et Wnt canonique                                       | non établi   | atrophie et fibrose rénales ( <i>Glis2<sup>tm1Amj</sup></i> ) ; ( <i>Glis2<sup>tm1Tre</sup></i> )  |
| <i>RPGRIP1L</i> | RPGRIP1L        | TZ, cil, jonctions cellulaires                  | Formation et fonction de TZ, modulateur de Hh et Wnt canonique/Wnt PCP                                    | hydrocéphalie, défauts de latéralité et CE <sup>(40)</sup>   | exencéphalie, polydactylie, défauts de latéralité, reins kystiques, létalité à la naissance ( <i>Rpgrip1L<sup>tmUrt</sup></i> )                            |
| <i>NEK8</i>     | NEK8            | compartiment Inv, BB                            | Modulateur de PC1 et PC2, régulateur cycle cellulaire   | kystes pronéphriques, défauts latéralité et CE <sup>(65)</sup>   | reins kystiques ( <i>Nek8<sup>ck</sup></i> )   |
| <i>SDCCAG8</i>  | SDCCAG8         | BB, TZ, jonctions cellulaires, foci nucléaires  | fonction ciliaire   | kystes pronéphriques, hydrocéphalie, défauts CE <sup>(66)</sup>  | non établi   |
| <i>TMEM67</i>   | TMEM67          | membrane ciliaire, TZ, jonctions cellulaires    | Formation et fonction de TZ, transport intraciliaire  | kystes pronéphriques, défauts formation des yeux et CE <sup>(67)</sup>   | reins kystiques, létalité postnatale ( <i>Tmem67<sup>tm1Dgen</sup></i> )   |
| <i>TTC21B</i>   | IFT139          | BB, cil   | transport rétrograde et fonction ciliaire, modulateur négatif de Hh                                       | défauts CE <sup>(9)</sup>  | polydactylie, côtes fendues ou fusionnées, défauts du tube neural, des yeux et du prosencéphale, létalité embryonnaire ( <i>Ttc21b<sup>aln</sup></i> )     |
| <i>WDR19</i>    | IFT144          | BB, cil   | transport rétrograde et fonction ciliaire, modulateur négatif de Hh                                       | non établi   | exencéphalie, dysplasie squelettique, anophtalmie, surdité ( <i>Ift144<sup>hrt</sup></i> )   |
| <i>IFT140</i>   | IFT140          | BB, cil   | transport rétrograde et fonction ciliaire, modulateur de Hh/Wnt/Hippo <sup>(8)</sup>                      | non établi   | reins kystiques ( <i>Ift140<sup>HoxB7-Cre</sup></i> ) <sup>(8)</sup>   |
| <i>CEP164</i>   | CEP164          | BB, foci nucléaires <sup>(6)</sup>              | réponse aux dommages de l'ADN <sup>(6)</sup>  | kystes pronéphriques, hydrocéphalie, dysplasie rétinienne, défauts de latéralité et CE, mort cellulaire <sup>(6)</sup> | non établi   |

Défauts de Convergence-Extension (CE): axe du corps courbé et raccourci, notochorde large et plié, somites difformes; BB: corps basal ; TZ: zone de transition; Hh: voie Hedgehog ; PCP: polarité planaire ; PC1: polycystine-1 ; PC2 : polycystine-2, RPGR : retinitis pigmentosa GTPase regulator.

Le poisson zèbre est aussi un bon modèle pour étudier les gènes impliqués dans la polarité planaire (PCP). En effet, la PCP contrôle les mouvements de CE au cours de la gastrulation. Des défauts dans ce processus mènent au raccourcissement et la courbure de l'axe du corps, à un élargissement de la notocorde et la déformation des somites. Ces phénotypes sont également retrouvés dans les modèles de poissons invalidés pour les gènes de NPH (Tableau 2 p.47).

Le pronéphros du poisson zèbre est un rein rudimentaire formé d'un glomérule vascularisé et de deux néphrons qui se rejoignent au niveau du cloaque (Figure 14). L'épithélium pronéphrique est composé à la fois de cils motiles et non motiles. Les défauts de motilité ou de battement ciliaire altèrent l'écoulement du flux urinaire et aboutit à la formation de kystes pronéphriques. En effet, la perte de fonction des IFT (IFT57, IFT81, IFT172) et des protéines ciliaires (polycystine-2, inversine, NPHP3, CEP290/NPHP6) dans l'embryon du poisson zèbre aboutissent à des kystes dans le pronéphros (Kramer-Zucker et al, 2005 ; Obara et al, 2006 ; Sayer et al, 2006 ; Sun et al, 2004, Tsujikawa et Malicki 2004 ; Zhou et al, 2010 ; Simons et al, 2005). De même, l'inactivation de certaines protéines de polarité cellulaire (Scribble, Crb2b), entraîne l'apparition de kystes dans le pronéphros (Skouloudaki et al, 2009, Omori et al, 2006) (Tableau 2 p.47).



**Figure 14 : Comparaison de l'unité de filtration chez les mammifères et le poisson zèbre.** (a) Représentation schématique d'un rein de mammifère et de l'organisation du néphron, unité de filtration du rein. (b) Vue latérale d'une représentation schématique d'un embryon de poisson zèbre avec l'unité de filtration du poisson : le pronéphros (bleu). L'agrandissement montre une vue dorsale du pronéphros avec son organisation segmentée. Pour les deux représentations le code couleur montre l'analogie entre les différents segments. Abréviations: G: glomérule; TCP: tubule contourné proximal; TDP: tubule droit proximal; TID: branche descendante du tube intermédiaire; TIA: branche ascendante du tube intermédiaire (ou Anse de Henlé); TDD: tube droit distal; TCD: tubule contourné distal; TCo: tubule connecteur; TC: tube collecteur; TP: tube proximal; TD: tube distal; CP: canal pronéphrique. Adapté de (Wingert et Davidson, 2008).

## ***3-2 Fonction non ciliaire des néphrocystines.***

### **3-2-1 Localisation des néphrocystines aux jonctions cellulaires**

En plus de leur localisation au cil primaire, NPHP1, inversine et NPHP4 se localisent aux jonctions cellulaires dans les cellules épithéliales rénales (Donaldson et al, 2000; Morgan et al, 2002 ; Mollet et al, 2005). En effet, des études ont montré une localisation de la protéine NPHP1 stablement surexprimée dans les cellules épithéliales MDCK polarisées, au niveau des jonctions adhérentes (Donaldson et al, 2000). De plus, une étude réalisée au laboratoire a montré la localisation subcellulaire au niveau des jonctions adhérentes de NPHP4 endogène dans les cellules MDCK. Ces cellules polarisées présentent une distribution subcorticale de NPHP4 qui co-localise avec les microtubules le long de l'axe apico-basolatéral (Mollet et al, 2005). De façon intéressante, l'interaction entre NPHP1 et NPHP4 semble requise pour la localisation de NPHP1 aux jonctions adhérentes. En effet, lorsque les derniers résidus de sa séquence protéique qui permettent l'interaction avec NPHP4 sont délétés (Mollet et al, 2005), NPHP1 n'est plus localisée aux jonctions adhérentes (Donaldson et al, 2002). L'ensemble de ces données suggèrent un rôle des néphrocystines dans l'adhésion ou la polarité cellulaire.

### **3-2-2 Interaction des NPHP avec les protéines des jonctions cellulaires**

Les néphrocystines interagissent avec des composants des jonctions adhérentes et des adhésions focales (Otto et al, 2000; Benzing et al, 2001; Donaldson et al, 2000 et 2002; Mollet et al, 2005 ; Eley et al, 2008). En particulier, l'étude réalisée au laboratoire par une double approche de criblage de banques peptidiques et de double hybride, a montré que le domaine SH3 de NPHP1 est capable de se lier : i) avec les protéines adaptatrices p130Cas et Efs (Embryonic Fyn Substrate), présentes au niveau des adhésions focales et phosphorylées en réponse au recrutement des intégrines; ii) avec une nouvelle protéine Rho-GAP (Grit), régulant les GTPases Rho impliquées dans les remaniements du cytosquelette lors des interactions des intégrines avec la matrice extracellulaire (MEC) et iii) avec la tyrosine kinase ACK1, effecteurs de Cdc42, qui co-précipitent avec l'intégrine  $\beta$ 1 et régulent de façon négative la formation des adhésions focales (Saunier et al., 2003). ACK1 et NPHP1 interagissent et co-localisent également à la membrane apicale des cellules des tubes collecteurs (Eley et al, 2008). D'autres études ont également montré l'interaction de NPHP1 avec p130cas (Donaldson et al, 2000 ; Hildebrandt et al, 2000 ; Eley et al, 2008), et leur co-localisation au niveau des jonctions adhérentes dans les cellules épithéliales rénales MDCK (Donaldson et al, 2000).

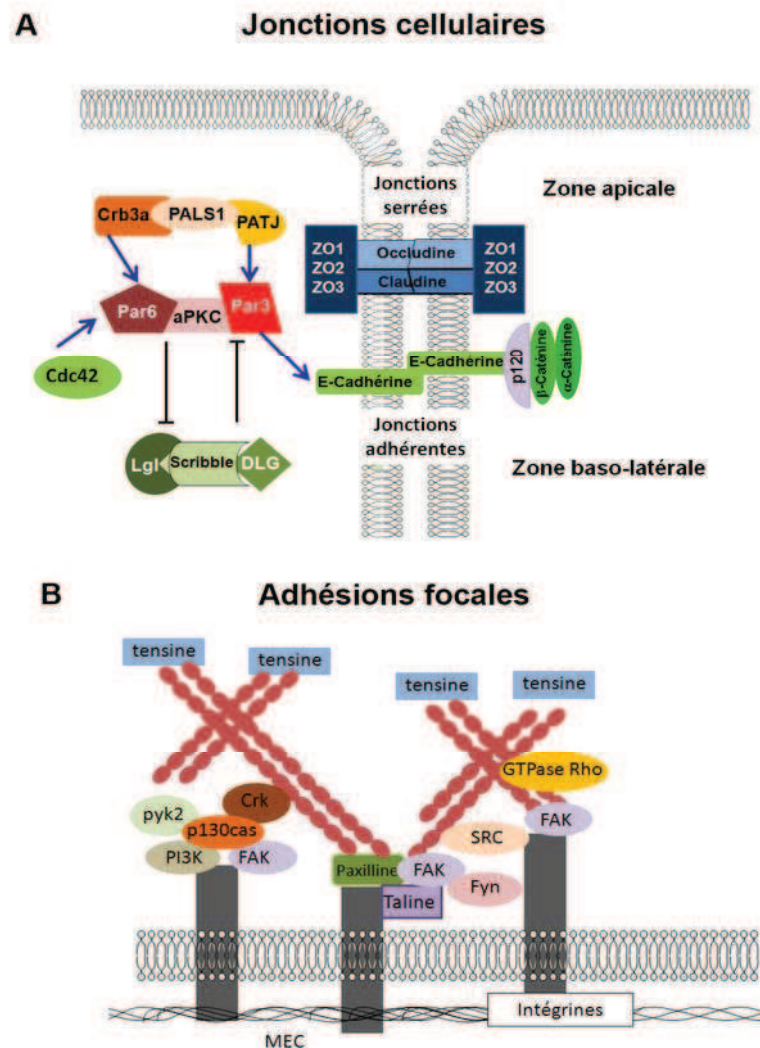
Par ailleurs, NPHP1 s'associe à la protéine kinase Pyk2 (proline-rich tyrosine kinase 2) qui régule les adhésions focales (Donaldson et al, 2002). Pyk2 est une protéine tyrosine kinase similaire à la kinase FAK, qui est activée par l'interaction des intégrines avec la MEC. Pyk2 est également activé par l'augmentation de la concentration du calcium intracellulaire (Benzing et al, 2001). Dans les cellules IMCD, la surexpression de NPHP1 aboutit à la relocalisation de Pyk2 à la membrane plasmique et à son activation par phosphorylation entraînant également l'activation des MAP kinases (Mitogen-Activated Protein Kinase) en aval (Benzing et al, 2001). De façon intéressante, il a été montré au laboratoire que NPHP4 interagit avec p130cas probablement via son interaction avec NPHP1 et qu'au contraire son interaction avec Pyk2 ne dépend pas de NPHP1 (Mollet et al, 2005). Les différentes interactions des néphrocystines avec les protéines des adhésions focales suggèrent qu'elles pourraient moduler leur activité.

Les néphrocystines interagissent également avec des protéines associées au cytosquelette d'actine telles que la tensine et les filamines (Donaldson et al, 2000 ; Benzing et al, 2001). L'ensemble de ces données suggèrent que les néphrocystines joueraient un rôle de protéines adaptatrices entre les protéines de signalisation et le cytosquelette d'actine au niveau des jonctions cellulaires permettant ainsi de renforcer et de maintenir l'adhésion des cellules épithéliales. En effet, l'invalidation du partenaire de NPHP1, la joubérine (Eley et al, 2008), dans les cellules épithéliales rénales entraîne une diminution de l'E-cadhérine aux jonctions cellulaires (Simms et al, 2012), suggérant que les jonctions adhérentes pourraient être déstabilisées.

### **3-2-3 Mise en place de la polarité apico-basale**

La stabilité de l'épithélium tubulaire rénal dépend de la polarisation correcte des cellules épithéliales. Celle-ci s'établit lors de la mise en place des interactions cellule-cellule et cellules-matrice extra-cellulaire (MEC). Les contacts cellules-cellules des jonctions adhérentes dépendent en particulier de l'E-cadhérine alors que les contacts cellule-MEC dépendent des protéines de la famille des intégrines. La protéine transmembranaire E-cadhérine interagit avec les protéines cytoplasmiques  $\alpha$ -caténine,  $\beta$ -caténine et p120 qui font le lien avec le cytosquelette intracellulaire. L'activation des intégrines au contact de la MEC permet la phosphorylation de la tyrosine kinase FAK qui se localise alors aux complexes des adhésions focales composés de protéines adaptatrices tels que la tensine, la vinculine, la paxilline et l' $\alpha$ -actinine. Ces complexes liés au réseau d'actine permettent le recrutement et l'association au niveau des adhésions focales, des molécules de signalisation tels que la protéine adaptatrice p130Cas, la tyrosine kinase Pyk2, la kinase Src, la GTPase Rho Cdc42 et la tyrosine kinase PI3K (Clark et al, 1995) (Figure 15). Ces étapes initient la formation des jonctions serrées qui déterminent les régions apicales et basolatérales des cellules. Ces jonctions serrées se composent des

protéines transmembranaires, telles que les claudines, l'occludine, des protéines cytoplasmiques *zona occludens* (ZO-1,2 et 3) et trois complexes macromoléculaires conservés à travers les types cellulaires et les espèces, qui participent à la délimitation de la polarité apico-basale : les complexes apicaux Par (Par3/Par6/aPKC) et Crumbs (PALS1/Patj/Crums) et le complexe baso-latérale SCRIB (Scrib/Dlg/Lgl) (Figure 15). La polarité apico-basale des cellules est essentielle au positionnement du noyau, de l'appareil de Golgi et du centrosome (Yeaman et al, 1999; Dupin et al, 2009).



**Figure 15 : Mise en place des complexes de polarité cellulaire.** A) Au niveau des jonctions adhérentes les contacts cellulaires latéraux permettent l'interaction des protéines transmembranaires E-cadhérine. Dans le cytoplasme, ces protéines interagissent avec les protéines  $\alpha$ -caténine,  $\beta$ -caténine et p120 qui font le lien avec le cytosquelette intracellulaire. Cette étape active la polarisation apicale et basolatérale des protéines membranaires mais aussi régule le positionnement du noyau, de l'appareil de Golgi et du centrosome (Yeaman et al, 1999; Dupin et al, 2009). Par la suite, la formation apicale des jonctions serrées établit une barrière paracellulaire entre les cellules épithéliales. Ces jonctions serrées



se composent des protéines transmembranaires, telles que les claudines et l'occludine, ou bien encore les protéines cytoplasmiques *zona occludens* (ZO-1,2 et 3). Trois complexes macromoléculaires conservés à travers les types cellulaires et les espèces, régulent la polarité apico-basale. Dans les cellules épithéliales les complexes Par (Par3/Par6/aPKC) et Crumbs (PALS1/Patj/Crumbs) sont apicaux et excluent le complexe SCRIB (Scrib/Dlg/Lgl) du compartiment apical et déterminent ainsi la membrane baso-latérale. La Rho GTPase Cdc42 coopère avec Par6 dans la formation des jonctions serrées. **B)** Les complexes protéiques au niveau des adhésions focales forment une large structure composée de protéines connectées entre elles. Au sein de ces complexes, FAK est l'un des points centraux de ces connexions en étant l'intermédiaire entre les signaux activateurs des intégrines et les autres protéines. Le nombre de protéines nécessite l'association de plusieurs protéines FAK pour permettre une bonne cohésion du système. FAK: focal adhesion kinase; Fyn: tyrosine kinase Fyn; p130<sup>Cas</sup>: protéine de 130 kDa associée à Crk (Crk-associated substrate); PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase; GTPase Rho telle que Cdc42; SRC: tyrosine kinase src. Adapté de (Cornillon et al, 2003 ; Genevet et Tapon, 2011).

### ***3-3 Voies de signalisation impliquant les néphrocystines***

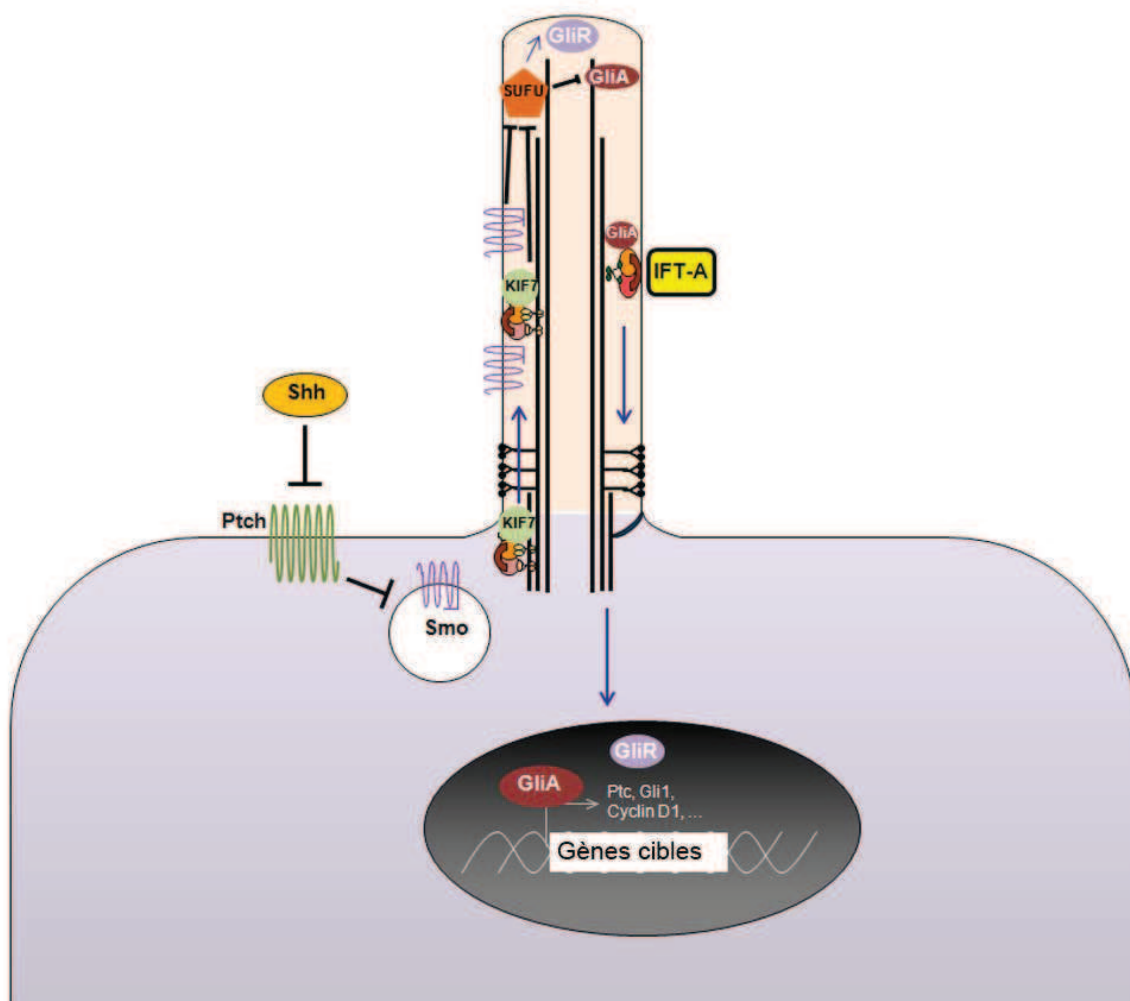
#### **3-3-1 La voie Hedgehog (Hh)**

La voie Hedgehog (Hh) régule le développement de nombreux organes chez les vertébrés et en particulier celui du tube neural et des membres. Chez les vertébrés, contrairement à la drosophile, la signalisation de la voie Hh a lieu au niveau du cil primaire; cependant les acteurs de la voie sont conservés (Figure 16). Les acteurs de la voie Hh se localisent dans le cil de façon très dynamique, ce qui souligne l'importance des complexes IFTA et IFTB pour la régulation de la voie. Les souris mutantes pour les protéines IFTBs (Ift172, Ift88 etc...) et la souris KO Ift144, qui n'ont plus de structure ciliaire, présentent des phénotypes de fermeture du tube neural ou de polydactylie, similaires aux phénotypes observés chez les mutants Shh (Haycraft et al, 2005 ; Huangfu et al, 2003; Liu et al, 2005; Houde et al, 2006 ; Liem et al, 2012). En revanche, les souris mutantes pour les IFTAs (Ift139, Ift122, Ift144 (mutation hypomorphe)) présentent des cils avec une structure anormale et une accumulation de protéines à leur extrémité (due au défaut de transport rétrograde) qui aboutit à une sur-activation de la voie Shh dans les cellules neurales (Qin et al, 2011; Tran et al, 2008; Cortellino et al, 2009; Ashe et al, 2012 ; Liem et al, 2012).

L'intégrité de la zone de transition semble également importante dans la régulation de la voie Hh. En effet, les souris *Tctn1*<sup>-/-</sup> et *Tctn2*<sup>-/-</sup> ou mutantes pour les protéines B9D1 et TMEM231, présentent des défauts du tube neural et une polydactylie (Reiter et al, 2006 ; Sang et al, 2011 ; Chih et al, 2011). *Tcnt1* et *Tcnt2* ont été décrits comme régulateur de la voie Shh (Reiter et al, 2006 ; Sang et al, 2011). L'absence de *Tcnt3* dans les fibroblastes de fœtus MKS aboutit à l'inhibition de la voie Shh

(Thomas et al, 2012). L'absence de *Rpgrip11* chez les souris *Ftm*<sup>-/-</sup> mène à une diminution de l'activation de la voie Hh entraînant une polydactylie et des défauts de développement du tube neural avec une absence des cellules du plancher et une forte réduction des progéniteurs des motoneurones et des interneurones V3 (Vierkotten et al, 2007). *Rpgrip11* contrôle la production des formes Gli répressives (Gli3R) qui sont nécessaires à la morphogenèse correcte du télencéphale et du bulbe olfactif (Vierkotten et al, 2007; Besse et al, 2011). NPHP7, ou Gli similar 2 (Glis2), est un facteur de transcription à doigts de zinc dont l'activité est modulée par phosphorylation (Vasanth et al, 2011). Glis2 est capable d'activer ou de réprimer la transcription de gènes et la régulation de cette activité joue un rôle dans la régulation de la voie Hh au cours du développement rénal et pour le maintien de l'intégrité des cellules rénales (Zhang et al, 2002 ; Attanasio et al, 2007 ; Li et al, 2011). Glis2 réprime *Gli1* qui est un activateur des gènes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et le développement de la fibrose, aspect histologique retrouvé dans la NPH (Attanasio et al, 2007). Ainsi, la souris mutée pour *Glis2* présente une augmentation de la transcription des gènes impliqués dans la TEM. L'expression de ces gènes participe à l'apparition de défauts phénotypiques du rein de la souris qui sont similaires à ceux retrouvés dans la NPH, à savoir l'épaississement des membranes basales tubulaires et la fibrose interstitielle et glomérulaire importante (Attanasio et al, 2007).

## La voie de signalisation Shh



**Figure 16 : La voie de signalisation Shh.** En absence de ligand, le récepteur Patched1 (PTCH1) se localise au niveau de la membrane apicale et bloque l'entrée de smoothen (SMO) dans le cil. La kinésine KIF7 se localise à la base du cil où elle forme un complexe protéique avec les protéines Gli (Gli1/2/3). Les facteurs de transcriptions Gli sont les effecteurs nucléaires de la voie Hh et sont clivés sous formes répressives (GliR) tels que Gli3R, ce qui inhibe l'expression des gènes cibles de la voie tels que *CyclinD1*, *Ptch*, *Gli1*. Après activation de la voie par Sonic (Shh), Indian (Ihh) ou Desert (Dhh), les composants de la voie Hh SMO et KIF7 se retrouve enrichis dans le cil. Ces derniers inhibent la fonction de SUFU (Suppressor of fused, régulateur négatif de Hh) ce qui empêche le clivage des protéines Gli sous formes répressives et favorise les formes Gli activatrices (GliA) tels que Gli2 et Gli3A. Les protéines GliA sont alors transportées de façon rétrograde vers la base du cil par les moteurs dynéines et les IFTs puis transportées vers le noyau où elles vont activées les gènes cibles (Revue dans Goetz et Anderson, 2010 et Ruat et al, 2012). Adapté de (Ruat et al, 2012)

### **3-3-2 Les voies Wnt**

#### **A) La voie Wnt canonique**

Les kystes rénaux sont fréquemment observés dans les ciliopathies et sont dus aux défauts de la prolifération cellulaire (Sugiyama et al, 2006) et aux défauts d'orientation de l'axe de division des mitoses (Fischer et al, 2006). L'activation de la voie de signalisation Wnt canonique régule la prolifération cellulaire par la stabilisation et l'accumulation de la  $\beta$ -caténine dans le noyau favorisant l'expression de gènes pro-prolifératifs (Figure 17). Lors du développement précoce du rein, la voie Wnt/ $\beta$ -caténine est essentielle à l'induction du mésenchyme métanéphrique et à la prolifération cellulaire au cours de la tubulogenèse (Perantoni 2003 ; Schmidt-Ott et al, 2007 et 2008 ; Schedl et al, 2007). L'activation persistante de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine au cours du développement tardif, entraîne l'apparition de kystes rénaux chez les souris invalidées pour APC (adenomatous polyposis coli) ou exprimant un dominant actif de la  $\beta$ -caténine (Qian et al, 2005 ; Saadi-Kheddouci et al, 2001). Cependant, des lésions rénales (atrophie tubulaire, fibrose interstitielle, multiples micro-kystes et des dilatations tubulaires à partir de 1 an) observées chez la souris invalidée pour le gène *AHII* codant la joubérine, sont associées à une diminution de l'activation de la voie Wnt canonique. En effet, la joubérine interagit avec la  $\beta$ -caténine et favorise son accumulation nucléaire activant ainsi la voie Wnt canonique (Lancaster et al, 2009). L'ensemble de ces données suggèrent que les mécanismes d'altération de la voie Wnt canonique conduisant à l'apparition des kystes rénaux seraient différents selon qu'ils interviennent pendant le développement ou plus tardivement lors du maintien de l'homéostasie du rein.

Par ailleurs, l'augmentation de l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine a été observée dans les fibroblastes des souris mutantes pour trois protéines ciliaires (Kif3a, IFT88 et Ofd1) (Corbit et al, 2008). De plus, l'invalidation conditionnelle de Kif3a dans les reins de souris aboutit à des défauts de ciliogenèse et à l'augmentation de l'expression de la  $\beta$ -caténine nucléaire ainsi qu'à l'apparition de kystes rénaux (Lin et al, 2003). Ceci impliquerait le cil dans la régulation de la voie de signalisation Wnt canonique.

#### **B) La voie Wnt/PCP ou polarité planaire**

La polarité planaire (PCP pour Planar Cell Polarity) ou voie Wnt/PCP, régule l'orientation coordonnée des cellules dans un plan perpendiculaire à l'axe apico-basale de l'épithélium (Lapébie et al, 2012). Découvertes par l'étude de mutants chez la drosophile, les protéines clé de la PCP, Frizzled, Vangl (Strabismus), Dishevelled et Prickle sont des protéines membranaires et cytosoliques. Ces protéines se partagent en deux complexes (Frizzled-Dishevelled et Vangl-Prickle) localisés de manière polarisée au sein des cellules épithéliales (Figure 17).

La PCP est requise pour le réarrangement dynamique des cellules au cours des mouvements de convergence et d'extension (CE) pendant le développement embryonnaire (Tada et Kai, 2009). Lors de ces mouvements, l'intercalation convergente des cellules vers une ligne médiane aboutit à l'extension du tissu selon un axe perpendiculaire au mouvement des cellules. Ainsi, l'inactivation de *Frizzled*, *Dishevelled* ou encore *Vangl* perturbe les mouvements de CE chez le xénope et le poisson zèbre (Djiane et al, 2000; Darken et al, 2002; Sokol, 1996; Jessen et al, 2002), entraînant un raccourcissement et une courbure de l'axe du corps, des déformations des somites et de la notochorde.

Par ailleurs, la PCP est également impliquée dans le développement de la cochlée des mammifères, pour l'orientation dans le plan de l'épithélium du chevron des stéréocils (en forme de V) des cellules ciliées de l'organe de Corti et pour le positionnement excentré du kinocil (cil primaire spécialisé de ces cellules). En effet, l'inactivation chez la souris des composants de la voie PCP (*Frizzled3* et *6*, *Vangl2*, *Scribble1*, *Wnt5a*), du transport intraflagellaire (*Ift88*) ou du BBSome (*Bbs1*, *Bbs4*, *Bbs6*) perturbe le positionnement du kinocil et désorganise le positionnement du chevron des stéréocils par rapport au plan de l'épithélium (Wang et al, 2006 ; Montcouquiol et al, 2003 ; Wang et al, 2005 ; Qian et al, 2007 ; Jones et al, 2008 ; Ross et al, 2005).

