

2M11. 3268.5

Université de Montréal

**Caractérisation des mécanismes moléculaires de la polykystose
rénale autosomique dominante**

Par
Caroline Thivierge

Département de biochimie
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du
grade de Maître es Sciences (M.Sc.) en biochimie

Août 2004

© Caroline Thivierge, 2004



W

4

U58

2005

v.058

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Caractérisation des mécanismes moléculaires de la polykystose
rénale autosomique dominante**

présenté par :
Caroline Thivierge

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jacques Michaud
président-rapporteur

Dre Marie Trudel
directrice de recherche

Dr Maxime Bouchard
membre du jury

RÉSUMÉ

La polykystose rénale autosomique dominante (ADPKD) est une maladie héréditaire systémique qui se caractérise principalement par la formation de kystes rénaux. Le gène de PKD1 est muté dans 85 % des cas et encode pour une protéine appelée la polycystine-1 (PC1). Plusieurs études suggèrent que le dosage de la PC1 pourrait être un mécanisme moléculaire de la kystogénèse.

Pour vérifier si la surexpression de Pkd1, sans Tsc2, est suffisante pour causer une kystogénèse rénale, nous avons généré une première souris transgénique, surnommée SBP, à l'aide de l'ADNc de Pkd1 et des éléments régulateurs rénaux spécifiques SB. Toutefois, une seule souris SBP analysée présentait un phénotype rénal.

Afin d'augmenter le niveau d'expression du transgène dans le rein, nous avons utilisé un BAC contenant le gène de Pkd1 pour produire une seconde souris transgénique. Deux événements de recombinaison homologue successifs ont été effectués afin d'insérer les éléments régulateurs SB et une mutation silencieuse (TAG) qui permet de différencier le transgène du gène endogène. Des analyses physiologiques montrent que les souris SBPkd1_{TAG} sont en insuffisance rénale à partir de 2 mois. De plus, les analyses morphologiques montrent que toutes les souris développent une pathologie rénale similaire à ADPKD. Les souris SBPkd1_{TAG} décèdent à partir de 4 mois et montrent pour la première fois que la surexpression de Pkd1 est suffisante pour causer la formation de kystes rénaux.

Dans le but d'étudier également les manifestations cliniques extrarénales observées chez les patients ADPKD, une troisième souris transgénique, surnommée Pkd1_{TAG} Δ Tsc2, a été générée. L'établissement des lignées de souris est en cours et des analyses seront effectuées sous peu.

Mots clés :

ADPKD, PKD1, polycystine-1, souris transgénique, BAC, recombinaison homologue, kystes rénaux

ABSTRACT

Individuals with autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) develop progressive renal cysts that lead to renal insufficiency. Extrarenal manifestations such as liver cysts, brain aneurisms and cardiac valves anomalies are also observed. Various mutations in the PKD1 gene responsible for most cases of ADPKD have been associated with loss, sustained or enhanced expression of polycystine-1 (PC1). Herein, we investigated whether Pkd1 overexpression can without Tsc2 be a pathogenetic mechanism in the mouse.

For the first experimental approach we used the Pkd1 cDNA combined to renal specific regulatory elements (SB) to produce SBP transgenic mice. However, we didn't get enough expression of the transgene to observe a cystic phenotype in these mice.

To increase the expression level of the transgene, we used a murine Pkd1 BAC to produce a second transgenic mice. We have modified this BAC by two successive homologous recombinations. First, the 5' regulatory elements in the Pkd1-BAC were substituted for renal epithelial specific regulatory elements (SB). Second, a silent point mutation (TAG) was introduced to distinguish the transgene from the endogenous gene/transcript. SBPkd1_{TAG} mice displayed severe renal insufficiency at 2-3 months of age and died at 4-5 months of renal failure with severe renal pathologies similar to ADPKD patients. Thus, Pkd1 overexpression in the kidneys induces ADPKD characteristic features in the mouse and thereby, supports overexpression as a pathogenetic mechanism in human ADPKD.

Futhermore, in order to study extrarenal manifestations of the disease, we produced a third transgenic mice, Pkd1_{TAG}ΔTsc2. Physiological and morphological analysis of these mice will be done soon.

Key words: ADPKD, polycystine-1, pathogenetic mechanism, renal cysts, transgenic mice, BAC, homologous recombination

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iv
ABSTRACT.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	xiii
REMERCIEMENTS.....	xvi
INTRODUCTION	1
1.1 NÉPRHOGENÈSE	1
1.1.1 Le développement rénal chez les mammifères	1
1.2 MALADIES HÉRÉDITAIRES CAUSANT LA KYSTOGÉNÈSE RÉNALE	4
1.2.1 La polykystose rénale autosomique récessive	4
1.2.2 Les maladies kystiques de la médulla	6
1.2.3 La sclérose tubéreuse	8
1.2.4 Les dysplasies kystiques du rein	10
1.3 POLYKYSTOSE RÉNALE AUTOSOMIQUE DOMINANTE	11
1.3.1 Définition de la maladie	11
1.3.2 Pathogenèse de la formation des kystes	13
1.3.2.1 Prolifération cellulaire	13
1.3.2.2 Apoptose	14
1.3.2.3 Anomalies de la membrane basale.....	14
1.3.2.4 Polarité épithéliale et sécrétions trans-épithéliales	15
1.4 LA GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE DE ADPKD.....	16
1.4.1 Les loci ADPKD1 et ADPKD2	16
1.4.2 Structure des gènes <i>PKD1</i> et <i>PKD2</i>	17
1.4.3 Mutations <i>PKD1</i> et <i>PKD2</i>	18
1.5 FONCTIONS DES POLYCYSTINES	19
1.5.1 La nouvelle famille des polycystines	19
1.5.2 Structures et interactions protéiques	21
1.5.1.1 Polycystine-1.....	21
1.5.1.2 Polycystine-2.....	26
1.5.3 Localisation cellulaire et sous-cellulaire	29
1.5.4 Transport ionique	31
1.5.5 Signalisation cellulaire	32
1.5.5.1 Voie des <i>Wnts</i>	32
1.5.5.2 Activation des petites protéines G hétérotrimériques	33
1.5.5.3 Régulation du cycle cellulaire.....	34
1.6 ÉTUDES CHEZ LA SOURIS.....	35
1.6.1 Modèles murins de polykystose rénale (PKD)	35
1.6.1.1 Prolifération cellulaire et apoptose	38
1.6.1.2 Rôle des cils dans la pathogenèse ADPKD	39
1.6.2 Orthologues murins de <i>PKD1</i> et <i>PKD2</i>	41
1.6.2.1 Structure des gènes <i>Pkd1</i> et <i>Pkd2</i>	41
1.6.2.2 Analyses d'expression et de localisation cellulaire.....	41

1.7.1	<i>Two-hit</i> et perte de fonction protéique	46
1.7.2	Effet de dosage	49
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....		51
2.1	CONSTRUCTION PLASMIDIQUE.....	51
2.1.1	Enzymes de restriction et de modification.....	51
2.1.2	Production d'un vecteur-T	51
2.1.3	Isolation des fragments d'ADN	52
2.1.4	Réaction de polymérase en chaîne (PCR).....	52
2.1.5	Ligation.....	54
2.1.6	Transformation.....	54
2.1.7	Mini préparation d'ADN plasmidique (lyse alcaline)	55
2.1.8	Maxi préparation d'ADN plasmidique (gradient de CICs)	56
2.2	RECOMBINAISON HOMOLOGUE DANS LES BAC.....	58
2.2.1	Préparation des cellules compétentes pour l'électroporation.....	58
2.2.2	Premier événement de recombinaison	59
2.2.3	Deuxième événement de recombinaison	60
2.2.4	Mini préparation d'ADN de BAC (lyse alcaline).....	60
2.2.5	Maxi préparation d'ADN de BAC (colonnes <i>Quiagen</i>).....	60
2.3	OBTENTION DES LIGNÉES DE SOURIS TRANSGÉNIQUES	62
2.3.1	Préparation des fragments à microinjecter.....	62
2.3.2	Microinjection.....	64
2.3.3	Établissement des lignées transgéniques	65
2.4	ÉTUDE DE LA STRUCTURE DU TRANSGÈNE	66
2.4.1	Extraction d'ADN.....	66
2.4.2	Transfert Southern	67
2.4.3	PCR.....	69
2.5	VÉRIFICATION DE L'EXPRESSION DU TRANSGÈNE	70
2.5.1	Extraction de l'ARN	70
2.5.2	RT-PCR.....	71
2.5.3	Protection à la RNase	75
2.6	PATHOLOGIE	77
2.6.1	Analyse des protéines urinaires par SDS-PAGE	77
2.7.2	Prélèvement des organes	78
2.7.3	Fixation des organes prélevés	78
RÉSULTATS.....		79
3.1	SOURIS TRANSGÉNIQUES SBP.....	79
3.1.1	Production du plasmide <i>SBPkd1β</i>	79
3.1.2	Détection et intégrité du transgène SBP	80
3.1.3	Analyses d'expression du transgène SBP	85
3.1.3.1	Essais de protection à la RNase	85
3.1.3.2	Essais de RT-PCR.....	85
3.1.4	Analyses phénotypiques des souris SBP	87
3.2	SOURIS TRANSGÉNIQUES <i>SBPKD1_{TAG}</i>	90
3.2.1	Modification du BAC <i>Pkd1-Tsc2</i> par recombinaison homologue	91
3.2.1.1	Insertion des éléments régulateurs rénaux spécifiques SB	91
3.2.1.2	Ajout d'une mutation silencieuse (TAG).....	92
3.2.1.3	Analyse complète du BAC modifié et microinjection	93
3.2.2	Détection et intégrité du transgène <i>SBPkd1_{TAG}</i>	98
3.2.3	Analyses d'expression du transgène <i>SBPkd1_{TAG}</i>	102

3.2.4 Analyses physiologiques des souris SBP<i>pkd1</i>_{TAG}	108
3.2.5 Analyses morphologiques des souris SBP<i>pkd1</i>_{TAG}	113
3.3 CROISEMENTS AVEC LES SOURIS <i>PKD1</i> KNOCK-OUT	126
3.3.1 Croisements et génotypage des souris SBP<i>pkd1</i>_{TAG} <i>Pkd1</i>^{-/-}	126
3.3.2 Analyses physiologiques des souris SBP<i>pkd1</i>_{TAG} <i>Pkd1</i>^{-/-}	128
3.4 SOURIS TRANSGÉNIQUES <i>PKD1</i>_{TAG}Δ<i>TSC2</i>	131
3.4.1 Modification du BAC <i>Pkd1</i> : Délétion du gène <i>Tsc2</i> (Δ<i>Tsc2</i>)	131
3.4.2 Détection et intégrité du transgène <i>Pkd1</i>_{TAG}Δ<i>Tsc2</i>	132
DISCUSSION ET CONCLUSION	138
4.1 DISCUSSION	138
4.1.1 Souris transgéniques SBP	139
4.1.1.1 Expression et spécificité du transgène	140
4.1.2 Souris transgéniques SBP<i>pkd1</i>_{TAG}	141
4.1.2.1 Expression du transgène	142
4.1.2.2 Insuffisance rénale chronique	143
4.1.2.3 Kystogénèse rénale	144
4.1.2.4 Oedème pulmonaire et problèmes cardiovasculaires	146
4.1.2.5 Rôle de <i>Pkd1</i> dans l'hématopoïèse?	147
4.1.2.6 La protéine produite avec le transgène SBP <i>pkd1</i> _{TAG} est fonctionnelle..	147
4.1.2.7 Mécanismes moléculaires de kystogénèse rénale	148
4.1.3 Souris transgéniques <i>Pkd1</i>_{TAG}Δ<i>Tsc2</i>	150
4.2 CONCLUSION	151
LISTE DES RÉFÉRENCES	152

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION

Tableau I-I	8
Caractéristiques moléculaires de la polykystose rénale et des maladies kystiques de la médulla	
Tableau I-II	10
Les dysplasies kystiques rénales	
Tableau I-III	20
Membres de la famille des polycystines	
Tableau I-IV	28
Interactions protéiques des polycystines-1 et -2	
Tableau I-V	36
Mutants spontanés et chimiques et mutagenèse insertionnelle	
Tableau I-VI	37
Modèles de souris transgéniques PKD	
Tableau I-VII	38
Modèles murins PKD d'ablation génique	
Tableau I-VIII	44
Résumé des modèles de souris Pkd1 et Pkd2 <i>knock-out</i>	

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Tableau II-I	53
Séquence des amorces utilisées pour l'amplification par PCR (clonage)	
Tableau II-II	53
Description des tampons et des cycles de PCR (clonage)	
Tableau II-III	69
Séquence des amorces utilisées pour le génotypage et la détection de polymorphismes	
Tableau II-IV	70
Description des tampons et des cycles de PCR (génotypage et polymorphismes)	
Tableau II-V	74
Séquence des amorces et taille des amplifications pour les analyses d'expression (RT-PCR)	
Tableau II-VI	74
Description des tampons et des cycles de PCR (RT-PCR)	

RÉSULTATS

Tableau III-I	82
Caractéristiques moléculaires des souris SBP	
Tableau III-II	88
Splénomégalies et tumeurs chez les souris SBP	
Tableau III-III	101
Caractéristiques moléculaires des souris SBPkd1 _{TAG}	
Tableau III-IV	107
Analyses d'expression semi-quantitatives des souris SBPkd1 _{TAG}	
Tableau III-V	109
Analyses urinaires chez les souris SBPkd1 _{TAG}	
Tableau III-VI	111
Analyses de sérum chez les souris SBPkd1 _{TAG}	
Tableau III-VII	112
Analyses des paramètres hématologiques chez les souris SBPkd1 _{TAG}	
Tableau III-VIII	118
Poids des organes par rapport au poids total chez les souris SBPkd1 _{TAG}	
Tableau III-IX	129
Analyses urinaires chez les souris SBPkd1 _{TAG3} ; Pkd1 ^{-/-}	
Tableau III-X	130
Analyses de sérum chez les souris SBPkd1 _{TAG3} ; Pkd1 ^{-/-}	
Tableau III-XI	137
Caractéristiques moléculaires des souris Pkd1 _{TAG} ΔTsc2	

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1.1	3
Le développement rénal chez les mammifères	
Figure 1.2	12
Reins polykystiques	
Figure 1.3	21
La polycystine-1	
Figure 1.4	27
La polycystine-2	
Figure 1.5	35
Voies de signalisation cellulaires impliquant les polycystines-1 et -2	

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Figure 2.1	58
Recombinaison homologue dans les BAC	
Figure 2.2	73
Position relative des amorces sens et antisens sur les différents gènes	

RÉSULTATS

SOURIS TRANSGÉNIQUES SBP

Figure 3.1	82
Détection génomique du transgène SBP	
Figure 3.2	84
Intégrité du transgène SBP	
Figure 3.3	86
Analyse d'expression du transgène SBP par RT-PCR	
Figure 3.4	89
Analyses histologiques de la rate chez les souris SBP	