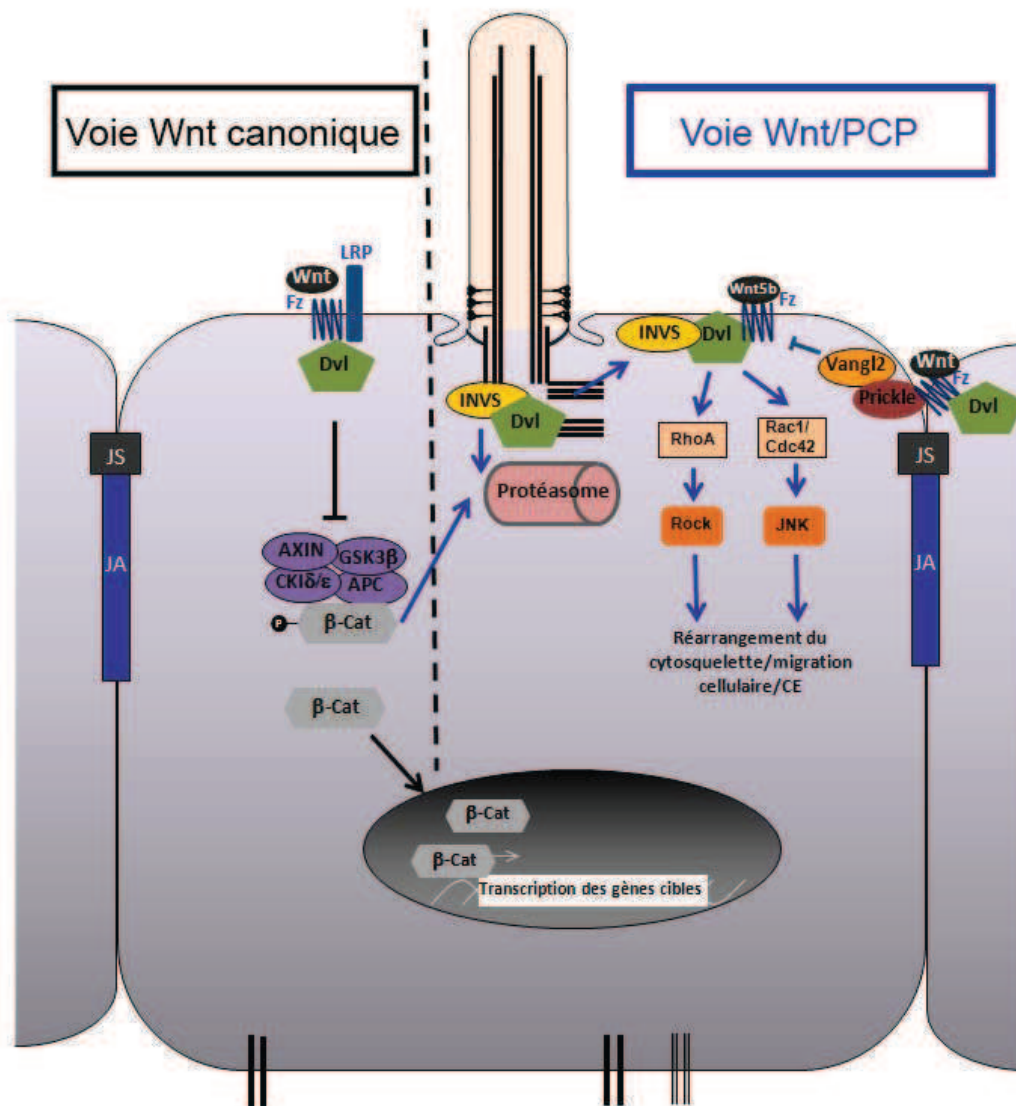
Au cours du développement du rein, la PCP régule l'orientation de l'axe de division des mitoses avec celui du tube, favorisant ainsi son élongation sans augmentation de son diamètre (Fischer et al, 2006). Une perturbation de cet alignement serait à l'origine des dilatations tubulaires aboutissant au développement des kystes rénaux dans les modèles murins invalidés pour la protéine de PCP *Fat4* ou pour *Pkd1* et le facteur de transcription *Hnf1β*, impliqués dans l'ARPKD et les hypodysplasies rénales kystiques (Saburi et al, 2008; Karner et al, 2009 ; Gresh et al, 2004 ; Verdeguer et al, 2010 ; Luyten et al, 2010 ; Fischer et al, 2006). Par ailleurs, un défaut de PCP plus précoce au cours des mouvements de convergence/extension aboutit également, dans la souris invalidée pour *Wnt9b*, à l'apparition de kystes rénaux.

### **C) Les néphrocystines régulent les voies Wnt**

En plus des nombreuses protéines ciliaires décrites précédemment, plusieurs néphrocystines tels que l'inversine (NPHP2), NPHP3, CEP290, sont impliquées dans la voie Wnt canonique et la voie Wnt/PCP. L'inversine a été décrite initialement pour être un « switch » moléculaire entre la voie Wnt canonique et la voie Wnt/PCP (Simons et al, 2005). En effet, son inactivation chez le poisson zèbre et le xénope entraîne des défauts des mouvements de CE et l'apparition de kystes pronéphriques (Simons et al, 2005) reflétant une dérégulation de la voie Wnt/PCP. De plus, les reins des souris *inv/inv* présentent un délai de la maturation tubulaire et le développement de multiples kystes rénaux similaire aux défauts retrouvés chez les souris mutantes présentant une activation de la voie Wnt canonique.

Simons et collaborateur ont montré que l'inversine inhibe la voie Wnt canonique en adressant Dishevelled à la dégradation par le protéasome (Simons et al, 2005) permettant la mobilisation du complexe de dégradation de la  $\beta$ -caténine. En accord avec ceci, une augmentation de l'expression des protéines  $\beta$ -caténine et Dishevelled 1 a été retrouvée dans les cellules des tubules de reins de patients mutés pour *INVS*, suggérant une activation de la voie Wnt canonique chez ces patients (Bellavia et al, 2010). Son rôle d'activateur de la PCP a été confirmé chez le xénope où l'inversine relaie l'activation du récepteur de PCP Frizzled-8 pour recruter Dishevelled à la membrane, ceci étant nécessaire à la morphogenèse de la partie proximale et intermédiaire du système pronéphrique (Lienkamp et al, 2010). Cependant ce « switch » a récemment été mis à défaut par l'étude de Sugiyama et collaborateur qui ont montré que dans la souris *inv/inv* le défaut d'orientation de l'axe mitotique précédait la prolifération cellulaire et que le croisement de cette souris avec une souris *BATlacZ* (modèle rapporteur de l'activité transcriptionnelle de la  $\beta$ -caténine) ne révélait pas d'activation anormale de la voie Wnt canonique au niveau du rein (Sugiyama et al, 2010). Ces résultats contradictoires suggèrent que la régulation des voies Wnt par l'inversine pourrait dépendre de l'espèce et du type de tissus examinés.

D'autre part, des études montrent le rôle d'autres néphrocystines dans la régulation des voies Wnt. En effet, l'invalidation de *cep290* chez le poisson zèbre aboutit à des défauts de CE et des kystes pronéphriques (Sayer et al, 2006). De même, l'invalidation de *nphp3* chez le xénope aboutit aux défauts de CE et de fermeture du tube neural (Bergmann et al, 2008). NPHP3 a été décrite comme partenaire de l'inversine et sa surexpression inhibe aussi la voie Wnt canonique. Cependant que ce soit pour NPHP3 ou CEP290 leur mécanisme d'action sur les composants des voies Wnt n'est pas connu.



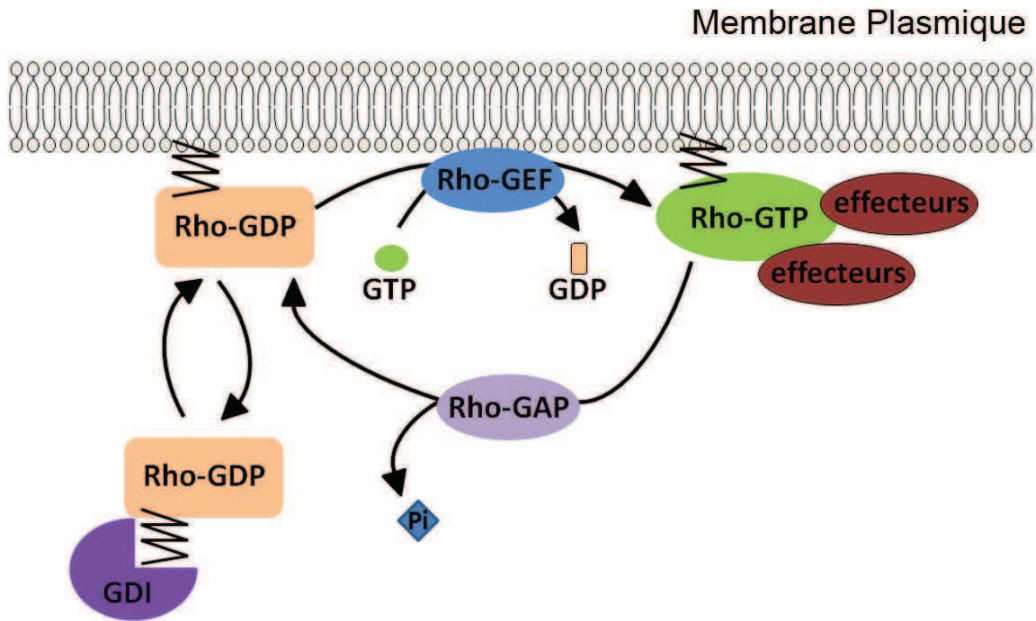
**Figure 17 : Représentation schématique de la voie de signalisation Wnt.** Un complexe protéique, composé des protéines suppresseurs de tumeur Axin et adenomatous polyposis coli (APC), et de deux sérine-thréonine kinases constitutivement actives: caséine kinase 1 (CK1  $\alpha/\delta$ ) et glycogène synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), phosphoryle la  $\beta$ -caténine sur ses résidus sérine-thréonine en N-terminale. La  $\beta$ -caténine phosphorylée est ubiquitinée et dégradée par le protéasome inhibant sa localisation nucléaire. Lorsqu'un ligand Wnt se fixe aux co-récepteurs Frizzled et LRP (lipoprotéine récepteur-relaté), Dishevelled (Dvl) et l'Axin sont recrutés par Frizzled et la queue phosphorylée de LRP, respectivement, ce qui entraîne le désassemblage du complexe de dégradation de la  $\beta$ -caténine. La  $\beta$ -caténine s'accumule dans le noyau où elle s'associe aux facteurs de transcription T cell factor (TCF)/lymphocyte enhancer factor (Lef) pour activer des gènes cibles induisant la prolifération. L'inversine inhibe la voie Wnt canonique en favorisant la dégradation de Dishevelled par le protéasome. D'autre part, la voie PCP requiert la localisation polarisée des complexes clé de la voie : Frizzled-Dishevelled et Prickled-Vangl2. L'inversine est nécessaire au recrutement de Dishevelled à la membrane pour activer la voie PCP. La voie Wnt/PCP entraîne l'activation des GTPases Rho, RhoA, Cdc42 et Rac1, qui participent au remaniement du cytosquelette d'actine favorisant des processus cellulaires tels que la migration lors des mouvements de convergence extension.

#### **D) La voie de signalisation des GTPases Rho en aval de la voie Wnt**

En aval de la cascade moléculaire de la voie Wnt/PCP, les GTPases Rho (Rho/Rac/cdc42) et la cascade des kinases JNK sont deux systèmes moléculaires nécessaires à l'organisation des cellules entre elles et aux processus de convergence/extension lors du développement chez la drosophile (Boutros et al, 1998 ; Eaton et al, 1996 ; Fanto et al, 2000 ; Weber et al, 2000 ; Winter et al, 2001) et les vertébrés (Habas et al, 2001; Marlow et al, 2002; Yamanaka, 2002) (Figure 17). Plusieurs études ont démontré l'activation des GTPases RhoA, Rac1 et Cdc42, en aval de Dishevelled dans les processus de migration cellulaire au cours de la gastrulation ou lors de « wound healing » et dans le développement des dendrites (Schlessinger et al, 2007 et 2009 ; Habas et al, 2001 et 2003 ; Tanegashima et al, 2008 ; Rosso et al, 2005 ; Zhu et al, 2012). Les GTPases Rho sont des protéines intracellulaires de la famille des petites protéines G et de la superfamille des Ras. Comme toutes les GTPases, elles oscillent de façon cyclique entre une forme active (GTP) et une forme inactive (GDP). Le cycle GTP/GDP des GTPases Rho est régulé par des Rho GEFs (guanine nucleotide exchange factors) qui catalysent l'échange du nucléotide et favorise l'activation, et par des Rho GAPs (GTPase activating protein) qui stimulent l'hydrolyse du GTP aboutissant à leur inactivation (Figure 18). Dans leur conformation active, elles interagissent avec leurs effecteurs, modulant ainsi les voies de signalisation nécessaires à de multiples processus cellulaires : l'organisation du cytosquelette d'actine, le trafic vésiculaire, la ciliogenèse, la morphogenèse, la formation des jonctions cellulaires et la progression du cycle cellulaire (Revue dans Jaffe et Hall, 2005). En particulier, Rac1, Cdc42 et RhoA modulent l'organisation du cytosquelette d'actine, favorisant respectivement la formation de lamellipodes, de filopodes et de fibres de stress.

De façon intéressante, des défauts d'activation de Cdc42 concomitants à ceux de la voie Wnt/PCP, ont été impliqués dans l'apparition des kystes rénaux du modèle murin invalidé pour *Pkd1* (Luyten et al, 2010). En effet, les reins prékystiques et kystiques des souris *Pkd1*<sup>-/-</sup> présentent des défauts de PCP (axe de division des mitoses/ augmentation et activation du récepteur Frizzled3) associés à une augmentation de Cdc42 (Luyten et al, 2010), suggérant un lien entre la dérégulation des GTPases Rho et le développement des kystes rénaux.

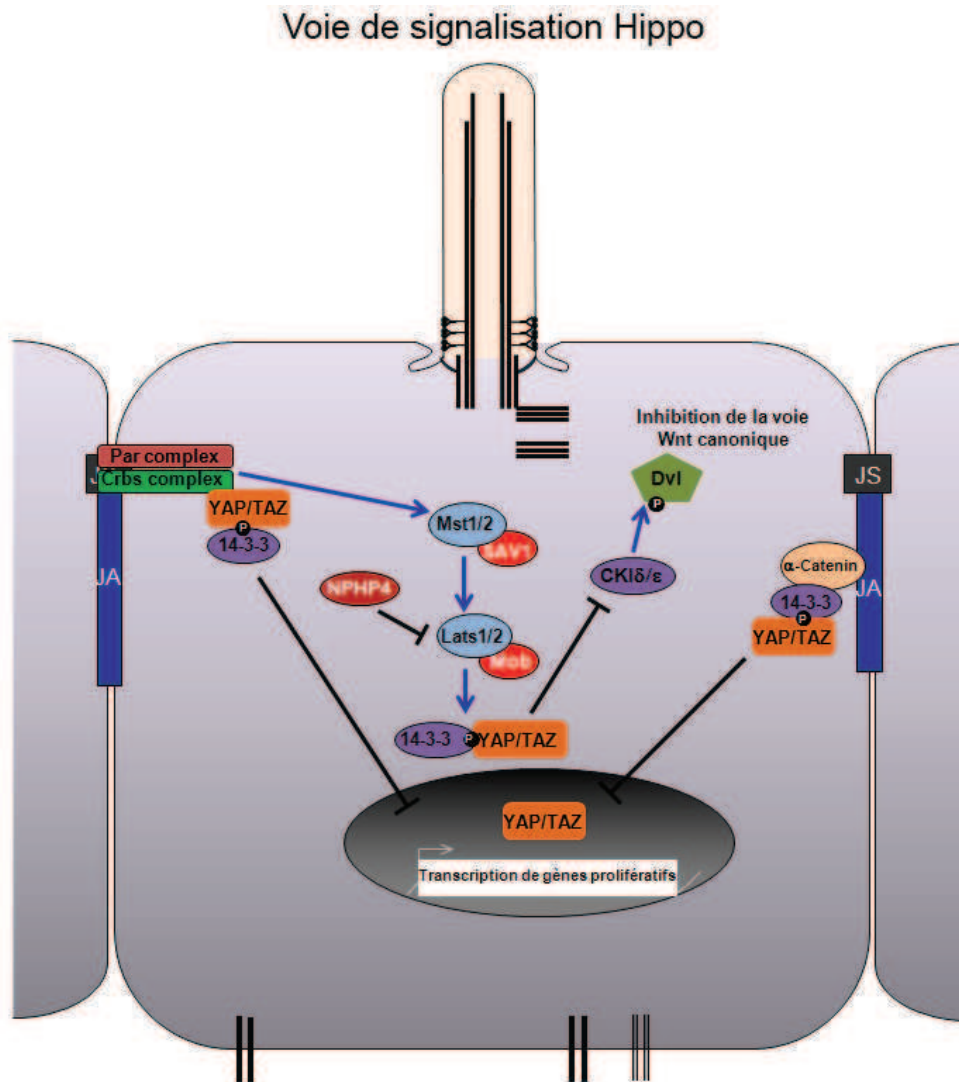




**Figure 18 : Cycle de régulation des GTPases Rho.** Représentation schématique de l'oscillation des GTPases Rho entre leur forme active (Rho-GTP) et leur forme inactive (Rho-GDP). Trois classes de protéines régulent ce cycle : les Rho GEFs (guanine nucleotide Exchange Factors), les Rho GAPs (GTPase-Activating Proteins) et les GDIs (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors). Adapté de (Etienne-Manneville et Hall, 2002)

### 3-3-3 La voie Hippo

Récemment, NPHP4 a été décrite impliquée dans la régulation d'une autre voie de signalisation intracellulaire, la voie Hippo. Cette voie de signalisation implique une cascade de protéine kinases (Figure 19) dont les composants sont pour la plupart conservés entre la drosophile et les vertébrés. La voie Hippo permet de réguler la taille des organes. En effet, les coactivateurs transcriptionnels YAP et TAZ favorisent la prolifération, la survie, la migration et la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) des cellules, notamment en interagissant avec d'autres voies de signalisation telles que la voie du TGF $\beta$  ou la voie Wnt canonique (revue dans Schroeder et al, 2012 et Zhao et al, 2011) (Figure 19). La voie Hippo semble régulée par la mise en place de la polarité apico-basale, la formation des jonctions adhérentes, l'architecture et l'environnement cellulaire (revue dans Schroeder et al, 2012). La surexpression de NPHP4 dans les cellules de mammifère régule négativement la voie Hippo en empêchant la kinase Lats1 de phosphoryler YAP/TAZ, entraînant leur accumulation nucléaire et l'activation de la prolifération cellulaire (Habbig et al, 2011) (Figure 19). Ainsi, la perte de fonction de NPHP4 diminuerait la prolifération cellulaire au cours du développement du rein, expliquant la taille réduite des reins chez les patients NPH. Cependant, une répression de la voie Hippo a été décrite chez des patients ADPKD et ARPKD et les souris *Pkd1*<sup>-/-</sup>. En effet, l'accumulation nucléaire importante de YAP a été retrouvée au niveau des tubes dilatés et des structures kystiques sur les coupes de reins des patients et l'accumulation de YAP/TAZ dans les noyaux des souris. Ces résultats suggèrent que la répression de la voie Hippo accompagne la formation des kystes (Happe et al, 2011).



**Figure 19 : La voie de signalisation Hippo.** Représentation schématique de la voie de signalisation Hippo régulant la taille des organes chez les vertébrés. Cette voie est une cascade de kinases qui se compose de MST1/2 (Hippo chez la drosophile) et son cofacteur WW45 (Sav), qui lie et phosphorylent la serine-thréonine kinase LATS1/2 (Warts). LATS1/2 activée agit avec son cofacteur MOB1A/B (Mats) pour phosphoryler les activateurs transcriptionnels YAP et TAZ (Yorkie). Lorsque YAP et TAZ sont phosphorylés ils deviennent inactifs et sont retenus dans le cytoplasme par leur interaction avec la protéine cytoplasmique 14-3-3. Les protéines YAP et TAZ non-phosphorylés vont entrer dans le noyau et interagir avec des facteurs de transcription tels que TEAD1-4 (Scalloped), Homothorax, Teashirt et Mad (pour Mothers against dpp) qui régulent la transcription de leur gène cibles. Quand les kinases de cette voie sont actives elles empêchent la croissance des tissus en inhibant l'activité de YAP et TAZ. La voie Hippo est aussi régulée par la polarité, les jonctions et l'architecture cellulaire. Abréviations JS: Jonctions serrées; JA: Jonctions adhérentes. Adapté de (Schroeder et Halder 2012).

### 3-3-4 La réparation de l'ADN

Une nouvelle voie de signalisation impliquant les néphrocystines indépendamment de leur rôle au cil primaire vient d'être identifiée : la réparation de l'ADN (DDR pour DNA damage response). En effet, très récemment des mutations dans deux gènes impliqués dans la DDR, *ZNF423* et *CEP164*, ont été identifiées chez des patients présentant un syndrome de Senior-Løken ou un syndrome « BBS-Like », associés à une NPH, identifiant ainsi les 14<sup>ème</sup> et 15<sup>ème</sup> gènes impliqués dans la NPH (Chaki et al, 2012). CEP164 (pour centrosomal protein 164), se localise à la base du cil primaire au niveau du centriole père pendant les étapes du cycle cellulaire (Graser et al, 2007). Lors d'une cassure double brin de l'ADN, les kinases ataxia telangiectasia mutated (ATM) et ATM/Rad3-related (ATR) sont recrutées au niveau des « foci » nucléaires où elles phosphorylent et activent les protéines de réparation de l'ADN (H2AX, 53BP1, BRCA1) et les protéines de régulation du cycle cellulaire (Chk1, Chk2). Lors de lésions de l'ADN, CEP164 se délocalise aux foci nucléaires où elle interagit et est phosphorylée par ATM et ATR permettant la modulation d'autres protéines (MDC1, RPA, CHK1) à cet endroit (Sivasubramaniam et al, 2008). Par ailleurs, d'autres néphrocystines semblent aussi impliquées dans la voie DDR (Chaki et al, 2012). En effet, NPHP10/SDCCAG8 et NPHP5/IQCB1 se localisent au niveau des sites de réparation de l'ADN avec CEP164. CEP164 interagit également avec NPHP3 et NPHP4, suggérant qu'elle fait partie du complexe NPHP (Chaki et al, 2012). L'ensemble de ces données indiquent un lien entre la NPH et les ciliopathies associées et les mécanismes de la signalisation DDR. Dans ce contexte on peut supposer que l'augmentation de l'apoptose observée dans les différents tissus de modèles murins (e.g. dans la rétine des souris *Nphp1*<sup>-/-</sup>) ou dans les reins de patients mutés pour *NPHP1*, pourrait impliquer la voie DDR (Wodarczyk et al, 2010).



# **EXPOSÉ DES RÉSULTATS**



# **PARTIE I**



# **NPHP1, NPHP4 et RPGRIP1L sont impliquées dans la polarité apico-basale et la morphogénèse épithéliale des cellules MDCK en culture tridimensionnelle.**

**Article 1 :** Marion Delous\*, Nathan E. Hellman\*, Helori-Mael Gaudé, Flora Silbermann, André Le Bivic, Rémi Salomon, Corinne Antignac et Sophie Saunier

\* les deux premiers auteurs ont participé de façon équivalente à ce travail.

## **Position du problème :**

Les études menées sur le produit des gènes *NPHP1*, *NPHP4*, *RPGRIP1L* identifiés au laboratoire a permis de montrer une interaction entre ces protéines, leur localisation aux jonctions adhérentes, à la base et le long du cil primaire dans les cellules épithéliales rénales. Afin de poursuivre l'étude des mécanismes physiopathologiques associés aux mutations de ces gènes, en particulier le rôle de ces protéines dans la polarité épithéliale, l'adhésion cellulaire et la fonction ciliaire, des cellules épithéliales rénales MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) ont été invalidées pour ces trois gènes par interférence à l'ARN (Marion Delous et Nathan Hellman). Lors de mon arrivée au laboratoire, j'ai participé à l'analyse du phénotype cellulaire de ces cellules (NPHP-KD). Par ailleurs, j'ai poursuivi la caractérisation des protéines associées au complexe NPHP1/NPHP4/RPGRIP1L. L'ensemble de ces études a permis de mettre en évidence le rôle de ces néphrocystines dans la polarité apico-basale et la morphogénèse épithéliale lors de culture 3D, potentiellement via leur interaction avec les protéines de polarité.

## **Résultats :**

### **1- Les néphrocystines sont requises pour la mise en place de la polarité apico-basale des cellules épithéliales.**

Dans un premier temps, nous avons montré par PCR quantitative que l'expression des gènes *NPHP* augmente au cours de l'épithélialisation et la formation du cil dans les cellules MDCK (article1 Fig.1). De façon intéressante, cette augmentation coïncide avec la localisation subcellulaire dynamique des NPHP1 et NPHP4, d'abord cytoplasmique puis aux jonctions cellulaires et à la base du cil primaire.

La perte de fonction de NPHP1, NPHP4 ou RPGRIP1L dans les cellules MDCK invalidées par interférence à l'ARN n'aboutit pas à des défauts de mise en place de la polarité apico-basale puisque les marqueurs de la surface apicale (gp135), des jonctions serrées (ZO1) et des jonctions adhérentes (E-cadhérine) sont correctement localisés en culture 2D et 3D (article 1, Fig.2 ; Fig.20A p.). L'analyse du cil primaire dans les cellules MDCK en culture 2D par un marquage de la tubuline alpha acétylée révèle une légère diminution du nombre de cellules ciliées dans la lignée invalidée pour *NPHP1* (N1-KD) ainsi qu'une réduction de la taille des cils pour les deux lignées invalidées *NPHP1* ou *NPHP4* (N4-KD) comparées aux lignées contrôles exprimant le vecteur vide (pSICOR). Cependant, après plusieurs jours de culture (15 jours), la taille des cils dans les cellules N4-KD semblent proche de celles des cellules contrôles, indiquant que la réduction de la taille des cils observée à J8 serait le reflet d'un retard de formation du cil (article1 Fig.3). En revanche, les cellules MDCK invalidées pour *RPGRIP1L* (RPGRIP1L-KD) présentent une réduction importante du nombre de cellules ciliées (environ 50%) et de la taille des cils restant, suggérant un rôle plus important de RPGRIP1L dans la formation du cil primaire des cellules MDCK en culture 2D (article3, Fig.Suppl4).

Nous avons ensuite suivi le comportement des cellules MDCK NPHP-KD lors d'une expérience de "Calcium switch", qui consiste à priver les cellules de calcium pendant 12 heures puis à rajouter du calcium dans le milieu de culture afin d'analyser la capacité des cellules épithéliales à reformer leurs jonctions cellulaires, ceci par la mesure de la résistance trans-épithéliale (TER). Nous avons ainsi montré que les cellules N1-KD et N4-KD présentent un retard dans la formation de leurs jonctions serrées se traduisant par un décalage dans le temps du pic de TER (4h pour les cellules contrôles versus 6 à 9 heures pour les cellules N1-KD et N4-KD) et un retard dans la réapparition de la protéine ZO1 aux jonctions serrées visualisé en immunofluorescence (article 1, Fig.4). Les cellules RPGRIP1L-KD présentent également un retard de la formation des jonctions serrées mais ce dernier semble moins sévère que pour les cellules N1-KD et N4-KD (Fig.20B p. ). Ceci suggère un rôle des néphrocystines dans l'établissement des jonctions serrées nécessaires à la formation d'un épithélium polarisé. Par ailleurs, nous avons observé une diminution de certains marqueurs des jonctions cellulaires dans les cellules RPGRIP1L-KD et parfois un aspect « en vague » des jonctions membranaires lorsqu'elles sont cultivées en cultures 2D (article 3 Fig Suppl 5).

Nous avons ensuite examiné le comportement des cellules MDCK NPHP-KD dans un système permettant de suivre l'organisation épithéliale des cellules en 3D dans un gel de collagène de type I. Dans ces conditions les cellules MDCK contrôles forment spontanément des structures sphériques polarisées autour d'une unique lumière centrale. En revanche, les cellules N1-KD, N4-KD et RPGRIP1L-KD présentent des structures très désorganisées avec la présence de plusieurs lumières suggérant un rôle important des ces protéines dans la morphogenèse épithéliale (article1, Fig5 ; Fig.20C-D p.). De façon étonnante, dans ces conditions les cils des cellules MDCK N1- et N4- KD

apparaissent plus longs que dans les sphères des cellules contrôles (article1, Fig5), suggérant que les NPHP1 et NPHP4 réguleraient la taille des cils dans les cellules épithéliales.

Ces défauts phénotypiques sont partiellement restaurés par l'excision de la cassette lentivirale ou la réexpression des protéines humaines NPHP1 et NPHP4 dans les cellules invalidées démontrant que les phénotypes observés sont spécifiques de l'absence des NPHP.

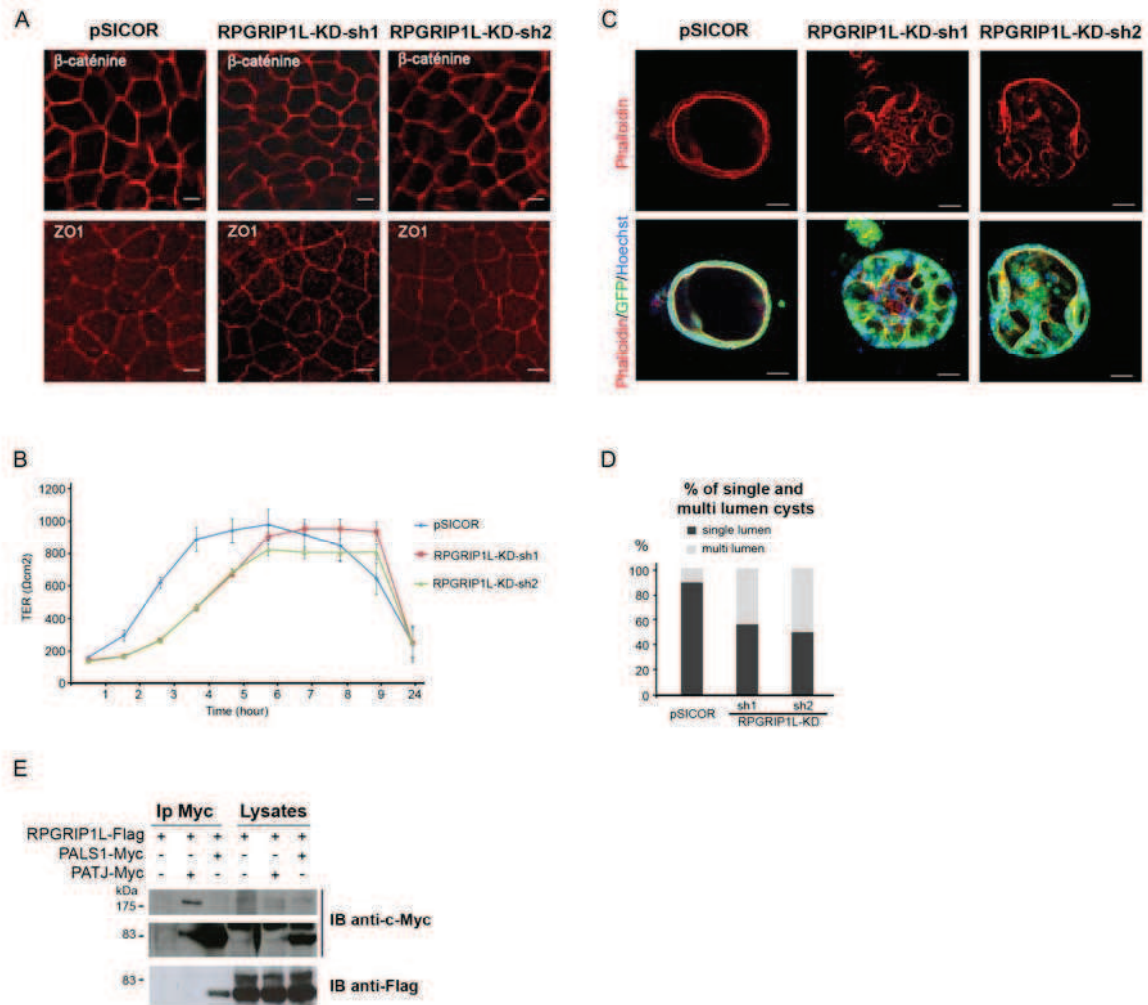
## **2- Les néphrocystines s'associent aux protéines des jonctions serrées PALS1, PATJ et PAR6.**

De façon intéressante, les phénotypes des cellules N1-KD, N4-KD et RPGRIP1L-KD, retard de la formation des jonctions serrées et structure désorganisées en culture 3D, sont similaires à ceux des cellules MDCK invalidées pour la protéine des jonctions serrées PALS1 (Straight et al, 2004). PALS1 fait partie avec PATJ et CRB3 du complexe Crumbs, qui, avec le complexe PAR (PAR3/PAR6/aPKC), détermine le domaine apical des cellules épithéliales, en excluant du domaine apical, le complexe latéral Dlg/Lgl/Scrib (Shin et al, 2005). Nous avons donc testé et validé l'interaction de NPHP1, NPHP4 et RPGRIP1L avec les protéines des jonctions serrées PALS1 et PATJ dans les cellules épithéliales rénales HEK293T (article1, Fig.6, et Fig.20E, p.). Nous avons aussi déterminé, par GST-pull down, que les domaines Coiled-coil et SH3 de la région N-terminale de NPHP1 étaient suffisant pour l'interaction avec PALS1. Des mutations dans le domaine SH3 de NPHP1 retrouvées chez des patients réduisent cette interaction, indiquant que le complexe NPHP1/PALS1 jouerait un rôle dans la physiopathologie de la NPH (article1 Fig.Suppl.4). PALS1 est une protéine adaptatrice qui, par son interaction directe avec Par6, permet le recrutement du complexe Par6/Par3/aPKC au niveau des jonctions serrées (Straight et al, 2004 ; Hurd et al, 2003 ; Lemmers et al, 2004). Nous avons également montré que NPHP1 et NPHP4 interagissaient avec Par6 mais interagissent plus faiblement avec le mutant Par6 délété pour le domaine PDZ, mutant connu pour réduire l'interaction de Par6 avec PALS1 et CRB3A (article1 Fig.6D). Ceci suggère que l'interaction NPHP-Par6 est dépendante de PALS1.