SOURIS TRANSGÉNIQUES SB*Pkd1*_{TAG}

Figure 3.5	94
Insertion des éléments régulateurs SB	
Figure 3.6	95
Ajout d'une mutation silencieuse (TAG)	
Figure 3.7A et B	96, 97
Analyse détaillée des BAC recombinants SB <i>Pkd1</i> _{TAG} , <i>Pkd1</i> _{TAG} et <i>Pkd1</i> _{TAG} Δ <i>Tsc2</i>	

Figure 3.8	98
Purification du fragment <i>SBPkd1</i> _{TAG} pour la microinjection	
Figure 3.9	99
Détection génomique du transgène <i>SBPkd1</i> _{TAG}	
Figure 3.10	100
Intégrité du transgène <i>SBPkd1</i> _{TAG}	
Figure 3.11	103
Analyse d'expression du transgène <i>SBPkd1</i> _{TAG} par RT-PCR	
Figure 3.12A	105
Démonstration de linéarité du RT-PCR semi-quantitatif	
Figure 3.12B	106
Analyse d'expression du transgène <i>SBPkd1</i> _{TAG} par RT-PCR	
Figure 3.13	110
Analyse qualitative des protéines urinaires chez les souris <i>SBPkd1</i> _{TAG}	
Figure 3.14	114
Laparotomie des reins chez les souris <i>SBPkd1</i> _{TAG}	
Figure 3.15	115
Laparotomie du coeur et des poumons chez les souris <i>SBPkd1</i> _{TAG}	
Figure 3.16	116
Splénomégalie et kystes sur la rate chez les souris <i>SBPkd1</i> _{TAG}	
Figure 3.17	119
Régression de la papille chez les souris <i>SBPkd1</i> _{TAG}	
Figure 3.18A et B	122, 123
Analyses histologiques des reins chez les souris <i>SBPkd1</i> _{TAG} adultes	
Figure 3.19	124
Analyses histologiques des reins chez les souris <i>SBPkd1</i> _{TAG} (20 et 45 jours)	
Figure 3.20	125
Analyses histologiques des poumons chez les souris <i>SBPkd1</i> _{TAG}	
Figure 3.21	127
Génotypage des souris <i>SBPkd1</i> _{TAG3} ; <i>Pkd1</i> ^{-/-}	
SOURIS TRANSGÉNIQUES <i>PKD1</i>_{TAG}Δ<i>Tsc2</i>	
Figure 3.22	132
Purification du fragment <i>Pkd1</i> _{TAG} Δ <i>Tsc2</i> pour la microinjection	
Figure 3.23	134
Détection génomique du transgène <i>Pkd1</i> _{TAG} Δ <i>Tsc2</i>	
Figure 3.24A	135
Intégrité du transgène <i>Pkd1</i> _{TAG} Δ <i>Tsc2</i> (extrémité 5')	
Figure 3.24B	136
Intégrité du transgène <i>Pkd1</i> _{TAG} Δ <i>Tsc2</i> (extrémité 3')	

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

A : adénosine
aa : acide aminé
ADNc : acide déoxyribonucléique complémentaire
ADPKD : polykystose rénale autosomique dominante
Amp : ampicilline
ARPKD : polykystose rénale autosomique récessive
ARNm : acide ribonucléique messenger
ARNt : acide ribonucléique de transfert
ATP : adénosine triphosphate
BAC : chromosomes artificiels de bactéries
Bq : Becquerel
BrEt : bromure d'éthidium
BSA : albumine de sérum bovin
BUN : déchets azotés sanguins (urée)
C : cystosine
Chlr : chloramphénicol
ClCs : chlorure de césium
Da : dalton
DEPC: diéthylpolycarbonate
DMSO : diméthylsulfoxyde
dNTP : déoxyribonucléique triphosphate (N : A, C, G ou T)
DTT : dithiothréitol
EDTA : éthylènediamine tétra-acide acétique
EPO : érythropoïétine
G : guanine
GPCR : récepteurs couplés aux protéines G
GPS : site de clivage protéolytique d'un GPCR
GSJG : Gonadotropine sérique de juments gravides
GuHCl: guanidium de chlorure d'hydrogène
GuSCN: guanidium thiocyanate

HCG: chorionique gonadotrophine humaine
HCT : hématocrite
HGB : concentration en hémoglobine
IFT: transport intraflagellaire
kb : kilobases
KOAc : acétate de potassium
LB : milieu de Luria-Bertani
LDL : lipoprotéine de basse densité
LNB-TM7 : sous-famille de récepteurs couplés aux protéines G
LOH : perte d'hétérozygotie
LRR : répétitions riches en leucines
LMP : agarose mou
MCHC : concentration globulaire moyenne en hémoglobine
MCV : volume globulaire moyen
MDCK : maladies kystiques de la médulla
M-MLV: virus Moloney murin leucémique
MOPS : (3-(N-morpholino) acide propanosulfonique)
MUPs: protéines urinaires majeures
 Na_2HPO_4 : hydrogène-orthophosphate disodium
 NaH_2PO_4 : dihydrogène-orthophosphate de sodium
NaOAc : acétate de sodium
 NH_4OAc : acétate d'ammonium
NPH: néphronophthisie
PAGE : gel d'électrophorèse de polyacrylamide
pb : paires de bases
PBS : tampon phosphate salin
PCR : réaction de polymérisation en chaîne
PFGE : gel d'électrophorèse à champs pulsés
Pipes : piperazine-N,N'-bis (2-acide éthanosulfonique)
PLAT : polycystine-1, lipo-oxygénase, alpha toxine
PolyA : site de polyadénylation

Pr : promoteur
RBC : globule rouge
RDW : indice d'anisocytose
REJ : *receptor for egg jelly*
Rétic : réticulocyte
RNase: ribonucléase
RNasin : inhibiteur de ribonucléase
rpm : révolution par minute
RT: transcription inverse
SB: *enhancer* SV40 et promoteur β -globine
SDS : sodium dodécyl sulfate
T : thymine
Taq : *Thermus aquaticus*
TBE : tris, acide borique, EDTA
TCA : acide trichloroacétique
TRPC : canaux récepteurs à potentiel transitoire
UTR : région non-traduite
UV : ultraviolet
WS25 : allèle instable du gène Pkd2
YAC : chromosomes artificiels de levures

REMERCIEMENTS

Je remercie ma directrice de maîtrise, le Dre Marie Trudel, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et d'avoir dirigé ce travail de recherche. Je la remercie également de l'aide qu'elle m'a apporté tout au long de ma maîtrise.

Je remercie tous les membres du laboratoire avec qui j'ai travaillé pour leur soutien moral et technique. De ce groupe, je désire remercier spécialement les autres PKD, Martin et Almira pour leur contribution à l'avancement du projet.

Je remercie également Mylène à l'animalerie pour avoir porté une attention toute spéciale à mes souris.

Finalement, je remercie ma famille et plus particulièrement mes parents qui m'ont toujours encouragé dans mes études et Ghislain qui m'a aidé à passer à travers les moments plus difficiles.

Chapitre 1

INTRODUCTION

1.1 NÉPRHOGENÈSE

1.1.1 Le développement rénal chez les mammifères

Chez les mammifères et les oiseaux, le rein se développe en trois étapes : le pronéphros, le mésonéphros et le métanéphros. Le pronéphros et le mésonéphros sont des structures transitoires et seul le métanéphros va se différencier pour former un rein fonctionnel et permanent.

L'organogénèse rénale commence très tôt au cours du développement embryonnaire, soit au 22^{ème} jour de gestation chez l'humain ou E8 chez la souris. La première structure transitoire, le pronéphros, est formée à partir du canal et des tubules pronéphriques qui émergent du mésoderme intermédiaire. Ces tubules sont fonctionnels chez les poissons et les larves d'amphibiens, mais dégénèrent chez les mammifères. Seule la partie caudale du canal pronéphrique, appelée le canal de Wolff, persiste et forme une partie du système excréteur (Kuure et al., 2000).

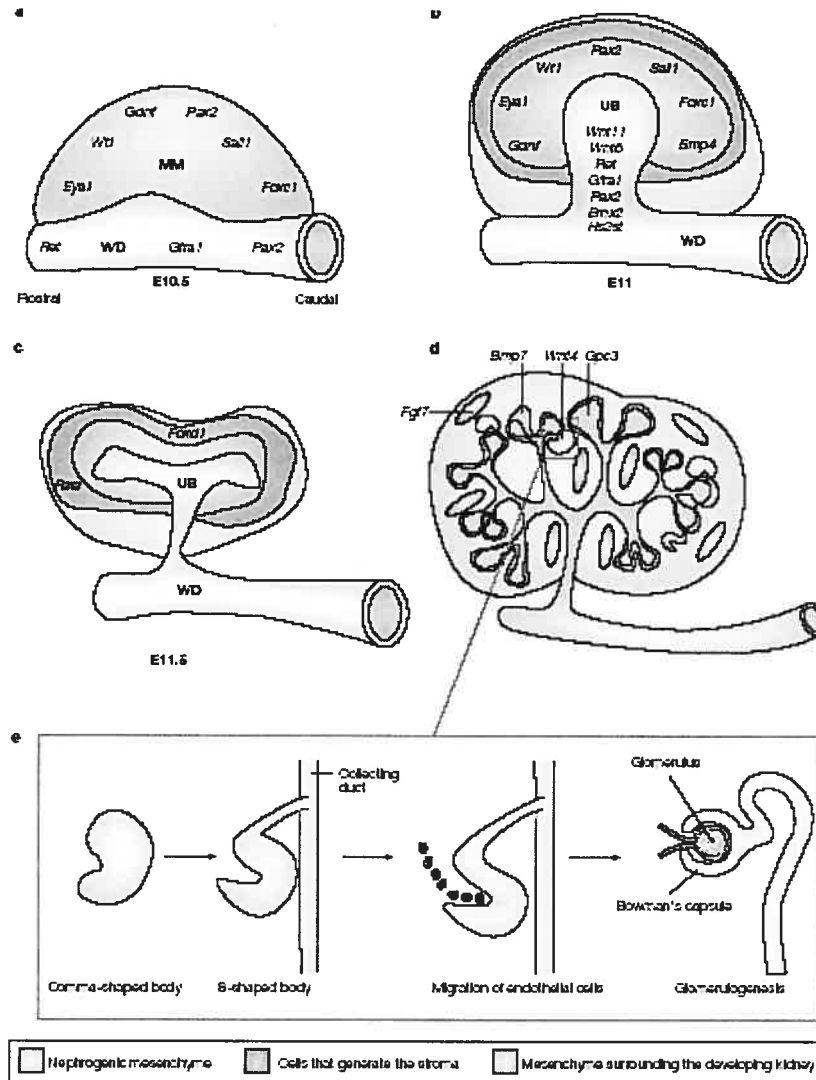
Au moment où les tubules pronéphriques dégénèrent, le canal de Wolff initie la formation de nouveaux tubules rénaux dans le mésenchyme adjacent pour former le mésonéphros. Les mésonéphros sont similaires aux métanéphros et sont constitués de tubules proximaux et distaux et d'une capsule glomérulaire. Ces structures sont fonctionnelles chez l'humain, mais chez la souris elles sont beaucoup plus primitives et forment un organe non-sécrétoire. Les tubules

mésonephriques dégénèrent complètement chez la femelle, alors que chez le mâle, le canal de Wolff et quelques tubules mésonephriques persistent pour devenir les canaux vas déferents et efférents des testicules (Kuure et al., 2000).

Le rein mammifère adulte, le métanéphros, se développe à partir d'interactions réciproques entre le bourgeon urétéral et le mésenchyme métanéphrique au 35^{ème} jour de gestation chez l'humain ou E10.5-E11 chez la souris. Le développement du métanéphros commence lorsque le canal de Wolff génère le bourgeon urétéral et que ce dernier envahit le blastème métanéphrogène. Cela permet au bourgeon urétéral d'induire les cellules mésenchymateuses qui l'entourent à se condenser en agrégats pré-tubulaires, alors que le mésenchyme induit le bourgeon urétéral à développer de nouveaux branchements. Les agrégats pré-tubulaires subissent une transition tissulaire mésenchyme-épithélium afin de former des tubules épithéliaux et les branches du bourgeon urétéral formeront éventuellement le système collecteur rénal. La condensation des cellules mésenchymateuses en agrégats pré-tubulaires commence par la formation d'un corps en virgule, puis en S. Le corps en S s'invagine et se fusionnent aux branches du bourgeon urétéral pour permettre aux parties proximales et distales des tubules de se différencier. Par la suite, des cellules endothéliales vont migrer vers l'invagination du corps en S pour former le glomérule (figure 1.1). Ensemble, les tubules et le glomérule forment le néphron, l'unité fonctionnelle du rein adulte chez les mammifères. Pendant la néphrogénèse, plus d'un million de néphrons seront produits chez l'humain, alors que chez la souris il y en aura environ quinze mille (Kuure et al., 2000; Vainio and Lin, 2002) (Gilbert, 2000).

FIGURE 1.1 :

Le développement rénal chez les mammifères.



MM : mésenchyme métanéphrique; WD : canal de Wolff; UB : bourgeon urétéral

LÉGENDE :

a- Le développement du rein chez la souris commence lorsque le bourgeon urétéral se forme à l'extrémité caudale du canal de Wolff (E 10.5). b- Le bourgeon urétéral envahit le mésenchyme métanéphrique et induit le mésenchyme adjacent à se condenser pour former la zone stromale mésenchymateuse (E 11). c- Le mésenchyme condensé induit le bourgeon urétéral à former des branchements (E 11.5). d et e- Parallèlement au branchement, le bourgeon urétéral induit la condensation des cellules mésenchymateuses en agrégats pré-tubulaires (formation des corps en virgule et en S).

Référence : (Vainio and Lin, 2002)

1.2 MALADIES HÉRÉDITAIRES CAUSANT LA KYSTOGÉNÈSE RÉNALE

Plusieurs maladies héréditaires peuvent perturber le développement et le maintien de l'architecture rénale et ainsi provoquer la formation de kystes aux reins. La polykystose rénale est une des principales causes de kystogénèse et elle peut se transmettre de manière autosomique récessive ou autosomique dominante. La polykystose rénale autosomique récessive (ARPKD) est beaucoup plus rare et elle se différencie de la forme dominante par une fibrose hépatique congénitale. La forme récessive est également plus sévère et elle se manifeste généralement chez les nourrissons et les enfants tandis que la forme dominante est observée principalement chez l'adulte.

Des kystes aux reins peuvent également être observés en association avec d'autres maladies génétiques telles que les maladies kystiques de la médulla, la sclérose tubéreuse et les dysplasies kystiques du rein. La polykystose rénale autosomique dominante (ADPKD) fera l'objet de ce mémoire et sera présentée en détail à partir de la section 1.3. L'ARPKD et les autres maladies génétiques pouvant causer une kystogénèse rénale sont brièvement décrites ci-dessous.

1.2.1 La polykystose rénale autosomique récessive

La polykystose rénale autosomique récessive (ARPKD) est une des néphropathies les plus importantes chez les enfants avec une fréquence d'une naissance sur vingt mille (Zerres et al., 1998). Cette maladie héréditaire se caractérise principalement par une augmentation importante du volume des reins, la formation de kystes rénaux au niveau du tube collecteur et une fibrose

hépatique congénitale. Des nouveau-nés atteints, jusqu'à 50 % souffriront de détresse respiratoire due à une hypoplasie pulmonaire et mourront peu de temps après la naissance. Quant aux autres patients, la majorité d'entre eux souffriront d'insuffisance rénale au cours des dix premières années de leur vie. De plus, d'autres complications s'ajouteront, essentiellement dues à la fibrose hépatique et à l'hypertension (Roy et al., 1997).

Malgré la variabilité phénotypique observée chez les patients, un seul locus est impliqué dans la pathogenèse ARPKD. Le gène *PKHD1* a été cloné récemment par deux groupes indépendants et est localisé dans la région chromosomique 6p21.1-p12 (Onuchic et al., 2002; Ward et al., 2002). La séquence génomique de ce gène s'étend sur plus de 470 kb et contient au moins 86 exons. Le plus grand cadre de lecture potentiel comprend 67 exons et produit plusieurs transcrits dont la taille varie entre 8.5 kb et 13 kb. Les analyses d'expression ont montré que *PKHD1* est exprimé fortement au niveau du rein fœtal et adulte et faiblement au niveau du foie et du pancréas, ce qui corrèle avec le phénotype de la maladie (Onuchic et al., 2002; Ward et al., 2002).

Le gène *PKHD1* encode une protéine de 4074 aa appelée fibrocystine ou polyductine. Cette protéine membranaire de 447 kDa contient un grand domaine extracellulaire (3858 aa), un segment transmembranaire et un court domaine intracellulaire (192 aa). Quelques motifs protéiques connus ont été identifiés par homologie de séquence dont des domaines TIG/IPT, des répétitions PbH1 et un domaine RGD. Dans la partie carboxy-terminale, des sites potentiels de phosphorylation par les protéines kinases A et C (PKA et PKC) ont également été

identifiés (Onuchic et al., 2002; Ward et al., 2002). La fonction de cette protéine est inconnue, mais un rôle au niveau de la différenciation terminale du tubule collecteur a été proposé.

Plus d'une soixantaine de mutations ont été identifiées jusqu'à maintenant et la plupart sont uniques et réparties sur toute la longueur du gène. Des études préliminaires montrent une certaine corrélation entre le type de mutation et la sévérité du phénotype. En effet, plus de la moitié des mutations détectées chez les enfants sévèrement affectés produisent une protéine tronquée et il semble que les individus qui sont homozygotes pour ce type de mutations décèdent au cours de la période périnatale (Bergmann et al., 2003).

1.2.2 Les maladies kystiques de la médulla

La néphronophthisie (NPH) et les maladies kystiques de la médulla adultes (MCDK) sont deux néphropathies héréditaires qui ont été regroupées en un seul syndrome appelé JN-MCD (*juvenile nephronophthisis-medullary cystic disease*). Contrairement à la polykystose rénale, la taille des reins demeure inchangée et les kystes sont localisés exclusivement à la jonction corticomédullaire. Au niveau histologique, on observe une désintégration de la membrane basale tubulaire, une atrophie tubulaire, des kystes médullaires, des infiltrats et de la fibrose interstitielle. Ces deux maladies se distinguent principalement par leur mode de transmission héréditaire et l'âge à laquelle les patients souffrent d'insuffisance rénale chronique. NPH se transmet de manière

autosomique récessive et affecte principalement les enfants et les adolescents tandis que MCKD est autosomique dominante et se manifeste beaucoup plus tardivement (Hildebrandt and Otto, 2000).

Les gènes de la néphronophthisie (*NPHP1-4*) ont été clonés récemment et, selon le gène qui est muté, elle est classée infantile, juvénile ou adolescente. Les gènes *NPHP1*, *3* et *4* encodent respectivement pour les néphrocystines-1, -3 et -4 alors que *NPHP2* ou *INVS* encode pour l'inversine (Hildebrandt et al., 1997a; Mollet et al., 2002; Olbrich et al., 2003; Otto et al., 2002; Otto et al., 2003). La fonction exacte de ces protéines n'a pas encore été élucidée, mais les études préliminaires d'interaction et de localisation de la néphrocystine-1 suggèrent un rôle au niveau des complexes d'adhésion. En effet, cette protéine interagit avec des protéines d'adhésion focales (p130^{cas} et Pyk2), des protéines de liaison à l'actine (tensine, filamine A et B), l'inversine et les néphrocystines-3 et -4 (Benzing et al., 2001; Donaldson et al., 2000; Donaldson et al., 2002; Mollet et al., 2002; Olbrich et al., 2003; Otto et al., 2003).

Dans le cas des maladies kystiques de la médulla, deux locus (*MCKD1* et *MCKD2*) ont été identifiés sur les chromosomes 1 et 16, mais les gènes n'ont pas encore été clonés (Christodoulou et al., 1998; Scolari et al., 1999).

Les caractéristiques moléculaires de la polykystose rénale et des maladies kystiques de la médulla sont présentées au tableau I-I.

TABLEAU I-I

Caractéristiques moléculaires de la polykystose rénale et des maladies kystiques de la médulla.

Type	Localisation Chr.	Gène	Protéine	Insuffisance rénale	Associations extrarénales	Réf.
Polykystose rénale (ARPKD) : autosomique récessive						
Infantile	6p21.1-p12	<i>PKHD1</i>	Fibrocystine	<10 ans	Fibrose hépatique	1,2,3
Polykystose rénale (ADPKD) : autosomique dominante						
Adulte	16p13.3	<i>PKD1</i>	Polycystine-1	53 ans	Kystes extrarénaux, anévrismes cérébraux, valves cardiaques	4,5,6
Adulte	4q21-q23	<i>PKD2</i>	Polycystine-2	69 ans		6,7
Néphronophthisie (NPH) : autosomique récessive						
Juvenile	2q12-q13	<i>NPHP1</i>	Néphrocystine-1	13 ans	Cervelet, foie, os	8,9
Infantile	9q22-q31	<i>NPHP2</i>	Inversine	1-3 ans	Non	10,11
Adolescente	3q21-q22	<i>NPHP3</i>	Néphrocystine-3	19 ans	Non	12,13
Juvenile	1p36	<i>NPHP4</i>	Néphrocystine-4	13 ans	non	14,15
Maladies kystiques de la médulla (MCKD) : autosomique dominante						
Adulte	1q21	<i>MCKD1</i>	Non-identifiée	62 ans	Hyperuricémie, goutte	16
Adulte	16p12	<i>MCKD2</i>	Non-identifiée	32 ans		17

LÉGENDE :

Chr.- chromosomique; Réf.- références

Références :

1- (Ward et al., 2002); 2- (Onuchic et al., 2002); 3- (Roy et al., 1997); 4- (1994); 5- (1995); 6- (Hateboer et al., 1999a); 7- (Mochizuki et al., 1996); 8- (Hildebrandt et al., 1997a); 9- (Hildebrandt et al., 1997b); 10- (Otto et al., 2003); 11- (Haider et al., 1998); 12- (Olbrich et al., 2003); 13- (Omran et al., 2000); 14- (Mollet et al., 2002); 15- (Otto et al., 2002) 16- (Christodoulou et al., 1998); 17- (Scolari et al., 1999)

1.2.3 La sclérose tubéreuse

La sclérose tubéreuse est une maladie héréditaire autosomique dominante qui affecte un individu sur six mille. Elle se caractérise principalement par la formation de tumeurs bénignes ou hamartomes dans plusieurs tissus et organes.

Certaines complications rénales telles que l'hypertension et l'insuffisance rénale peuvent survenir suite au développement de kystes et d'hamartomes rénaux. Au niveau génétique, deux locus ont été identifiés soit *TSC1* et *TSC2*. Ces deux gènes encodent respectivement pour les protéines hamartine et tubérine. Le gène de *TSC2* est localisé sur le chromosome 16 en orientation queue à queue avec le gène de *PKD1*. Étant donné que les kystes rénaux ont été observés seulement chez 30 % des patients *TSC2* et aucun patient *TSC1*, plusieurs études ont essayé de déterminer le rôle de *PKD1* dans la kystogénèse rénale de ces patients. Ces dernières ont montré que chez la majorité des patients, le gène de *PKD1* n'est pas muté et le phénotype est relativement modéré (Stillwell et al., 1987). Toutefois, chez une minorité de patients (~2 %), un phénotype sévère de polykystose rénale est observé à la naissance ou peu de temps après. Cette forme sévère de la maladie diffère de l'ADPKD typique et est appelée syndrome contigu *PKD1-TSC2*. Dans la majorité des cas, une délétion génomique couvrant les gènes de *PKD1* et *TSC2* a été détectée alors que 10 % des patients ont différents types de mutations au locus *PKD1-TSC2* (Brook-Carter et al., 1994; Longa et al., 1997; Sampson et al., 1997). Le phénotype observé chez ces patients suggère un rôle synergique entre les gènes de *PKD1* et *TSC2* dans le développement des kystes rénaux. Il est probable que la perte de fonction de *TSC2* contribue à la progression rapide du phénotype rénal puisque ce dernier est un gène suppresseur de tumeur. Ainsi, il semble qu'une mutation dans le gène de *TSC2* est suffisante pour causer la formation de kystes rénaux, mais dans les cas où un phénotype sévère est observé le gène de *PKD1* est également en cause.

1.2.4 Les dysplasies kystiques du rein

Les dysplasies kystiques du rein regroupent plusieurs syndromes où le développement rénal est perturbé et empêche la différenciation terminale des néphrons et des tubules collecteurs. Ces dysplasies représentent près de 40 % des causes d'insuffisance rénale chez les enfants et se caractérisent principalement par de l'hypoplasie rénale ou, dans certains cas, de l'aplasie rénale, des kystes rénaux et des anomalies urétérales. Les principaux syndromes où des kystes rénaux ont été observés sont présentés dans le tableau I-II.

TABLEAU I-II

Les dysplasies kystiques rénales.

Syndrome	Gène	Fonction	Manifestations cliniques rénales
Beckwith-Wiedemann	<i>P57KIP2</i>	Cycle cellulaire	Kystes et dysplasie
Acidurie glutarique type II	Déhydrogénase glutaryl-CoA		Kystes et dysplasie
Meckel	Gènes inconnus: loci 11q et 17q		Kystes et dysplasie
Oro-facio-digital type I	<i>OFD1</i>	Protéine du centrosome	Kystes glomérulaires
Kystes rénaux et diabète	<i>HNF1β</i>	Facteur de transcription	Kystes, hypoplasie et dysplasie
Simpson-Golabi-Behmel	<i>GPC3</i>	Protéoglycane	Kystes et dysplasie
Smith-Lemli-Opitz	Réductase δ (7)-déhydrocholestérol		Kystes et dysplasie
von Hippel Lindau	<i>VHL</i>	Suppresseur de tumeurs	Kystes et tumeurs
Zellweger	<i>PEX</i>	Peroxisome	Kystes et dysplasie

LÉGENDE :

Référence : (Woolf et al., 2004)

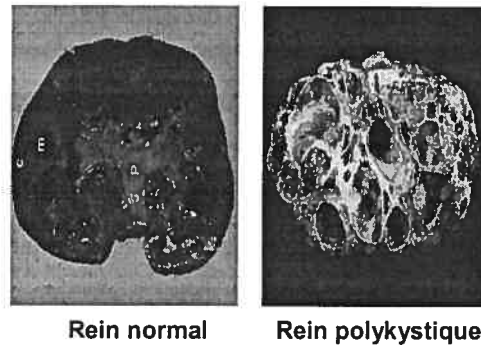
1.3 POLYKYSTOSE RÉNALE AUTOSOMIQUE DOMINANTE

1.3.1 Définition de la maladie

La polykystose rénale autosomique dominante (ADPKD), est une des maladies génétiques les plus fréquentes avec une prévalence d'environ une naissance sur mille. Elle affecte les individus de toutes les races et, au total, environ cinq millions d'hommes et de femmes en sont atteints à travers le monde.

L'ADPKD est une maladie systémique qui se caractérise principalement par la présence de kystes rénaux bilatéraux et représente 10 % des cas de dialyse et de transplantation rénale. Les kystes peuvent être issus de toutes les parties des tubules rénaux et de la capsule glomérulaire, mais seulement 1-2 % des deux millions de néphrons sont affectés (Grantham et al., 1987). Les reins polykystiques sont hypertrophiés et peuvent contenir plusieurs centaines de kystes ayant jusqu'à 20 cm de diamètre (figure 1.2). Dans certains cas, des dilatations glomérulaires et tubulaires ont été observées *in utero*, mais les kystes sont généralement détectés par ultrasonographie à partir de l'enfance ou de l'adolescence (Michaud et al., 1994; Zerres et al., 1993). Les kystes envahissent progressivement le parenchyme environnant et causent une diminution des fonctions rénales. Dans la majorité des cas, les patients souffriront d'insuffisance rénale autour de la soixantaine. Toutefois, une grande variabilité phénotypique a été observée et certaines personnes auront besoin d'être traitées dès l'enfance alors que d'autres demeureront asymptomatiques toute leur vie.

FIGURE 1.2 :
Reins polykystiques



Des kystes ont été observés au niveau de plusieurs organes tels que le foie, le pancréas, les ovaires et la rate. Les kystes hépatiques sont les plus fréquents et leur prévalence augmente avec l'âge. Ils sont observés chez 75% des patients âgés de plus de 60 ans, mais dans la plupart des cas, ils sont asymptomatiques (Milutinovic et al., 1980). Des anomalies au niveau des valves cardiaques ainsi que des anévrismes cérébraux ont également été rapportés (Hossack et al., 1988). La diminution des fonctions rénales engendre généralement des complications médicales telles que des douleurs chroniques et aiguës au dos et à l'abdomen, de l'hypertension, de l'hématurie et de la protéinurie (Gabow, 1993).

Aucun traitement n'existe présentement pour prévenir ou soigner l'ADPKD. Les patients reçoivent la dialyse à long terme et/ou une transplantation rénale et une thérapie palliative.

1.3.2 Pathogenèse de la formation des kystes

Plusieurs études effectuées sur des patients ADPKD suggèrent que les principaux mécanismes pathophysiologiques de la kystogénèse impliquent une dérégulation des mécanismes de prolifération cellulaire et d'apoptose, des anomalies structurales et biochimiques de la membrane basale, une polarité cellulaire anormale et des sécrétions trans-épithéliales de liquides.

1.3.2.1 Prolifération cellulaire

Chez les patients ADPKD, l'index de prolifération cellulaire est augmenté jusqu'à cent fois au niveau des tubules kystiques et plus de dix fois dans les tubules non-kystiques. Ces analyses suggèrent que l'hyperplasie cellulaire précède la formation des kystes et est donc une cause primaire de la kystogénèse (Lanoix et al., 1996; Nadasdy et al., 1995).