Par ailleurs, nous avons analysé la localisation de ces complexes sur des coupes de reins humains adultes et montré la localisation de NPHP4 le long des jonctions cellules-cellules avec une co-localisation partielle aux jonctions serrées avec les protéines ZO1 et Par3 (article1 Fig.7) . Par ailleurs, alors que PATJ, Par3 et ZO1 se localisent aux jonctions serrées de tous les segments du néphron, NPHP4 n'est présent que dans la branche ascendante de l'anse de Henlé et les tubules distaux (article1 Fig.Suppl.5). De façon intéressante, ces segments rénaux sont ceux où les lésions kystiques se développent chez les patients NPH.

## Conclusion

L'ensemble de ces travaux a permis de mettre en évidence le rôle important de NPHP1, NPHP4 et RPGRIP1L dans l'organisation épithéliale des cellules. En effet, nous avons montré que l'expression des gènes NPHP1, NPHP4 et RPGRIP1L augmente au cours de l'épithélialisation des cellules MDCK et la formation du cil. L'invalidation par interférence à l'ARN dans les cellules épithéliales rénales MDCK aboutit à un retard dans la formation des jonctions cellulaires et la ciliogenèse (cil plus courts dans les N1- et N4-KD). Les cellules RPGRIP1L-KD présentent également un retard dans la formation des jonctions, cependant le phénotype ciliaire est plus sévère (absence de cil dans environ la moitié des cellules), indiquant un rôle de RPGRIP1L dans la ciliogenèse/maintien du cil. Les trois lignées présentent des défauts d'organisation en culture 3D. L'interaction physique de ces néphrocystines avec les protéines des complexes des jonctions serrées PALS1/PATJ et Par6, permet de proposer un mécanisme moléculaire par lequel les NPHP pourraient participer à l'établissement/maintien de la polarité apico-basal et ainsi à la morphogenèse épithéliale au niveau du rein.



**Figure 20 : Rôle de RPGRIP1L dans la polarité apico-basale et la morphogénèse épithéliale en culture 3D.** A) L'immunofluorescence des protéines des jonctions serrées ZO1 et des jonctions adhérentes β-caténine dans les cellules MDCK RPGRIP1L-KD-sh1 ou sh2, ne révèle pas de défaut de mise en place de la polarité apico-basale. B) La formation des jonctions serrées est retardée dans les cellules MDCK RPGRIP1L-KD-sh1/2 après une expérience de "calcium switch", se traduisant par un décalage dans le temps du pic de TER de 5h pour les cellules contrôles (pSICOR) à 7-8h pour les cellules RPGRIP1L-KD. C) Les cellules RPGRIP1L-KD forment des structures désorganisées en culture 3D en gel de collagène de type I. Les structures des cellules contrôles et RPGRIP1L-KD sont marquées par la phalloïdine et les noyaux au Hoechst. D) Le graphique représente le nombre de structures avec une ou plusieurs lumières dans les différentes lignées cellulaires et montre une augmentation de ces structures désorganisées en l'absence de RPGRIP1L. E) Co-immunoprécipitation de RPGRIP1L-Flag avec PALS1-Myc dans les cellules HEK293T. Les lysats cellulaires ont été immunoprécipités avec un anticorps anti-c-Myc et immunoblottés avec cet anticorps et un anticorps anti-Flag.

*ARTICLE 1*

" Nephrocystin-1 and nephrocystin-4 are required for epithelial morphogenesis and associate with PALS1/PATJ and Par6 "

Delous M\*, Hellman NE\*, Gaudé HM, Silbermann F, Le Bivic A, Salomon R, Antignac C, Saunier S.

Hum Mol Genet. 2009 Dec 15;18(24):4711-23. Epub 2009 Sep 14.

\* les deux premiers auteurs ont participé de façon équivalente à ce travail.



## **PARTIE II**





## **NPHP4 régule les voies Wnt et la morphogenèse du pronéphros chez le poisson zèbre.**

**Article 2** : Céline Burcklé\*, **Helori-Mael Gaudé\***, Christine Vesque, Flora Silbermann, Rémi Salomon, Cécile Jeanpierre, Corinne Antignac, Sophie Saunier and Sylvie Schneider-Maunoury

\* les deux premiers auteurs ont participé de façon équivalente à ce travail.

### **Position du problème :**

Alors que la polarité apico-basale détermine l'organisation des cellules épithéliales dans leur axe vertical (de la base à l'apex), la polarité planaire (PCP) détermine leur agencement dans le plan de l'épithélium. Des études ont montré qu'un défaut de la PCP tel que la désorientation de l'axe du fuseau mitotique au cours de l'élongation des tubes pendant le développement des néphrons serait à l'origine des dilations tubulaires et de la formation des kystes dans des modèles murins de polykystoses (Fischer et al, 2006). De plus, la néphrocystine inversine (*NPHP2*) est impliquée dans la régulation des voies de signalisation de la PCP : elle inhibe la voie Wnt canonique dépendante de la  $\beta$ -caténine en favorisant la dégradation de Dishevelled cytoplasmique par l'adressage de ce dernier au protéasome, un élément clé pour l'activation de la voie non-canonique Wnt/PCP (Simons et al, 2005). De plus, les mutants *nphp2 (inv)* et *nphp6 (cep290)* chez le poisson zèbre présentent des défauts de convergence-extension (CE) lors de la gastrulation (Otto et al, 2003; Sayer et al, 2006). La perte de fonction chez le poisson zèbre de *nphp6* ainsi que d'autres néphrocystines et protéines ciliaires, *nphp3* ou polycystine-2, abouti au développement de kystes pronéphriques (Sayer et al, 2006 ; Obara et al, 2006 ; Zhou et al, 2010).

Afin d'examiner le rôle potentiel de NPHP4 dans la régulation des voies Wnt, j'ai analysé les éléments clé de ces voies, Dishevelled, inversine et  $\beta$ -caténine, dans les modèles de cellules épithéliales rénales, en particulier les cellules MDCK invalidées pour *NPHP4* (N4-KD). En parallèle, en collaboration avec le laboratoire du Dr Sylvie Schneider-Maunoury (CNRS UMR7622), Céline Burcklé, alors post-doctorante dans notre équipe, a confirmé le rôle de NPHP4 dans la régulation de la voie Wnt canonique et Wnt/PCP par l'étude *in vivo* de perte de fonction de *nphp4* chez poisson zèbre.

## Résultats :

### 1- Phénotypes des poissons invalidés pour *Nphp4*.

Afin d'étudier le rôle de NPHP4 dans la morphogenèse du rein, nous avons utilisé la technique de perte de fonction de la protéine chez le poisson zèbre par morpholinos antisens. L'invalidation de *nphp4* dans l'embryon du poisson aboutit à des défauts ciliaires. Les poissons morphants présentent des défauts des mouvement de convergence-extension (CE) au cours de la gastrulation aboutissant soit à des anomalies discrètes de la notochorde, soit à un raccourcissement et une courbure de l'axe du corps avec une compression des somites et des déformations de la notochorde suivant la quantité de morpholinos injectés (article2 Fig1A-E). Ces défauts entraînent également le raccourcissement précoce du canal pronéphrique (article2 Tableau3). Des défauts de latéralisation avec l'inversement de la position du cœur et l'expression aléatoire du marqueur de latéralité *southpaw* sont également observés. Ces altérations sont associées à une réduction du nombre et de la longueur des cils dans la vésicule de Küppfer (KV) (article2 Fig.2 et Fig.Suppl.2). Au stade 2,5 jours, des dilatations kystiques sont visibles le long du pronéphros (article2 Fig.1F-L). L'utilisation d'une lignée de poisson transgénique codant pour la protéine membranaire claudine GFP a révélé des anomalies du réarrangement et de l'architecture des cellules dans la région distale du pronéphros, aboutissant à des défauts d'ouverture du cloaque vers l'extérieur (article2 Fig.3). Dans le pronéphros des morphants *nphp4*, les cils des cellules multiciliées ne présentent pas de défaut de taille, de structure ou de mobilité. En revanche le cil primaire des cellules de la région distale (cloaque et canal pronéphrique) sont plus court et moins mobile que les cils des cellules chez les poissons contrôles, suggérant un lien avec les défauts de morphogénèse et d'obstruction de cette région distale. A 3 jours, des défauts de lamination au niveau de la rétine sont observés (article2 Fig.Suppl.2).

### 2- NPHP4 activateur de la voie Wnt/PCP.

Les mouvements de CE étant régulés par la voie de signalisation Wnt/PCP, Céline a alors examiné le rôle de NPHP4 dans cette voie. Elle a démontré qu'il existait une interaction génétique entre NPHP4 et les composants de la voie Wnt-PCP tels que *vangl2*, *dishevelled*, *prickled1* et *inversine*, lors de l'élongation de l'axe du poisson et la morphogenèse du pronéphros. En effet, l'injection d'une faible dose de morpholinos *nphp4* dans des souches de poissons mutantes pour *Vangl2* augmente considérablement les défauts phénotypiques de CE alors que l'injection dans les morphants *nphp4* d'un mutant de *Dishevelled* tronqué en N-Terminale, connu pour activer la voie Wnt-PCP sans altérer la voie Wnt canonique, restaure partiellement ces défauts d'élongation de l'axe du poisson (article2 Fig.4A-C). De plus, le pourcentage de dilatations kystiques le long du pronéphros est augmenté dans les doubles morphants *nphp4:inv* (*inversine*) (100%) ou *nphp4:pk2* (*prickle2*)

(74%) (article2 Fig.4D-E). Ces résultats démontrent que la néphrocystine-4 est un activateur de la voie Wnt-PCP. Cependant, les doubles morphants *nphp4:pk2* ne présentent pas d'augmentation des défauts d'obstruction du cloaque suggérant qu'un autre mécanisme pourrait être impliqué dans le développement de ce phénotype (article2 Fig.4F).

### 3- NPHP4 inhibiteur de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine.

En parallèle, j'ai examiné *in vitro* le rôle potentiel de NPHP4 dans la voie Wnt canonique en utilisant un rapporteur luciférase de l'activité de la  $\beta$ -caténine (TOPFlash) dans les cellules HEK293T. J'ai montré que la surexpression de NPHP4 réprimait l'activation de la voie Wnt canonique dépendante de la  $\beta$ -caténine en présence de Dishevelled (article2 Fig.5A). En Western blot, la diminution d'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine par NPHP4 s'accompagne d'une diminution de la quantité de Dishevelled (article2 Fig.5B). En revanche, l'absence de NPHP4 dans les cellules épithéliales rénales MDCK, N4-KD, aboutit à une augmentation de la quantité cytoplasmique des Dishevelled-2 et -3 endogènes, accompagnée d'une augmentation de la quantité de  $\beta$ -caténine. De plus, la surexpression de la protéine humaine NPHP4 porteuse d'une étiquette (V5) dans les cellules MDCK (N4-KD+N4V5) restaure la quantité protéique de Dishevelled et de la  $\beta$ -caténine à un niveau équivalent à celui des cellules contrôles (Psi-C1) (article2 Fig.5D-E). Ces données suggèrent que NPHP4 régule la dégradation de ces protéines. A l'aide d'une lignée de poisson TOP-dGFP rapportant l'activité de la  $\beta$ -caténine, nous avons observé une augmentation de l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans la région du cloaque des poissons morphants *nphp4* (article2 Fig.G-I).

Ces résultats démontrent que NPHP4 est un répresseur de la voie Wnt-canonique *in vivo* et *in vitro* et qu'elle est requise à la fois pour l'activation de la voie Wnt/PCP et l'inhibition de la voie Wnt/canonique lors de la morphogénèse du pronéphros du poisson.

### 4- Mécanismes moléculaires de la régulation de la voie Wnt par NPHP4

Par immunofluorescence, nous avons analysé la localisation de Dishevelled-2 et -3 dans les cellules MDCK en fonction du temps de culture. Dans les cellules contrôles, Dishevelled-2 et -3 présentent une localisation subcellulaire dynamique au cours de l'épithélialisation des cellules MDCK, d'abord au centrosome/corps basal et à la membrane apicale (2 à 8 jours), puis majoritairement à la membrane des cellules bien polarisées (> 8 jours) (article2 Fig.6 et Fig.Suppl5). Les cellules N4-KD présentent une augmentation importante de Dishevelled-2 et -3 dans le cytoplasme et à la membrane des cellules au cours de l'épithélialisation (article2 Fig.6). Dans ces cellules, le marquage de Dishevelled au corps basal/centrosome est plus faible et plus étalé mais ne semble pas totalement perdu (article2 Fig.6 et Fig.Suppl5). De façon intéressante, la surexpression de la protéine humaine

NPHP4-V5 permet de réduire la quantité de Dishevelled cytoplasmique et restaure sa localisation préférentielle au corps basal/centrosome. De plus NPHP4-V5 colocalise avec Dishevelled-2 et -3 au niveau du corps basal dans les cellules MDCK, suggérant une interaction physique entre ces protéines (article2 Fig.6).

J'ai ensuite cherché à savoir si, comme l'inversine, NPHP4 régule la voie Wnt canonique par la dégradation de Dishevelled par le protéasome. L'utilisation d'un inhibiteur du protéasome clasto-lactacystine  $\beta$ -lactone sur les cellules HEK293T surexprimant NPHP4 permet de maintenir la quantité de Dishevelled-2 et -3 démontrant que NPHP4 régule la dégradation par le protéasome (article2 Fig.5B-C). L'inversine et NPHP4 ont donc la même action sur Dishevelled. Par des expériences de co-immunoprécipitation dans les cellules HEK293T, j'ai montré que NPHP4 forme un complexe avec l'inversine et Dishevelled-2 (article2 Fig.7A-B). De plus, dans les cellules HEK293T surexprimant transitoirement l'inversine, la quantité d'inversine est stabilisée en présence de NPHP4 après un traitement à la cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique (article2 Fig.7C-D). Par ailleurs, la double invalidation de *nphp4* et *inversine* chez le poisson zèbre aboutit à une augmentation drastique de la formation des kystes dans le pronéphros démontrant une interaction fonctionnelle entre ces deux protéines (article2 Fig.7E-F). L'ensemble de ces résultats démontre que NPHP4 coopère *in vitro* et *in vivo* avec l'inversine pour moduler la quantité et la localisation sub-cellulaire de Dishevelled et qu'elles sont nécessaires à la morphogenèse correcte du pronéphros.

## **Conclusion :**

Les résultats obtenus chez le poisson zèbre montre un rôle important de NPHP4 dans la signalisation liée au cil primaire. En effet, les poissons morphants pour *nphp4* présentent un phénotype ciliaire classique caractérisé par des défauts d'élongation de l'axe du poisson, de latéralisation gauche-droite, de kystes pronéphriques associés à la morphogenèse anormale du canal pronéphrique et du cloaque et des défauts de la rétine. Nous avons montré que NPHP4 contrôle à la fois l'élongation précoce du canal pronéphrique et le réarrangement cellulaire nécessaire à la morphogenèse du cloaque. De plus, NPHP4 coopère avec l'inversine et la voie de signalisation Wnt/PCP pour la morphogenèse du pronéphros. Nous avons démontré que NPHP4 régule la quantité de Dishevelled cytoplasmique dans les cellules épithéliales rénales réprimant la voie Wnt canonique. Nos résultats permettent de proposer un mécanisme moléculaire par lequel NPHP4, inversine et Dishevelled agissent ensemble pour réguler les voies Wnt et la morphogenèse du pronéphros chez le poisson zèbre.

## *ARTICLE 2*

" Control of the Wnt pathways by nephrocystin-4 is required for morphogenesis of the zebrafish pronephros "

Burcklé C\*, Gaudé HM\*, Vesque C, Silbermann F, Salomon R, Jeanpierre C, Antignac C, Saunier S, Schneider-Maunoury S.

Hum Mol Genet. 2011 Jul 1;20(13):2611-27. Epub 2011 Apr 15.

\* les deux premiers auteurs ont participé de façon équivalente à ce travail.



## **PARTIE III**





## **La stabilisation de Dishevelled à la base du cil par Rpgrip1l est essentielle pour la polarité planaire.**

**Article 3** : Alexia Mahuzier\*, **Helori-Mael Gaudé**\*, Valentina Grampa, Isabelle Anselme, Flora Silbermann, Margot Leroux-Berger, Delphine Delacour, Jerome Ezan, Mireille Montcouquiol, Sophie Saunier, Sylvie Schneider-Maunoury, Christine Vesque

\* les deux premiers auteurs ont participé de façon équivalente à ce travail.

### **Position du problème :**

Le gène *RPGRIP1L* a été identifié au laboratoire chez des patients atteints d'un syndrome de Joubert avec une NPH ou d'un syndrome de Meckel. Son invalidation chez la souris *Ftm*<sup>-/-</sup> entraîne l'apparition de phénotypes rappelant ceux des fœtus MKS : défauts de latéralisation, polydactylie, exencéphalie, dilatations microkystiques des tubes proximaux et des anomalies de la plaque ductale associées à une fibrose hépatique (Delous *et al.*, 2007; Vierkotten *et al.*, 2007). Ces phénotypes sont similaires à ceux dus à l'altération de la régulation de la voie de signalisation Sonic hedgehog (Shh) dans le modèle murin, une voie essentielle au développement du cerveau et du rein (Vierkotten *et al.*, 2007). Par ailleurs, RPGRIP1L et NPHP4 forment un complexe à la base du cil, et des mutations chez les patients avec un JBTS et une NPH affecte cette association (Delous *et al.*, 2007). Suite aux travaux sur NPHP4 (article2) et à la collaboration entamée avec le groupe de Sylvie Schneider-Maunoury, nous avons cherché à identifier le rôle de RPGRIP1L dans la régulation de Dishevelled et des voies Wnt. Christine Vesque et Alexia Mahuzier, ont réalisé l'invalidation de *rpgrip1l* dans le poisson zèbre. Les poissons morphants pour *rpgrip1l* présentent des altérations reflétant des défauts ciliaires (CE, latéralité). Dans les cellules épithéliales rénales ainsi que chez le poisson zèbre et la souris, l'absence de Rpgrip1L s'accompagne d'une perte de la localisation de Dishevelled à la base du cil primaire. L'absence de Dishevelled à la base du cil s'accompagne de défauts de PCP dans les cellules ciliées de la cochlée des souris *Ftm*<sup>-/-</sup> et des cellules du plancher neural des poissons. J'ai ensuite montré dans les cellules épithéliales rénales, le mécanisme de régulation de Dishevelled par le complexe RPGRIP1L-NPHP4-inversine.

## Résultats :

### 1- L'absence de *rpgrip11* aboutit à des défauts de polarité planaire (PCP) chez le poisson zèbre et la souris.

Christine Vesque et Alexia Mahuzier, dans l'équipe de Sylvie Schneider-Maunoury, ont montré que l'absence de *rpgrip11* aboutit à des défauts de positionnement et d'orientation du kinocilium (cil primaire spécialisé des cellules de la cochlée) le long de l'axe proximo-distal dans la cochlée des souris *Ftm*<sup>-/-</sup>, reflet d'une altération de la PCP (article3 Fig.1). De plus l'invalidation de *rpgrip11* par morpholino anti-sens chez le poisson zèbre mène à des phénotypes ciliaires tels que des défauts de CE et de latéralité (article3 Fig.2). Dans ces morphants, l'absence de *rpgrip11* aboutit également à des défauts de positionnement du centrosome dans l'axe antéropostérieur des cellules du plancher neurale, confirmant son rôle dans la PCP (article3 Fig.3). Ces défauts s'accompagnent d'une diminution de l'expression ectopique de Dishevelled-2-Myc et d'une perte de la localisation du Dishevelled-GFP à la base du cil des cellules du plancher neurale des poissons morphants (article3 Fig.4B-D). Christine et Alexia ont démontré une interaction fonctionnelle entre *rpgrip11* et les composants de la voie Wnt-PCP tels que *vangl2*, *dishevelled*, *prickle1* et *inversine*, pour l'élongation de l'axe du poisson (article3 Fig.4A et Fig Suppl.3). De plus, l'injection dans les morphants *rpgrip11* d'un ARN codant Dishevelled de drosophile restaure le phénotype de CE et le positionnement postérieur du centrosome dans les cellules du plancher (article3 Fig.4C). Ces résultats suggèrent que dans le modèle du poisson zèbre la stabilisation de Dishevelled par Rpgrip11 est requise pour sa fonction dans la polarité planaire.

### 2- RPGRIP1L stabilise Dishevelled à la base du cil dans les cellules épithéliales

L'analyse de l'invalidation de *RPGRIP1L* dans le modèle de cellules MDCK a révélé des défauts de ciliogenèse et des défauts d'organisation épithéliale en culture 3D (partie1). De façon surprenante, l'analyse par Western Blot dans les cellules MDCK invalidées pour *RPGRIP1L*, montre une réduction globale de la quantité de Dishevelled-2 et -3 (article 3 Fig.5C). Etant donné que RPGRIP1L et Dishevelled -2 et -3 présentent une localisation commune à la base du cil primaire, nous avons analysé, par immunofluorescence, l'impact de l'absence de RPGRIP1L sur la localisation des différents Dishevelled dans les cellules MDCK. Alors que dans les cellules contrôles, Dishevelled-2 et -3 se localisent au niveau et autour du corps basal à huit jours de culture, les cellules RPGRIP1L-KD perdent cette localisation (article 3 Fig.5A). L'absence de RPGRIP1L aboutit également à une diminution de la localisation de NPHP4, *inversine* et  $\gamma$ -tubulin au niveau et autour du corps basal, suggérant que l'absence de RPGRIP1L déstabilise la zone péricentriolaire à l'origine de la réduction importante du nombre et de la taille des cils primaires (article3 Fig.5 et Fig. Suppl.4). Ces résultats

suggèrent que RPGRIP1L stabilise la zone péricentriolaire, en particulier Dishevelled-2 et -3 à la base du cil afin de garantir la ciliogenèse des cellules MDCK.

### **3- RPGRIP1L agit en complexe avec NPHP4 et inversine**

Pour déterminer les mécanismes moléculaires par lesquels RPGRIP1L stabilise Dishevelled, nous avons traité les cellules RPGRIP1L-KD avec un inhibiteur du protéasome (clasto-lactacystine  $\beta$ -lactone) et mis en évidence que RPGRIP1L stabilise Dishevelled-2 et -3 en empêchant leur dégradation par le protéasome (article 3 Fig.6A). De plus, par des expériences de co-immunoprécipitation nous avons montré que RPGRIP1L fait partie d'un complexe comprenant NPHP4/Inversine/Dishevelled et ne rentre pas en compétition avec NPHP4 ou inversine pour leur interaction avec Dishevelled (article 3 Fig.6C-D). Dans les cellules HEK293T surexprimant transitoirement Dishevelled, la quantité de Dishevelled est stabilisée en présence de RPGRIP1L mais pas en présence de RPGRIP1L porteur des mutations identifiées chez des patients JBTS (article 3 Fig.6B,E) et pour lesquelles nous avons montré qu'elles perturbent l'interactions avec NPHP4. Ces résultats suggèrent que RPGRIP1L stabilise Dishevelled à la base du cil primaire par son interaction avec NPHP4.

### **Conclusion :**

L'ensemble de ces travaux a permis de mettre en évidence le rôle de RPGRIP1L dans la PCP. En effet, nous avons montré à la fois dans l'épithélium sensoriel de la cochlée chez la souris et dans les cellules du plancher neural chez le poisson zèbre, que RPGRIP1L est nécessaire au positionnement correct du corps basal dans l'axe de polarité planaire de l'épithélium. Nous avons démontré le rôle essentiel de RPGRIP1L dans la stabilisation de Dishevelled à la base du cil à la fois dans les cellules épithéliales rénales et dans les cellules du plancher neurale chez le poisson zèbre, nécessaire au positionnement correct du corps basal dans ce modèle. Nos expériences dans les cellules épithéliales rénales suggèrent que RPGRIP1L agit dans le complexe NPHP4-inversine pour réguler finement la stabilité de Dishevelled cytoplasmique et que son interaction avec NPHP4 est nécessaire à la stabilité de Dishevelled à la base du cil primaire. Nos résultats dans ces cellules suggèrent également un rôle plus général de RPGRIP1L dans la stabilité de la zone péricentriolaire et nécessaire à la régulation du cil.



### *ARTICLE 3*

" Dishevelled stabilization by the ciliopathy protein Rpgrip11 is essential for planar cell polarity "

Mahuzier A\*, Gaudé HM\*, Grampa V, Anselme I, Silbermann F, Leroux-Berger M, Delacour D, Ezan J, Montcouquiol M, Saunier S, Schneider-Maunoury S, Vesque C.

J Cell Biol. 2012 Sep 3;198(5):927-40. Epub 2012 Aug 27

\* les deux premiers auteurs ont participé de façon équivalente à ce travail.



## **PARTIE IV**





## **NPHP1 et NPHP4 régulent les voies de signalisation des GTPases Rho et de leurs effecteurs en aval de Dishevelled pour garantir l'intégrité de l'épithélium rénal.**

**Article 4, en préparation :** Helori-Mael Gaudé\*, Rodrick Montjean\*, Marion Delous, Flora Silbermann, Valentina Grampa, Corinne Antignac, Sophie Saunier

\* les deux premiers auteurs ont participé de façon équivalente à ce travail.

### **Position du problème :**

Dans la voie Wnt/PCP, Dishevelled active les GTPase Rho (Rac1 Cdc42 et RhoA), pour contrôler les processus cellulaires tels que la migration et le remodelage du cytosquelette (Schlessinger et al, 2007; Habas et al, 2001; Tanegashima et al, 2008; Rosso et al, 2005). Par ailleurs, l'activation des GTPases Rho est connue pour moduler les jonctions cellulaires (jonctions serrées et jonctions adhérentes) et la polarité (Nusrat et al, 1995). En particulier, la GTPase Rho Cdc42 coopère avec Par6 dans la formation des jonctions serrées (Hurd et al, 2003) mais cette association peut également, après stimulation par l'hépatocyte growth factor (HGF), favoriser le désassemblage des jonctions serrées et l'induction de la tubulogénèse en culture 3D (Togawa et al, 2010). La dérégulation de Cdc42-GTP dans les cellules MDCK aboutit également à la formation de structure multilumen en culture 3D en gel de collagène (Martin-Belmonte et al, 2007). De plus, Cdc42-GTP induit la phosphorylation de p130Cas et ACK1 au cours de la migration (), entraînant ainsi la dissociation des adhésions focales () et la migration cellulaire (Geiger et al, 2006 ; Yang et al, 2001 ; Coon et al, 2002). NPHP1 et NPHP4 sont associées aux effecteurs de Cdc42 aux jonctions serrées (Par6) et aux adhésions focales (Pyk2, p130Cas et ACK) (Mollet et al, 2005 ; Eley et al, 2008 ; Article1). Suite à mes travaux montrant la modulation de Dishevelled par NPHP4, nous avons analysé les processus de migration et d'adhésion cellulaires dans les cellules MDCK N1-KD et N4-KD. Nous avons ensuite cherché à savoir si les GTPases Rho et leurs effecteurs étaient dérégulés. Ainsi nous avons montré que les cellules MDCK-KD présentent un défaut de migration, d'adhésion sur collagène et une réorganisation du cytosquelette. Ces défauts sont associés à une augmentation de l'activation des GTPases Rho et de leur effecteurs.

## **Résultats :**

### **1- NPHP1 et NPHP4 sont impliquées dans les processus cellulaires de migration et d'adhésion sur collagène.**

Des expériences de migration cellulaire par blessure « wound healing », ont été réalisées sur les cellules MDCK et analysées par vidéomicroscopie. Les cellules MDCK N1-KD et N4-KD présentent une augmentation de mobilité et de la distance parcourue de, respectivement, 2 et 1,5 fois supérieures aux cellules contrôles. La trajectoire des cellules MDCK-KD est plus rectiligne, avec parfois le détachement de certaines cellules au front de migration, que celle des cellules contrôles, qui migrent vers la blessure de manière groupée et homogène (Fig.1 A-C p.115). Par ailleurs, l'absence de NPHP1 ou NPHP4 dans les cellules MDCK entraîne un étalement des cellules sur collagène plus rapide que les cellules contrôles, alors qu'il n'y a pas de différences dans le nombre de cellules qui ont adhérees (Fig1 D-E p.115). Le phénomène s'accompagne d'une augmentation du nombre de lamellipodes et de filopodes dans les cellules N1 et N4-KD, alors que les cellules contrôles sont encore rondes, et d'une augmentation du marquage des protéines des adhésions focales paxilline et vinculine en immunofluorescence (Fig. Suppl1 p.119). De plus, nous avons regardé l'activation des composants des adhésions focales p130cas et Pyk2 par immunoprécipitation et Western Blot, en réponse à l'adhésion sur collagène. Nous avons comparé la phosphorylation de ces protéines dans les cellules après 45 minutes d'adhésion sur collagène aux cellules restées 45 minutes en suspension. Nous avons observé une augmentation de la phosphorylation des protéines p130cas et Pyk2 par rapport aux cellules contrôles, reflétant une augmentation de leur activation dans les cellules MDCK-KD lors de l'adhésion, mais également dans les cellules N4-KD restées en suspension (Fig.1 F p.115). Ces résultats suggèrent que NPHP1 et NPHP4 sont des régulateurs négatifs de leurs partenaires des adhésions focales p130cas et Pyk2.