Plusieurs proto-oncogènes tels que *C-MYC* et *C-ErbB2* sont surexprimés au niveau des tissus ADPKD (Herrera, 1991; Lanoix et al., 1996). Les facteurs de croissances de l'épiderme et de la transformation (*EGF* et *TGF- α*) ainsi que leur récepteur (*EGFR*) semblent également jouer un rôle important dans la kystogénèse. En effet, une surexpression de *TGF- α* et du récepteur *EGFR* a été observée dans l'épithélium kystique des patients ADPKD et le récepteur *EGFR* est mal localisé au niveau du tube collecteur. Ce dernier est normalement localisé à la membrane basolatérale, mais dans le cas de la polykystose rénale il se situe du côté apical (Lee et al., 1998).

1.3.2.2 Apoptose

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est élevée pendant le développement rénal et pratiquement inexistante au niveau du rein adulte normal. Toutefois, certaines conditions pathologiques peuvent entraîner une augmentation de morts cellulaires. C'est le cas de la polykystose rénale où des niveaux anormalement élevés d'apoptose ont été observés chez les patients ADPKD. Des cellules apoptotiques ont été détectées dans les tubules kystiques et non-kystiques au stade précoce de la maladie. Ce qui suggère que l'apoptose pourrait contribuer au développement des kystes (Lanoix et al., 1996; Woo, 1995).

Des niveaux d'expression élevés de *C-MYC* et de *BCL-2* ont également été observés chez les patients ADPKD (Lanoix et al., 1996). Plusieurs études ont montré qu'en plus de jouer un rôle au niveau de la prolifération cellulaire, *C-MYC* peut induire l'apoptose (Evan et al., 1992) et *BCL-2* est un régulateur négatif de la voie apoptotique.

1.3.2.3 Anomalies de la membrane basale

Plusieurs anomalies structurales et biochimiques de la membrane basale et de la matrice extracellulaire ont été observées. Parmi les différentes anomalies, on note, un épaissement de la membrane basale (Cuppige et al., 1980; Wilson et al., 1992) et une synthèse altérée de plusieurs composantes de la matrice extracellulaire telles que la laminine, la fibronectine, le collagène de type IV et les protéoglycanes (Carone et al., 1988; Liu et al., 1992).

Le maintien de la matrice extracellulaire nécessite un équilibre entre la synthèse et la dégradation de ces composantes et plusieurs protéases sont impliquées dans ce processus dont les métalloprotéinases de la matrice (MMP) et les cathepsines. Ces deux groupes de protéases peuvent dégrader les composantes de la membrane basale et de la matrice extracellulaire *in vitro* et sont exprimées au niveau du rein. Plusieurs études ont confirmé que le niveau d'activité de MMP-2 et des cathepsines B, L et H est altéré dans les reins et le liquide kystique des patients ADPKD (Hartz and Wilson, 1997; Norman et al., 1995).

1.3.2.4 Polarité épithéliale et sécrétions trans-épithéliales

La polarité épithéliale est essentielle pour le maintien de l'intégrité et le fonctionnement de plusieurs organes. Au niveau du rein, elle permet la réabsorption et la sécrétion vectorielle le long du néphron par l'insertion polarisée de canaux et de transporteurs d'ions à la membrane apicale ou basolatérale. Au stade fœtal, la pompe à sodium et le récepteur EGFR sont localisés du côté apical de la membrane tandis qu'au stade adulte ils sont situés exclusivement du côté basolatéral (Burrow et al., 1999).

Dans le cas de la polykystose rénale, la polarité de quelques protéines membranaires est altérée dont la pompe à sodium Na^+, K^+ -ATPase, le récepteur de facteurs de croissance EGFR, le transporteur $\text{Na}^+ \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$, l'ankyrine, la fodrine et E-cadhérine. Toutefois, cela ne semble pas être un défaut général puisque la polarité de la majorité des protéines étudiées est normale (Wilson, 1997). La localisation apicale de la pompe à sodium Na^+, K^+ -ATPase et du récepteur EGFR

chez les patients ADPKD suggère une persistance du programme fœtal. De plus, des analyses ont montré que la pompe à sodium Na^+, K^+ -ATPase du côté apical est fonctionnelle et cause une sécrétion de liquide dans le lumen des kystes ce qui pourrait contribuer à leur expansion (Wilson et al., 1991).

La plupart de ces études montrent que les anomalies observées au niveau de la membrane basale, de la polarité épithéliale et des sécrétions trans-épithéliales surviennent généralement après la formation des kystes. Ce qui suggère que ces mécanismes pathophysiologiques ne sont pas nécessairement à l'origine de la kystogénèse, mais contribuent au développement et à la croissance des kystes dans la pathogenèse ADPKD.

1.4 LA GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE DE ADPKD

1.4.1 Les loci ADPKD1 et ADPKD2

Deux loci sont impliqués dans la pathogenèse ADPKD soit *PKD1* et *PKD2* qui sont localisés respectivement sur les chromosomes 16p13.3 et 4q21-23. Le gène de *PKD1* est muté chez plus de 85 % des patients ADPKD tandis que *PKD2* est responsable de l'autre 15 % des cas. Indépendamment du gène qui est muté, un phénotype similaire est observé, mais dans le cas de *PKD2*, la pathologie survient plus tardivement et les complications sont moins fréquentes. L'espérance de vie sans dialyse ou transplantation est de 53 ans pour les patients ADPKD1 alors que chez les patients ADPKD2 elle est de 69 ans (Hateboer et al., 1999a).

Le gène de *PKD1* a été cloné grâce à l'identification d'une translocation chromosomique entre les chromosomes 16 et 22 chez une famille portugaise. La

présence de mutations dans le gène *PBP* (*Polycystic Break Point*) chez d'autres patients ADPKD a confirmé qu'il s'agissait du gène recherché et *PBP* a été rebaptisé *PKD1* (1994). Le gène candidat pour le deuxième locus a été découvert par clonage positionnel et la ségrégation de mutations non sens chez trois familles ADPKD2 a confirmé l'identité de *PKD2* (Mochizuki et al., 1996).

1.4.2 Structure des gènes *PKD1* et *PKD2*

Le gène de *PKD1* comprend 46 exons qui sont répartis sur 54 kb et produit un transcrite de 14 kb (1995; Hughes et al., 1995). Une des particularités de ce gène est que les exons 1 à 33 sont dupliqués au moins six fois dans la région proximale 16p13.1. Ces gènes homologues à *PKD1* ont une homologie de plus de 95 % avec *PKD1*. Des études effectuées avec des cellules de glioblastomes T98G ont montré que les gènes homologues sont transcrits, mais qu'ils ne sont pas traduits. La présence d'un codon de terminaison de la traduction dans l'exon 8 de la plupart de ces gènes suggère que même s'ils étaient traduits, il y aurait probablement une terminaison précoce de la traduction (Bogdanova et al., 2001). Le gène de *PKD1* contient également des séries de polypurines-polypyrimidines de 2.5 et 0.5 kb dans les introns 21 et 22. Ces structures sont capables de former des triplex intramoléculaires qui peuvent prédisposer le gène à la mutagenèse (Blaszak et al., 1999).

PKD2 est un gène de 68 kb qui contient 15 exons et produit un transcrite de 5 kb (Hayashi et al., 1997).

1.4.3 Mutations *PKD1* et *PKD2*

Suite au clonage des gènes de *PKD1* et *PKD2* dans les années quatre-vingt-dix, plusieurs analyses ont été effectuées chez les patients ADPKD afin de détecter des mutations. Jusqu'à maintenant, plus de deux cent mutations ont été identifiées au niveau du gène de *PKD1* et cinquante dans le cas de *PKD2*. Ces mutations comprennent des décalages du cadre de lecture, des non-sens, des faux sens et des délétions. Dans le cas de *PKD1*, les premières mutations identifiées étaient localisées principalement dans la région non dupliquée (partie 3'). Par la suite, des nouvelles techniques d'analyses ont été mises au point pour faciliter la détection des mutations dans la partie 5' et des mutations réparties sur toute la longueur du gène ont été identifiées (Rossetti et al., 2001; Rossetti et al., 2002b).

Une grande variabilité phénotypique inter- et intra-familiale a été observée chez les patients ADPKD1, mais il ne semble pas y avoir de corrélation entre le type de mutations et la sévérité du phénotype (Hateboer et al., 1999b; Milutinovic et al., 1992; Rossetti et al., 2002a). Des analyses statistiques ont montré qu'en général les mutations à l'extrémité 5' du gène causent un phénotype plus sévère que celles à l'extrémité 3', mais il y a des exceptions et cela ne permet pas d'expliquer la variabilité observée à l'intérieur d'une même famille (Rossetti et al., 2002a). Un des exemples qui illustre bien cette variabilité est le cas des jumeaux dizygotes où la même mutation non sens dans la région 3' du gène de *PKD1* produit deux phénotypes totalement différents. Les reins d'un des jumeaux ont été diagnostiqués polykystiques *in utero* à trente et une semaines de gestation alors que ceux de l'autre jumeau étaient normaux à l'âge de cinq ans. Un des

jumeaux est atteint de ADPKD infantile tandis que l'autre commencera probablement à être malade autour de la cinquantaine (Peral et al., 1996). Cela suggère qu'en plus des mutations dans les gènes de *PKD1* et *PKD2*, des facteurs environnementaux et génétiques additionnels pourraient également influencer le développement de la maladie.

1.5 FONCTIONS DES POLYCYSTINES

1.5.1 La nouvelle famille des polycystines

Les gènes de *PKD1* et *PKD2* encodent respectivement pour les polycystines-1 et -2. Les polycystines définissent une nouvelle famille de protéines transmembranaires. En plus des polycystines-1 et -2, six nouveaux membres ont été identifiés par homologie de séquence et ont été classés en deux sous-familles selon leur structure protéique (tableau I-III). Toutefois, seules les polycystines-1 et -2 semblent être impliquées dans la pathogenèse ADPKD.

Les membres de la sous-famille de la polycystine-1 ont tous un grand domaine extracellulaire, jusqu'à onze domaines transmembranaires et un petit domaine intracellulaire. De plus, plusieurs domaines protéiques identifiés initialement au niveau de la polycystine-1 tels que PKD, REJ, GPS, PLAT et *coiled-coil* sont conservés entre les membres de cette sous-famille (1994; Hughes et al., 1999; Li et al., 2003a; Yuasa et al., 2002).

Les trois membres de la sous-famille de la polycystine-2 ont six segments transmembranaires et sont homologues aux canaux ioniques (Guo et al., 2000; Mochizuki et al., 1996; Nomura et al., 1998). La polycystine-2L ou -L est la

première protéine de cette famille dont l'activité ionique a été démontrée et cela suggérait une fonction similaire pour la polycystine-2 (Chen et al., 1999).

L'étude fonctionnelle des membres de cette nouvelle famille de protéines devrait nous aider à élucider le rôle des polycystines-1 et -2 dans la pathogenèse ADPKD.

TABLEAU I-III

Membres de la famille des polycystines.

Protéine	Gène	Localisation Chr.	Expression	Pathologie	Réf.
Sous-famille de la polycystine-1					
polycystine-1	<i>PKD1</i>	16p13.3	La plupart des organes et tissus, plus élevé au niveau fœtal	ADPKD	1
polycystine-REJ	<i>PKDREJ</i>	22q13	Testicules	N.D.	2
polycystine-1L1	<i>PKD1L1</i>	7p12-p13	Cœur (adulte et fœtal) et testicules	N.D.	3
polycystine-1L2	<i>PKD1L2</i>	16q22-q23	La plupart des organes et tissus	N.D.	4
polycystine-1L3	<i>PKD1L3</i>	16q22-q23	La plupart des organes et tissus	N.D.	4
Sous-famille de la polycystine-2					
polycystine-2	<i>PKD2</i>	4q21-q23	La plupart des organes et tissus	ADPKD	5
polycystine-2L	<i>PKDL</i>	10q24-q25	La plupart des organes et tissus	N.D.	6
polycystine-2L2	<i>PKD2L2</i>	5q31	Reins, cerveau et testicules	N.D.	7

LÉGENDE :

Chr.- chromosomique; N.D. – non-déterminé; Réf. - référence

Références :

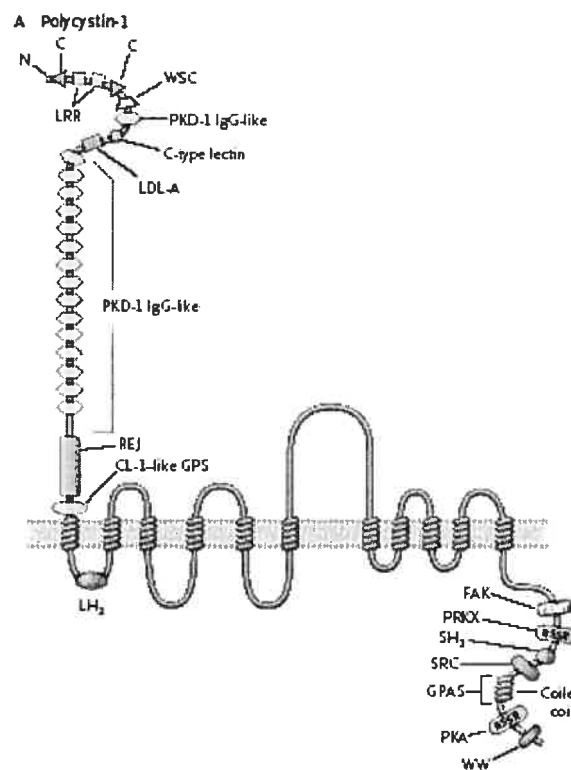
1- (1994); 2- (Hughes et al., 1999); 3- (Yuasa et al., 2002); 4- (Li et al., 2003a); 5- (Mochizuki et al., 1996); 6- (Nomura et al., 1998); 7- (Guo et al., 2000)

1.5.2 Structures et interactions protéiques

1.5.1.1 Polycystine-1

La polycystine-1 est une protéine de 4302 aa. Cette protéine de plus de 460 kDa est extrêmement complexe et sa structure cristallographique n'a pas encore été résolue. Le modèle protéique (figure 1.3) a été déterminé principalement par des analyses de séquences primaires à l'exception du domaine PKD.

FIGURE 1.3 :
La polycystine-1



Référence : (Wilson, 2004)

La polycystine-1 est une protéine transmembranaire dont la partie aminoterminal est extracellulaire et couvre les deux tiers de la protéine (3074 aa) et la partie carboxy-terminale est intracellulaire (199 aa) (Sandford et al., 1997).

Dans la partie extracellulaire, plusieurs domaines connus pour être impliqués dans différents types d'interactions cellulaires ont été identifiés par homologie de séquence. La séquence codante commence avec un peptide signal de 23 aa suivie de deux répétitions riches en leucines (LRR) de type B encodées respectivement par les exons 2 et 3 (1995; Hughes et al., 1995). Le LRR se caractérise par une séquence consensus de 20-29 aa qui contient des leucines ou des acides aminés aliphatiques à des positions clés. En plus de la séquence consensus, des domaines riches en cystéines sont situés de part et d'autre du LRR. Ce motif est présent chez plusieurs familles de protéines et est généralement impliqué dans les interactions protéines-protéines (Kobe and Kajava, 2001). Par des essais de liaison *in vitro*, Malhas et al. ont montré que le domaine LRR de la polycystine-1 peut lier différentes protéines de la matrice extracellulaire telles que le collagène I, la laminine et la fibronectine. Ce domaine peut également interagir avec des composantes non-identifiées du liquide kystique et diminuer la prolifération cellulaire (Malhas et al., 2002).

Le domaine LRR est suivi d'un domaine WSC, nommé d'après la protéine WSC1 chez *Saccharomyces cerevisiae* (*cell wall integrity and stress component protein*). Chez la levure les protéines WSC1-3 sont des senseurs de stress environnementaux et WSC4 est impliquée dans la translocation des protéines vers le réticulum endoplasmique (Ponting et al., 1999). Au niveau de la polycystine-1,

le domaine WSC a été identifié dans l'exon 5 par homologie de séquence (Ponting et al., 1999) et aucune expérience n'a été effectuée pour déterminer sa fonction.

Au niveau des exons 6 et 7, un domaine lectine de type C a été identifié (1995; Hughes et al., 1995). Ces domaines sont présents dans la partie extracellulaire de plusieurs protéines et lient des sucres spécifiques en présence de calcium. Les domaines lectines de type C sont généralement impliqués dans plusieurs processus biologiques dont la signalisation cellulaire et l'exocytose. Des études *in vitro* avec une protéine de fusion GST ont montré que le domaine lectine de type C de la polycystine-1 peut interagir avec différents sucres et que cette interaction nécessite la présence de calcium (Weston et al., 2001).

Deux études suggèrent la présence d'un domaine LDL-A (lipoprotéines de basse densité-A) dans l'exon 10 de *PKD1* (1995; Sandford et al., 1997). Ce domaine comprend une séquence riche en cystéines (environ quarante résidus) et est généralement impliqué dans la liaison du ligand chez les récepteurs de type LDL. Toutefois, par rapport à la polycystine-1, le rôle du domaine LDL-A n'a pas été déterminé.

La polycystine-1 contient également seize nouveaux motifs appelés domaines PKD. Le premier domaine PKD se situe dans l'exon 5 tandis que les quinze autres sont localisés au niveau des exons 11 à 15. La structure du premier domaine PKD a été étudiée par résonance magnétique nucléaire. Ce domaine de 80 aa est constitué de deux feuillets β qui ont un repliement similaire au domaine immunoglobuline, mais les acides aminés qui définissent le domaine immunoglobuline ne sont pas conservés dans le domaine PKD (Bycroft et al.,

1999). Des interactions homophiliques entre les différents domaines PKD ont été montrées par des essais de liaison *in vitro*. De plus, l'ajout d'un anticorps dirigé contre le domaine PKD, dans une culture de cellules MDCK perturbe les interactions cellules-cellules (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 2000).

Le module REJ qui signifie *receptor for egg jelly* a été découvert initialement chez l'oursin de mer suite à la caractérisation du récepteur impliqué dans la réaction acrosomiale (suREJ) (Moy et al., 1996). Ce module d'environ 1000 aa contient dix résidus cystéines conservés et couvre les exons 15 à 27 de la polycystine-1 (Moy et al., 1996; Sandford et al., 1997). La structure et la fonction exacte du module REJ n'ont pas été déterminées, mais il pourrait être impliqué dans la régulation du transport d'ions.

Juste en amont du premier domaine transmembranaire, un domaine GPS (*GPCR proteolytic site*) a été identifié. Ce domaine riche en cystéines est un site de clivage protéolytique que l'on retrouve principalement chez les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) appartenant à la famille LNB-TM7 (Krasnoperov et al., 2002). La présence de ce domaine en amont du premier domaine transmembranaire de la polycystine-1 suggère que la protéine serait clivée entre la leucine 3048 et la thréonine 3049 (Ponting et al., 1999). Des études de co-immunoprécipitation ont montré que la polycystine-1 est effectivement clivée *in vitro* (Qian et al., 2002).

Onze domaines transmembranaires (TM I-XI) ont été identifiés par des analyses d'hydrophobicité (Sandford et al., 1997) et cette étude a été confirmée récemment par des analyses biochimiques (Nims et al., 2003). La première boucle

intracellulaire entre les domaines transmembranaires I et II comprend un domaine PLAT (polycystine-1, lipo-oxygénase, alpha toxine). La structure tridimensionnel de ce domaine est un sandwich bêta et il est généralement impliqué dans des interactions protéines-protéines et lipides-protéines (Bateman and Sandford, 1999). Dans le cas de la polycystine-1, aucune analyse n'a été effectuée au niveau de ce domaine.

La partie carboxy-terminale de la polycystine est relativement courte, mais elle comprend plusieurs sites de phosphorylation potentiels, une séquence riche en prolines, une séquence d'activation des protéines G hétérotrimériques et un domaine *coiled-coil* (Li et al., 1999; Nims et al., 2003; Parnell et al., 1998; Qian et al., 1997). Le domaine *coiled-coil* de la polycystine-1 (exon 46) (Qian et al., 1997) semble interagir avec la polycystine-2, la protéine encodée par *PKD2* (Hanaoka et al., 2000; Newby et al., 2002; Qian et al., 1997; Tsiokas et al., 1997). Ce domaine interagit également avec des composantes des filaments intermédiaires (Xu et al., 2001) et RGS7, une protéine régulatrice de la signalisation des protéines G (Kim et al., 1999a).

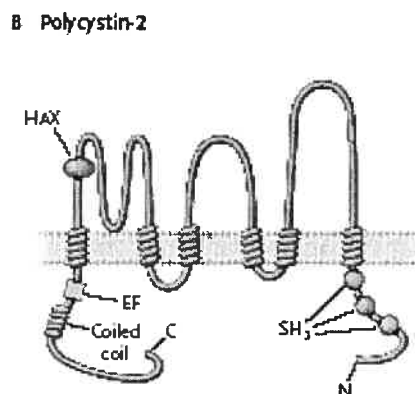
Des études de colocalisation et de co-immunoprécipitation semblent également montré que la polycystine-1 fait partie de complexes multiprotéiques. Elle peut interagir avec les cadhérines et les caténines (Geng et al., 2000; Huan and van Adelsberg, 1999), des protéines de liaison à l'actine (vinculine, taline et α -actinine) (Geng et al., 2000) ainsi que des composantes des complexes d'adhésion focales (intégrine $\alpha 2\beta 1$, paxilline, pp125 FAK, pp60src et p130Cas) (Geng et al., 2000; Wilson et al., 1999) (tableau I-IV).

1.5.1.2 Polycystine-2

La polycystine-2 est une protéine transmembranaire de 968 aa (figure 1.4). Cette protéine contient six segments transmembranaires et les domaines amino- et carboxy-terminales sont intracellulaires. La séquence des segments transmembranaires (S1-6) est similaire à 50 % au six derniers domaines transmembranaires de la polycystine-1 et à la sous-unité alpha du canal calcique voltage dépendant ($VACC_{\alpha 1E}$) (Mochizuki et al., 1996). La région S5-6 est également homologue aux canaux récepteurs à potentiel transitoire (TRPC), ces derniers sont impliqués dans le contrôle des réserves de calcium intracellulaire (Tsiokas et al., 1999).

La partie carboxy-terminale comprend au moins deux régions fonctionnelles soit un domaine *EF-hand* et un domaine de localisation au réticulum endoplasmique (Cai et al., 1999). La présence d'un domaine *coiled-coil* dans la partie carboxy-terminale a également été suggérée, mais le domaine identifié n'a pas la structure amphipathique qui caractérise habituellement les domaines *coiled-coil* (Qian et al., 1997).

FIGURE 1.4 :
La polycystine-2



RÉFÉRENCE : (Wilson, 2004)

En plus de former des homodimères, la polycystine-2 peut interagir avec plusieurs protéines dont la polycystine-1 et le canal TRPC1 (Qian et al., 1997; Tsiokas et al., 1997; Tsiokas et al., 1999). Un lien avec le cytosquelette a également été suggéré puisque la polycystine-2 interagit avec des protéines associées à celui-ci, CD2AP et HAX-1 (Gallagher et al., 2000; Lehtonen et al., 2000). Récemment, des études ont montré une interaction directe entre la polycystine-2 et des protéines impliquées dans la régulation des microfilaments d'actine, soit la tropomyosine-1 et la troponine-1 (Li et al., 2003b; Li et al., 2003c).

Les interactions protéiques des polycystines-1 et -2 sont présentées au tableau I-IV.

TABLEAU I-IV

Interactions protéiques des polycystines-1 (PC1) et -2 (PC2).

	Protéines	Domaine de liaison de la polycystine	Complexe protéique	Réf.
Polycystine-1				
PC1	Caténines α , β , γ	Non-déterminé	Jonctions adhérentes	1, 2
PC1	E-cadhérine	Non-déterminé	Jonctions adhérentes	1, 2
PC1	Intégrines	Non-déterminé	Complexes d'adhésions focales	2, 3
PC1	Collagène I, II, IV	Lectine de type C	Matrice extracellulaire	4
PC1	PC1	PKD II-XVI	Polycystine	5
PC1	Vimentine	Coiled-coil	Filaments intermédiaires	6
PC1	RGS7	Coiled-coil		7
PC1	Protéines G	4181-4303 aa		8
Polycystine-2				
PC2	HAX-1	Boucle 5	Cytosquelette	9
PC2	CD2AP	C-terminale	Cytosquelette	10
PC2	Tropomyosine-1	C-terminale	Cytosquelette	11
PC2	Troponine-1	C-terminale	Cytosquelette	12
PC2	PC2	C-terminale	Polycystine	13, 14
PC2	PC1	PC1 4214-4248 aa PC2 871-968 aa	Canal ionique	13, 14
PC2	TRPC1	S2-5	Canal ionique	15

LÉGENDE :**Références:**

1- (Huan and van Adelsberg, 1999); 2- (Geng et al., 2000); 3- (Wilson et al., 1999); 4- (Weston et al., 2001); 5- (Ibraghimov-Beskrovnya et al., 2000); 6- (Xu et al., 2001); 7- (Kim et al., 1999a); 8- (Parnell et al., 1998); 9- (Gallagher et al., 2000); 10- (Lehtonen et al., 2000); 11- (Li et al., 2003b); 12- (Li et al., 2003c); 13- (Tsiokas et al., 1997); 14- (Qian et al., 1997); 15- (Tsiokas et al., 1999)

1.5.3 Localisation cellulaire et sous-cellulaire

Plusieurs études d'immunohistochimie ont été effectuées avec différents anticorps pour déterminer la localisation cellulaire et sous-cellulaire des polycystines-1 et -2. Les profils d'expression cellulaires de ces deux protéines au niveau du rein sont sensiblement les mêmes. Toutefois, contrairement à la polycystine-2, le niveau d'expression de la polycystine-1 diminue considérablement lorsque la formation du rein est complétée. En plus d'être exprimé dans le rein, les polycystines-1 et -2 ont été détectées dans la plupart des tissus et organes aux stades foetal et adulte.

Au stade précoce du développement rénal, les polycystines-1 et -2 sont exprimées fortement dans le canal de Wolff et les tubules mésonéphriques. Un peu plus tard au cours du développement, elles sont détectées au niveau des précurseurs épithéliaux tels que les corps en S et les branchements proximaux et distaux du bourgeon urétéral. Dans les portions plus matures du rein foetal, elles sont présentes dans toutes les parties du néphron, mais leurs expressions dans les tubules proximaux diminue à partir de vingt-quatre semaines. La polycystine-2 est également exprimée dans les artères et la partie ascendante de l'anse de Henle (Chauvet et al., 2002; Foggensteiner et al., 2000; Geng et al., 1996; Ong et al., 1999b; Peters et al., 1996; van Adelsberg et al., 1997).

Au niveau du rein adulte, les polycystines-1 et -2 sont exprimées principalement dans les tubules contournés distaux et les tubules rénaux collecteurs ainsi que dans la partie ascendante de l'anse de Henle dans le cas de la polycystine-2 (Foggensteiner et al., 2000; Geng et al., 1996; Ibraghimov-

Beskrovnaya et al., 1997; Ong et al., 1999a; Ong et al., 1999b; Peters et al., 1996; Ward et al., 1996).

Chez les patients ADPKD1 et ADPKD2, les polycystines-1 et -2 sont exprimées fortement dans l'épithélium kystique rénal. La majorité des kystes, soit environ 80 %, expriment ces deux protéines au niveau de la membrane plasmique ou du cytoplasme (Geng et al., 1996; Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1997; Ong et al., 1999a; Ong et al., 1999b; Peters et al., 1996; van Adelsberg et al., 1997; Ward et al., 1996). De plus, chez les patients atteints d'une forme sévère d'ADPKD, ADPKD infantile ou syndrome contigu *PKD1-TSC2*, la polycystine est détectée dans près de 100 % des kystes analysés (Ong et al., 1999a).

Plusieurs études de localisation sous-cellulaire ont montré que la polycystine-1 est principalement associée avec la membrane plasmique (Boletta et al., 2001; Geng et al., 1996; Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1997; Peters et al., 1999) et elle a été détectée au niveau de plusieurs types de jonctions à la membrane latérale (Huan and van Adelsberg, 1999; Scheffers et al., 2000). Toutefois, une faible quantité de protéines a également été détectée dans le cytoplasme cellulaire ce qui suggère que la polycystine-1 est continuellement recyclée à l'intérieur de la cellule (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1997; Peters et al., 1999).

Jusqu'à tout récemment, la localisation sous-cellulaire de la polycystine-2 était assez controversée puisque, selon les études effectuées, elle était localisée au niveau du réticulum endoplasmique ou à la membrane plasmique (Foggensteiner et al., 2000; Koulen et al., 2002; Vassilev et al., 2001). Dernièrement, des études

ont montré que la localisation sous-cellulaire de la polycystine-2 peut varier entre les protéines exogènes et endogènes ainsi que selon le type de cellules employées (Luo et al., 2003).

1.5.4 Transport ionique

L'homologie de séquence observée entre la polycystine-2 et différents canaux ioniques suggère que cette protéine pourrait jouer un rôle important dans le transport d'ions. Ainsi, plusieurs études ont été effectuées pour confirmer cette hypothèse et ont montré que la polycystine-2 peut effectivement former un canal ionique calcique. Par contre, selon le système cellulaire utilisé, certains résultats apparaissent controversés par rapport au rôle de la polycystine-1 dans la formation et la localisation cellulaire du canal ionique formé par la polycystine-2.

Les premières expériences réalisées par *Hanaoka et al.* ont montré que la co-expression des polycystines-1 et -2 est nécessaire pour former un nouveau canal calcique à la membrane plasmique (Hanaoka et al., 2000). Par contre, des études effectuées dans d'autres systèmes cellulaires ont montré que la polycystine-2 est suffisante pour former un canal ionique fonctionnel au réticulum endoplasmique (Koulen et al., 2002; Vassilev et al., 2001). Par la suite d'autres analyses ont confirmé que la polycystine-1 n'est pas nécessaire à la formation du canal ionique, mais qu'elle permet d'activer et stabiliser la polycystine-2 (Xu et al., 2002). Récemment, *Luo et al.* ont montré pour la première fois que le canal ionique formé par la polycystine-2 endogène est fonctionnel à la membrane

plasmique et n'exclut pas qu'il pourrait également jouer un rôle important au niveau du réticulum endoplasmique (Luo et al., 2003).