### **2- Les cellules N1 et N4-KD présentent des défauts d'organisation de l'actine.**

Les néphrocystines interagissent avec des protéines du cytosquelette d'actine et des microtubules telles que filamine, tensine,  $\beta$  et  $\alpha$ -tubuline (Benzing et al, 2001 ; Donaldson et al, 2002 ; Otto et al, 2003 ; Mollet et al, 2005). Nous avons analysé par immunomarquage l'organisation de l'actine des cellules MDCK dans différentes conditions de culture. Lorsque les cellules N1 et N4-KD sont cultivées à très faible densité, elles présentent une augmentation de la formation de lamellipodes et de filopodes, qu'elles soient cultivées dans un milieu avec ou sans sérum de veau fœtal (SVF) (Fig.2A p.116). Les cellules N1 et N4-KD, cultivées à confluence pendant huit jours ou très polarisées après onze jours de culture, présentent une diminution de la formation des fibres de stress au niveau apical et une réorganisation de l'actine sous-corticale en "agrégats" (Fig.2B-C p.116). Ces résultats

suggèrent un rôle de NPHP1 et NPHP4 dans la régulation de la réorganisation du cytosquelette d'actine.

### **3- Les cellules N1 et N4-KD présentent une augmentation de l'activation des GTPases Rho.**

L'ensemble des défauts phénotypiques observés dans les cellules MDCK invalidées pour *NPHP1* et *NPHP4* sont des processus étroitement régulés par les GTPases Rho. En effet, la formation des lamellipodes, des filopodes et des fibres de stress dépend des GTPases Rho, Cdc42, Rac1 et RhoA. Nous avons alors réalisé des tests GST-pull down pour doser l'état d'activation des GTPase Rho. Pour cela, des extraits cellulaires sont mis en présence d'une construction GST-Rhotekin se liant à RhoA-GTP ou d'une construction GST-PAK se liant aux formes GTP de Cdc42, Rac1. Dans les cellules polarisées et cultivées pendant huit jours sans traitement particulier, seule la GTPase RhoA présente une augmentation de l'activation de deux fois dans les cellules N1 et N4-KD par rapport aux cellules contrôles (Fig.3A p.117). Cependant lorsque les cellules sont ensemencées à forte densité et collectées le jour suivant pour favoriser la formation des jonctions serrées, les GTPases Cdc42, Rac1, RhoA présentent une nette augmentation de leur activation dans les cellules N4-KD par rapport aux cellules contrôles (Fig.3B p.117). Les cellules N1-KD présentent également une augmentation de l'activation de Cdc42 et RhoA mais une diminution de l'activation de Rac1 (Fig.3B p.117). Ces résultats suggèrent que les néphrocystines régulent négativement l'activation de RhoA pour la maintenance de l'épithélium et qu'elles régulent également les GTPases Rho après stimulation de la formation des jonctions. Etant donné ces résultats et l'interaction de NPHP1 et NPHP4 avec des effecteurs de Cdc42 (Par6, ACK, p130cas) (Geiger et al, 2006 ; Hurd et al, 2003), nous avons alors testé l'interaction éventuelle de ces protéines entre elles. Les lysats de cellules surexprimant transitoirement NPHP1-Myc et NPHP4-Myc ont été mis en présence de la construction GST-Cdc42 avec du GTP ou du GDP. Ces expériences ont permis de démontrer une interaction entre NPHP1 ou NPHP4 et Cdc42 indépendante de son état d'activation (Fig.3C-D p.117). L'ensemble de ces résultats suggèrent une régulation directe des GTPases Rho par NPHP1 et NPHP4.

### **4- L'implication de Cdc42 dans les phénotypes des cellules N1 et N4-KD**

Afin d'examiner si les défauts dans les processus cellulaires observés dans les cellules MDCK N1 et N4-KD tels que la migration, l'adhésion sur collagène ou encore la formation de sphère en culture 3D, résultaient de l'activation anormale des GTPases Rho, nous avons généré des cellules surexprimant le dominant négatif Cdc42N17 dans les trois lignées (pSICOR+Cdc42N17; N1-KD+Cdc42N17, N4-KD+Cdc42N17) (Fig4A p.118). De façon intéressante, lors de l'analyse du processus de migration, l'expression de Cdc42N17 réduit la mobilité des cellules N4-KD de plus de 2x alors qu'elle a un effet moindre sur les N1-KD (1,5x) et un léger effet sur les cellules contrôles (1,3x).

(Fig.4 p.118). De la même façon, l'expression de Cdc42N17 dans les cellules N4-KD restaure les défauts d'étalement des cellules après 60 minutes d'adhésion sur collagène (Fig.4C p.118). En revanche, le sauvetage est partiel dans les cellules N1-KD (40% des cellules étalées versus 20%) (Fig.4C p.118). Enfin, nous avons analysé en culture 3D en gel de collagène l'effet de l'expression de Cdc42N17 dans les cellules N1-KD et N4-KD sur la formation des sphères. Nous avons constaté que la proportion de structures avec multilumen en gel de collagène passe de 80% dans les cellules N4-KD à 20% dans les cellules N4-KD+Cdc42N17, alors que cette proportion ne change pas pour les cellules N1-KD versus N1-KD+Cdc42N17 (Fig.4D p.118). Par ailleurs l'expression de Cdc42N17 dans les cellules contrôles augmente la proportion de structures désorganisées en accord avec les données de la littérature (Rogers et al, 2003). L'ensemble de ces résultats suggèrent une régulation de la GTPase Rho Cdc42 par la NPHP4 pour moduler les processus de migration, d'adhésion cellulaires et d'organisation épithéliale.

### **Discussion :**

L'ensemble de ces travaux a permis de mettre en évidence le rôle important de NPHP1, NPHP4 dans la migration et l'adhérence cellulaire. En effet, l'invalidation par interférence à l'ARN dans les cellules épithéliales rénales MDCK aboutit à un étalement précoce sur collagène, une augmentation de la migration, avec une réorganisation du cytosquelette d'actine. Ces cellules présentent également une augmentation de l'activation des GTPases Rho en particulier lors de la formation des jonctions cellulaires, ainsi qu'une activation accrue des protéines des adhésions focales p130cas et pyk2 après adhésion sur collagène, suggérant une régulation négative de NPHP1 et NPHP4 sur ces protéines. L'expression du dominant négatif de Cdc42 et l'interaction des néphrocystines avec cette GTPase Rho, permet de proposer un mécanisme moléculaire par lequel les NPHP pourraient inhiber la migration et maintenir l'adhérence des cellules épithéliales afin de garantir l'intégrité de l'épithélium rénal.

Les GTPases Cdc42, RhoA et Rac1 sont des activateurs du complexe Par lors de la polarisation du front de migration des cellules (Pegtel et al, 2007; Goldstein et Macara, 2007). D'une part, Cdc42 active le complexe Par6/aPKC au front de migration des cellules permettant l'assemblage de plusieurs autres complexes nécessaires à la polarisation du cytosquelette des microtubules, du centrosome et de l'appareil de Golgi (Etienne-Manneville et Hall, 2003). D'autre part, au front de migration des cellules, l'interaction de Par3 avec Tiam1/2 et le complexe aPKC/Par6/Cdc42-GTP et la phosphorylation de Par3 par la kinase ROCK, modulent l'activation de Rac1 permettant l'assemblage et le désassemblage dynamique des protusions de la membrane nécessaire à la migration des cellules (Nakayama et al, 2008 ; Jaffe et Hall, 2005 ; Pertz et al, 2006). Cdc42 régule la directionnalité de la migration cellulaire ce qui expliquerait que les cellules MDCK N1-KD et N4-KD présentent une

migration directe vers la blessure comparée aux cellules contrôle qui migrent de façon homogène et groupée pour refermer la blessure. Le retard de formation des jonctions serrées que nous avons observé dans ces lignées lors des essais de « calcium switch » (article 1) serait ainsi dus à un défaut de régulation des protéines des complexes de polarité Par et Crbs par Cdc42. De façon intéressante, il a été montré que maintenir intact les jonctions cellule-cellule est essentielle lors de la migration collective (Hidalgo-Carcedo et al, 2011). Ainsi, les jonctions serrées des cellules invalidées pour NPHP1 ou NPHP4 pourraient être déstabilisées ce qui favoriserait la migration rectiligne des cellules. De plus Cdc42 est responsable de l'activation de Rac1 par le recrutement de la GEF  $\beta$ PIX lors du wound healing (Cau et Hall 2005). Rac influence la directionnalité et la vitesse cellulaire (Pankov et al, 2005 ; Petrie et al, 2009) et son activation accrue dans les fibroblastes entraîne une diminution de la vitesse (Sander et al, 1999). Dans les cellules N1-KD une diminution de l'activation de Rac1 est observée parallèlement à l'activation de Cdc42, cette baisse d'activation de Rac1 pourrait accroître la vitesse des cellules N1-KD migrant vers la blessure.

Cdc42 est connu pour être un régulateur à la fois des jonctions cellulaires et des adhésions focales (Nusrat et al, 1995 ; Geiger et al, 2006 ; Hurd et al, 2003). En effet, Cdc42-GTP induit la phosphorylation de p130Cas et ACK1, entraînant la dissociation des adhésions focales (Yang et al, 2001) et la migration cellulaire (Coon et al, 2002 ; Geiger et al, 2006). Certains effecteurs de Cdc42 (p130cas, Par6) ainsi que plusieurs protéines associées au réseau d'actine (filamines A/B et tensine) sont également des partenaires de NPHP1 et NPHP4 (Mollet et al, 2005 ; Delous et al, 2009), suggérant que les NPHP peuvent moduler l'activation des RhoGTPases et leurs conséquences sur la réorganisation du cytosquelette d'actine et les processus cellulaires qui en découlent à différents niveaux.

Le système de culture 3D est un système intégratif qui traduit les défauts des jonctions cellule-cellule et des adhésions focales par la formation de structures désorganisées à plusieurs lumens. En effet, l'inactivation de Cdc42 ou le dominant négatif de Cdc42 (Cdc42N17) dans les cellules MDCK entraîne la formation de structures désorganisées en culture 3D en gel de collagène de type I (Martin-Balmonte et al 2007, Rogers et al, 2003). L'expression de Cdc42N17 restaure principalement les défauts phénotypiques des cellules MDCK invalidées pour *NPHP4*, suggérant une régulation de NPHP4 en amont de la signalisation des Rho GTPases, soit directe ou par l'intermédiaire de Dishevelled. Les structures multilumens en culture 3D persistent en présence de Cdc42N17 dans les cellules N1-KD suggérant que les effecteurs sont toujours dérégulés ou que d'autres acteurs entre en jeu. Ainsi, NPHP1 agirait en aval pour réguler les effecteurs des Rho GTPases tel que p130Cas, Pyk2, ACK1 ou même Par6.

Plusieurs données suggèrent une régulation directe des néphrocystines sur les GTPases Rho :

i) nous avons montré l'interaction de NPHP4 et NPHP1 avec Cdc42 indépendamment de son état d'activation; ii) il a été montré au laboratoire par une double approche de criblage de banque peptidique et de double hybride, que le domaine SH3 de NPHP1 est capable de se lier à la protéine Rho-GAP Grit dont les partenaires sont des molécules adaptatrices impliquées dans la voie de signalisation en aval des récepteurs tyrosine kinases tels que Trk (Matsuda et Kurata, 1996 ; Nakamura et al, 1998 ; Nakazawa et al, 2002), iii) des mutations ont été identifiées chez des patients avec NPH dans un nouveau gène codant une Rho GEF régulant Cdc42. Ainsi, on peut imaginer que la régulation des GTPases Rho pourrait être via l'interaction des néphrocystines avec les protéines régulatrices Rho-GAP et Rho-GEF.

Enfin, les défauts d'organisation/migration cellulaires ainsi que l'augmentation des GTPases Rho dans les cellules MDCK NPHP-KD pourrait également être la conséquence d'une modulation anormale des voies Wnt/PCP et de l'augmentation de Dishevelled (article 2 et données personnelles). En effet, Dishevelled et la protéine APC favorise la localisation de paxilline au front de migration des cellules et le renouvellement des adhésions focales après activation par le ligand de la voie Wnt/PCP Wnt5a (Matsumoto et al, 2010). Par ailleurs, on observe une activation anormale de RhoA dans les cellules MDCK-KD en culture. Cette activation est constante et ne varie pas lors de la formation des jonctions ou de l'adhésion cellulaire. Ceci est en accord avec les données montrant que l'adhésion des cellules MDCK ne dépend pas de l'activation de RhoA (Pralhad et al, 2003). L'augmentation de RhoA en absence d'un composant de la zone de transition TMEM216 impliquée dans le JBTS2, est associée à des défauts de polarité planaire et d'ancrage du corps basal dans les cellules IMCD (Valente et al, 2011). Ceci indique que l'activation de RhoA dans les cellules MDCK pourrait influencer l'organisation planaire des cellules. L'étude de l'effet d'un dominant négatif RhoA exprimé de façon stable dans les cellules MDCK N1-KD et N4-KD cultivées en culture 3D, nous permettrait de démontrer son rôle dans la morphogène épithéliale. En accord avec cette hypothèse, les souris *Nphp4*<sup>-/-</sup> générées au laboratoire développent des lésions rénales kystiques après néphrectomie subtotale qui sont associées à une activation anormale de Cdc42 et RhoA.

Les multiples niveaux de régulations dans lesquels sont impliquées les néphrocystines semblent requis pour garantir l'inhibition de l'activation des adhésions focales, l'intégrité des jonctions serrées afin de garantir le maintien des cellules dans un état différencié dans l'épithélium rénal. Les perturbations de ces voies de signalisation pourraient rendre compte des mécanismes pathophysiologiques aboutissant aux altérations retrouvées chez les patients, telles que la fibrose interstitielle rénale et la formation de kystes.

*ARTICLE 4, en préparation*

" Nephrocystins depletion lead to migration and adherence defects of MDCK cells associated with up regulation of Rho GTPases and their effectors "

Gaudé HM\*, Montjean R\*, Delous M, Silbermann F, Grampa V, Antignac C, Saunier S.

\* les deux premiers auteurs ont participé de façon équivalente à ce travail.



**Title** : Nephrocystins depletion lead to migration and adherence defects of MDCK cells associated with up regulation of Rho GTPases and their effectors.

Helori-Mael Gaudé<sup>1,§</sup>, Rodrick Montjean<sup>1,§</sup>, Marion Delous<sup>2</sup>, Flora Silbermann<sup>1</sup>, Valentina Grampa<sup>1</sup>, Corinne Antignac<sup>1</sup>, Sophie Saunier<sup>1,#</sup>

1 INSERM, U983, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, Imagine Institute, 75015 Paris, France; 2 Department of Biochemistry and Biophysics, Program in Developmental and Stem Cell Biology, Liver Center and Diabetes Center, University of California - San Francisco, San Francisco, CA 94158, USA

<sup>§</sup>These authors contributed equally to the work

Keywords: NPHP, Dishevelled, planar cell polarity, Rho GTPases, Cdc42.

# To whom correspondence should be addressed: [sophie.saunier@inserm.fr](mailto:sophie.saunier@inserm.fr)

## **ABSTRACT**

Nephronophthisis is a hereditary nephropathy characterized by interstitial fibrosis and cyst formation that is caused by mutations in *NPHP* genes encoding the nephrocystin family of ciliary proteins. We previously showed that nephrocystin-4 represses the Wnt- $\beta$ catenin pathway in the zebrafish cloaca and in mammalian kidney cells wherein nephrocystin-4 interacts with inversin and dishevelled, regulating its stability and subcellular localization. Moreover, depletion of *NPHP1* or *NPHP4* by shRNA-mediated knockdown in MDCK cells led to a delay in tight junction formation and disorganized structures in 3D culture. Here, we report that knockdown of either gene in MDCK cells also increases cell migration, enhances spreading on collagen I and disorganizes actin cytoskeleton. These defects are accompanied by overactivation of proteins that regulate focal adhesion structures *i.e.* p130cas and Pyk2, as well as an overactivation of Rho GTPases Cdc42, Rac1 and RhoA. Interestingly, we also demonstrate an interaction between Cdc42 and NPHP1 and NPHP4 proteins and show that expression of a dominant negative form of Cdc42 rescued migration, spreading on collagen I and 3D phenotype defects in the NPHP-depleted cells.

Our data suggest that nephrocystin-1 and -4 act as negative modulators of Rho GTPases and their effectors in order to inhibit cell migration and to maintain cell adhesion in renal epithelia.

## INTRODUCTION

*NPHP1* and *NPHP4* are two genes whose mutations cause isolated juvenile nephronophthisis (NPH) or nephronophthisis in association with retinitis pigmentosa (Senior-Løken syndrome) or ocular motor apraxia (Cogan syndrome) (Hoefele et al, 2005; Mollet et al, 2005). NPH, an autosomal recessive chronic interstitial nephropathy, is the most common genetic cause of chronic renal failure in children and young adults. The age of onset of end-stage renal disease (ESRD) defines three distinct forms of NPH (juvenile, infantile and adolescent). Renal histology is characterized by tubular atrophy with thickened tubular basement membranes, diffuse interstitial fibrosis and cyst formation at the cortico-medullary junction. Subsets of patients with NPH display additional symptoms such as retinal degeneration (Senior-Løken syndrome), mental retardation and cerebellar ataxia (Joubert syndrome), bone anomalies or hepatic fibrosis. These disorders are collectively termed ciliopathies, as the mutated genes encode proteins that localize to the primary cilia, similar to members of the well known polycystic kidney disease protein family. Indeed, more than 15 genes have been identified to date to cause NPH. These genes encode two families of proteins: nephrocystins and IFT-A proteins. Nephrocystins are proteins ubiquitously expressed that share a common, but not exclusive, location at the base of the primary cilium more specifically at the transition zone. IFT-A proteins are involved in intraflagellar retrograde transport. All these proteins are involved in cilia function and structure (Hildebrandt et al; 2011).

Cilia are microtubule-based organelles projecting out from the cell surface of most eukaryotic cells. Cilia collect a wide variety of extracellular signals and transduce them to regulate cellular processes such as proliferation, polarity, differentiation, or tissue maintenance. Dysfunction of cilia appears to account for the involvement of multiple organ systems in ciliopathies (Hildebrandt et al, 2011).

*NPHP1* and *NPHP4* form a protein complex with *RPGRIP1L* that is enriched at the transition zone of the cilium and at the cell junctions (Delous et al, 2007; Delous et al, 2009; Mollet et al, 2005; Sang et al, 2011). *NPHP1* and *NPHP4* interact directly with cytoskeletal components and distinct protein complexes, such as regulators of cell–cell/cell–matrix adhesion and actin cytoskeleton (p130Cas and Pyk2), and the polarity complex proteins *PALS1/PATJ* and *Par6* (Mollet et al, 2002; Mollet et al, 2005; Delous et al, 2009). We have recently demonstrated that the protein complex *NPHP4/RPGRIP1L/inversin* modulates Wnt signaling pathways via control of dishevelled stability and subcellular localization. The loss of *NPHP4* increases cytoplasmic dishevelled protein level while overexpression of *NPHP4* targets dishevelled to the proteasome pathway, hence modulating Wnt canonical pathway (Burcklé et al, 2011). In contrast, we demonstrated that *RPGRIP1L* counteracts the *inversin-NPHP4*-dependent proteasomal degradation of dishevelled, leading to its stabilization at the

cilium base and the establishment of planar cell polarity (PCP) in mouse and zebrafish (Mahuzier et al, 2012). In addition, we have also shown that NPHP1 and NPHP4 regulate epithelial morphogenesis and ciliogenesis in MDCK cell lines. shRNA-mediated knockdown of either *NPHP1* (N1-KD) or *NPHP4* (N4-KD) in these cells resulted in delayed tight junction formation, abnormal cilia formation and disorganized multi-lumen structures when grown in a three-dimensional collagen matrix (Delous et al, 2009).

In the Wnt/PCP pathway, dishevelled modulates Rho GTPases activation to control cellular processes such as cytoskeleton organization or cell migration (Lai et al, 2009; Schlessinger et al, 2007). In addition, aberrant PCP signaling contributes to upregulation and activation of Cdc42 and development of cysts in kidneys of mice mutant for polycystin-1 (Luyten et al, 2010). Rho GTPases (Rho, Rac, and Cdc42) are intracellular signaling proteins belonging to the family of small G proteins. Like all GTPases, Rho GTPases cycle between an active (GTP bound) and an inactive (GDP bound) conformation. In the active state, they interact with their effectors to mediate downstream signaling. The GTP/GDP cycle of Rho GTPases is highly regulated by guanine nucleotide exchange factors (RhoGEFs) which catalyze nucleotide exchange and mediate activation, and by GTPase activating proteins (RhoGAPs) which stimulate GTP hydrolysis, leading to inactivation. Rho GTPases control a large spectrum of cellular functions including actin cytoskeleton organization, vesicular trafficking, ciliogenesis, morphogenesis, tight junction formation and cell cycle progression (Jaffe and Hall, 2002).

In this paper, we have further investigated the role of NPHP1 and NPHP4 in the regulation of cellular polarity and maintenance of renal epithelia integrity, using epithelial cell models. We report that knockdown of either *NPHP1* or *NPHP4* led to an increased migration, enhanced spreading on collagen I and actin cytoskeletal disorganization in MDCK cells. These defects are accompanied by an overactivation of proteins that regulate focal adhesion structures *i.e* p130cas and Pyk2, and a modulation of activation of Cdc42, RhoA and Rac1. Interestingly, migration, spreading and 3D phenotype alterations are rescued by the expression of a dominant negative form of Cdc42, indicating that overactivation of Cdc42 is involved in dysregulation of these proteins. Taken together, our results point to a negative regulation of Rho GTPases and their effectors by the nephrocystins to maintain polarization of renal epithelium.

## RESULTS

### ***NPHP1* and *NPHP4* knockdown cells show an increased cell migration and an enhanced spreading with early activation of focal adhesion proteins**

To decipher the role of *NPHP1* and *NPHP4* in the regulation of cellular polarity and maintenance of renal epithelia integrity, we first investigated the migratory behavior of control and knockdown MDCK cells, by video microscopy. Cells were grown at confluence in the presence of serum for 8 days to allow correct epithelialization. After overnight starvation, wound healing was performed (Fig 1A) and the trajectories of 20 cells per cell line were monitored (Fig 1B). As showing in figure 1B, control cells showed a collective migration whereas knockdown cells exhibited a more direct trajectory into the wound with sometimes cells detached from the group. After 7 hours of migration of *NPHP1* and *NPHP4* KD cells (N1-KD/N4-KD) was 1,5 to 2 fold higher than that compared of control cells (Fig 1C, upper panel). The loss of *NPHP1* or *NPHP4* in MDCK cells also resulted in an increased cell velocity in the same proportion 1,5 to 2 (Fig 1C, lower panel). These observations indicate that the absence of nephrocystins alters proper migration and cell-cell contacts.

As *NPHP1* and *NPHP4* are also associated with proteins of focal adhesions Pyk2, p130Cas (Eley et al, 2008 ; Mollet et al, 2005), we next evaluated the ability of N1-KD and N4-KD cells to spread on type I collagen. After one hour of attachment, 80% to 90% of N1-KD and N4-KD cells were spreaded whereas control cells remained with a round shape (Fig 1D-E). The fast spreading of the depleted cells led us to examine the localization and activation of the adhesion complex components paxillin and vinculin as well as the adhesion signaling proteins p130Cas and pyk2.

As revealed by immunofluorescence microscopy, upon one hour of spreading, knockdown cells showed a strong staining of paxillin/vincullin focal adhesion proteins at the plasma membrane compared to control cells, suggesting an early activation of the FAK complex protein (Fig 1D and suppl Fig1). We further investigated the activation/phosphorylation of these molecules, upon adhesion versus suspension by immunoprecipitation of endogenous p130cas protein and western blot analysis of phosphorylation on pyk2 Y402 and phosphorylated tyrosine on p130Cas proteins. The enhanced spreading observed in the absence of nephrocystins was correlated with an increased phosphorylation of Pyk2 Y402 and phosphorylated Tyr on p130Cas upon adhesion (Figure 1F). In suspension depleted cells, also exhibited an increased phosphorylation of pyk2 and p130Cas compared to control cells (more for N4-KD than N1-KD) suggesting a constitutive activation of these proteins. This indicates that *NPHP1* and *NPHP4* act as negative regulators of focal adhesion proteins (Figure 1F).

### ***NPHP* KD cells show a disorganization of actin cytoskeleton.**

As cytoskeletal reorganization is important during migration and adhesion processes, we next investigated actin reorganization in different conditions of stimulation. We first studied the actin organization in isolated cells in order to visualize the cortical actin rearrangement. Stimulated cells present formation of lamellipodia and filopodia while unstimulated cells do not. Compared to control cells, depleted MDCK cells showed a 3- and a 2-fold increase in the proportion of stimulated cells in starving and cell stimulation conditions (Fig 2C). We next looked the actin reorganization after induction of tight junction formation since N1-KD or N4-KD in MDCK cells resulted in delayed tight junction formation and in well polarized cells. In both cases, control cells show a dense actin network with transversal stress fibers while deplete cells do not and present a clear disappearance of stress fibers and a strong cortical staining (Fig 1C, right panel). Taken together, these data indicate that nephrocystins-1 and -4 are required for actin dynamics.

### ***NPHP* knockdown cells show an abnormal activation of RhoGTPases**

Actin-driven processes including migration and adhesion as well as cytoskeleton reorganization, are mediated by Rho GTPases such as RhoA, Cdc42 and Rac1. Since we described perturbation of these cellular processes in MDCK KD cells, we next explored the activation status of these three Rho GTPases. We first analyzed the activation of Rho GTPases in cells grown for 8 days in the presence of serum. In these conditions, there was no obvious difference in term of Cdc42 and Rac activation in KD cells compared to control cells (Fig 3C, left and middle panel). However, we showed a significant 2-fold activation of RhoA in both KD cell lines (Fig 3C, right panel) (Burcklé 2011). In parallel, we studied the activation of these three GTPases after induction of tight junction formation. Cells were plated at high density and collected the following day to favor formation of cell-cell contact events. In these conditions, activation was 4-fold increased for Cdc42 (Fig 3D, left panel) and 2-fold increased for RhoA, in KD cells compared to control cells (Fig 3C, right panel). Surprisingly, we found a 2-fold decrease in activation of Rac1 in N1-KD cells whereas N4-KD cells showed a 2-fold activation of Rac (Fig 3 C, middle panel). These results suggest a role of nephrocystins in the regulation of RhoA during epithelium maintenance and in the regulation of Cdc42 and RhoA in tight junction formation.

All these findings, prompted us to test whether nephrocystin-1 and -4 could regulate the activation of Rho GTPases by interacting with these molecules and particularly with Cdc42. Using pull-down assays on HEK293T lysates transiently transfected with NPHP4-Myc and NPHP1-Myc constructs, we demonstrated an interaction between these two nephrocystins and Cdc42. Interestingly, both nephrocystins interacted with both the Cdc42-GTP active form and the Cdc42-GDP inactive form (Fig 3).

### **Involvement of Cdc42 in the phenotype of *NPHP* knockdown cells**

To further assess the role of Cdc42 these cellular processes, we generated cells invalidated for *NPHP1* or *NPHP4* overexpressing a dominant negative form of Cdc42 (+Cdc42 N17). After a cloning selection we selected clones presenting similar levels of Cdc42 N17 protein expression (suppl Fig.1). By videomicroscopy we showed that the expression of Cdc42N17 reduces motility of N4-KD cells more efficiently (2,1) than N1-KD (1,5) or control cells (1,3). Moreover, that of upon one hour adhesion on collagen, overexpression of Cdc42N17 decreased the percentage of spreaded cells from 80 % to 40 % and 90 % to 70 % in N4-KD cells and N1-KD cells, respectively, and increased spreaded cells from 20% to 35% in control cells. These results suggest that over activation of Cdc42 observed in MDCK-KD cell lines plays a role in the enhanced cell migration and adhesion on collagen.

We previously showed that depletion of either *NPHP1* or *NPHP4* genes in MDCK cells led to severely disorganized structures containing multiple lumens compared to control cell lines which formed organized, single-lumen structures (Delous et al, 2009). Surprisingly, overexpression of Cdc42 N17 in N4-KD cells rescued the multiple lumens phenotype in 3D culture collagen I matrix while this Cdc42 N17 construct had no effect in N1-KD cells (Figure 4D). In agreement with Rogers's observation (Rogers et al, 2003), we also noted that overexpression of the Cdc42 N17 construct in control cell lines induced the formation of multiple lumen structures. This indicates that nephrocystins in particular NPHP4 regulate activation of Cdc42 and that abnormal activation of Cdc42 may account for the instability in cell junctions and alterations in epithelial organization during epithelial morphogenesis observed in N1-KD and N4-KD cells (Delous et al, 2009).

## **DISCUSSION**

In this paper, we investigated the cellular functions of NPHP1 and NPHP4 to elucidate their implication in the molecular mechanisms involved in nephronophthisis. In this respect, we analyzed MDCK NPHP-depleted behavior in different cellular process. We observed that the absence of NPHP1 and NPHP4 in renal epithelial cells lead to abnormal activation of Cdc42 RhoA and Rac1 and their downstream components such as p130Cas and Pyk2. These deregulations are associated with alterations of cellular processes including migration, adhesion, and cytoskeleton reorganization. Our results point to a role of NPHP1 and NPHP4 in negative regulation of Rho GTPases and focal adhesion signaling in order to inhibit migration and maintain cellular adhesion in epithelia. Alteration of such mechanisms could account for the renal defects observed in NPH.

(voir la discussion en français)



## **MATERIALS AND METHODS**

### **Plasmids and antibodies**

Full length Myc-tagged nephrocystin-1 (N1-Myc) and nephrocystin-4 (N4-Myc) were described previously (Mollet et al 2005). Edd-Myc was kindly provided by A. Smahi (Necker Hospital, Paris, France). Cdc42-HA constructs were provided by C. Carpenter (HMS, Boston, USA)

### **Establishment of stable Cdc42N17 MDCK cell lines.**

MDCK cells stably expressing a shRNA targeting *NPHP1* and *NPHP4* have been described previously (Delous et al 2009). Expression of Cdc42 N17 in these cells was performed using the Cdc42 N17 cDNA sequence cloned in pRRL.SINcPPT.PGK/WRPE (Zufferey et al 1998) by insertion X-X. Lentiviral infections were performed as described (Delous et al 2009). Cloning selection was performed by the cytometry facilities Inserm U768 with a ARIA II.

### **F-actin immunofluorescence on MDCK cells**

MDCK cells were grown for 8 days on coverslips or on transwells and fixed, `s glf g bnnck dnbx or plated at 10% confluence then starved, stimulated FCS and fixed 2 days after plating. Cells were fixed in 4% PFA in PBS for 20 min followed by treatment with 50 mM NH<sub>4</sub>Cl for 10 min. Cells were then treated with PBS, 0.1% Tween-20, 3% BSA, 10% donkey serum for 30 min, before incubating with phalloïdin (Sigma). Confocal images were taken using a ZEISS LSM 750 laser scanning microscope system with a plan achromat 40x/1.3 oil DIC M27 or a plan achromat 63x/1.4oil DIC M27 objectives (Carl Zeiss North America, Thornwood, NY, USA).

### **Migration assays**

MDCK cells were grown for 8 days in 24 wells plate (Falcon) or in Chamber-slide system (Lab-Tek) and serum starved overnight before wound healing. Directional cell migration was analyzed by scratch assays and video were obtained by taking pictures of cells every 5min over a time course of 6 to 7 h. Cells pathways, distance and velocity were calculated with Image J software. In three independent

experiment 20 cells were followed for each cell lines and used to calculate distance of migration and cell velocity .