Dans le cas de la polycystine-1, plusieurs études ont montré qu'elle peut réguler l'activité de la polycystine-2 (Xu et al., 2002) ainsi que d'autres canaux ioniques non-identifiés (Babich et al., 2004; Vandorpe et al., 2001; Vandorpe et al., 2002).

1.5.5 Signalisation cellulaire

Les analyses de séquences protéiques, les études d'interactions ainsi que plusieurs études fonctionnelles en culture cellulaire ont permis d'identifier les principales voies de signalisations activées par les polycystines (figure 1.5).

1.5.5.1 Voie des *Wnts*

Plusieurs études suggèrent que la voie des *Wnts*, et plus particulièrement la β -caténine, sont impliquées dans la pathogenèse de la polykystose rénale. La β -caténine joue un rôle structural important aux jonctions cellules-cellules et elle peut également réguler la transcription des gènes de la famille *TCF/LEF* lorsque sa forme non complexée est transloquée au noyau. Chez les patients ADPKD, le niveau d'expression de *C-MYC*, un gène activé par la β -caténine, est anormalement élevé (Lanoix et al., 1996). De plus, la transfection transitoire de la partie carboxy-terminale de la polycystine-1 stabilise la forme soluble de la β -caténine et permet ainsi l'activation de siamois, un gène cible de la β -caténine (Kim et al., 1999b). Étonnamment, des éléments de liaison *TCF/LEF* (*TBE*) ont

été identifiés dans la séquence promotrice de *PKD1* et suggèrent qu'il est lui-même un gène cible de la β -caténine (Rodova et al., 2002).

1.5.5.2 Activation des petites protéines G hétérotrimériques

La présence d'un domaine GPS et d'une séquence d'activation des protéines G suggèrent que la polycystine-1 pourrait agir comme un récepteur couplé aux protéines G (GPCR) malgré ces onze domaines transmembranaires. Les voies de signalisation activées par les petites protéines G peuvent réguler plusieurs réponses cellulaires qui semblent jouer un rôle important dans la polykystose rénale telles que la prolifération, la polarité, la différenciation et la survie cellulaire. Afin de confirmer cette hypothèse, plusieurs études fonctionnelles ont été effectuées.

Tout d'abord, *Parnell et al.* ont montré que le domaine d'activation des protéines G de la polycystine-1 peut lier et activer les protéines G hétérotrimériques Gi/Go *in vitro* (Parnell et al., 1998). De plus, la partie carboxy-terminale de la polycystine-1 peut réguler les gènes *AP-1* dépendants via l'activation de plusieurs classes de protéines G incluant les protéines G hétérotrimériques et les Rho GTPases Rac1 et Cdc42 (Arnould et al., 1998; Parnell et al., 2002).

L'activation des protéines G de type Gi/Go par la polycystine-1 peut également moduler l'activité des canaux ioniques de calcium et de potassium par le relâchement des sous-unités G $\beta\gamma$. Toutefois, dans ce cas-ci, la signalisation des protéines G est inhibée par la co-expression de la polycystine-2 (Delmas et al.,

2002). Ce qui suggère que cette voie de signalisation est activée seulement lorsque le complexe protéique des polycystines est perturbé.

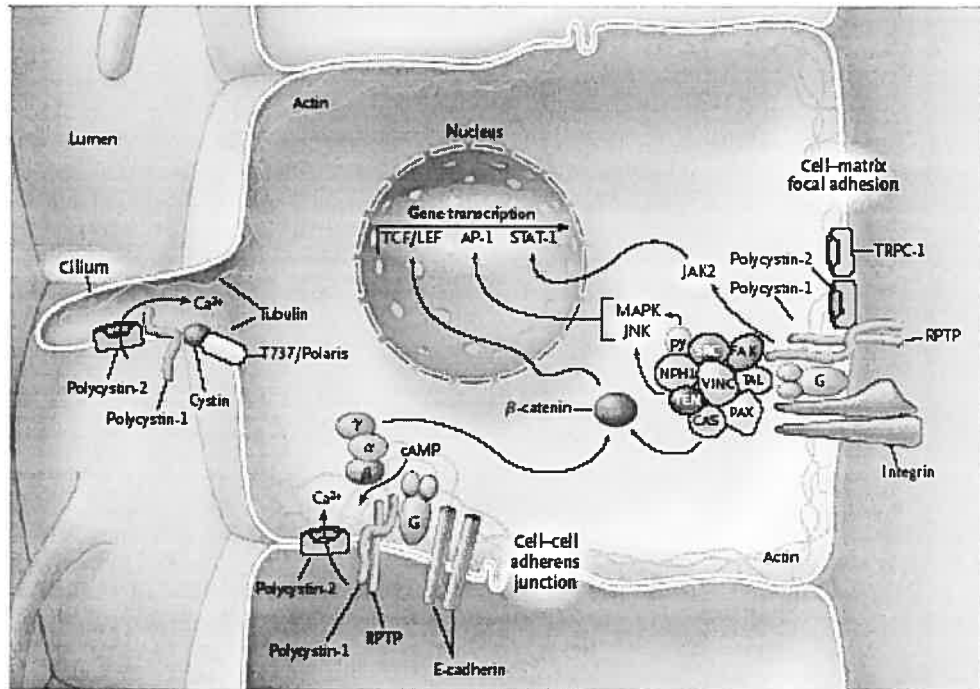
Finalement, la partie carboxy-terminale de la polycystine-1 peut lier et stabiliser RGS7, un régulateur de la signalisation des protéines G (Kim et al., 1999a). La stabilisation de RGS7 influence probablement les différentes cascades de signalisation dépendantes des protéines G et plus particulièrement celles activées par la polycystine-1.

1.5.5.3 Régulation du cycle cellulaire

La polycystine-1 semble également jouer un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire par l'activation de la voie JAK-STAT. Cette voie de signalisation joue un rôle important au niveau du développement embryonnaire et elle est impliquée dans la régulation de plusieurs processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation et la survie. Des études effectuées en culture cellulaire ont montré que la polycystine-1 permet l'arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 par l'augmentation de p21^{waf1}. De plus, une interaction avec la polycystine-2 semble être nécessaire pour l'activation de JAK2 puisque lorsque le domaine d'interaction avec la polycystine-2 est muté, JAK2 n'est pas phosphorylé (Bhunia et al., 2002).

FIGURE 1.5 :

Voies de signalisation impliquant les polycystines-1 et-2



Référence : (Wilson, 2004)

1.6 ÉTUDES CHEZ LA SOURIS

1.6.1 Modèles murins de polykystose rénale (PKD)

Les modèles animaux sont fort utiles pour étudier les maladies génétiques et développer des stratégies thérapeutiques. Bien avant que les gènes humains de *PKD1* et *PKD2* ne soient clonés, une pathologie rénale similaire à PKD a été observée chez plusieurs modèles murins chimiques, spontanées, transgéniques et *knock-out* (tableaux I-V à I-VII).

Étonnamment, aucun des modèles murins spontanés de polykystose rénale n'affecte les deux gènes orthologues responsables de l'ADPKD chez l'humain soit *Pkd1* et *Pkd2* (tableau I-V). Parmi les différents modèles de souris

spontanées, la souris *cpk* est certainement celle qui a été le plus étudiée. Le gène muté chez ces souris a été cloné dernièrement et encode pour une nouvelle protéine appelée la cystine. La fonction de cette protéine est inconnue, mais tel que mentionné précédemment elle est localisée au niveau des cils primaires des cellules épithéliales rénales avec les polycystines-1 et -2 (Hou et al., 2002).

TABLEAU I-V

Mutants spontanés et chimiques et mutagenèse insertionnelle.

Modèles murins	PKD	Gène	Localisation Chr.	Protéine	Fonction	Réf.
Mutants spontanés						
<i>Cpk</i>	ARPKD	<i>Cpk</i>	12	Cystine	N.D.	1
<i>Pcy</i>	NPH	<i>Nphp-3</i>	3	Néphrocystine-3	N.D.	2
<i>Bpk</i>	ARPKD	<i>Bicc1</i>	10	Bicc1	N.D.	3
<i>Kat</i>	ADPKD	N.D.	8	N.D.	N.D.	4
<i>Jck</i>	ADPKD	N.D.	11	N.D.	N.D.	5
Mutants chimiques						
<i>Jcpk</i>	ARPKD	<i>Bicc1</i>	10	Bicc1	N.D.	3
Mutagenèse insertionnelle						
<i>Orpk</i>	ARPKD	<i>Tg737</i>	14	Polaris	Ciliogénèse	6

LÉGENDE :

Jcpk et *Bpk* représentent différentes mutations du même gène.

Réf. - références; Chr. - chromosomique; N.D. - non-déterminé

Références :

1- (Hou et al., 2002); 2- (Olbrich et al., 2003); 3- (Cogswell et al., 2003); 4- (Janaswami et al., 1997); 5- (Atala et al., 1993); 6- (Moyer et al., 1994)

Une pathologie rénale similaire à la polykystose rénale a également été observée chez plusieurs modèles murins de transgénèse et d'ablation génique où différents gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, la différenciation

cellulaire, la prolifération cellulaire et l'apoptose sont surexprimés ou délétés (tableaux I-VI et I-VII).

TABLEAU I-VI:

Modèles de souris transgéniques PKD.

Gènes	Fonctions	Réf.
<i>c-myc</i>	Protooncogène : division cellulaire et mort cellulaire	1
<i>v-src</i>	Protooncogène	2
<i>SV40</i>	Protooncogène : division cellulaire	3,4
<i>HrasT24</i>	Protooncogène	5
<i>c-erbB2</i>	Protooncogène	6
<i>TGF-α</i>	Facteur de croissance : régulation de la synthèse de la MEC	7
<i>KGF</i>	Facteur de croissance des kératinocytes	8
<i>HGF</i>	Facteur de croissance des hépatocytes	9
<i>Pax-2</i>	Facteur de transcription: développement embryonnaire	10

LÉGENDE :

Réf. – références

Références :

1- (Trudel et al., 1991); 2- (Boulter et al., 1992); 3- (MacKay et al., 1987); 4- (Kelley et al., 1991); 5- (Schaffner et al., 1993); 6- (Stocklin et al., 1993); 7- (Lowden et al., 1994); 8- (Nguyen et al., 1996); 9- (Takayama et al., 1997); 10- (Dressler et al., 1993)

TABLEAU I-VII

Modèles murins PKD d'ablation génique.

Gènes	Fonctions	Réf.
<i>Bcl-2</i>	Régulation de l'apoptose	1
<i>Ap-2β</i>	Facteur de transcription : développement embryonnaire	2,3
<i>Tg737</i>	Protéine impliquée dans la ciliogénèse	4
<i>Kif3a</i>	Sous-unité motrice de la kinésine-II : transport intraflagellaire	5
Tensin	Adhésions focales	6

LÉGENDE :

Réf. – références

Références :

1- (Veis et al., 1993); 2- (Moser et al., 1997); 3- (Moser et al., 2003); 4- (Murcia et al., 2000); 5- (Lin et al., 2003); 6- (Lo et al., 1997)

1.6.6.1 Prolifération cellulaire et apoptose

Les études chez la souris corrélaient avec les résultats observés chez l'humain par rapport au rôle de la prolifération cellulaire et de l'apoptose dans le développement des kystes. En effet, la surexpression des proto-oncogènes *c-erbB-2*, *c-myc* et *ras* et des facteurs de croissance *TGF- α* , *HGF* et *KGF* est suffisante pour induire l'hyperplasie cellulaire et la kystogénèse rénale (Gilbert et al., 1997; Lowden et al., 1994; Nguyen et al., 1996; Schaffner et al., 1993; Stocklin et al., 1993; Takayama et al., 1997; Trudel et al., 1991). De plus, la surexpression ou l'ablation génique de gènes reconnues pour être impliqués dans l'apoptose tels que *c-myc*, *bcl-2* et *AP-2 β* cause un phénotype kystique et des niveaux élevés d'apoptose sont observés avant la kystogénèse (Moser et al., 1997; Sorenson et al., 1996; Trudel et al., 1998; Veis et al., 1993).

Tout comme chez l'humain, le récepteur EGFR est surexprimé et mal localisé chez la souris *cpk* (Orellana et al., 1995). Une augmentation de EGF a également été observé dans le liquide kystique de ces souris (Horikoshi et al., 1991). Ces différents modèles murins ont donc été forts utiles pour confirmer le rôle du récepteur EGFR dans la progression des kystes et tester différents inhibiteurs. Par exemple, une diminution de l'activité tyrosine kinase chez les souris double homozygotes *orpk* ; *waved-2* (*wa-2*), freine la kystogénèse au niveau du tube collecteur et améliore les fonctions rénales de ces souris. Dans ce cas-ci, l'allèle *wa-2* spontané est un changement d'un acide aminé dans le récepteur EGFR qui entraîne une baisse de l'activité tyrosine kinase (Richards et al., 1998). Des résultats similaires ont été obtenus en traitant la souris *bpk* avec des inhibiteurs du récepteur EGFR (Sweeney et al., 2000).

1.6.1.2 Rôle des cils dans la pathogenèse ADPKD

Plusieurs études ont suggéré que des anomalies structurales et fonctionnelles du cil primaire au niveau des cellules épithéliales rénales sont associées à une pathogenèse PKD. Chez les vertébrés, il existe deux types de cils, soit les cils motiles et les cils non-motiles, communément appelés cils primaires. Au cours du développement embryonnaire, les cils motiles sont présents à la surface du nœud et semblent être nécessaires à l'établissement de l'axe droit-gauche (Marszalek et al., 1999; Nonaka et al., 1998). Quant aux cils primaires, ils sont exprimés à la surface de plusieurs types cellulaires et pourraient jouer un rôle important comme senseurs de l'environnement (Bargmann and Horvitz, 1991;

Dwyer et al., 1998). Au niveau du rein, toutes les cellules épithéliales rénales, excepté les cellules intercalaires, ont un cil primaire qui s'étend dans le lumen.

Le lien entre PKD et les cils a d'abord été suggéré suite à la découverte du gène *Tg737* chez la souris *orpk*, un modèle ARPKD. En effet, *Tg737* est l'orthologue murin de *IFT88* (*Chlamydomonas*) et *OSM-5* (*Caenorhabditis elegans*), deux protéines IFT impliquées dans le transport des précurseurs nécessaires à l'assemblage des cils (Haycraft et al., 2001; Pazour et al., 2000; Qin et al., 2001). Ainsi, chez la souris *orpk*, un mutant hypomorphe du gène *Tg737*, les cils primaires sont plus courts (Pazour et al., 2000) tandis que la délétion complète du gène *Tg737* empêche la ciliogénèse et cause un défaut de l'axe droit-gauche (Murcia et al., 2000). Le phénotype kystique observé chez le *knock-out* conditionnel murin de *Kif3a* (Lin et al., 2003) permet également de faire un lien entre la ciliogénèse et le développement des kystes puisque *Kif3a* est une des deux sous-unités motrices de la kinésine-II, une protéine hétérotrimérique impliquée dans le transport antérograde des particules IFT le long de l'axonème ciliaire (Rosenbaum and Witman, 2002). Finalement, des études de localisation cellulaire ont montré que la cystine (souris *cpk*) et polaris (souris *orpk*) sont localisées au niveau du cil primaire des cellules épithéliales rénales (Yoder et al., 2002). Ainsi, la plupart des protéines impliquées dans la pathogénèse PKD telles que les polycystines, la fibrocystine, la néphrocystine et l'inversine sont localisées à cet endroit.

1.6.2 Orthologues murins de *PKD1* et *PKD2*

Afin de mieux comprendre la fonction de *PKD1* et *PKD2* chez l'humain, ces deux gènes ont été clonés chez la souris.

1.6.2.1 Structure des gènes *Pkd1* et *Pkd2*

Le gène de *Pkd1* est localisé sur le chromosome 17 dans une orientation queue à queue avec le gène de *Tsc2* et sa région codante est homologue au gène humain à 79 % (Lohning et al., 1997; Olsson et al., 1996). Contrairement au gène humain, le gène murin n'est pas dupliqué et ne contient pas de séries de polypurines-polypyrimidines dans les introns 21 et 22 (Olsson et al., 1996; Piontek and Germino, 1999). Au niveau protéique, les polycystines humaines et murines sont également homologue à 79 % et tous les domaines protéiques identifiés chez l'humain sont présents chez la souris (Lohning et al., 1997).

Quant au gène de *Pkd2*, il est localisé sur le chromosome 5 de la souris et une homologie de plus de 95 % a été observée avec la séquence protéique de *PKD2* humain (Wu et al., 1997).

1.6.2.2 Analyses d'expression et de localisation cellulaire

Le profil d'expression des gènes de *Pkd1* et *Pkd2* a été déterminé par des essais d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie et des résultats similaires à ceux observés chez l'humain ont été obtenus chez la souris. Les deux gènes sont exprimés dans la plupart des organes et tissus, et au niveau du rein, ils sont exprimés principalement dans les tubules contournés distaux et le système

collecteur rénal. De plus, le niveau d'expression de *Pkd2* demeure élevé chez la souris adulte tandis que celui de *Pkd1* diminue de manière importante après la naissance des souriceaux (Guillaume et al., 1999; Guillaume and Trudel, 2000; Markowitz et al., 1999).

Les études chez la souris ont montré que *Pkd1* et *Pkd2* sont exprimés au stade de la morula (8-16 cellules) et au cours du développement embryonnaire ils sont exprimés fortement dans tous les tissus mésenchymateux et cartilagineux (Guillaume et al., 1999; Guillaume and Trudel, 2000). Des divergences entre les profils d'expression de *Pkd1* et *Pkd2* ont également été observées. Par exemple, *Pkd1* est exprimé fortement au niveau des tissus dérivés des cellules de la crête neurale et du système nerveux central alors que *Pkd2* est difficilement détectable dans ces tissus. De plus, contrairement à *Pkd2*, *Pkd1* est exprimé pendant la condensation du mésenchyme (Guillaume and Trudel, 2000).

1.6.2.3 Études d'ablation génique et de transgénèse

Dans le but d'étudier la fonction de *Pkd1* et *Pkd2*, plusieurs souris *knock-out* ont été produites (tableau I-VIII) (Boulter et al., 2001; Kim et al., 2000; Lu et al., 1997; Lu et al., 2001; Muto et al., 2002; Wu et al., 1998; Wu et al., 2000; Wu et al., 2002).

Chez tous les modèles de souris *Pkd1* homozygotes, les premières étapes du développement rénal semblent procéder normalement jusqu'à E13.5, mais à partir de E15.5, on note la présence de kystes. Des kystes pancréatiques sont également observés dans la plupart des cas à partir de E13.5. Ces résultats

suggèrent que les polycystines ne sont pas requises pour l'induction des néphrons, mais qu'elles jouent un rôle important au niveau du maintien et de la maturation de l'architecture tubulaire rénale. La plupart de ces souris meurent entre le jour embryonnaire E12.5 et la période périnatale. Des anomalies au niveau du cœur et des poumons ainsi que de l'œdème sous-cutané et des hémorragies focales ont été décrites, mais la cause exacte de leur décès est inconnue. Probablement en raison de leur décès précoce, aucun kyste hépatique n'a été observé chez ces souris. Dans le cas des souris *Pkd1*^{del34}, *Pkd1*^{null} et *Pkd1*^{del17-21}, des anomalies au niveau du développement squelettique ont également été rapportées (Boulter et al., 2001; Lu et al., 2001).

Les souris hétérozygotes *Pkd1* développent aussi des kystes rénaux, mais le phénotype est généralement modéré et variable. Dans le cas des souris *Pkd1*^{null} et *Pkd1*^{del17-21}, les kystes sont couramment détectés à partir de 3 mois et affectent plus de 50 % des souris analysées avant l'âge de 9 mois. Chez ces souris, on note également la présence de kystes hépatiques à partir de 11 mois, mais aucun kyste pancréatique n'a été observé (Boulter et al., 2001; Lu et al., 2001).

Tableau I-VIII

Résumé des modèles de souris Pkd1 et Pkd2 *knock-out*.

Mutants	Exons affectés	Décès (âge)	Phénotypes extrarénaux	Hétérozygote (phénotypes et âge de la souris)	Réf.
Pkd1 <i>knock-out</i>					
Pkd1 del34	34	E 18.5	Kystes au pancréas; hypoplasie pulmonaire	Kystes rénaux et hépatiques: >9 mois	1,2
Pkd1L	43-45	E14.5-15.5	Kystes au pancréas; œdème sous-cutané; hémorragie; fragilité vasculaire	Aucun phénotype jusqu'à 7 mois	3
Pkd1 del 17-21pgeo	17-21	E13.5-14.5	Oedème sous-cutané; hémorragie; anomalies squelettiques et cardiaques	Kystes rénaux: >3 mois Kystes hépatiques (rare): >19 mois	4
Pkd1 null	4	E13.5-16.5	Kystes au pancréas; oedème sous-cutané; anomalies squelettiques	Kystes rénaux: 2.5 mois Kystes hépatiques: >11 mois	5
Pkd1-/-	2-6	E14.5	Oedème sous-cutané; hémorragie; anomalies cardiaques	N.D.	6
Pkd1 null	1	E12.5-naissance	Kystes au pancréas; œdème sous-cutané; hémorragie	Kystes rénaux: >3 mois Pas de kystes hépatiques	7
Pkd2 <i>knock-out</i>					
Pkd2 WS25 (null)	1	E13.5-18.5	Kystes au pancréas; anomalies cardiaques	Pkd2 +/- et Pkd2 WS25/- : Kystes rénaux et hépatiques: > 9 semaines	8,9

LÉGENDE:

N.D. – non-déterminé; Réf. – référence

Références des modèles de souris *knock-out*:

1- (Lu et al., 1997); 2- (Lu et al., 1999); 3- (Kim et al., 2000); 4- (Boulter et al., 2001); 5- (Lu et al., 2001); 6- (Muto et al., 2002); 7- (Wu et al., 2002); 8- (Wu et al., 1998); 9- (Wu et al., 2000)

Afin de vérifier si la surexpression de *PKD1* peut être un mécanisme pathogénétique de kystogénèse, une souris double transgénique pour les gènes de *PKD1* et *TSC2* humains a été générée (Pritchard et al., 2000). Le PAC utilisé pour générer ces souris contient les gènes de *PKD1* et *TSC2* en entier ainsi que les gènes de *RAB26* et *SLC9A3R2*, mais ces derniers ne sont pas mentionnés dans le papier. Les analyses d'expression par Northern montrent que *PKD1* est faiblement exprimé dans le rein adulte alors que les Western montrent que la polycystine-1 est détectable chez les nouveaux-nés seulement. Ces mêmes analyses montrent également que *TSC2* est exprimé dans le rein adulte. Le phénotype rénal observé chez ces souris se manifeste très tardivement et n'est pas complètement pénétrant. En effet, des kystes rénaux ont été observés chez 38 % des souris âgées entre douze et vingt-quatre mois. En plus des kystes, plusieurs anomalies rénales ont été observées telles que de la fibrose interstitielle, de l'atrophie tubulaire, de la glomérulosclérose et de l'inflammation interstitielle à la jonction cortico-médullaire. On note également un phénotype extrarénal au niveau du foie chez plus de 50 % des souris ayant des kystes rénaux. Le croisement des souris transgéniques *PKD1-TSC2* avec le *knock-out Pkd1^{del34}* permet la survie des souris homozygotes et montre que la protéine produite par le transgène est fonctionnelle. Des souris transgéniques; *Pkd1^{-/-}* de moins de 11 mois ont été sacrifiées et aucun phénotype kystique n'a été observé chez ces souris (Pritchard et al., 2000). Dans ce cas-ci, il est difficile d'établir un lien direct entre la surexpression de *PKD1* et le développement des kystes rénaux, puisqu'au moment où le phénotype est observé, le niveau d'expression du transgène *PKD1*

est à peine détectable. De plus, tel que mentionné à la section 1.2.3, le gène de *TSC2* pourrait être impliqué dans la pathologie rénale de ces souris.

1.7 MÉCANISMES PATHOGÉNÉTIQUES DES POLYCYSTINES

Les mécanismes moléculaires menant à la formation de kystes sont encore incompris, mais d'après les études effectuées chez l'humain et la souris plusieurs hypothèses peuvent être émises.

1.7.1 *Two-hit* et perte de fonction protéique

Chez les patients ADPKD, moins de 5 % des néphrons développeront des kystes et ce malgré le fait que toutes les cellules épithéliales rénales héritent de la même mutation germinale. Une des hypothèses suggérées pour expliquer la nature focale de la kystogénèse est le *two-hit*. Inspirée de la théorie de Knudson pour expliquer l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur (Knudson, Jr., 1971), elle propose qu'en plus d'une mutation germinale dans les gènes de *PKD1* ou *PKD2*, une mutation somatique de l'allèle normal serait requise pour le développement des kystes. Ainsi, selon cette hypothèse, ADPKD est une maladie génétique dominante au point de vue de la transmission héréditaire, mais elle serait récessive au niveau moléculaire.

Afin de vérifier l'hypothèse du *two-hit*, des analyses de perte d'hétérozygotie (LOH) ont été effectuées sur des kystes isolés de patients ADPKD. Entre 18 % et 82 % des kystes rénaux provenant de patients ADPKD1 étaient monoclonaux (Brasier and Henske, 1997; Koptides et al., 1998; Qian et

al., 1996) et des mutations somatiques de l'allèle normal ont été détectés dans 30% des kystes hépatiques (Watnick et al., 1998). Il est vrai que le pourcentage de kystes ayant subi un deuxième hit est relativement faible, mais cela est probablement attribuable à la technique employée et à la complexité de la structure génomique de *PKD1*. Chez les patients ADPKD2, des LOH ainsi que des mutations somatiques ont également été observés et dans tous les cas où cela a pu être déterminé, c'est l'allèle normal qui était affecté (Koptides et al., 1999; Pei et al., 1999; Torra et al., 1999; Watnick et al., 2000). Avec une technique d'analyse plus sensible, des mutations somatiques dans l'allèle normal de *PKD2* ont été détectés dans plus de 70 % des kystes analysés (Watnick et al., 2000). Des mutations somatiques dans le gène de *PKD2* chez des patients ADPKD1 et vice versa ont également été observées suggérant que les cellules trans-hétérozygotes seraient susceptibles de développer des kystes (Koptides et al., 2000; Watnick et al., 2000). Finalement, en combinant l'hybridation génomique comparative et la perte d'hétérozygotie, des débalancements chromosomiques ont été observés dans les régions 1p, 9q, 16p, 19 et 22q (Gogusev et al., 2003). L'hypothèse du two-hit suggère qu'une perte de fonction de la protéine serait à l'origine du développement des kystes et cela est appuyé par des études d'ablation géniques effectuées chez la souris. En effet, même si les souris *Pkd1* et *Pkd2 knock-out* meurent *in utero*, des microkystes aux reins et au pancréas ont pu être observés à partir de E15.5 et E13.5-E14.5 respectivement (Kim et al., 2000; Lu et al., 1997; Lu et al., 2001; Wu et al., 2000).

Plusieurs études effectuées chez l'humain et la souris sont contradictoires à la théorie du *two-hit*. Par exemple, la perte des deux allèles *PKD1* ou *PKD2* implique une perte d'expression de la polycystine sauvage. Toutefois, plusieurs études d'immunohistochimie montrent que plus de 80 % des kystes rénaux ADPKD expriment la polycystine (Geng et al., 1996; Ong et al., 1999a; Ong et al., 1999b; Peters et al., 1996; Ward et al., 1996). Certains ont également montré que c'est la forme sauvage de la protéine qui est exprimée en utilisant des anticorps dans la partie tronquée de la protéine mutante (Ong et al., 1999a; Ong et al., 1999b). La seule façon de réconcilier cette observation avec le *two-hit* est de proposer que l'allèle normal subit principalement des mutations faux sens, soit le changement d'un acide aminé. Cependant, toutes les mutations somatiques identifiées jusqu'à maintenant sont des non sens, des insertions et des délétions et devraient toutes causer une perte d'expression de la polycystine sauvage (Koptides et al., 1999; Pei et al., 1999; Torra et al., 1999; Watnick et al., 2000). Chez la souris, le développement de kystes rénaux et hépatiques observé suite à la surexpression des gènes de *PKD1* et *TSC2* est aussi difficilement réconciliable avec la théorie du *two-hit* (Pritchard et al., 2000). De plus, il est peu probable que le modèle de trans-hétérozygotie puisse être à l'origine du développement des kystes puisque deux patients ayant chacun des mutations germinales dans les gènes de *PKD1* et *PKD2* ont été décrit (Pei et al., 2001). Un modèle similaire de trans-hétérozygotie a également été produit chez la souris (Wu et al., 2002). Dans les deux cas, le phénotype est un peu plus sévère, mais la nature focale des kystes persiste.

Étant donné que les analyses de LOH et de mutations somatiques ont été effectuées exclusivement sur des reins de patients ADPKD en phase terminale d'insuffisance rénale, il est probable que ces événements somatiques observés au niveau de l'allèle normal soient davantage impliqués dans l'expansion et la progression des kystes plutôt que dans leur initiation. Par contre, le mécanisme pathogénétique de perte de fonction protéique, appuyé par les souris *Pkd1* et *Pkd2* *knock-out*, pourrait être réconciliable avec un second mécanisme appelé effet de dosage.