### **GTPase activity assays**

Cells were grown for 8 days or plated at high confluency the day before lysis. The relative levels of GTP-bound RhoA, Rac1, or Cdc42 were determined by an effector pulldown assay as described previously (Wang et al, 2003). Lysis of MDCK cells and pull down assay were done according to the manufacturer's instructions (Cytoskeleton). In brief, cells were lysed in ice cold buffer and cell lysates were immediately clarified by centrifugation. An aliquot of cell extract was incubated with the GST-PAK fusion protein (Rac1 and Cdc42 assay) or with the GST-rhotekin fusion protein (RhoA assay). The bead pellet was washed and re-suspended in 2 x Laemmli sample buffer. Proteins bound to the beads were separated on a 15% SDS polyacrylamide gel, transferred onto a nitrocellulose membrane, and membranes were blotted with RhoA (cytoskeleton ARH03), Rac1 (BD transduction) or Cdc42 (Santa Cruz) antibodies. The band density was quantified by Bio1D software (Vilber Lourmat), and the relative density of pulled down RhoA and Rac1/Cdc42 were normalized to the total RhoA, Rac1 or Cdc42 (input) in the same sample.

### **Adhesion assays**

MDCK cells were grown for 8 days, serum starved overnight, trypsinized and incubated in suspension in MEM without FCS. Then cells were either leaved in suspension or allowed to adhere 45/60 min on type I collagen (40µg/mL). Cells adhered on coverslips were fixed in 4% PFA in PBS for 20 min followed by treatment with 50 mM NH<sub>4</sub>Cl for 10 min. Cells were then treated with PBS, 0.1% Tween-20, 3% BSA, 10% donkey serum for 30 min, before incubating with the following primary antibodies: rabbit mouse-Pyk2 (1/100 X), rabbit anti-p130Cas (Santacruz), rabbit anti-Paxillin (BD transduction), rabbit anti-vinculin (Sigma) for 2h and followed by the appropriate fluorescent secondary antibody. Cells in suspension and adhered in 6 wells plate were washed in PBS and lysed as described (Burcklé et al, 2011). Immunoprecipitation of p130Cas was performed as described (Delous et al, 2009). After denaturation, samples were immunoblotted with the indicated antibodies and p-Tyr (Millipore) and Y402-Pyk2 (Upstate). Western Blots images were captured with a fusion Fx7 system and confocal images were taken using a ZEISS LSM 750 .

**Three-dimensional collagen gel culture** were done as described (Delous et al, 2009)

**Transfection and GST fusion protein pull-down assays.**

NPHP1-Myc, NPHP4-Myc and Edd-Myc, were transfected into HEK293T cells by the calcium phosphate method. For GST pull down assays, GST fusion proteins were produced in *E. coli* BL21 strain and purified using glutathione-agarose beads (Sigma). For GST-Cdc42 beads were initially loaded with GTP or GDP by incubation for 1h in a buffer containing 200  $\mu$ M GTP- $\gamma$ S or GDP- $\gamma$ S (Sigma-Aldrich), Hépès 25 mM (pH 7,5), EDTA 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM and Complete (Roche). Equal amounts of GST and GST-Cdc42 proteins were incubated with lysates of HEK293T transfected cells for 1h at 4°C. After washes and denaturation, templates were processed for immunoblotting with the antibodies  $\alpha$ -Myc (Santa Cruz).

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank the mouse facilities of the IFR83 (Paris, France) for efficient technical support. We are grateful to C. Carpenter for providing Cdc42 plasmids. O. Pellé of the cytometry facility InsermU768 for his help. We also thank N. Gourdin and M. Garfa-Traoré for their technical assistance with confocal microscopy and video microscopy (Imaging facilities of the IFR 94). This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Agence Nationale de la Recherche (S.S. grant R07089KS), the Fondation pour la Recherche Médicale ('Equipe FRM' grant DEQ20071210558 to S.S.), the Association pour l'Utilisation du Rein Artificiel (AURA). H.M.G was the recipient of a PhD fellowship from the Société de Néphrologie and the Association pour l'Information et la Recherche sur les maladies Rénales Génétiques (AIRG).

## REFERENCES

- Burckle, C., H. M. Gaude, et al. "Control of the Wnt pathways by nephrocystin-4 is required for morphogenesis of the zebrafish pronephros." *Hum Mol Genet* **20**(13): 2611-27.
- Delous, M., L. Baala, et al. (2007). "The ciliary gene RPGRIP1L is mutated in cerebello-oculo-renal syndrome (Joubert syndrome type B) and Meckel syndrome." *Nat Genet* **39**(7): 875-81.
- Delous, M., N. E. Hellman, et al. (2009). "Nephrocystin-1 and nephrocystin-4 are required for epithelial morphogenesis and associate with PALS1/PATJ and Par6." *Hum Mol Genet* **18**(24): 4711-23.
- Eley, L., S. H. Moochhala, et al. (2008). "Nephrocystin-1 interacts directly with Ack1 and is expressed in human collecting duct." *Biochem Biophys Res Commun* **371**(4): 877-82.
- Hoefele, J., R. Sudbrak, et al. (2005). "Mutational analysis of the NPHP4 gene in 250 patients with nephronophthisis." *Hum Mutat* **25**(4): 411.
- Jaffe, A. B. and A. Hall (2002). "Rho GTPases in transformation and metastasis." *Adv Cancer Res* **84**: 57-80.
- Lai, S. L., A. J. Chien, et al. (2009). "Wnt/Fz signaling and the cytoskeleton: potential roles in tumorigenesis." *Cell Res* **19**(5): 532-45.
- Luyten, A., X. Su, et al. "Aberrant regulation of planar cell polarity in polycystic kidney disease." *J Am Soc Nephrol* **21**(9): 1521-32.
- Mahuzier, A., H. M. Gaude, et al. "Dishevelled stabilization by the ciliopathy protein Rpgrip11 is essential for planar cell polarity." *J Cell Biol*.
- Mollet, G., R. Salomon, et al. (2002). "The gene mutated in juvenile nephronophthisis type 4 encodes a novel protein that interacts with nephrocystin." *Nat Genet* **32**(2): 300-5.
- Mollet, G., F. Silbermann, et al. (2005). "Characterization of the nephrocystin/nephrocystin-4 complex and subcellular localization of nephrocystin-4 to primary cilia and centrosomes." *Hum Mol Genet* **14**(5): 645-56.
- Rogers, K. K., T. S. Jou, et al. (2003). "The Rho family of small GTPases is involved in epithelial cystogenesis and tubulogenesis." *Kidney Int* **63**(5): 1632-44.
- Sang, L., J. J. Miller, et al. "Mapping the NPHP-JBTS-MKS protein network reveals ciliopathy disease genes and pathways." *Cell* **145**(4): 513-28.
- Schlessinger, K., E. J. McManus, et al. (2007). "Cdc42 and noncanonical Wnt signal transduction pathways cooperate to promote cell polarity." *J Cell Biol* **178**(3): 355-61.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1:** *NPHP* knockdown cells present abnormal migratory and spreading behavior upon collagen matrix adhesion. (A) Confluent monolayers of control MDCK cells and *NPHP1* or *NPHP4*-depleted cells (N1-KD, N4-KD), wounded and allowed to migrate. The migration was followed by videomicroscopy from start (upper images) until 7 hours (lower images)(White line are starting point). (B) Trajectories of migrating cells followed by video microscopy (supplementary videos). Lines represent the migration of 20 cells during 7h and all trajectories have been normalized to a mutual starting point. (C) Bars graphs represent mean distance and velocity of cells into the wound (n=60 cells were followed from three independent migration test). (D) Immunostaining underlined enhanced spreading on type I collagen matrix for *NPHP1* and *NPHP4*-depleted MDCK cells versus round shape control cells. Pyk2 (upper panels) and p130Cas (lower panels) immunostaining, demonstrated induction and activation of focal adhesion complex all around the cell body (white arrowhead) in depleted cells versus control. Scale bars: 10  $\mu\text{m}$ . (E) Analysis of the percentage of very spread cells (spread ++), just spread cells (spread +) versus non-spread cells (spread -) in the several cell lines. 80-100 cells of each cell lines were scored for the measure. (F) Immunoblot of phospho-Y402-Pyk2 (left panels) and phospho-Tyrosine after immunoprecipitation of p130Cas (right panels) in MDCK cells upon 45 minutes of adhesion on collagen matrix or 45 minute of suspension (Collagen+/-). Immunoblots of p130Cas in immunoprecipitate complex and in total cell lysates.

**Figure 2:** *NPHP* depleted cells present actin reorganization along epithelialization. (A) Phalloïdin immunostaining on isolated MDCK cells and bar graph reveal that nephrocystins-depleted cells present increased lamellipodia (white arrow) formation both with and without cell stimulation. (B-C) Phalloïdin immunostaining on junction-stimulated (B) or on well polarized MDCK cells (C lower panels) underlined decreased stress fibers (white arrowhead) formation at the apical region and subcortical actin reorganization in *NPHP1* and *NPHP4* depleted MDCK cells versus control cells. (D) Electron microscopy images of control and N4-KD cells

**Figure 3:** *NPHP* protein interact with Rho GTPase Cdc42 and their depletion lead to abnormal activation of RhoA, Cdc42 and Rac1. (A) Western blot analysis after pull down assay of activation of Cdc42 (Cdc42 GTP, left panels), Rac1 (Rac1-GTP middle panels) and RhoA (RhoA-GTP, right panels) and quantification in MDCK cells grown for 8 days demonstrated a significant enhancement of RhoA activation level in *NPHP1* and *NPHP4*-depleted cells (N1-KD and N4-KD) compared with

control. (B) In contrast, Western blot analysis and quantification in these same junction-stimulated cells revealed an up-regulation of both Cdc42-GTP and RhoA-GTP (left and right panels, respectively). (C-D) *In vitro* pull down assay of NPHP1-Myc, NPHP4-Myc (C) and Edd-Myc (D) expressed transiently in HEK293T using GST fusion protein of Cdc42 and GST alone. While NPHP1-Myc and NPHP4-Myc precipitated with GST-Cdc42, Edd-Myc did not.

**Figure 4:** Dominant negative form of Cdc42 (Cdc42 N17) rescued migration, adhesion and 3D structure defects. (A) Trajectories of migrating cells followed by video microscopy (supplementary videos). Lines represent the migration of 20 cells during 7h and all trajectories have been normalized to a mutual starting point. (B) Bar graph represents mean distance of cells with or without Cdc42 N17 into the wound and demonstrate a decrease of migration in N1-KD and N4-KD MDCK cells overexpressing Cdc42 N17. (C) Analysis of the percentage of very spread cells or spread cells versus non-spread cells (round shape) in the several cell lines with or without Cdc42 N17. 80-100 cells of each cell lines were scored for the measure. (D) Structure of the N4-KD and N4-KD + Cdc42N17-HA MDCK cysts, grown for 3 weeks in type-I collagen matrix, as assessed by immunostaining of phalloidin. Quantification of number of lumen per cysts in control, N1-KD and N4-KD with or without overexpression of Cdc42 N17-HA ( $n = X$ ).

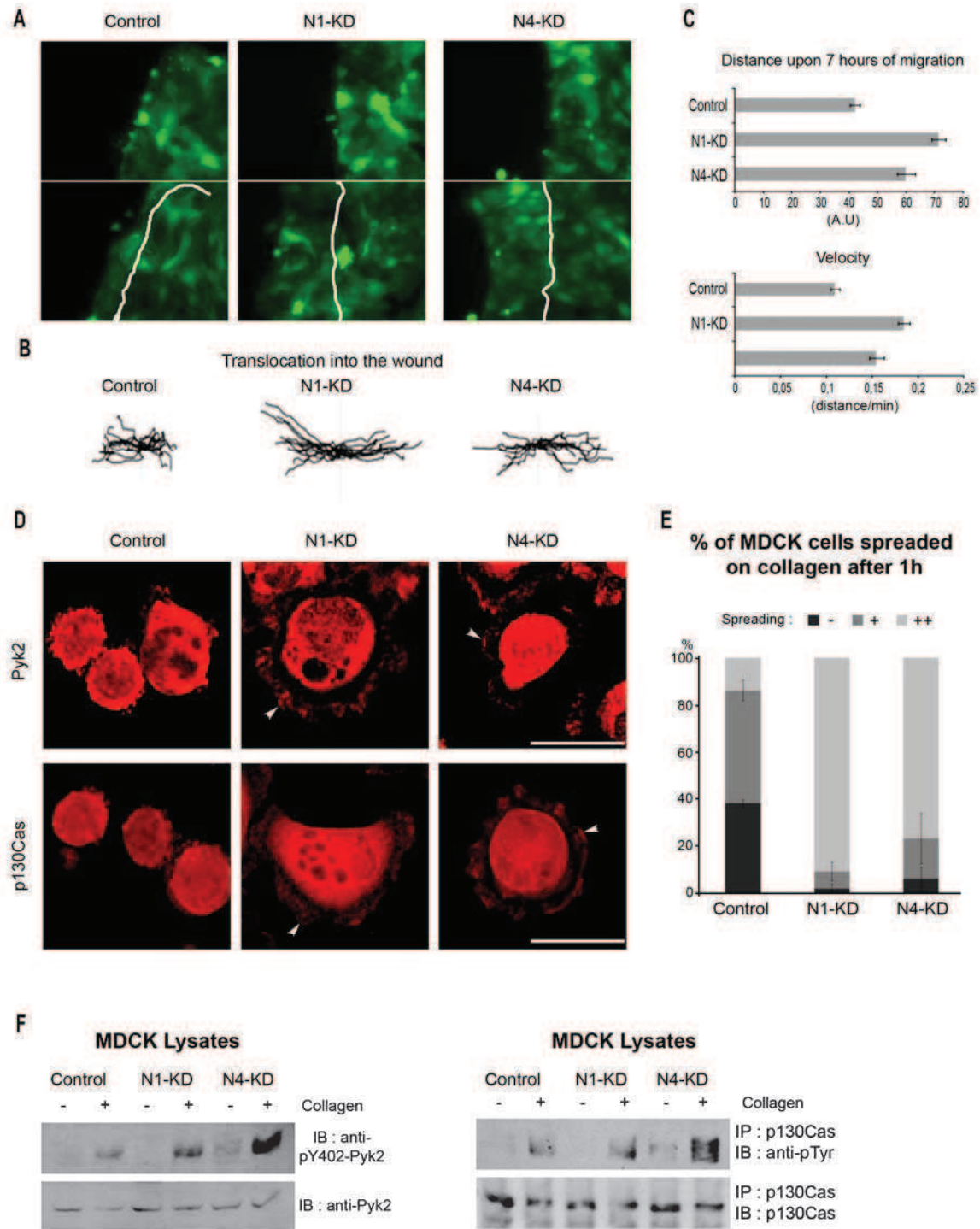


Figure 1



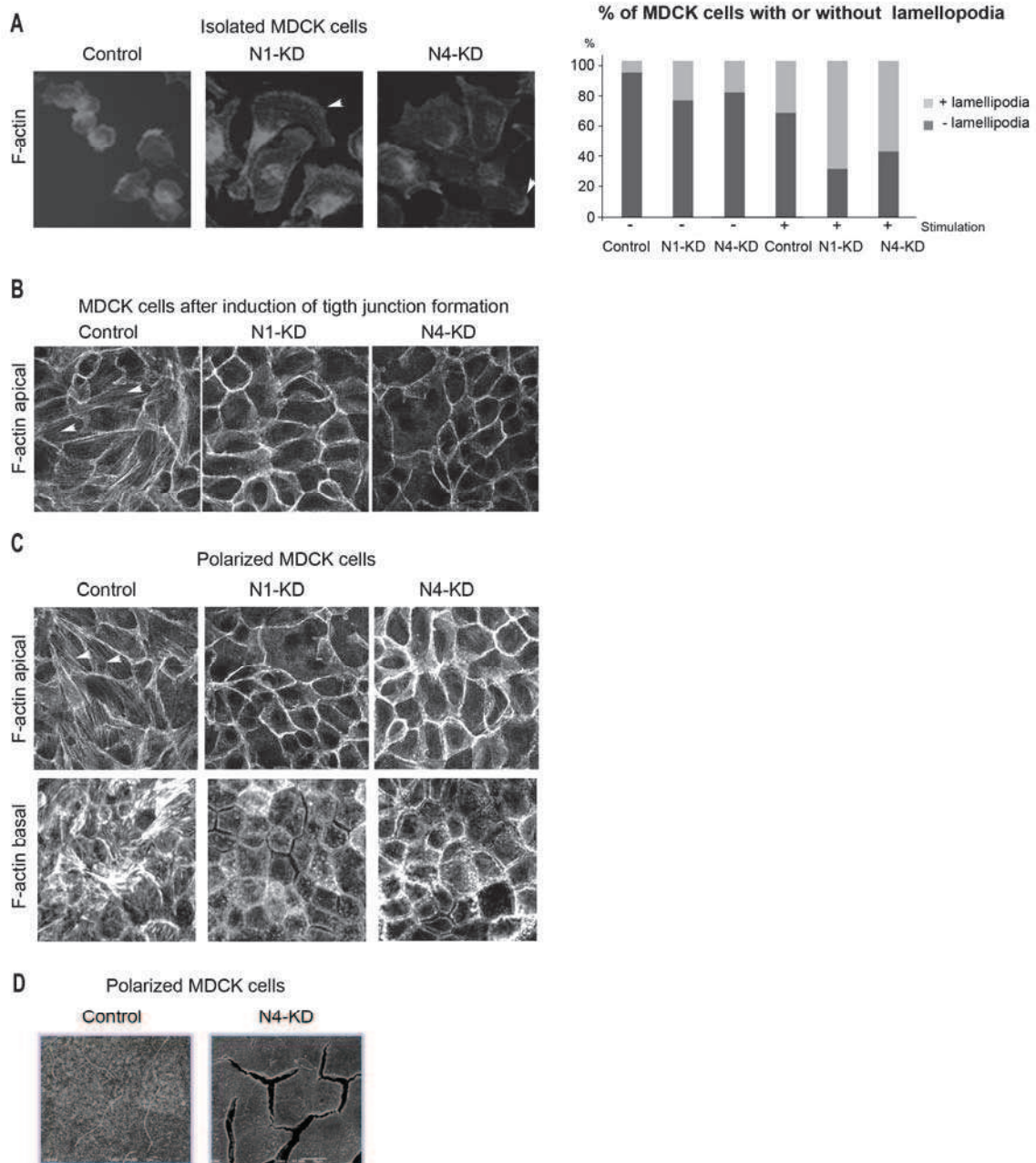
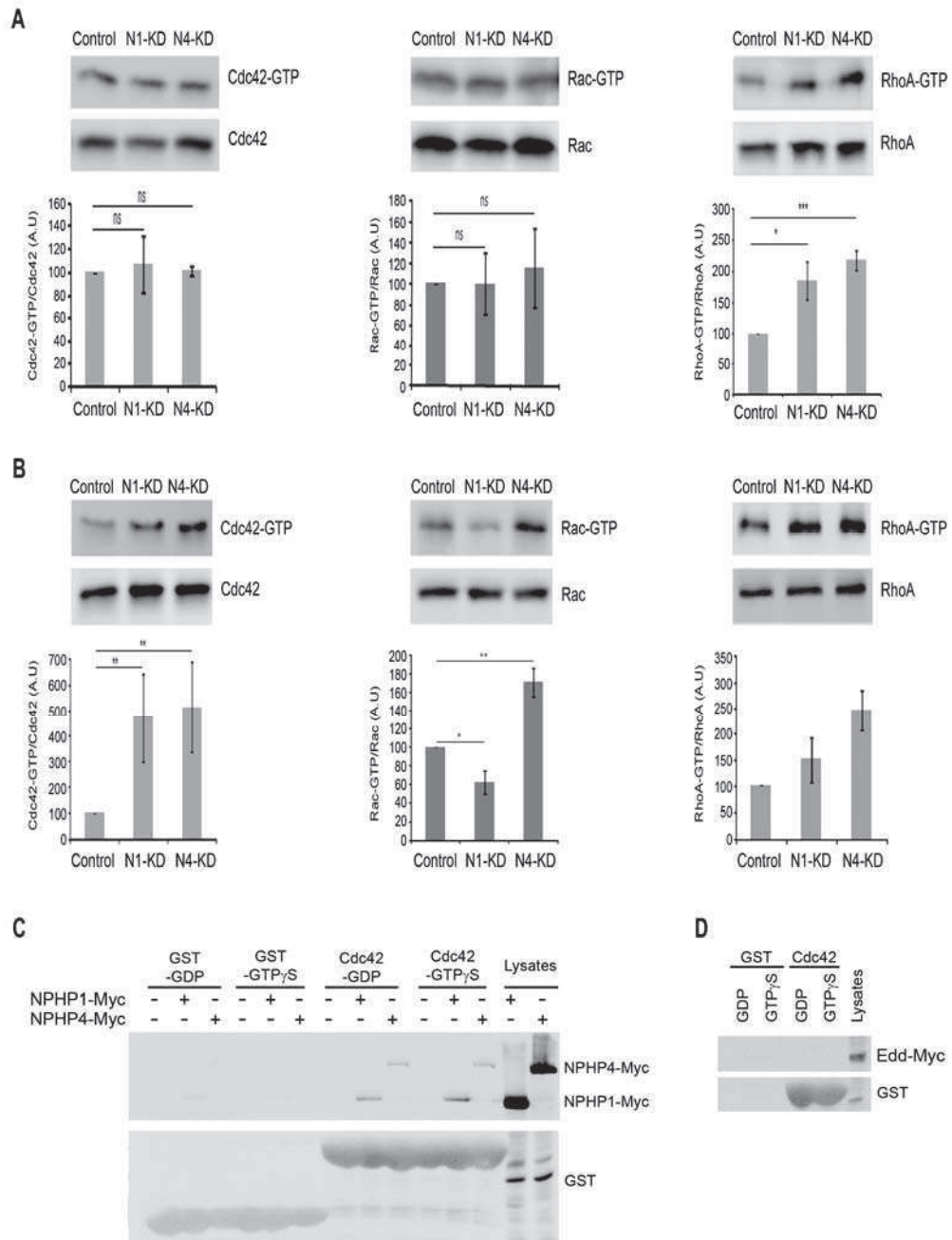


Figure 2



**Figure 3**

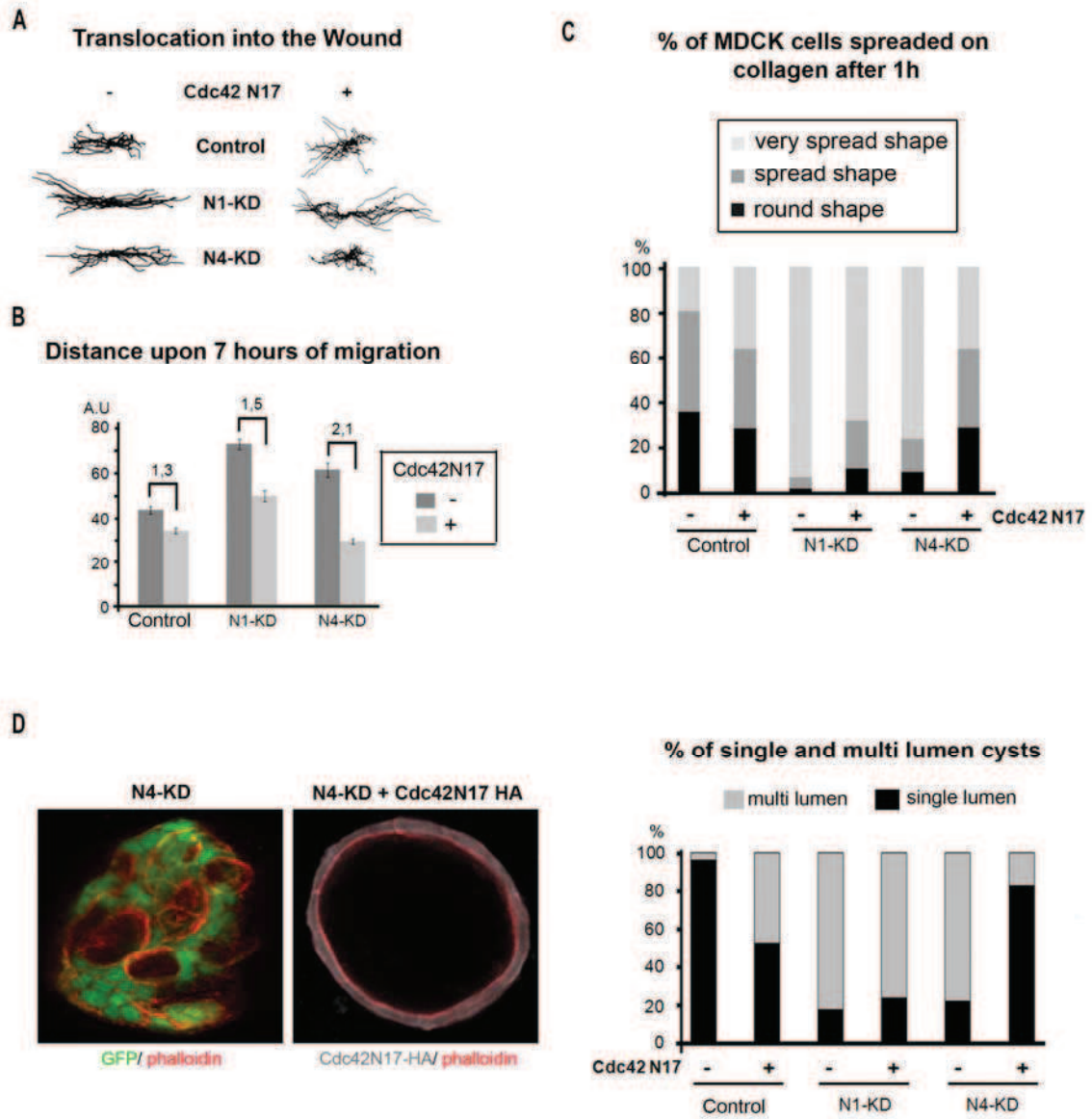
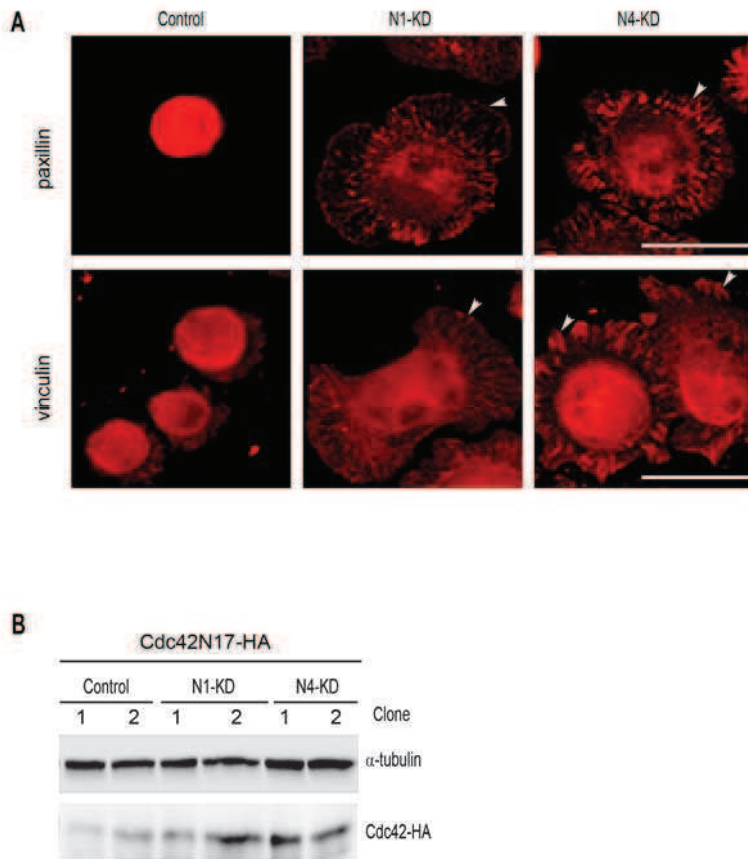


Figure 4



**Supplementary Figure 1:** (A) Paxillin (upper panels) and vinculin (lower panels) immunostaining, demonstrated induction and activation of focal adhesion complex all around the cell body (white arrowhead) in depleted cells versus control. Scale bars: 10  $\mu$ m. (B) Western blot analysis of the overexpression protein level of the dominant negative form (Cdc42-N17-HA) in the three cell line : control, depleted for NPHP1 or NPHP4.



# **DISCUSSION-CONCLUSION**



## Discussion-Conclusion

L'analyse des cellules épithéliales rénales déficientes pour les gènes *NPHP1*, *NPHP4* et *RPGRIP1L* mutés dans la néphronophtise, et des modèles animaux invalidés pour les gènes *Nphp4* et *Rpgrip1l* (souris, poisson zèbre) ont permis de mettre en évidence le rôle des néphrocystines codées par ces gènes dans plusieurs mécanismes cellulaires différents. En effet, nous avons montré que ces protéines régulent la polarité apico-basale et la morphogénèse épithéliale lors de culture 3D, possiblement via leur interaction avec les protéines de polarité (PATJ, PALS1, Par6). En particulier, les néphrocystines participent à la régulation du cil (structure/composition), aux processus de migration et d'adhésion cellulaires en modulant les GTPases Rho et leurs effecteurs aux adhésions focales. Nous avons également démontré que *NPHP4* et *RPGRIP1L* joue un rôle essentiel dans la régulation de Dishevelled et de la PCP: *NPHP4* et inversine modulent la dégradation de Dishevelled pour réguler la voie Wnt canonique et la voie Wnt/PCP et la morphogénèse du pronéphros du poisson zèbre, et *RPGRIP1L* joue un rôle important dans la régulation de la PCP par la stabilisation de Dishevelled à la base du cil primaire.

### *I Fonction des néphrocystines au cil primaire*

Nous avons montré que l'absence des néphrocystines *NPHP1*, *NPHP4* et *RPGRIP1L* entraîne des défauts de structure/taille du cil dans les différents modèles d'étude. En effet, des cils plus courts sont observés dans la vésicule de Küppfer et la partie distale du pronéphros, correspondant à la région du cloaque chez les poissons morphants *nphp4* (Delous et al, 2009 ; Burcklé et al, 2011). De même, dans les cellules MDCK N1-KD et N4-KD en culture 2D les cils apparaissent plus courts, cependant cette réduction est liée à un retard de formation du cil dans les cellules N4KD (Delous et al, 2009). En revanche, des cils sont plus longs que dans les cellules contrôles lorsque les cellules MDCK N1- et N4-KD sont cultivées en culture 3D en gel de collagène (Delous et al, 2009), ou encore dans les tubules dilatés des reins des souris *Nphp4*<sup>-/-</sup> après réduction néphronique. Ces différences de taille des cils pourraient être dus aux défauts de retard ou de mise en place de la polarité apico-basale dans ces différentes structures (cloaque et KV des morphants *nphp4* et sphères 3D des cellules N1-and N4-KD). En effet, les protéines de polarité, CRB3 et les protéines du complexe Par, sont non seulement localisées aux jonctions cellulaires mais également localisées au niveau du cil primaire des cellules MDCK. La protéine Par3 interagit avec la kinésine2, moteur moléculaire du transport intraflagellaire antérograde, démontrant un lien entre les protéines de polarité avec le transport intraflagellaire et la formation du cil (Fan et al, 2004). L'invalidation de *CRB3* et *PAR3* dans les cellules MDCK aboutit



respectivement à une perte du cil et à une réduction de la taille des cils (Fan et al, 2004 ; Sfakianos et al, 2007). Ces défauts sont similaires à l'invalidation de *NPHP1*, *NPHP4* et *RPGRIP1L* dans les cellules MDCK. Or nous avons montré l'interaction de ces protéines avec les protéines des complexes CRBS et Par à savoir PALS1-PATJ et Par6 (Delous et al, 2009), suggérant que ces néphrocystines pourraient participer avec ces protéines à la régulation du transport intraflagellaire ou la régulation de la fonction ciliaire.

Des cils plus long sont aussi retrouvés dans d'autres types de cellules où l'établissement de l'épithélialisation est différent et n'est pas dépendant des jonctions cellulaires tels que les cellules IMCD N1-KD et N4-KD ou les cellules RPE1 N1-KD et N4-KD. Ainsi, différents mécanismes peuvent rendre compte des altérations de la taille des cils. Etant donné la localisation de NPHP1-NPHP4-RPGRIP1L à la zone de transition, leur rôle de « gatekeeper » ou barrière de filtration serait alors altéré. En effet, chez *C. elegans* le complexe *nphp1-nphp4* régule la localisation spécifique de composants ciliaires tels que les protéines du transport intraflagellaire (IFT52, CHE-13) (Jauregui et al, 2008). Un défaut d'entrée des IFTs dans le cil réduirait sa taille alors qu'un défaut de sortie des IFTs l'augmenterait. De façon intéressante, les études génétiques menées au laboratoire en collaboration avec d'autres équipes, ont montré que des mutations des gènes codant les protéines IFTs du complexe A sont associés à la NPH soit isolée soit avec des défauts squelettiques et rétinien (Bredrup et al, 2011 ; Perrault et al, 2012 ; Davis et al, 2011). Ceci suggère une interaction physique et fonctionnelle entre le complexe NPHP1-NPHP4-RPGRIP1L et les IFTAs qui pourraient avoir lieu à la zone de transition pour permettre la formation correcte du cil ou pour réguler la composition des protéines ciliaires et ainsi les voies de signalisations passant par le cil (Shh, Wnt, Calcium) (Zhao et Malicki, 2011). L'exocyste pourrait être un autre mécanisme cellulaire qui régulerait la composition du cil par l'adressage et le transport de vésicules vers le cil primaire. En effet, les composants de l'exocyste interagissent avec les protéines du complexe de polarité (Par3/Par6) au niveau du cil et sont adressé au cil primaire par la Rho GTPase Cdc42 et les IFTs (Zuo et al, 2009 et 2011).

Les cellules MDCK RPGRIP1L-KD présentent quant à elles, une absence ou une réduction de la taille des cils suggérant un rôle majeur de cette protéine dans la ciliogenèse. Ces défauts du cil pourraient être la conséquence d'un défaut d'ancrage du corps basal ou de positionnement du cil à la surface apicale. En effet, nous avons montré que RPGRIP1L participe, à travers la stabilité de Dishevelled, à la polarisation du corps basal des cellules du plancher neurale chez le poisson zèbre et des cellules de la cochlée chez la souris (Mahuzier et al, 2012). Or, dans les cellules multiciliées de l'épiderme du xénope, Dishevelled est requis pour l'ancrage polarisé des corps basaux nécessaires aux battements coordonnés des cils (Park et al, 2008). De plus, il a récemment été montré que RPGRIP1L interagit avec la sérine/thréonine kinase Nek4, protéine requise pour l'assemblage du cil primaire des cellules RPE1 (Coene et al, 2011). On peut ainsi supposer que l'absence de RPGRIP1L entraînerait un

défaut de l'ancrage du corps basal, compromettant la ciliogenèse dans les cellules épithéliales rénales MDCK. Par ailleurs, RPGRIP1L servirait au maintien du complexe NPHP4-inversine-Dishevelled au corps basal. Ceci est en accord avec les données obtenues chez *C. elegans* qui démontrent que RPGRIP1L est nécessaire à la localisation des protéines des complexes NPHP-MKS-JBTS et en particulier NPHP4, à la zone de transition dans les neurones sensoriels ciliés (Williams et al, 2011). L'absence des protéines IFT-MKS-JBTS à la zone de transition, modulent la composition membranaire du cil et l'activité des voies de signalisation qui en découlent, en particulier les voie Wnt et la voie Shh (Garcia-gonzalo et al, 2011 ; Chih et al, 2012 ; Bishop et al, 2007, Choi et al, 2011; Larkins et al, 2011 ; Haycraft et al, 2005 ; Huangfu et al, 2003; Liu et al, 2005; Houde et al, 2006 ; Liem et al, 2012 ; Jonassen et al, 2012; Davis et al, 2010 ; Dowdle et al, 2011). Chez la souris *Ftm*<sup>-/-</sup>, les défauts de ciliogenèse sont variables selon les tissus observés comme ce qui est décrit pour d'autres protéines MKS-JBTS (Tectonic1, B9D1, TMEM231) (Garcia-Gonzalo et al, 2011 ; Chih et al, 2012). En effet, les cils du nœud embryonnaire et des membres sont absents ou présents avec de sévères défauts (courts, bulbeux) (Vierkoten et al, 2007), alors que les cils au niveau du rein sont de taille normale voir légèrement augmentée (donnée de Sylvie Schneider-Maunoury). Les anomalies phénotypiques observées chez la souris *Ftm*, défaut de fermeture du tube neurale, polydactylie, létalité embryonnaire, rappellent ceux observés chez les foetus Meckel porteurs de mutation « perte de fonction » de *RPGRIP1L* (Delous et al, 2007). Ces phénotypes sont la conséquence d'altérations de la voie Shh liées à un défaut du rapport Gli activateur/Gli répresseur (Vierkoten et al, 2007; Besse et al, 2011). Les mutations de *RPGRIP1L* retrouvées chez les patients développant un syndrome de Joubert avec NPH, préservent une fonction partielle de la protéine mais dérégulent le complexe RPGRIP1L/NPHP4 (Delous et al, 2007). Ce défaut d'interaction pourrait entraîner des défauts progressifs de la barrière de filtration à la zone de transition, modifiant la composition du cil, entraînant le développement du syndrome de Joubert.

## ***II Rôle des néphrocystines aux jonctions cellulaires.***

Contrairement à *RPGRIP1L* dont les mutations « perte de fonction » aboutissent au syndrome de Meckel, les mutations « perte de fonction » des gènes *NPHP1* et *NPHP4* causent principalement une NPH juvénile isolée dont l'atteinte rénale est progressive avec des dilatations kystiques tardives. Ceci suggère que NPHP1 et NPHP4 joueraient un « rôle secondaire » dans la ciliogenèse des cellules épithéliales rénales. En revanche, elles auraient un rôle majeur dans l'établissement et le maintien des jonctions cellulaires et la polarité apico-basale. En effet, leur expression augmente au cours de l'épithélialisation (Delous et al, 2009), et elles sont co-localisées et interagissent avec des protéines des

jonctions serrées (Par, CRBS), jonction adhérentes (E-cadhérine), adhésions focales (p130cas, pyk2) et le cytosquelette (tensine, filamines, tubuline) (Delous et al, 2009; Mollet et al, 2005).

L'analyse des tubes séminifères chez les souris *Nphp4*<sup>-/-</sup> révèle des défauts de perméabilité de la barrière sang-testis et des altérations des jonctions cellules de Sertoli-spermatide mature (données non publiées). Ces défauts reflètent l'instabilité des jonctions serrées *in vivo* observée également *in vitro* qui pourrait être à l'origine des défauts de maturation des spermatogonies responsable de l'infertilité des souris mâles. De plus, les défauts de réarrangement des cellules aboutissant à l'obstruction du cloaque des poissons morphants *nphp4*, sont évocateurs d'une altération de la morphogenèse épithéliale rappelant les défauts des cellules MDCK-KD en culture 3D (article1 ; article2). Une étude récente, a montré que l'obstruction du cloaque dans les poissons morphants pour *nphp4* est aggravée par l'invalidation de *par6*. Cette obstruction est la conséquence d'une migration anormale des cellules du cloaque et d'un défaut de fusion avec les cellules proctodéales nécessaire à l'ouverture du canal pronéphrique (Slanchev et al 2011). Ces données viennent renforcer nos résultats suggérant que les néphrocystines et en particulier NPHP4 régulent les complexes de polarité aux jonctions cellulaires lors de la migration cellulaire durant la morphogenèse du pronephros.

Par ailleurs, l'établissement de la polarité apico-basale passe également par la mise en place des jonctions cellule-matrice extra cellulaire. Même si une co-localisation avec les intégrines n'a jamais été décrite, nous avons montré que l'absence de NPHP1 et NPHP4 dans les cellules MDCK entraîne une augmentation de la phosphorylation de p130cas et pyk2. Cette phosphorylation anormale est le reflet d'une instabilité des complexes focaux et d'une induction potentielle de la migration suggérant une régulation négative de ces processus par les néphrocystines dans les cellules épithéliales rénales. D'autre part, les cellules MDCK invalidées pour *NPHP1* et *NPHP4*, présentent une augmentation de l'activation de Cdc42 et Rac1 (uniquement pour NPHP4) après induction de la formation des jonctions alors que RhoA est activée de manière constante dans les cellules MDCK-KD. Ces GTPases Rho sont des activateurs du complexe Par à la fois lors de l'établissement de la polarité apico-basale et lors de la polarisation du front de migration des cellules (Pegtel et al, 2007; Goldstein et Macara, 2007). L'augmentation de leur activation pourraient entrainer le retard de la formation des jonctions serrées (Delous et al, 2009), déstabiliser les adhésions focales et être le mécanisme moléculaire favorisant à la fois la migration des cellules lors du wound-healing et l'étalement précoce des cellules sur collagène.

Les néphrocystines interagissent avec plusieurs protéines associées aux filaments d'actine telles que la tensine et les filamines qui sont des protéines de maintien du réseau d'actine au niveau des adhésions focales. De façon intéressante, les souris invalidées pour le gène de la tensine développent progressivement une insuffisance rénale à l'âge adulte avec l'apparition de kystes au niveau des tubules proximaux, du cortex et de la médullaire (Lo et al, 1997). De plus les adhésions cellule-cellule

et cellule-matrice extra-cellulaire sont requises pour réguler le cytosquelette d'actine, les forces mécaniques et la morphogenèse des tissus. En effet, plus la surface d'adhésion de la cellule est grande et plus les jonctions cellulaires seront « lâches » (Burute et Théry, 2012). Ainsi, en absence de NPHP1 et NPHP4, les défauts du cytosquelette d'actine contribueraient à l'instabilité des jonctions cellulaires.

#### *Conséquences physiopathologiques de l'instabilité des jonctions cellulaires.*

De façon intéressante, l'invalidation de la protéine Mals3 chez la souris (composant des jonctions serrées et adhérentes, et régulateur de la polarité apico-basale), entraîne l'instabilité des jonctions cellule-cellule et la perte de PALS1 aux jonctions serrées conduisant au développement de kystes et d'une fibrose rénale, similaire à ce qui est observé dans la NPH (Olsen et al, 2007). De plus, un défaut de stabilité des structures d'adhésion inter-cellulaires (jonctions serrées et adhérentes) entraîne la dissociation de l' $\alpha$ -caténine et de la  $\beta$ -caténine des molécules d'E-cadhérine, favorisant l'activation des voies pro-prolifératives telles que les voies de signalisation Hh et Wnt canonique (revue dans (Pugacheva et al, 2006)). De même, la phosphorylation de Par6 de façon dépendante de la voie du TGF $\beta$ , un élément clé de la fibrose rénale, facilite la dissociation des jonctions serrées et la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules épithéliales de la glande mammaire (Ozdamar et al, 2005 ; Bottinger, 2007). Même si un mécanisme similaire dans les reins des patients NPH reste à démontrer, on peut imaginer que l'instabilité des jonctions serrées dans les cellules épithéliales rénales entraînerait une dédifférenciation épithéliale et une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) des cellules. Par ailleurs, une étude récente a montré que l'augmentation de la phosphorylation de Pyk2 dans les reins de souris sauvages soumis à une obstruction urétérale unilatérale cause l'augmentation de la transcription des gènes tels que *CTGF*, *TGF $\beta$ 1*, favorisant l'apparition de la fibrose rénale (Sonomura et al, 2011). L'augmentation anormale de l'activation de Pyk2 observée dans les cellules rénales en l'absence de NPHP4 pourrait donc favoriser l'apparition des lésions fibrotiques dans les souris *Nphp4*<sup>-/-</sup> après néphrectomie subtotale (données du laboratoire). La régulation anormale des jonctions cellule-cellule et cellule-MEC dans les reins des patients NPH, au cours de l'enfance pourrait donc entraîner une perte progressive de dédifférenciation et favoriser l'apparition des lésions rénales.

### ***III Rôles des néphrocystines dans la polarité planaire***

La mise en place de la polarité apico-basale, du cil primaire et la migration cellulaire sont des processus liés à la régulation de la polarité planaire (PCP). Nous avons montré que NPHP4 et RPGRIP1L participe à la PCP. En effet, l'invalidation de ces deux protéines chez le poisson zèbre

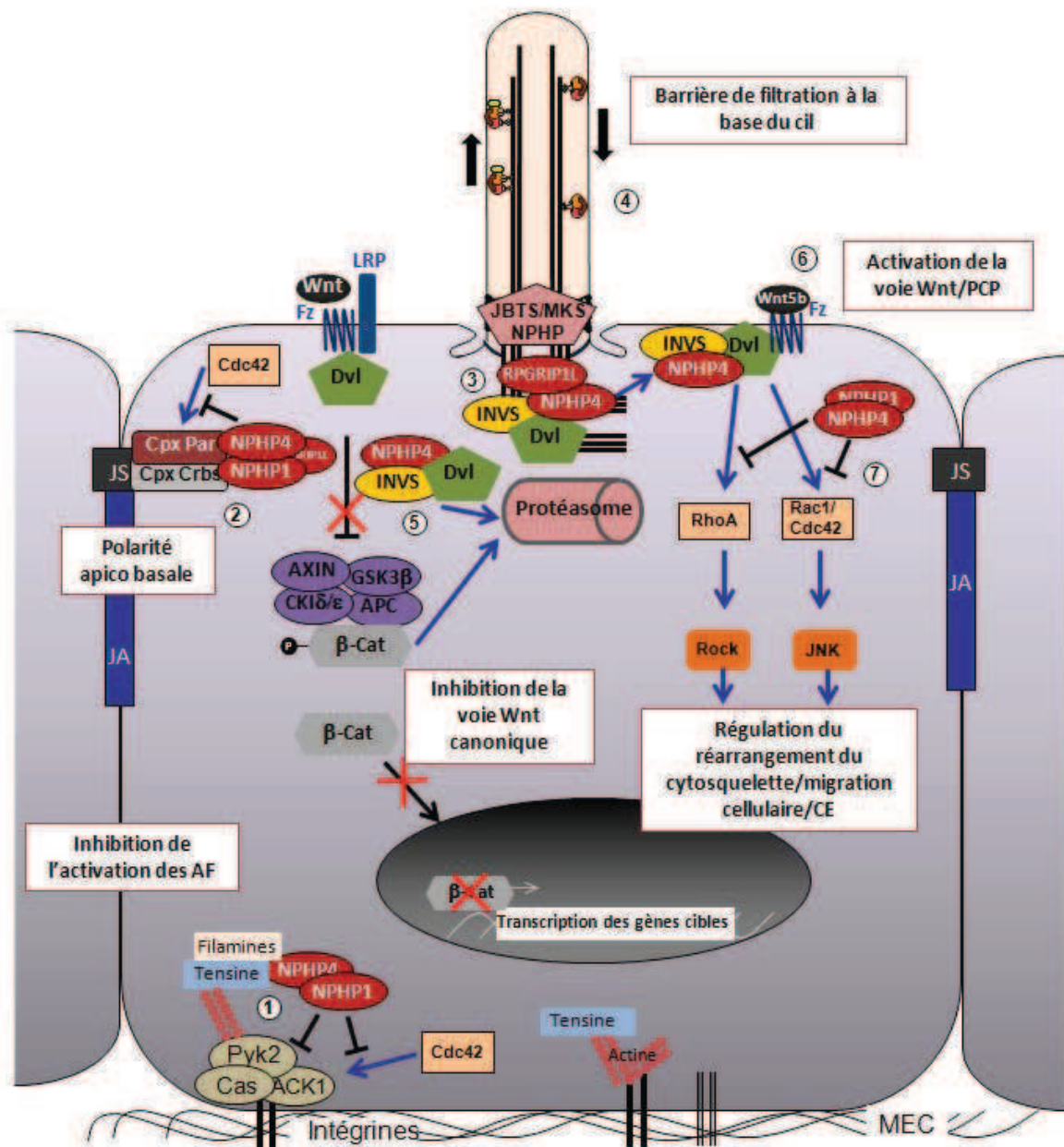
mène à des défauts des mouvements de convergence extension de l'embryon et des kystes le long du pronéphros, caractéristiques d'un défaut de la PCP (Burcklé et al, 2011 ; Mahuzier et al, 2012). De plus, nous avons montré pour *nphp4* une interaction génétique et fonctionnelle avec les acteurs de la PCP (Prickle, Vangl, inversine) lors de la morphogenèse du pronéphros. Les poissons doubles morphants présentent des kystes pronéphriques mais pas d'augmentation des défauts d'obstruction du cloaque, suggérant qu'un autre mécanisme est impliqué dans cette altération. De façon intéressante, nous avons observé une augmentation de la voie Wnt canonique dans cette région, pouvant entraîner la déstabilisation du complexe E-cadhérine/ $\beta$ -caténine et des jonctions cellule-cellule.

Nous avons montré que le complexe NPHP4-inversine-RPGRIP1L module Dishevelled, protéine clé du mécanisme de modulation des voies Wnt canonique et Wnt/PCP (Burcklé et al, 2011 ; Mahuzier et al, 2012). D'une part, NPHP4 en coopération avec inversine favorise la dégradation de Dishevelled par le protéasome (Burcklé et al, 2011). En revanche, RPGRIP1L stabilise et permet l'ancrage du complexe macromoléculaire comprenant NPHP4-inversine-Dishevelled à la région péricentriolaire, favorisant la ciliogenèse et la voie PCP (Mahuzier et al, 2012). Etant donné que RPGRIP1L ne rentre pas en compétition avec NPHP4 ou inversine pour leur interaction avec Dishevelled, RPGRIP1L pourrait moduler l'activité de NPHP4 et inversine sur la dégradation de Dishevelled, en empêchant leur interaction avec des protéines nécessaire à cette dégradation. Par exemple, elle pourrait moduler l'interaction de l'ubiquitine ligase APC-C qui interagit avec à la fois Dishevelled et inversine et régule la stabilité de Dishevelled (Morgan et al, 2002; Ganner et al, 2009). De la même manière, RPGRIP1L pourrait moduler l'interaction de l'ubiquitine ligase Jade-1 avec NPHP4. Jade-1 est l'ubiquitine ligase qui dégrade la  $\beta$ -caténine et réprime ainsi la voie Wnt canonique (Chitalia et al, 2008 ; Borgal et al, 2012). Ainsi les mutations de RPGRIP1L réduisant son interaction avec NPHP4, pourraient favoriser l'interaction des protéines comme APC-C ou Jade-1 avec le complexe NPHP4-inversine-Dishevelled et  $\beta$ -caténine.

Le rôle de NPHP4 dans la dégradation protéique peut être étendue à d'autres de ces partenaires ou composants des voies de signalisation régulées par les néphrocystines. En effet, dans les cellules HEK293T, la surexpression de NPHP4 réduit la quantité d'expression de PATJ. De manière similaire, dans les cellules MDCK surexprimant NPHP4, l'expression de RhoA totale diminue, alors qu'en son absence dans les cellules N4-KD, son expression augmente et l'utilisation d'un inhibiteur du protéasome restaure la quantité d'expression de RhoA dans les cellules surexprimant NPHP4. Ces données suggèrent que NPHP4 pourrait avoir un rôle plus général dans la dégradation via le protéasome des protéines des voies de signalisation qu'elle module, éventuellement en étant une protéine adaptatrice d'une E3 ubiquitine ligase telle que Jade-1 ou Smurf1 qui régule la dégradation de RhoA (Wang et al, 2006).

Par ailleurs, la souris *Nphp4*<sup>-/-</sup> présente des dilatations kystiques tubulaires rénales après néphrectomie subtotale. Les tubules dilatés présentent un réarrangement anormal des cellules dans lesquelles on observe en immunofluorescence une délocalisation des acteurs de la voie Wnt/PCP tels que Vangl2 et Dishevelled. Ces défauts s'accompagnent également de l'augmentation de l'expression de Dishevelled-2 et de l'activation de Cdc42 et RhoA. Contrairement à d'autres modèles de ciliopathies (*Pkd1*, *Pkd2*, *Bbs4*) le développement des kystes rénaux dans les reins des souris *Nphp4*<sup>-/-</sup> ne sont pas la conséquence des défauts d'apoptose ou de prolifération cellulaire (Ong et Harris, 2005; Wodarczyk et al, 2010 ; Mykityn et al, 2004). Par son rôle dans différents processus cellulaires tels que la polarité apico-basale, la migration et l'adhésion cellulaire, les voies de signalisation Wnt, dans lesquels les néphrocystines sont également impliquées, Dishevelled pourrait être un acteur majeur des défauts phénotypiques rencontrés dans les cellules MDCK-KD ou dans l'apparition des défauts histologiques rencontrés dans la NPH. Il serait donc intéressant d'invalider Dishevelled dans les cellules N1-KD et N4-KD pour déterminer si l'augmentation de Dishevelled dans ces cellules est à l'origine ou en partie responsable des défauts phénotypiques observés dans ces cellules.

Ainsi, l'ensemble de ces travaux a donc démontré que les néphrocystines NPHP1, NPHP4 et RPGRIP1L par leur rôle intégratif à la base du cil et aux jonctions cellulaires moduleraient des voies de signalisations et des complexes régulateurs du cytosquelette des cellules pour maintenir l'homéostasie des tissus. La perturbation de ce complexe serait à l'origine de la dédifférenciation progressive de l'épithélium rénal aboutissant aux défauts des membranes basales tubulaires, à l'apparition de la fibrose rénale et des kystes tardifs retrouvés dans la néphronophytose.



**Figure 21 : Rôles intégratifs du complexe NPHP1-NPHP4- RPGRIP1L dans le maintien de l'intégrité de l'épithélium rénal.** (1) En absence de stimulation les néphrocystines inhiberaient l'activation par phosphorylation des protéines p130cas, pyk2 et ACK1 au niveau des adhésions focales (AF). NPHP1 et NPHP4 interagiraient avec ces protéines de signalisation associées aux intégrines pour empêcher leur activation par la GTPase Cdc42. (2) NPHP1, NPHP4 et RPGRIP1L sont présents au niveau des jonctions intercellulaires (jonctions serrées (JS) et jonctions adhérentes (JA)), où elles favoriseraient la mise en place de la polarité apico-basale par leurs interactions aux protéines des complexes de polarité Par et Crumbs (cpx Par/cpx CRBS). Le mécanisme de régulation des complexes de polarité par le complexe des néphrocystines serait de maintenir leur stabilité en régulant négativement l'activation de la GTPase Cdc42. (3) En parallèle, RPGRIP1L permettrait la localisation du complexe NPH à la base du cil nécessaire à la ciliogenèse. (4) De plus, cette localisation du complexe NPH à la zone de transition et son interaction avec d'autres protéines de ciliopathies formant les complexes JBTS/MKS, permettrait de réguler l'entrée et/ou la sortie des protéines ciliaires et ainsi moduler les voies de signalisation dépendantes du cil. Ceci permettrait notamment la régulation de la

voie Wnt canonique (5) et Wnt/PCP (6). NPHP4 et inversine favorise la dégradation cytoplasmique de Dishevelled inhibant ainsi la voie Wnt canonique (5). D'autre part, RPGRIP1L et NPHP4 active la voie Wnt/PCP (6) et le complexe NPHP1/NPHP4 régule l'activation des GTPase Cdc42, Rac1 et RhoA (7) pour contrôler les processus de réarrangement du cytosquelette et la migration cellulaire.





# **BIBLIOGRAPHIE**



## BIBLIOGRAPHIE

- (1994). "The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. The European Polycystic Kidney Disease Consortium." Cell **77**(6): 881-94.
- Adams, N. A., A. Awadein, et al. (2007). "The retinal ciliopathies." Ophthalmic Genet **28**(3): 113-25.
- Afzelius, B. A. (1976). "A human syndrome caused by immotile cilia." Science **193**(4250): 317-9.
- Ala-Mello, S., O. Koskimies, et al. (1999). "Nephronophthisis in Finland: epidemiology and comparison of genetically classified subgroups." Eur J Hum Genet **7**(2): 205-11.
- Alstrom, C. H., B. Hallgren, et al. (1959). "Retinal degeneration combined with obesity, diabetes mellitus and neurogenous deafness: a specific syndrome (not hitherto described) distinct from the Laurence-Moon-Bardet-Biedl syndrome: a clinical, endocrinological and genetic examination based on a large pedigree." Acta Psychiatr Neurol Scand Suppl **129**: 1-35.
- Andersen, J. S., C. J. Wilkinson, et al. (2003). "Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling." Nature **426**(6966): 570-4.
- Antic, D., J. L. Stubbs, et al. "Planar cell polarity enables posterior localization of nodal cilia and left-right axis determination during mouse and Xenopus embryogenesis." PLoS One **5**(2): e8999.
- Arikawa, K. and D. S. Williams (1993). "Acetylated alpha-tubulin in the connecting cilium of developing rat photoreceptors." Invest Ophthalmol Vis Sci **34**(6): 2145-9.
- Arnaiz, O., A. Malinowska, et al. (2009). "Cilddb: a knowledgebase for centrosomes and cilia." Database (Oxford) **2009**: bap022.
- Ashe, A., N. C. Butterfield, et al. "Mutations in mouse *Ift144* model the craniofacial, limb and rib defects in skeletal ciliopathies." Hum Mol Genet **21**(8): 1808-23.
- Attanasio, M., N. H. Uhlénhaut, et al. (2007). "Loss of GLIS2 causes nephronophthisis in humans and mice by increased apoptosis and fibrosis." Nat Genet **39**(8): 1018-24.
- Avidor-Reiss, T., A. M. Maer, et al. (2004). "Decoding cilia function: defining specialized genes required for compartmentalized cilia biogenesis." Cell **117**(4): 527-39.
- Baala, L., S. Romano, et al. (2007). "The Meckel-Gruber syndrome gene, MKS3, is mutated in Joubert syndrome." Am J Hum Genet **80**(1): 186-94.
- Babich, V., W. Z. Zeng, et al. (2004). "The N-terminal extracellular domain is required for polycystin-1-dependent channel activity." J Biol Chem **279**(24): 25582-9.
- Beals, R. K. and R. G. Weleber (2007). "Conorenal dysplasia: a syndrome of cone-shaped epiphysis, renal disease in childhood, retinitis pigmentosa and abnormality of the proximal femur." Am J Med Genet A **143A**(20): 2444-7.
- Bellavia, S., K. Dahan, et al. "A homozygous mutation in *INVS* causing juvenile nephronophthisis with abnormal reactivity of the Wnt/beta-catenin pathway." Nephrol Dial Transplant **25**(12): 4097-102.
- Benzing, T., P. Gerke, et al. (2001). "Nephrocystin interacts with Pyk2, p130(Cas), and tensin and triggers phosphorylation of Pyk2." Proc Natl Acad Sci U S A

- 98(17): 9784-9.**
- Berbari, N. F., J. S. Lewis, et al. (2008). "Bardet-Biedl syndrome proteins are required for the localization of G protein-coupled receptors to primary cilia." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(11): 4242-6.
- Bergmann, C., M. Fliegauf, et al. (2008). "Loss of nephrocystin-3 function can cause embryonic lethality, Meckel-Gruber-like syndrome, situs inversus, and renal-hepatic-pancreatic dysplasia." Am J Hum Genet **82**(4): 959-70.
- Besse, L., M. Neti, et al. "Primary cilia control telencephalic patterning and morphogenesis via Gli3 proteolytic processing." Development **138**(10): 2079-88.
- Betz, R., C. Rensing, et al. (2000). "Children with ocular motor apraxia type Cogan carry deletions in the gene (NPHP1) for juvenile nephronophthisis." J Pediatr **136**(6): 828-31.
- Bhunia, A. K., K. Piontek, et al. (2002). "PKD1 induces p21(waf1) and regulation of the cell cycle via direct activation of the JAK-STAT signaling pathway in a process requiring PKD2." Cell **109**(2): 157-68.
- Bishop, G. A., N. F. Berbari, et al. (2007). "Type III adenylyl cyclase localizes to primary cilia throughout the adult mouse brain." J Comp Neurol **505**(5): 562-71.
- Blacque, O. E., E. A. Perens, et al. (2005). "Functional genomics of the cilium, a sensory organelle." Curr Biol **15**(10): 935-41.
- Bloodgood, R. A. "Sensory reception is an attribute of both primary cilia and motile cilia." J Cell Sci **123**(Pt 4): 505-9.
- Blowey, D. L., U. Querfeld, et al. (1996). "Ultrasound findings in juvenile nephronophthisis." Pediatr Nephrol **10**(1): 22-4.
- Boichis, H., J. Passwell, et al. (1973). "Congenital hepatic fibrosis and nephronophthisis. A family study." Q J Med **42**(165): 221-33.
- Bollee, G., F. Fakhouri, et al. (2006). "Nephronophthisis related to homozygous NPHP1 gene deletion as a cause of chronic renal failure in adults." Nephrol Dial Transplant **21**(9): 2660-3.
- Borgal, L., S. Habbig, et al. "The Ciliary Protein Nephrocystin-4 Translocates the Canonical Wnt Regulator Jade-1 to the Nucleus to Negatively Regulate beta-Catenin Signaling." J Biol Chem **287**(30): 25370-80.
- Bottinger, E. P. (2007). "TGF-beta in renal injury and disease." Semin Nephrol **27**(3): 309-20.
- Bouck, G. B. (1971). "The structure, origin, isolation, and composition of the tubular mastigonemes of the Ochromas flagellum." J Cell Biol **50**(2): 362-84.
- Boutros, M., N. Paricio, et al. (1998). "Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling." Cell **94**(1): 109-18.
- Boylan, J. P. and A. F. Wright (2000). "Identification of a novel protein interacting with RPGR." Hum Mol Genet **9**(14): 2085-93.
- Bredrup, C., S. Saunier, et al. "Ciliopathies with skeletal anomalies and renal insufficiency due to mutations in the IFT-A gene WDR19." Am J Hum Genet **89**(5): 634-43.
- Broadhead, R., H. R. Dawe, et al. (2006). "Flagellar motility is required for the viability of the bloodstream trypanosome." Nature **440**(7081): 224-7.
- Brunner, F. P., M. Broyer, et al. (1988). "Demography of dialysis and transplantation in children in Europe, 1985. Report from the European Dialysis and Transplant

- Association Registry." Nephrol Dial Transplant **3**(3): 235-43.
- Bukanov, N. O., L. A. Smith, et al. (2006). "Long-lasting arrest of murine polycystic kidney disease with CDK inhibitor roscovitine." Nature **444**(7121): 949-52.
- Burckle, C., H. M. Gaude, et al. "Control of the Wnt pathways by nephrocystin-4 is required for morphogenesis of the zebrafish pronephros." Hum Mol Genet **20**(13): 2611-27.
- Burute, M. and M. They "Spatial segregation between cell-cell and cell-matrix adhesions." Curr Opin Cell Biol.
- Caridi, G., M. Dagnino, et al. (2006). "Nephronophthisis type 1 deletion syndrome with neurological symptoms: prevalence and significance of the association." Kidney Int **70**(7): 1342-7.
- Chaki, M., R. Airik, et al. "Exome Capture Reveals ZNF423 and CEP164 Mutations, Linking Renal Ciliopathies to DNA Damage Response Signaling." Cell **150**(3): 533-48.
- Chang, B., H. Khanna, et al. (2006). "In-frame deletion in a novel centrosomal/ciliary protein CEP290/NPHP6 perturbs its interaction with RPGR and results in early-onset retinal degeneration in the rd16 mouse." Hum Mol Genet **15**(11): 1847-57.
- Chiang, A. P., D. Nishimura, et al. (2004). "Comparative genomic analysis identifies an ADP-ribosylation factor-like gene as the cause of Bardet-Biedl syndrome (BBS3)." Am J Hum Genet **75**(3): 475-84.
- Chih, B., P. Liu, et al. "A ciliopathy complex at the transition zone protects the cilia as a privileged membrane domain." Nat Cell Biol **14**(1): 61-72.
- Choi, Y. H., A. Suzuki, et al. "Polycystin-2 and phosphodiesterase 4C are components of a ciliary A-kinase anchoring protein complex that is disrupted in cystic kidney diseases." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(26): 10679-84.
- Clark, E. A. and J. S. Brugge (1995). "Integrins and signal transduction pathways: the road taken." Science **268**(5208): 233-9.
- Coene, K. L., D. A. Mans, et al. "The ciliopathy-associated protein homologs RPGRIP1 and RPGRIP1L are linked to cilium integrity through interaction with Nek4 serine/threonine kinase." Hum Mol Genet **20**(18): 3592-605.
- Coene, K. L., R. Roepman, et al. (2009). "OFD1 is mutated in X-linked Joubert syndrome and interacts with LCA5-encoded lebercilin." Am J Hum Genet **85**(4): 465-81.
- Cogan, D. G. (1972). "Heredity of congenital ocular motor apraxia." Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol **76**(1): 60-3.
- Collin, G. B., J. D. Marshall, et al. (2002). "Mutations in ALMS1 cause obesity, type 2 diabetes and neurosensory degeneration in Alstrom syndrome." Nat Genet **31**(1): 74-8.
- Contreras, C. B. and J. S. Espinoza (1960). "Discussion clinica y anatomopatologica de enfermos que presentaron un problema diagnostico." Pediatrics (Santiago) **3**: 271-82.
- Coon, M. and R. Herrera (2002). "Modulation of HeLa cells spreading by the non-receptor tyrosine kinase ACK-2." J Cell Biochem **84**(4): 655-65.
- Coppieters, F., S. Lefever, et al. "CEP290, a gene with many faces: mutation overview and presentation of CEP290base." Hum Mutat **31**(10): 1097-108.
- Corbit, K. C., A. E. Shyer, et al. (2008). "Kif3a constrains beta-catenin-dependent Wnt signalling through dual ciliary and non-ciliary mechanisms." Nat Cell Biol **10**(1): 70-6.

- Cornillon, J., L. Campos, et al. (2003). "[Focal adhesion kinase (FAK), a multifunctional protein]." Med Sci (Paris) **19**(6-7): 743-52.
- Cortellino, S., C. Wang, et al. (2009). "Defective ciliogenesis, embryonic lethality and severe impairment of the Sonic Hedgehog pathway caused by inactivation of the mouse complex A intraflagellar transport gene *Ift122/Wdr10*, partially overlapping with the DNA repair gene *Med1/Mbd4*." Dev Biol **325**(1): 225-37.
- Costet, C., F. Betis, et al. (2000). "[Pigmentosum retinis and tubulo-interstitial nephronophthisis in Sensenbrenner syndrome: a case report]." J Fr Ophthalmol **23**(2): 158-60.
- Craige, B., C. C. Tsao, et al. "CEP290 tethers flagellar transition zone microtubules to the membrane and regulates flagellar protein content." J Cell Biol **190**(5): 927-40.
- Darken, R. S., A. M. Scola, et al. (2002). "The planar polarity gene *strabismus* regulates convergent extension movements in *Xenopus*." Embo J **21**(5): 976-85.
- Davis, E. E., Q. Zhang, et al. "TTC21B contributes both causal and modifying alleles across the ciliopathy spectrum." Nat Genet **43**(3): 189-96.
- Dawe, H. R., U. M. Smith, et al. (2007). "The Meckel-Gruber Syndrome proteins MKS1 and meckelin interact and are required for primary cilium formation." Hum Mol Genet **16**(2): 173-86.
- De Robertis, E. (1956). "Electron microscope observations on the submicroscopic organization of the retinal rods." J Biophys Biochem Cytol **2**(3): 319-30.
- Deane, J. A., D. G. Cole, et al. (2001). "Localization of intraflagellar transport protein IFT52 identifies basal body transitional fibers as the docking site for IFT particles." Curr Biol **11**(20): 1586-90.
- Delous, M., L. Baala, et al. (2007). "The ciliary gene *RPGRIP1L* is mutated in cerebello-oculo-renal syndrome (Joubert syndrome type B) and Meckel syndrome." Nat Genet **39**(7): 875-81.
- Delous, M., N. E. Hellman, et al. (2009). "Nephrocystin-1 and nephrocystin-4 are required for epithelial morphogenesis and associate with PALS1/PATJ and Par6." Hum Mol Genet **18**(24): 4711-23.
- Deretic, D., L. A. Huber, et al. (1995). "rab8 in retinal photoreceptors may participate in rhodopsin transport and in rod outer segment disk morphogenesis." J Cell Sci **108** ( Pt 1): 215-24.
- Di Rocco, M., P. Picco, et al. (1997). "Retinitis pigmentosa, hypopituitarism, nephronophthisis, and mild skeletal dysplasia (RHYNS): a new syndrome?" Am J Med Genet **73**(1): 1-4.
- Djiane, A., J. Riou, et al. (2000). "Role of frizzled 7 in the regulation of convergent extension movements during gastrulation in *Xenopus laevis*." Development **127**(14): 3091-100.
- Dollar, G. L., U. Weber, et al. (2005). "Regulation of Lethal giant larvae by Dishevelled." Nature **437**(7063): 1376-80.
- Donaldson, J. C., P. J. Dempsey, et al. (2000). "Crk-associated substrate p130(Cas) interacts with nephrocystin and both proteins localize to cell-cell contacts of polarized epithelial cells." Exp Cell Res **256**(1): 168-78.
- Donaldson, J. C., R. S. Dise, et al. (2002). "Nephrocystin-conserved domains involved in targeting to epithelial cell-cell junctions, interaction with filamins, and establishing cell polarity." J Biol Chem **277**(32): 29028-35.
- Dowdle, W. E., J. F. Robinson, et al. "Disruption of a ciliary B9 protein complex

- causes Meckel syndrome." Am J Hum Genet **89**(1): 94-110.
- Dryja, T. P., S. M. Adams, et al. (2001). "Null RPGRIP1 alleles in patients with Leber congenital amaurosis." Am J Hum Genet **68**(5): 1295-8.
- Dupin, I., E. Camand, et al. (2009). "Classical cadherins control nucleus and centrosome position and cell polarity." J Cell Biol **185**(5): 779-86.
- Eaton, S., R. Wepf, et al. (1996). "Roles for Rac1 and Cdc42 in planar polarization and hair outgrowth in the wing of *Drosophila*." J Cell Biol **135**(5): 1277-89.
- Efimenko, E., K. Bubb, et al. (2005). "Analysis of *xbx* genes in *C. elegans*." Development **132**(8): 1923-34.
- Eley, L., S. H. Moochhala, et al. (2008). "Nephrocystin-1 interacts directly with Ack1 and is expressed in human collecting duct." Biochem Biophys Res Commun **371**(4): 877-82.
- Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2002). "Rho GTPases in cell biology." Nature **420**(6916): 629-35.
- Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2003). "Cdc42 regulates GSK-3 $\beta$  and adenomatous polyposis coli to control cell polarity." Nature **421**(6924): 753-6.
- Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2003). "Cell polarity: Par6, aPKC and cytoskeletal crosstalk." Curr Opin Cell Biol **15**(1): 67-72.
- Fan, S., T. W. Hurd, et al. (2004). "Polarity proteins control ciliogenesis via kinesin motor interactions." Curr Biol **14**(16): 1451-61.
- Fanconi, G., E. Hanhart, et al. (1951). "[Familial, juvenile nephronophthisis (idiopathic parenchymal contracted kidney)]." Helv Paediatr Acta **6**(1): 1-49.
- Fanto, M., U. Weber, et al. (2000). "Nuclear signaling by Rac and Rho GTPases is required in the establishment of epithelial planar polarity in the *Drosophila* eye." Curr Biol **10**(16): 979-88.
- Field, S., K. L. Riley, et al. "Pkd111 establishes left-right asymmetry and physically interacts with Pkd2." Development **138**(6): 1131-42.
- Fischer, E., E. Legue, et al. (2006). "Defective planar cell polarity in polycystic kidney disease." Nat Genet **38**(1): 21-3.
- Fliegauf, M., T. Benzing, et al. (2007). "When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(11): 880-93.
- Fliegauf, M., J. Horvath, et al. (2006). "Nephrocystin specifically localizes to the transition zone of renal and respiratory cilia and photoreceptor connecting cilia." J Am Soc Nephrol **17**(9): 2424-33.
- Fogelgren, B., S. Y. Lin, et al. "The exocyst protein Sec10 interacts with Polycystin-2 and knockdown causes PKD-phenotypes." PLoS Genet **7**(4): e1001361.
- Gagnadoux, M. F., J. L. Bacri, et al. (1989). "Infantile chronic tubulo-interstitial nephritis with cortical microcysts: variant of nephronophthisis or new disease entity?" Pediatr Nephrol **3**(1): 50-5.
- Ganner, A., S. Lienkamp, et al. (2009). "Regulation of ciliary polarity by the APC/C." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(42): 17799-804.
- Garcia-Gonzalo, F. R., K. C. Corbit, et al. "A transition zone complex regulates mammalian ciliogenesis and ciliary membrane composition." Nat Genet **43**(8): 776-84.
- Garcia-Gonzalo, F. R. and J. F. Reiter "Scoring a backstage pass: mechanisms of ciliogenesis and ciliary access." J Cell Biol **197**(6): 697-709.
- Garel, L. A., R. Habib, et al. (1984). "Juvenile nephronophthisis: sonographic appearance in children with severe uremia." Radiology **151**(1): 93-5.
- Geiger, B. (2006). "A role for p130Cas in mechanotransduction." Cell **127**(5): 879-81.



- Genevet, A. and N. Tapon "The Hippo pathway and apico-basal cell polarity." Biochem J **436**(2): 213-24.
- Gherman, A., E. E. Davis, et al. (2006). "The ciliary proteome database: an integrated community resource for the genetic and functional dissection of cilia." Nat Genet **38**(9): 961-2.
- Goetz, S. C. and K. V. Anderson "The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development." Nat Rev Genet **11**(5): 331-44.
- Goldstein, B. and I. G. Macara (2007). "The PAR proteins: fundamental players in animal cell polarization." Dev Cell **13**(5): 609-22.
- Gorden, N. T., H. H. Arts, et al. (2008). "CC2D2A is mutated in Joubert syndrome and interacts with the ciliopathy-associated basal body protein CEP290." Am J Hum Genet **83**(5): 559-71.
- Graser, S., Y. D. Stierhof, et al. (2007). "Cep164, a novel centriole appendage protein required for primary cilium formation." J Cell Biol **179**(2): 321-30.
- Gresh, L., E. Fischer, et al. (2004). "A transcriptional network in polycystic kidney disease." Embo J **23**(7): 1657-68.
- Guo, W., F. Tamanoi, et al. (2001). "Spatial regulation of the exocyst complex by Rho1 GTPase." Nat Cell Biol **3**(4): 353-60.
- Habas, R., I. B. Dawid, et al. (2003). "Coactivation of Rac and Rho by Wnt/Frizzled signaling is required for vertebrate gastrulation." Genes Dev **17**(2): 295-309.
- Habas, R., Y. Kato, et al. (2001). "Wnt/Frizzled activation of Rho regulates vertebrate gastrulation and requires a novel Formin homology protein Daam1." Cell **107**(7): 843-54.
- Habbig, S., M. P. Bartram, et al. "NPHP4, a cilia-associated protein, negatively regulates the Hippo pathway." J Cell Biol **193**(4): 633-42.
- Hagstrom, S. A., R. F. Watson, et al. "Tulp1 is involved in specific photoreceptor protein transport pathways." Adv Exp Med Biol **723**: 783-9.
- Happe, H., A. M. van der Wal, et al. "Altered Hippo signalling in polycystic kidney disease." J Pathol **224**(1): 133-42.
- Hartong, D. T., E. L. Berson, et al. (2006). "Retinitis pigmentosa." Lancet **368**(9549): 1795-809.
- Hashimoto, M., K. Shinohara, et al. "Planar polarization of node cells determines the rotational axis of node cilia." Nat Cell Biol **12**(2): 170-6.
- Hattula, K., J. Furuholm, et al. (2002). "A Rab8-specific GDP/GTP exchange factor is involved in actin remodeling and polarized membrane transport." Mol Biol Cell. **13**(9):3268-80.
- Haycraft, C. J., B. Banizs, et al. (2005). "Gli2 and Gli3 localize to cilia and require the intraflagellar transport protein polaris for processing and function." PLoS Genet **1**(4): e53.
- He, B. and W. Guo (2009). "The exocyst complex in polarized exocytosis." Curr Opin Cell Biol **21**(4): 537-42.
- Hearn, T., C. Spalluto, et al. (2005). "Subcellular localization of ALMS1 supports involvement of centrosome and basal body dysfunction in the pathogenesis of obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes." Diabetes **54**(5): 1581-7.
- Herdman, R. C. (1967). "Generalized renal cystic disease in children." Minn Med **50**(9): 1315-20.
- Hildebrandt, F., M. Attanasio, et al. (2009). "Nephronophthisis: disease mechanisms of a ciliopathy." J Am Soc Nephrol **20**(1): 23-35.
- Hildebrandt, F., E. Otto, et al. (1997). "A novel gene encoding an SH3 domain protein

- is mutated in nephronophthisis type 1." Nat Genet **17**(2): 149-53.
- Hildebrandt, F., R. Waldherr, et al. (1992). "The nephronophthisis complex: clinical and genetic aspects." Clin Investig **70**(9): 802-8.
- Hildebrandt, F. and W. Zhou (2007). "Nephronophthisis-associated ciliopathies." J Am Soc Nephrol **18**(6): 1855-71.
- Hirokawa, N., Y. Tanaka, et al. (2006). "Nodal flow and the generation of left-right asymmetry." Cell **125**(1): 33-45.
- Hoefele, J., A. Nayir, et al. "Pseudodominant inheritance of nephronophthisis caused by a homozygous NPHP1 deletion." Pediatr Nephrol **26**(6): 967-71.
- Hoefele, J., R. Sudbrak, et al. (2005). "Mutational analysis of the NPHP4 gene in 250 patients with nephronophthisis." Hum Mutat **25**(4): 411.
- Houde, C., R. J. Dickinson, et al. (2006). "Hippi is essential for node cilia assembly and Sonic hedgehog signaling." Dev Biol **300**(2): 523-33.
- Huang, L., K. Szymanska, et al. "TMEM237 is mutated in individuals with a Joubert syndrome related disorder and expands the role of the TMEM family at the ciliary transition zone." Am J Hum Genet **89**(6): 713-30.
- Huangfu, D. and K. V. Anderson (2005). "Cilia and Hedgehog responsiveness in the mouse." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(32): 11325-30.
- Huangfu, D., A. Liu, et al. (2003). "Hedgehog signalling in the mouse requires intraflagellar transport proteins." Nature **426**(6962): 83-7.
- Hubbert, C., A. Guardiola, et al. (2002). "HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase." Nature **417**(6887): 455-8.
- Huber, C. and V. Cormier-Daire "Ciliary disorder of the skeleton." Am J Med Genet C Semin Med Genet **160**(3): 165-74.
- Huber, L. A., S. Pimplikar, et al. (1993). "Rab8, a small GTPase involved in vesicular traffic between the TGN and the basolateral plasma membrane." J Cell Biol **123**(1): 35-45.
- Hunnicutt, G. R., M. G. Kosfisz, et al. (1990). "Cell body and flagellar agglutinins in *Chlamydomonas reinhardtii*: the cell body plasma membrane is a reservoir for agglutinins whose migration to the flagella is regulated by a functional barrier." J Cell Biol **111**(4): 1605-16.
- Hurd, T. W., L. Gao, et al. (2003). "Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly." Nat Cell Biol **5**(2): 137-42.
- Inglis, P. N., K. A. Boroevich, et al. (2006). "Piecing together a ciliome." Trends Genet **22**(9): 491-500.
- Ishikawa, H., A. Kubo, et al. (2005). "Odf2-deficient mother centrioles lack distal/subdistal appendages and the ability to generate primary cilia." Nat Cell Biol **7**(5): 517-24.
- Ishikawa, H. and W. F. Marshall "Ciliogenesis: building the cell's antenna." Nat Rev Mol Cell Biol **12**(4): 222-34.
- Jaffe, A. B. and A. Hall (2002). "Rho GTPases in transformation and metastasis." Adv Cancer Res **84**: 57-80.
- Jaffe, A. B. and A. Hall (2005). "Rho GTPases: biochemistry and biology." Annu Rev Cell Dev Biol **21**: 247-69.
- Jauregui, A. R., K. C. Nguyen, et al. (2008). "The *Caenorhabditis elegans* nephrocystins act as global modifiers of cilium structure." J Cell Biol **180**(5): 973-88.
- Jessen, J. R., J. Topczewski, et al. (2002). "Zebrafish trilobite identifies new roles for Strabismus in gastrulation and neuronal movements." Nat Cell Biol **4**(8): 610-

- 5.
- Jeune, M., C. Beraud, et al. (1955). "[Asphyxiating thoracic dystrophy with familial characteristics]." Arch Fr Pediatr **12**(8): 886-91.
- Jiang, S. T., Y. Y. Chiou, et al. (2009). "Essential role of nephrocystin in photoreceptor intraflagellar transport in mouse." Hum Mol Genet **18**(9): 1566-77.
- Jonassen, J. A., J. SanAgustin, et al. "Disruption of IFT complex A causes cystic kidneys without mitotic spindle misorientation." J Am Soc Nephrol **23**(4): 641-51.
- Jones, C., V. C. Roper, et al. (2008). "Ciliary proteins link basal body polarization to planar cell polarity regulation." Nat Genet **40**(1): 69-77.
- Joubert, M., J. J. Eisenring, et al. (1969). "Familial agenesis of the cerebellar vermis. A syndrome of episodic hyperpnea, abnormal eye movements, ataxia, and retardation." Neurology **19**(9): 813-25.
- Karner, C. M., R. Chirumamilla, et al. (2009). "Wnt9b signaling regulates planar cell polarity and kidney tubule morphogenesis." Nat Genet **41**(7): 793-9.
- Katsanis, N., S. J. Ansley, et al. (2001). "Triallelic inheritance in Bardet-Biedl syndrome, a Mendelian recessive disorder." Science **293**(5538): 2256-9.
- Keller, L. C., E. P. Romijn, et al. (2005). "Proteomic analysis of isolated chlamydomonas centrioles reveals orthologs of ciliary-disease genes." Curr Biol **15**(12): 1090-8.
- Khanna, H., E. E. Davis, et al. (2009). "A common allele in RPGRIP1L is a modifier of retinal degeneration in ciliopathies." Nat Genet **41**(6): 739-45.
- Kim, J., S. R. Krishnaswami, et al. (2008). "CEP290 interacts with the centriolar satellite component PCM-1 and is required for Rab8 localization to the primary cilium." Hum Mol Genet **17**(23): 3796-805.
- Kim, S. K., A. Shindo, et al. "Planar cell polarity acts through septins to control collective cell movement and ciliogenesis." Science **329**(5997): 1337-40.
- Klein, D. and F. Ammann (1969). "The syndrome of Laurence-Moon-Bardet-Biedl and allied diseases in Switzerland. Clinical, genetic and epidemiological studies." J Neurol Sci **9**(3): 479-513.
- Kobayashi, T. and B. D. Dynlacht "Regulating the transition from centriole to basal body." J Cell Biol **193**(3): 435-44.
- Kramer-Zucker, A. G., F. Olale, et al. (2005). "Cilia-driven fluid flow in the zebrafish pronephros, brain and Kupffer's vesicle is required for normal organogenesis." Development **132**(8): 1907-21.
- Kreiling, J. A., G. Williams, et al. (2007). "Analysis of Kupffer's vesicle in zebrafish embryos using a cave automated virtual environment." Dev Dyn **236**(7): 1963-9.
- Krishnan, R., L. Eley, et al. (2008). "Urinary concentration defects and mechanisms underlying nephronophthisis." Kidney Blood Press Res **31**(3): 152-62.
- Lai, S. L., A. J. Chien, et al. (2009). "Wnt/Fz signaling and the cytoskeleton: potential roles in tumorigenesis." Cell Res **19**(5): 532-45.
- Lancaster, M. A., J. Schroth, et al. "Subcellular spatial regulation of canonical Wnt signalling at the primary cilium." Nat Cell Biol **13**(6): 700-7.
- Lapebie, P., C. Borchellini, et al. "Dissecting the PCP pathway: one or more pathways?: Does a separate Wnt-Fz-Rho pathway drive morphogenesis?" Bioessays **33**(10): 759-68.
- Larkins, C. E., G. D. Aviles, et al. "Arl13b regulates ciliogenesis and the dynamic

- localization of Shh signaling proteins." Mol Biol Cell **22**(23): 4694-703.
- Leber, T. (1869). "Retinitis Pigmentosa und angeborene Amaurose." Albrecht von Graefes Arch. Ophthal **15**: 1-25.
- Lee, K. H., Y. Johmura, et al. "Identification of a novel Wnt5a-CK1varepsilon-Dvl2-Plk1-mediated primary cilia disassembly pathway." Embo J **31**(14): 3104-17.
- Lemmers, C., D. Michel, et al. (2004). "CRB3 binds directly to Par6 and regulates the morphogenesis of the tight junctions in mammalian epithelial cells." Mol Biol Cell **15**(3): 1324-33.
- Lewis, M., J. Shaw, et al. (2007). "Demography and management of childhood established renal failure in the UK (chapter 13)." Nephrol Dial Transplant **22 Suppl 7**: vii165-75.
- Li, B., A. A. Rauhauser, et al. "Increased hedgehog signaling in postnatal kidney results in aberrant activation of nephron developmental programs." Hum Mol Genet **20**(21): 4155-66.
- Li, J. B., J. M. Gerdes, et al. (2004). "Comparative genomics identifies a flagellar and basal body proteome that includes the BBS5 human disease gene." Cell **117**(4): 541-52.
- Liebau, M. C., K. Hopker, et al. "Nephrocystin-4 regulates Pyk2-induced tyrosine phosphorylation of nephrocystin-1 to control targeting to monocilia." J Biol Chem **286**(16): 14237-45.
- Liem, K. F., Jr., A. Ashe, et al. "The IFT-A complex regulates Shh signaling through cilia structure and membrane protein trafficking." J Cell Biol **197**(6): 789-800.
- Lienkamp, S., A. Ganner, et al. "Inversin relays Frizzled-8 signals to promote proximal pronephros development." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(47): 20388-93.
- Lin, F., T. Hiesberger, et al. (2003). "Kidney-specific inactivation of the KIF3A subunit of kinesin-II inhibits renal ciliogenesis and produces polycystic kidney disease." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(9): 5286-91.
- Lina, F. and L. M. Satlinb (2004). "Polycystic kidney disease: the cilium as a common pathway in cystogenesis." Curr Opin Pediatr **16**(2): 171-6.
- Liu, A., B. Wang, et al. (2005). "Mouse intraflagellar transport proteins regulate both the activator and repressor functions of Gli transcription factors." Development **132**(13): 3103-11.
- Liu, S., W. Lu, et al. (2002). "A defect in a novel Nek-family kinase causes cystic kidney disease in the mouse and in zebrafish." Development **129**(24): 5839-46.
- Lo, S. H., Q. C. Yu, et al. (1997). "Progressive kidney degeneration in mice lacking tensin." J Cell Biol **136**(6): 1349-61.
- Logan, C. V., Z. Abdel-Hamed, et al. "Molecular genetics and pathogenic mechanisms for the severe ciliopathies: insights into neurodevelopment and pathogenesis of neural tube defects." Mol Neurobiol **43**(1): 12-26.
- Loken, A. C., O. Hanssen, et al. (1961). "Hereditary renal dysplasia and blindness." Acta Paediatr **50**: 177-84.
- Louie, C. M., G. Caridi, et al. "AHI1 is required for photoreceptor outer segment development and is a modifier for retinal degeneration in nephronophthisis." Nat Genet **42**(2): 175-80.
- Luyten, A., X. Su, et al. "Aberrant regulation of planar cell polarity in polycystic kidney disease." J Am Soc Nephrol **21**(9): 1521-32.
- Ma, L., X. Zhao, et al. (2006). "Mitosin/CENP-F in mitosis, transcriptional control, and

- differentiation." J Biomed Sci **13**(2): 205-13.
- Mahuzier, A., H. M. Gaude, et al. "Dishevelled stabilization by the ciliopathy protein Rpgrip11 is essential for planar cell polarity." J Cell Biol.
- Mainzer, F., R. M. Saldino, et al. (1970). "Familial nephropathy associated with retinitis pigmentosa, cerebellar ataxia and skeletal abnormalities." Am J Med **49**(4): 556-62.
- Maisonneuve, C., I. Guilleret, et al. (2009). "Bicaudal C, a novel regulator of Dvl signaling abutting RNA-processing bodies, controls cilia orientation and leftward flow." Development **136**(17): 3019-30.
- Marion, V., D. Schlicht, et al. "Bardet-Biedl syndrome highlights the major role of the primary cilium in efficient water reabsorption." Kidney Int **79**(9): 1013-25.
- Marlow, F., J. Topczewski, et al. (2002). "Zebrafish Rho kinase 2 acts downstream of Wnt11 to mediate cell polarity and effective convergence and extension movements." Curr Biol **12**(11): 876-84.
- Marshall, J. D., R. T. Bronson, et al. (2005). "New Alstrom syndrome phenotypes based on the evaluation of 182 cases." Arch Intern Med **165**(6): 675-83.
- Marszalek, J. R., X. Liu, et al. (2000). "Genetic evidence for selective transport of opsin and arrestin by kinesin-II in mammalian photoreceptors." Cell **102**(2): 175-87.
- Marszalek, J. R., P. Ruiz-Lozano, et al. (1999). "Situs inversus and embryonic ciliary morphogenesis defects in mouse mutants lacking the KIF3A subunit of kinesin-II." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(9): 5043-8.
- Martin-Belmonte, F., A. Gassama, et al. (2007). "PTEN-mediated apical segregation of phosphoinositides controls epithelial morphogenesis through Cdc42." Cell **128**(2): 383-97.
- Matsuda, M. and T. Kurata (1996). "Emerging components of the Crk oncogene product: the first identified adaptor protein." Cell Signal **8**(5): 335-40.
- Matsumoto, S., K. Fumoto, et al. "Binding of APC and dishevelled mediates Wnt5a-regulated focal adhesion dynamics in migrating cells." Embo J **29**(7): 1192-204.
- May, S. R., A. M. Ashique, et al. (2005). "Loss of the retrograde motor for IFT disrupts localization of Smo to cilia and prevents the expression of both activator and repressor functions of Gli." Dev Biol **287**(2): 378-89.
- McGrath, J., S. Somlo, et al. (2003). "Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse." Cell **114**(1): 61-73.
- Menco, B. P. (1994). "Ultrastructural aspects of olfactory transduction and perireceptor events." Semin Cell Biol **5**(1): 11-24.
- Menco, M. (1980). "Qualitative and quantitative freeze-fracture studies on olfactory and respiratory epithelial surfaces of frog, ox, rat, and dog. IV. Ciliogenesis and ciliary necklaces (including high-voltage observations)." Cell Tissue Res **212**(1): 1-16.
- Mochizuki, T., G. Wu, et al. (1996). "PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein." Science **272**(5266): 1339-42.
- Mockel, A., Y. Perdomo, et al. "Retinal dystrophy in Bardet-Biedl syndrome and related syndromic ciliopathies." Prog Retin Eye Res **30**(4): 258-74.
- Mollet, G., R. Salomon, et al. (2002). "The gene mutated in juvenile nephronophthisis type 4 encodes a novel protein that interacts with nephrocystin." Nat Genet **32**(2): 300-5.
- Mollet, G., F. Silbermann, et al. (2005). "Characterization of the

- nephrocystin/nephrocystin-4 complex and subcellular localization of nephrocystin-4 to primary cilia and centrosomes." Hum Mol Genet **14**(5): 645-56.
- Montcouquiol, M., R. A. Rachel, et al. (2003). "Identification of Vangl2 and Scrb1 as planar polarity genes in mammals." Nature **423**(6936): 173-7.
- Morgan, D., L. Eley, et al. (2002). "Expression analyses and interaction with the anaphase promoting complex protein Apc2 suggest a role for inversin in primary cilia and involvement in the cell cycle." Hum Mol Genet **11**(26): 3345-50.
- Moritz, O. L., B. M. Tam, et al. (2001). "Mutant rab8 Impairs docking and fusion of rhodopsin-bearing post-Golgi membranes and causes cell death of transgenic *Xenopus* rods." Mol Biol Cell **12**(8): 2341-51.
- Moudgil, A., A. Bagga, et al. (1998). "Nephronophthisis associated with Ellis-van Creveld syndrome." Pediatr Nephrol **12**(1): 20-2.
- Nachury, M. V., A. V. Loktev, et al. (2007). "A core complex of BBS proteins cooperates with the GTPase Rab8 to promote ciliary membrane biogenesis." Cell **129**(6): 1201-13.
- Nachury, M. V., E. S. Seeley, et al. "Trafficking to the ciliary membrane: how to get across the periciliary diffusion barrier?" Annu Rev Cell Dev Biol **26**: 59-87.
- Nakamura, T. and H. Hamada "Left-right patterning: conserved and divergent mechanisms." Development **139**(18): 3257-62.
- Nakamura, T., N. Yamamuro, et al. (1998). "Cloning of the trkAH gene cluster and characterization of the Trk K(+)-uptake system of *Vibrio alginolyticus*." Microbiology **144** ( Pt 8): 2281-9.
- Nakayama, M., T. M. Goto, et al. (2008). "Rho-kinase phosphorylates PAR-3 and disrupts PAR complex formation." Dev Cell **14**(2): 205-15.
- Nakazawa, T., I. Nakano, et al. (2002). "Comparative expression profiles of Trk receptors and Shc-related phosphotyrosine adapters during retinal development: potential roles of N-Shc/ShcC in brain-derived neurotrophic factor signal transduction and modulation." J Neurosci Res **68**(6): 668-80.
- Nauli, S. M., F. J. Alenghat, et al. (2003). "Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells." Nat Genet **33**(2): 129-37.
- Nogales-Cadenas, R., F. Abascal, et al. (2009). "CentrosomeDB: a human centrosomal proteins database." Nucleic Acids Res **37**(Database issue): D175-80.
- Nonaka, S., Y. Tanaka, et al. (1998). "Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein." Cell **95**(6): 829-37.
- Nonaka, S., S. Yoshida, et al. (2005). "De novo formation of left-right asymmetry by posterior tilt of nodal cilia." PLoS Biol **3**(8): e268.
- Norris, D. P. and D. T. Grimes "Mouse models of ciliopathies: the state of the art." Dis Model Mech **5**(3): 299-312.
- Novick, P., C. Field, et al. (1980). "Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway." Cell **21**(1): 205-15.
- Nusrat, A., M. Giry, et al. (1995). "Rho protein regulates tight junctions and perijunctional actin organization in polarized epithelia." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(23): 10629-33.

- Obara, T., S. Mangos, et al. (2006). "Polycystin-2 immunolocalization and function in zebrafish." J Am Soc Nephrol **17**(10): 2706-18.
- Ocbina, P. J., J. T. Eggenschwiler, et al. "Complex interactions between genes controlling trafficking in primary cilia." Nat Genet **43**(6): 547-53.
- O'Connell, M. J., M. J. Krien, et al. (2003). "Never say never. The NIMA-related protein kinases in mitotic control." Trends Cell Biol **13**(5): 221-8.
- O'Dea, D., P. S. Parfrey, et al. (1996). "The importance of renal impairment in the natural history of Bardet-Biedl syndrome." Am J Kidney Dis **27**(6): 776-83.
- Okabe, N., B. Xu, et al. (2008). "Fluid dynamics in zebrafish Kupffer's vesicle." Dev Dyn **237**(12): 3602-12.
- Okada, Y., S. Nonaka, et al. (1999). "Abnormal nodal flow precedes situs inversus in iv and inv mice." Mol Cell **4**(4): 459-68.
- Olbrich, H., M. Fliegau, et al. (2003). "Mutations in a novel gene, NPHP3, cause adolescent nephronophthisis, tapeto-retinal degeneration and hepatic fibrosis." Nat Genet **34**(4): 455-9.
- Olsen, O., L. Funke, et al. (2007). "Renal defects associated with improper polarization of the CRB and DLG polarity complexes in MALS-3 knockout mice." J Cell Biol **179**(1): 151-64.
- Omori, Y. and J. Malicki (2006). "oko meduzy and related crumbs genes are determinants of apical cell features in the vertebrate embryo." Curr Biol **16**(10): 945-57.
- Omran, H., K. Haffner, et al. (2001). "Human adolescent nephronophthisis: gene locus synteny with polycystic kidney disease in pcy mice." J Am Soc Nephrol **12**(1): 107-13.
- Ong, A. C. and P. C. Harris (2005). "Molecular pathogenesis of ADPKD: the polycystin complex gets complex." Kidney Int **67**(4): 1234-47.
- Onuchic, L. F., L. Furu, et al. (2002). "PKHD1, the polycystic kidney and hepatic disease 1 gene, encodes a novel large protein containing multiple immunoglobulin-like plexin-transcription-factor domains and parallel beta-helix 1 repeats." Am J Hum Genet **70**(5): 1305-17.
- Ostrowski, L. E., K. Blackburn, et al. (2002). "A proteomic analysis of human cilia: identification of novel components." Mol Cell Proteomics **1**(6): 451-65.
- O'Toole, J. F., Y. Liu, et al. "Individuals with mutations in XPNPEP3, which encodes a mitochondrial protein, develop a nephronophthisis-like nephropathy." J Clin Invest **120**(3): 791-802.
- Otto, E., A. Kispert, et al. (2000). "Nephrocystin: gene expression and sequence conservation between human, mouse, and Caenorhabditis elegans." J Am Soc Nephrol **11**(2): 270-82.
- Otto, E. A., T. W. Hurd, et al. "Candidate exome capture identifies mutation of SDCCAG8 as the cause of a retinal-renal ciliopathy." Nat Genet **42**(10): 840-50.
- Otto, E. A., B. Loeys, et al. (2005). "Nephrocystin-5, a ciliary IQ domain protein, is mutated in Senior-Loken syndrome and interacts with RPGR and calmodulin." Nat Genet **37**(3): 282-8.
- Otto, E. A., B. Schermer, et al. (2003). "Mutations in INVS encoding inversin cause nephronophthisis type 2, linking renal cystic disease to the function of primary cilia and left-right axis determination." Nat Genet **34**(4): 413-20.
- Otto, E. A., K. Tory, et al. (2009). "Hypomorphic mutations in meckelin (MKS3/TMEM67) cause nephronophthisis with liver fibrosis (NPHP11)." J Med

- Genet **46**(10): 663-70.
- Otto, E. A., M. L. Trapp, et al. (2008). "NEK8 mutations affect ciliary and centrosomal localization and may cause nephronophthisis." J Am Soc Nephrol **19**(3): 587-92.
- Ou, G., O. E. Blacque, et al. (2005). "Functional coordination of intraflagellar transport motors." Nature **436**(7050): 583-7.
- Ozdamar, B., R. Bose, et al. (2005). "Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity." Science **307**(5715): 1603-9.
- Pan, J., Y. You, et al. (2007). "RhoA-mediated apical actin enrichment is required for ciliogenesis and promoted by Foxj1." J Cell Sci **120**(Pt 11): 1868-76.
- Papermaster, D. S., B. G. Schneider, et al. (1985). "Vesicular transport of newly synthesized opsin from the Golgi apparatus toward the rod outer segment. Ultrastructural immunocytochemical and autoradiographic evidence in *Xenopus* retinas." Invest Ophthalmol Vis Sci **26**(10): 1386-404.
- Paricio, N., F. Feiguin, et al. (1999). "The *Drosophila* STE20-like kinase misshapen is required downstream of the Frizzled receptor in planar polarity signaling." Embo J **18**(17): 4669-78.
- Parisi, M. A. (2009). "Clinical and molecular features of Joubert syndrome and related disorders." Am J Med Genet C Semin Med Genet **151C**(4): 326-40.
- Park, T. J., B. J. Mitchell, et al. (2008). "Dishevelled controls apical docking and planar polarization of basal bodies in ciliated epithelial cells." Nat Genet **40**(7): 871-9.
- Parker, J. D., L. K. Hilton, et al. "Centrioles are freed from cilia by severing prior to mitosis." Cytoskeleton (Hoboken) **67**(7): 425-30.
- Pazour, G. J., N. Agrin, et al. (2005). "Proteomic analysis of a eukaryotic cilium." J Cell Biol **170**(1): 103-13.
- Pazour, G. J., S. A. Baker, et al. (2002). "The intraflagellar transport protein, IFT88, is essential for vertebrate photoreceptor assembly and maintenance." J Cell Biol **157**(1): 103-13.
- Pazour, G. J. and R. A. Bloodgood (2008). "Targeting proteins to the ciliary membrane." Curr Top Dev Biol **85**: 115-49.
- Pazour, G. J., B. L. Dickert, et al. (2000). "Chlamydomonas IFT88 and its mouse homologue, polycystic kidney disease gene tg737, are required for assembly of cilia and flagella." J Cell Biol **151**(3): 709-18.
- Pedersen, L. B. and J. L. Rosenbaum (2008). "Intraflagellar transport (IFT) role in ciliary assembly, resorption and signalling." Curr Top Dev Biol **85**: 23-61.
- Pegtel, D. M., S. I. Ellenbroek, et al. (2007). "The Par-Tiam1 complex controls persistent migration by stabilizing microtubule-dependent front-rear polarity." Curr Biol **17**(19): 1623-34.
- Pennekamp, P., C. Karcher, et al. (2002). "The ion channel polycystin-2 is required for left-right axis determination in mice." Curr Biol **12**(11): 938-43.
- Perantoni, A. O. (2003). "Renal development: perspectives on a Wnt-dependent process." Semin Cell Dev Biol **14**(4): 201-8.
- Perrault, I., N. Delphin, et al. (2007). "Spectrum of NPHP6/CEP290 mutations in Leber congenital amaurosis and delineation of the associated phenotype." Hum Mutat **28**(4): 416.
- Perrault, I., S. Saunier, et al. "Mainzer-Saldino syndrome is a ciliopathy caused by IFT140 mutations." Am J Hum Genet **90**(5): 864-70.



- Pertz, O., L. Hodgson, et al. (2006). "Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells." Nature **440**(7087): 1069-72.
- Potter, D. E., M. A. Holliday, et al. (1980). "Treatment of end-stage renal disease in children: a 15-year experience." Kidney Int **18**(1): 103-9.
- Praetorius, H. A. and K. R. Spring (2001). "Bending the MDCK cell primary cilium increases intracellular calcium." J Membr Biol **184**(1): 71-9.
- Prahalad, P., I. Calvo, et al. (2004). "Regulation of MDCK cell-substratum adhesion by RhoA and myosin light chain kinase after ATP depletion." Am J Physiol Cell Physiol **286**(3): C693-707.
- Pugacheva, E. N., S. A. Jablonski, et al. (2007). "HEF1-dependent Aurora A activation induces disassembly of the primary cilium." Cell **129**(7): 1351-63.
- Pugacheva, E. N., F. Roegiers, et al. (2006). "Interdependence of cell attachment and cell cycle signaling." Curr Opin Cell Biol **18**(5): 507-15.
- Putoux, A., T. Attie-Bitach, et al. "Phenotypic variability of Bardet-Biedl syndrome: focusing on the kidney." Pediatr Nephrol **27**(1): 7-15.
- Qian, C. N., J. Knol, et al. (2005). "Cystic renal neoplasia following conditional inactivation of apc in mouse renal tubular epithelium." J Biol Chem **280**(5): 3938-45.
- Qian, D., C. Jones, et al. (2007). "Wnt5a functions in planar cell polarity regulation in mice." Dev Biol **306**(1): 121-33.
- Qin, J., Y. Lin, et al. "Intraflagellar transport protein 122 antagonizes Sonic Hedgehog signaling and controls ciliary localization of pathway components." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(4): 1456-61.
- Rasi, M. Q., J. D. Parker, et al. (2009). "Katanin knockdown supports a role for microtubule severing in release of basal bodies before mitosis in *Chlamydomonas*." Mol Biol Cell **20**(1): 379-88.
- Reiter, J. F. and W. C. Skarnes (2006). "Tectonic, a novel regulator of the Hedgehog pathway required for both activation and inhibition." Genes Dev **20**(1): 22-7.
- Roepman, R., N. Bernoud-Hubac, et al. (2000). "The retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR) interacts with novel transport-like proteins in the outer segments of rod photoreceptors." Hum Mol Genet **9**(14): 2095-105.
- Roepman, R., S. J. Letteboer, et al. (2005). "Interaction of nephrocystin-4 and RPGRIP1 is disrupted by nephronophthisis or Leber congenital amaurosis-associated mutations." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(51): 18520-5.
- Rogers, K. K., T. S. Jou, et al. (2003). "The Rho family of small GTPases is involved in epithelial cystogenesis and tubulogenesis." Kidney Int **63**(5): 1632-44.
- Rogers, K. K., P. D. Wilson, et al. (2004). "The exocyst localizes to the primary cilium in MDCK cells." Biochem Biophys Res Commun **319**(1): 138-43.
- Rohlich, P. (1975). "The sensory cilium of retinal rods is analogous to the transitional zone of motile cilia." Cell Tissue Res **161**(3): 421-30.
- Roof, D., M. Adamian, et al. (1991). "Cytoskeletal specializations at the rod photoreceptor distal tip." J Comp Neurol **305**(2): 289-303.
- Rosenbaum, J. L. and F. M. Child (1967). "Flagellar regeneration in protozoan flagellates." J Cell Biol **34**(1): 345-64.
- Rosenbaum, J. L. and G. B. Witman (2002). "Intraflagellar transport." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(11): 813-25.
- Ross, A. J., H. May-Simera, et al. (2005). "Disruption of Bardet-Biedl syndrome ciliary proteins perturbs planar cell polarity in vertebrates." Nat Genet **37**(10): 1135-40.

- Rosso, S. B., D. Sussman, et al. (2005). "Wnt signaling through Dishevelled, Rac and JNK regulates dendritic development." Nat Neurosci **8**(1): 34-42.
- Ruat, M., H. Roudaut, et al. "Hedgehog trafficking, cilia and brain functions." Differentiation **83**(2): S97-104.
- Saadi-Kheddouci, S., D. Berrebi, et al. (2001). "Early development of polycystic kidney disease in transgenic mice expressing an activated mutant of the beta-catenin gene." Oncogene **20**(42): 5972-81.
- Saburi, S., I. Hester, et al. (2008). "Loss of Fat4 disrupts PCP signaling and oriented cell division and leads to cystic kidney disease." Nat Genet **40**(8): 1010-5.
- Salomon, R., S. Saunier, et al. (2009). "Nephronophthisis." Pediatr Nephrol **24**(12): 2333-44.
- Sang, L., J. J. Miller, et al. "Mapping the NPHP-JBTS-MKS protein network reveals ciliopathy disease genes and pathways." Cell **145**(4): 513-28.
- Satran, D., M. E. Pierpont, et al. (1999). "Cerebello-oculo-renal syndromes including Arima, Senior-Loken and COACH syndromes: more than just variants of Joubert syndrome." Am J Med Genet **86**(5): 459-69.
- Sattar, S. and J. G. Gleeson "The ciliopathies in neuronal development: a clinical approach to investigation of Joubert syndrome and Joubert syndrome-related disorders." Dev Med Child Neurol **53**(9): 793-8.
- Saunier, S., J. Calado, et al. (2000). "Characterization of the NPHP1 locus: mutational mechanism involved in deletions in familial juvenile nephronophthisis." Am J Hum Genet **66**(3): 778-89.
- Saunier, S., J. Calado, et al. (1997). "A novel gene that encodes a protein with a putative src homology 3 domain is a candidate gene for familial juvenile nephronophthisis." Hum Mol Genet **6**(13): 2317-23.
- Saunier, S., R. Salomon, et al. (2005). "Nephronophthisis." Curr Opin Genet Dev **15**(3): 324-31.
- Sayer, J. A., E. A. Otto, et al. (2006). "The centrosomal protein nephrocystin-6 is mutated in Joubert syndrome and activates transcription factor ATF4." Nat Genet **38**(6): 674-81.
- Schedl, A. (2007). "Renal abnormalities and their developmental origin." Nat Rev Genet **8**(10): 791-802.
- Schlessinger, K., A. Hall, et al. (2009). "Wnt signaling pathways meet Rho GTPases." Genes Dev **23**(3): 265-77.
- Schlessinger, K., E. J. McManus, et al. (2007). "Cdc42 and noncanonical Wnt signal transduction pathways cooperate to promote cell polarity." J Cell Biol **178**(3): 355-61.
- Schmidt-Ott, K. M. and J. Barasch (2008). "WNT/beta-catenin signaling in nephron progenitors and their epithelial progeny." Kidney Int **74**(8): 1004-8.
- Schmidt-Ott, K. M., T. N. Masckauchan, et al. (2007). "beta-catenin/TCF/Lef controls a differentiation-associated transcriptional program in renal epithelial progenitors." Development **134**(17): 3177-90.
- Schroeder, M. C. and G. Halder "Regulation of the Hippo pathway by cell architecture and mechanical signals." Semin Cell Dev Biol.
- Seeger-Nukpezah, T., M. C. Liebau, et al. "The centrosomal kinase Plk1 localizes to the transition zone of primary cilia and induces phosphorylation of nephrocystin-1." PLoS One **7**(6): e38838.
- Senior, B., A. I. Friedmann, et al. (1961). "Juvenile familial nephropathy with tapetoretinal degeneration. A new oculorenal dystrophy." Am J Ophthalmol **52**:

625-33.

- Sensenbrenner, J. A., J. P. Dorst, et al. (1975). "New syndrome of skeletal, dental and hair anomalies." Birth Defects Orig Artic Ser **11**(2): 372-9.
- Seo, S., L. M. Baye, et al. "BBS6, BBS10, and BBS12 form a complex with CCT/TRiC family chaperonins and mediate BBSome assembly." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(4): 1488-93.
- Sfakianos, J., A. Togawa, et al. (2007). "Par3 functions in the biogenesis of the primary cilium in polarized epithelial cells." J Cell Biol **179**(6): 1133-40.
- Shiba, D., D. K. Manning, et al. "Inv acts as a molecular anchor for Nphp3 and Nek8 in the proximal segment of primary cilia." Cytoskeleton (Hoboken) **67**(2): 112-9.
- Shiba, D., T. Takamatsu, et al. (2005). "Primary cilia of inv/inv mouse renal epithelial cells sense physiological fluid flow: bending of primary cilia and Ca<sup>2+</sup> influx." Cell Struct Funct **30**(2): 93-100.
- Shiba, D., Y. Yamaoka, et al. (2009). "Localization of Inv in a distinctive intraciliary compartment requires the C-terminal ninein-homolog-containing region." J Cell Sci **122**(Pt 1): 44-54.
- Shillingford, J. M., N. S. Murcia, et al. (2006). "The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(14): 5466-71.
- Shin, K., V. C. Fogg, et al. (2006). "Tight junctions and cell polarity." Annu Rev Cell Dev Biol **22**: 207-35.
- Shin, K., S. Straight, et al. (2005). "PATJ regulates tight junction formation and polarity in mammalian epithelial cells." J Cell Biol **168**(5): 705-11.
- Simms, R. J., A. M. Hynes, et al. "Modelling a ciliopathy: Ahi1 knockdown in model systems reveals an essential role in brain, retinal, and renal development." Cell Mol Life Sci **69**(6): 993-1009.
- Simons, M., J. Gloy, et al. (2005). "Inversin, the gene product mutated in nephronophthisis type II, functions as a molecular switch between Wnt signaling pathways." Nat Genet **37**(5): 537-43.
- Singla, V., M. Romaguera-Ros, et al. "Ofd1, a human disease gene, regulates the length and distal structure of centrioles." Dev Cell **18**(3): 410-24.
- Sivasubramaniam, S., X. Sun, et al. (2008). "Cep164 is a mediator protein required for the maintenance of genomic stability through modulation of MDC1, RPA, and CHK1." Genes Dev **22**(5): 587-600.
- Skouloudaki, K., M. Puetz, et al. (2009). "Scribble participates in Hippo signaling and is required for normal zebrafish pronephros development." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(21): 8579-84.
- Slanchev, K., M. Putz, et al. "Nephrocystin-4 is required for pronephric duct-dependent cloaca formation in zebrafish." Hum Mol Genet **20**(16): 3119-28.
- Smith, C. and J. Graham (1945). "Congenital medullary cysts of the kidneys with severe refractory anemia." Am J Dis Child(69): 369-377.
- Sobkowicz, H. M., S. M. Slapnick, et al. (1995). "The kinocilium of auditory hair cells and evidence for its morphogenetic role during the regeneration of stereocilia and cuticular plates." J Neurocytol **24**(9): 633-53.
- Sohara, E., Y. Luo, et al. (2008). "Nek8 regulates the expression and localization of polycystin-1 and polycystin-2." J Am Soc Nephrol **19**(3): 469-76.
- Sokol, S. Y. (1996). "Analysis of Dishevelled signalling pathways during Xenopus development." Curr Biol **6**(11): 1456-67.

- Song, H., J. Hu, et al. "Planar cell polarity breaks bilateral symmetry by controlling ciliary positioning." Nature **466**(7304): 378-82.
- Sonomura, K., M. Okigaki, et al. "The kinase Pyk2 is involved in renal fibrosis by means of mechanical stretch-induced growth factor expression in renal tubules." Kidney Int **81**(5): 449-57.
- Steinberg, R. H. and I. Wood (1975). "Clefts and microtubules of photoreceptor outer segments in the retina of the domestic cat." J Ultrastruct Res **51**(3): 307-403.
- Stolc, V., M. P. Samanta, et al. (2005). "Genome-wide transcriptional analysis of flagellar regeneration in *Chlamydomonas reinhardtii* identifies orthologs of ciliary disease genes." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(10): 3703-7.
- Straight, S. W., K. Shin, et al. (2004). "Loss of PALS1 expression leads to tight junction and polarity defects." Mol Biol Cell **15**(4): 1981-90.
- Sugiyama, N., T. Tsukiyama, et al. "The canonical Wnt signaling pathway is not involved in renal cyst development in the kidneys of inv mutant mice." Kidney Int **79**(9): 957-65.
- Sun, Z., A. Amsterdam, et al. (2004). "A genetic screen in zebrafish identifies cilia genes as a principal cause of cystic kidney." Development **131**(16): 4085-93.
- Tabin, C. J. and K. J. Vogan (2003). "A two-cilia model for vertebrate left-right axis specification." Genes Dev **17**(1): 1-6.
- Tada, M. and M. Kai (2009). "Noncanonical Wnt/PCP signaling during vertebrate gastrulation." Zebrafish **6**(1): 29-40.
- Tanaka, Y., Y. Okada, et al. (2005). "FGF-induced vesicular release of Sonic hedgehog and retinoic acid in leftward nodal flow is critical for left-right determination." Nature **435**(7039): 172-7.
- Tanegashima, K., H. Zhao, et al. (2008). "WGEF activates Rho in the Wnt-PCP pathway and controls convergent extension in *Xenopus* gastrulation." Embo J **27**(4): 606-17.
- Taschner, M., S. Bhogaraju, et al. "Architecture and function of IFT complex proteins in ciliogenesis." Differentiation **83**(2): S12-22.
- Thomas, S., M. Legendre, et al. "TCTN3 mutations cause Mohr-Majewski syndrome." Am J Hum Genet **91**(2): 372-8.
- Togawa, A., J. Sfakianos, et al. "Hepatocyte Growth Factor stimulated cell scattering requires ERK and Cdc42-dependent tight junction disassembly." Biochem Biophys Res Commun **400**(2): 271-7.
- Tory, K., T. Lacoste, et al. (2007). "High NPHP1 and NPHP6 mutation rate in patients with Joubert syndrome and nephronophthisis: potential epistatic effect of NPHP6 and AHI1 mutations in patients with NPHP1 mutations." J Am Soc Nephrol **18**(5): 1566-75.
- Tory, K., C. Rousset-Rouviere, et al. (2009). "Mutations of NPHP2 and NPHP3 in infantile nephronophthisis." Kidney Int **75**(8): 839-47.
- Tran, P. V., C. J. Haycraft, et al. (2008). "THM1 negatively modulates mouse sonic hedgehog signal transduction and affects retrograde intraflagellar transport in cilia." Nat Genet **40**(4): 403-10.
- Tsang, W. Y., C. Bossard, et al. (2008). "CP110 suppresses primary cilia formation through its interaction with CEP290, a protein deficient in human ciliary disease." Dev Cell **15**(2): 187-97.
- Tsimaratos, M., J. Sarles, et al. (1998). "Renal and retinal involvement in the Sensenbrenner syndrome." Am J Med Genet **77**(4): 337.
- Tsujiyama, M. and J. Malicki (2004). "Intraflagellar transport genes are essential for

- differentiation and survival of vertebrate sensory neurons." Neuron **42**(5): 703-16.
- Valente, E. M., C. V. Logan, et al. "Mutations in TMEM216 perturb ciliogenesis and cause Joubert, Meckel and related syndromes." Nat Genet **42**(7): 619-25.
- Vasanth, S., G. ZeRuth, et al. "Identification of nuclear localization, DNA binding, and transactivating mechanisms of Kruppel-like zinc finger protein Gli-similar 2 (Glis2)." J Biol Chem **286**(6): 4749-59.
- Verdeguer, F., S. Le Corre, et al. "A mitotic transcriptional switch in polycystic kidney disease." Nat Med **16**(1): 106-10.
- Vierkotten, J., R. Dildrop, et al. (2007). "Ftm is a novel basal body protein of cilia involved in Shh signalling." Development **134**(14): 2569-77.
- Waldherr, R., T. Lennert, et al. (1982). "The nephronophthisis complex. A clinicopathologic study in children." Virchows Arch A Pathol Anat Histo **394**(3): 235-54.
- Wang, G., A. B. Cadwallader, et al. "The Rho kinase Rock2b establishes anteroposterior asymmetry of the ciliated Kupffer's vesicle in zebrafish." Development **138**(1): 45-54.
- Wang, H. R., A. A. Ogunjimi, et al. (2006). "Degradation of RhoA by Smurf1 ubiquitin ligase." Methods Enzymol **406**: 437-47.
- Wang, J., S. Mark, et al. (2005). "Regulation of polarized extension and planar cell polarity in the cochlea by the vertebrate PCP pathway." Nat Genet **37**(9): 980-5.
- Wang, S., J. Zhang, et al. (2007). "Fibrocystin/polyductin, found in the same protein complex with polycystin-2, regulates calcium responses in kidney epithelia." Mol Cell Biol **27**(8): 3241-52.
- Wang, Y., N. Guo, et al. (2006). "The role of Frizzled3 and Frizzled6 in neural tube closure and in the planar polarity of inner-ear sensory hair cells." J Neurosci **26**(8): 2147-56.
- Warady, B. A., D. Hebert, et al. (1997). "Renal transplantation, chronic dialysis, and chronic renal insufficiency in children and adolescents. The 1995 Annual Report of the North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study." Pediatr Nephrol **11**(1): 49-64.
- Warburton-Pitt, S. R., A. R. Jauregui, et al. "Ciliogenesis in *Caenorhabditis elegans* requires genetic interactions between ciliary middle segment localized NPHP-2 (inversin) and transition zone-associated proteins." J Cell Sci **125**(Pt 11): 2592-603.
- Ward, C. J., M. C. Hogan, et al. (2002). "The gene mutated in autosomal recessive polycystic kidney disease encodes a large, receptor-like protein." Nat Genet **30**(3): 259-69.
- Ward, C. J., D. Yuan, et al. (2003). "Cellular and subcellular localization of the ARPKD protein; fibrocystin is expressed on primary cilia." Hum Mol Genet **12**(20): 2703-10.
- Watanabe, D., Y. Saijoh, et al. (2003). "The left-right determinant Inversin is a component of node monocilia and other 9+0 cilia." Development **130**(9): 1725-34.
- Weber, U., N. Paricio, et al. (2000). "Jun mediates Frizzled-induced R3/R4 cell fate distinction and planar polarity determination in the *Drosophila* eye." Development **127**(16): 3619-29.
- Williams, C. L., C. Li, et al. "MKS and NPHP modules cooperate to establish basal

- body/transition zone membrane associations and ciliary gate function during ciliogenesis." J Cell Biol **192**(6): 1023-41.
- Williams, C. L., S. V. Masyukova, et al. "Normal ciliogenesis requires synergy between the cystic kidney disease genes MKS-3 and NPHP-4." J Am Soc Nephrol **21**(5): 782-93.
- Williams, C. L., M. E. Winkelbauer, et al. (2008). "Functional redundancy of the B9 proteins and nephrocystins in *Caenorhabditis elegans* ciliogenesis." Mol Biol Cell **19**(5): 2154-68.
- Wingert, R. A. and A. J. Davidson (2008). "The zebrafish pronephros: a model to study nephron segmentation." Kidney Int **73**(10): 1120-7.
- Winkelbauer, M. E., J. C. Schafer, et al. (2005). "The *C. elegans* homologs of nephrocystin-1 and nephrocystin-4 are cilia transition zone proteins involved in chemosensory perception." J Cell Sci **118**(Pt 23): 5575-87.
- Winter, C. G., B. Wang, et al. (2001). "Drosophila Rho-associated kinase (Drok) links Frizzled-mediated planar cell polarity signaling to the actin cytoskeleton." Cell **105**(1): 81-91.
- Wodarczyk, C., G. Distefano, et al. "Nephrocystin-1 forms a complex with polycystin-1 via a polyproline motif/SH3 domain interaction and regulates the apoptotic response in mammals." PLoS One **5**(9): e12719.
- Wright, K. J., L. M. Baye, et al. "An ARL3-UNC119-RP2 GTPase cycle targets myristoylated NPHP3 to the primary cilium." Genes Dev **25**(22): 2347-60.
- Xiong, H., Y. Chen, et al. (2002). "A novel gene encoding a TIG multiple domain protein is a positional candidate for autosomal recessive polycystic kidney disease." Genomics **80**(1): 96-104.
- Yamanaka, H., T. Moriguchi, et al. (2002). "JNK functions in the non-canonical Wnt pathway to regulate convergent extension movements in vertebrates." EMBO Rep **3**(1): 69-75.
- Yang, W., Q. Lin, et al. (2001). "The nonreceptor tyrosine kinase ACK2, a specific target for Cdc42 and a negative regulator of cell growth and focal adhesion complexes." J Biol Chem **276**(47): 43987-93.
- Yasuhiko, Y., F. Imai, et al. (2001). "Calmodulin binds to inv protein: implication for the regulation of inv function." Dev Growth Differ **43**(6): 671-81.
- Yeaman, C., K. K. Grindstaff, et al. (1999). "New perspectives on mechanisms involved in generating epithelial cell polarity." Physiol Rev **79**(1): 73-98.
- Yoder, B. K., X. Hou, et al. (2002). "The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia." J Am Soc Nephrol **13**(10): 2508-16.
- Yokoyama, T., N. G. Copeland, et al. (1993). "Reversal of left-right asymmetry: a situs inversus mutation." Science **260**(5108): 679-82.
- Yoshimura, S., J. Egerer, et al. (2007). "Functional dissection of Rab GTPases involved in primary cilium formation." J Cell Biol **178**(3): 363-9.
- Zhang, F., G. Nakanishi, et al. (2002). "Characterization of Glis2, a novel gene encoding a Gli-related, Kruppel-like transcription factor with transactivation and repressor functions. Roles in kidney development and neurogenesis." J Biol Chem **277**(12): 10139-49.
- Zhang, X., E. Bi, et al. (2001). "Cdc42 interacts with the exocyst and regulates polarized secretion." J Biol Chem **276**(50): 46745-50.
- Zhang, X., J. Zhu, et al. (2007). "Dishevelled promotes axon differentiation by regulating atypical protein kinase C." Nat Cell Biol **9**(7): 743-54.

- Zhao, B., K. Tumaneng, et al. "The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal." Nat Cell Biol **13**(8): 877-83.
- Zhao, C. and J. Malicki "Nephrocystins and MKS proteins interact with IFT particle and facilitate transport of selected ciliary cargos." Embo J **30**(13): 2532-44.
- Zhou, W., J. Dai, et al. "Nephrocystin-3 is required for ciliary function in zebrafish embryos." Am J Physiol Renal Physiol **299**(1): F55-62.
- Zhu, Y., Y. Tian, et al. "Dvl2-dependent activation of Daam1 and RhoA regulates Wnt5a-induced breast cancer cell migration." PLoS One **7**(5): e37823.
- Zuo, X., B. Fogelgren, et al. "The small GTPase Cdc42 is necessary for primary ciliogenesis in renal tubular epithelial cells." J Biol Chem **286**(25): 22469-77.
- Zuo, X., W. Guo, et al. (2009). "The exocyst protein Sec10 is necessary for primary ciliogenesis and cystogenesis in vitro." Mol Biol Cell **20**(10): 2522-9.