1.7.2 Effet de dosage

Le développement de kystes rénaux chez les souris *Pkd1* et *Pkd2* homozygotes et hétérozygotes ainsi que chez les souris transgéniques *PKD1-TSC2* suggère que le dosage de la protéine pourrait être un mécanisme pathogénétique de la kystogénèse. Ces trois modèles murins montrent que tant une augmentation qu'une diminution de la polycystine pourrait initier le développement des kystes.

Chez les souris hétérozygotes les kystes apparaissent à l'âge adulte et progressent beaucoup plus lentement que chez les souris homozygotes (Lu et al., 1999; Lu et al., 2001; Wu et al., 1998). Parmi les différents *knock-out* de *Pkd*, les souris *Pkd2*^{WS25} montrent clairement une corrélation entre le développement des kystes et le dosage de la protéine. Ces souris ont un allèle instable (WS25) prédisposée à une inactivation suite à un événement de recombinaison homologue et la sévérité du phénotype rénal s'accroît avec la perte de l'allèle *Pkd2* (Wu et al., 1998).

Dans le cas des souris transgéniques *PKD1-TSC2*, la surexpression de la polycystine serait suffisante pour causer la formation de kystes rénaux et hépatiques chez les souris adultes (Pritchard et al., 2000). Toutefois, la validité de ce modèle est quelque peu contestée parce que le gène de *TSC2* est également présent. *TSC2* est un des deux gènes impliqués dans la sclérose tubéreuse, une maladie génétique où 30 % des patients développeront des kystes rénaux (Stillwell et al., 1987).

Les mécanismes moléculaires de kystogénèse sont relativement complexes et d'autres études seront nécessaires pour déterminer si le dosage de la protéine peut effectivement être un mécanisme pathogénétique des polycystines. Dans le but de vérifier si la surexpression de *Pkd1*, sans *Tsc2*, est suffisante pour initier le développement des kystes rénaux, nous avons généré des souris surexprimant uniquement le gène de *Pkd1*.

Chapitre 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 CONSTRUCTION PLASMIDIQUE

2.1.1 Enzymes de restriction et de modification

Les fragments d'ADN plasmidiques et les vecteurs sont digérés avec différents enzymes de restriction selon les recommandations du manufacturier (New England Biolabs Inc., Beverley, MA; Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON; Amersham Biosciences., Piscatway, NJ).

Lorsque la digestion enzymatique produit des extrémités incompatibles, la Klenow est utilisée afin de rendre franches les extrémités cohésives par remplissage. La réaction de Klenow se fait à 37 °C pendant 15 min en présence de 5 U de Klenow (Invitrogen) et 25 mM de dNTP pour chaque microgramme d'ADN. La Klenow est ensuite inactivée en chauffant à 65 °C pendant 10 min ou par une extraction phénol/chloroforme/isoamyl (24 :24 :1) et la phase supérieure est précipitée avec deux volumes d'EtOH 95 % et du NaCl (0.15 M final) à -20 °C toute la nuit ou à -80 °C pendant 1 h.

2.1.2 Production d'un vecteur-T

Afin de faciliter le clonage des produits de PCR, une thymidine a été ajoutée au plasmide *pbluescript* digéré avec un enzyme produisant des extrémités franches. Le plasmide digéré est incubé en présence de Taq polymérase (1 U/μg

plasmide/20 μ L) (Perkin Elmer, Norwalk, CT), de tampon 1X (50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8.3, 1.5 mM $MgCl_2$, BSA 200 mg/ml) et 2 mM dTTP pendant 2 h à 70 °C. L'absence des autres nucléotides (dATP, dCTP et dGTP) dans la réaction fait en sorte qu'une thymidine est ajoutée à l'extrémité 3' de chaque fragment. Suite à une extraction phénol et une précipitation, le vecteur-T peut être utilisé pour le clonage des produits de PCR.

2.1.3 Isolation des fragments d'ADN

Les fragments d'ADN digérés et modifiés sont isolés sur gel d'agarose (0.8-1.2 %) et extrait de l'agarose par électroélution à 85 V pendant 2 h à l'aide de membranes à dialyse *Spectra/Por*, 10 mm (Fisher, Pittsburgh, PA) et/ou précipités.

2.1.4 Réaction de polymérase en chaîne (PCR)

Plusieurs fragments d'ADN utilisés dans diverses étapes de clonages ont été générés par PCR. Pour ce faire, deux amorces spécifiques de la région à amplifier sont utilisées. L'amplification par PCR est effectuée dans un volume de 20 μ L par tube au moyen d'un appareil *Gene Amp PCR System 9 600*. La réaction de PCR se fait dans un tampon de PCR 1X avec 0.2 mM de dNTP, 2.5 U de Taq polymérase et 20 pmol de chaque amorce. Après 5 min de dénaturation à 94 °C, les conditions de PCR sont de trente cycles pour l'amplification et se terminent par un 10 min d'élongation à 72 °C. Le tableau II-I regroupe la

séquence des différentes amorces qui ont été utilisées pour l'amplification par PCR et le tableau II-II décrit les différents tampons et cycles de PCR utilisés.

TABLEAU II-I:

Séquences des amorces utilisées pour l'amplification par PCR (clonage).

Amorces	Séquence 5'-3'	Position	Taille (pb)
97-15	atgccgcccggcgcgctgct	<i>Pkd1</i>	1 361
02-01	Agccgggcagtgggtgtgcacacc	ATG - intron 1	
02-35	cctctgcatcgattggcacag	<i>Pkd1</i>	1 160
02-36	ggcacagaaaaaagaattcctcc	Intron 8 - exon 10	
02-37	ggaaggaattctttttctgtgc	<i>Pkd1</i>	860
02-38	gttttgctggatccgctgttg	exon 10 - intron 11	

LÉGENDE:

Séquences des amorces sens et antisens qui ont été utilisées pour amplifier des régions spécifiques de *Pkd1*.

TABLEAU II-II:

Description des tampons et des cycles de PCR (clonage).

Amorces	Tampon 10X	Cycle
97-15	100 mM Tris-HCl pH 8.8, 500 mM KCl,	94 °C 50 s, 63 °C 45 s, 72 °C 50 s
02-01	15 mM MgCl ₂ , 2.5 % formamide	
02-35	100 mM Tris-HCl pH 8.8, 500 mM KCl,	95 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 2 min
02-36	12.5 mM MgCl ₂	
02-37	100 mM Tris-HCl pH 8.8, 500 mM KCl,	95 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 2 min
02-38	12.5 mM MgCl ₂	

LÉGENDE:

Le tableau présente les différentes conditions de PCR utilisées pour amplifier spécifiquement chacun des fragments d'ADN.

2.1.5 Ligation

Les ligations sont effectuées à 4 °C ou 16 °C selon que les extrémités d'ADN sont franches ou cohésives. La réaction se fait pendant 16 h dans un volume de 5-10 µL en présence de tampon de ligation (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, polyéthylène glycol-8 000 2.5 % p/v), de BSA (0.1 mg/mL), d'ATP (1 mM), de ligase ADN T4 (0.5 U/µL) (Amersham) et d'ADN (60 ng/µL).

2.1.6 Transformation

Le produit de la ligation (100-200 ng d'ADN) est introduit dans des cellules bactériennes par choc thermique ou électroporation. Dans le cas de la transformation par choc thermique, l'ADN est d'abord incubé avec 100 µL de Tris 100 mM pH 8.0 et 200 µL de cellules compétentes *E. coli* DH5α (10⁸ cellules/mL) (Sambrook et al., 1989) pendant 30 min sur glace. Cette incubation est suivie d'un choc thermique à 37 °C pendant 5 min. Par la suite, 800 µL de milieu LB sont ajoutés et le tout est incubé sous agitation à 37 °C pendant 1 h avant d'être étalé sur un milieu sélectif. Les cultures sont étalées sur des pétris LB contenant 100 µg/mL du gène de résistance présent sur le vecteur, généralement l'ampicilline, puis incubées à 37 °C pendant 16 h. Pour les électroporations, la ligation d'ADN est diluée à 1 ng/µL dans de l'eau ou du TE (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.5) afin de diminuer la quantité de sel et 1-2 µL sont incubés sur glace 1 min avec 40 µL de cellules électrocompétentes

E. coli XL-1 (10^{10} cellules/mL). L'ADN est ensuite électroporé dans une cuvette de 0.2 cm en appliquant un voltage de 2.5 kV pendant 4.7 s avec un appareil *Gene Pulser* (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA). Suite à l'électroporation, 1 mL de milieu LB est immédiatement ajouté et le tout est incubé 1 h à 37°C avant d'être étalé sur un pétri LB avec une sélection à un antibiotique.

2.1.7 Mini préparation d'ADN plasmidique (lyse alcaline)

Les colonies isolées poussant sur des pétris sont repiquées, inoculées dans 1 mL de milieu LB contenant 100 µg/mL d'ampicilline puis, incubées à 37 °C pendant 16 h. Une adaptation de la technique classique de lyse alcaline (Sambrook et al., 1989) est utilisée afin d'isoler l'ADN plasmidique. Premièrement, le culot bactérien est resuspendu dans 100 µL de solution I (lysozyme 2 mg/mL, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM glucose, 10 mM EDTA pH 8.0) et gardé sur glace pour 15-30 min afin de lyser la paroi des bactéries. La lyse est favorisée en ajoutant 200 µL de solution II (0.2 N NaOH, SDS 1 %) sur glace pour 5 min. Après la lyse bactérienne, les protéines sont précipitées en ajoutant 150 µL de solution III (NaOAc 3 M pH 4.8), en incubant sur glace pendant 1 h. Les protéines sont centrifugées pendant 5 min à la température de la pièce et aux 400 µL de surnageant récupérés, 1 mL d'EtOH 95 % froid est ajouté afin de précipiter l'ADN plasmidique pendant 30 min à -20 °C. Finalement, le culot d'ADN est lavé avec 100 µL d'EtOH 70 % puis séché sous vide avant d'être resuspendu dans 50 µL de TE. Cet ADN plasmidique est digéré à l'aide d'un enzyme de restriction spécifique et visualisé sur gel d'agarose. Les clones ayant

intégrés l'insert dans la bonne orientation sont séquencés et conservés à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ dans 16 % de glycérol.

2.1.8 Maxi préparation d'ADN plasmidique (gradient de CICs)

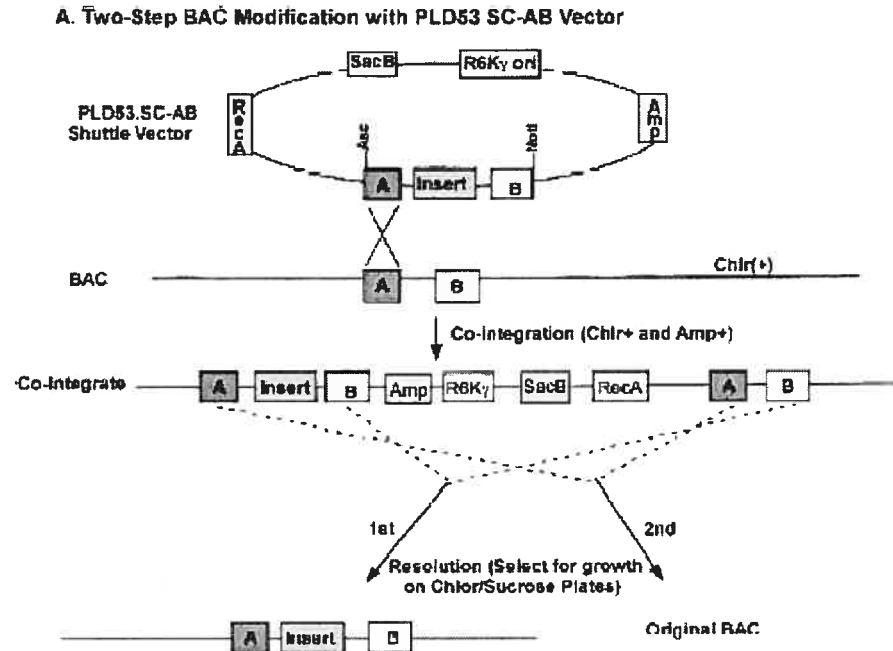
Après la croissance bactérienne et l'amplification du plasmide provenant d'une colonie isolée, les bactéries sont culottées par centrifugation dans un rotor à angle fixe de type Beckman J.A 14 à 3 000 rpm pendant 10 min à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Les culots bactériens sont resuspendus dans 10 mL d'une solution de sucrose 25 % et Tris-HCl (50 mM pH 8.0) puis incubés sur glace 5 min. Par la suite 2 mL d'une solution de lysozyme (10 mg/mL) sont ajoutés suivis d'une incubation de 10 min afin de lyser la paroi des bactéries. Pour inhiber certaines enzymes bactériennes, 2 mL d'EDTA (0.5 M pH 8.5) sont ajoutés suivis d'une autre incubation de 5 min et finalement 16 mL d'une solution contenant du Triton 0.1 %, de l'EDTA (62.5 mM pH 8.5) et du Tris-HCl (50 mM pH 8.0) sont ajoutés pour précipiter l'ADN génomique. Après une incubation d'au moins 15 min, ce mélange est déposé dans un tube de polyallomère et centrifugé dans un rotor à godets oscillants de type SW 28 à 21 000 rpm à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 1 h afin de culotter l'ADN génomique bactérien, les protéines et les débris cellulaires. La phase limpide du surnageant contenant l'ADN plasmidique est prélevée et déposée dans un second tube de polyallomère afin d'effectuer une centrifugation sur coussin de CICs. Pour ce faire, 3 mL d'une solution de CICs saturée dans du TE sont déposés au fond d'un tube contenant le surnageant d'ADN plasmidique à l'aide d'une longue pipette pasteur siliconisée. Le tout est centrifugé à l'aide d'un rotor SW 28 à 21 000 rpm

toute la nuit à 20 °C. Le lendemain, la phase inférieure du tube (7.6 mL), contenant l'ADN plasmidique est prélevée et mélangée avec 4.5 g de ClCs et 400 µL de BrEt à 4 mg/mL afin de purifier l'ADN plasmidique superenroulé sur un gradient de ClCs. Après une centrifugation à 50 000 rpm pendant 24 h à 15 °C dans un rotor de type T8-75, la bande contenant l'ADN superenroulé est prélevée à l'aide d'une aiguille 20 G ½. L'ADN purifié est extrait deux ou trois fois avec de l'isopropanol et est ensuite précipité à -20 °C pendant 1 h en présence de quatre volumes d'EtOH 70 % et de NaCl (0.15 M final). L'ADN est resuspendu et précipité à nouveau avec du NaCl (0.15 M final) et deux volumes d'EtOH 95 % puis lavé à l'EtOH 70 % avant d'être resuspendu dans du TE. Un rendement variant de 0.5 à 3 mg d'ADN est généralement obtenu.

2.2 RECOMBINAISON HOMOLOGUE DANS LES BAC

FIGURE 2.1 :

Recombinaison homologue dans les BAC



Méthode de Gong (Gong et al., 2002)

2.2.1 Préparation des cellules compétentes pour l'électroporation

Le BAC (chromosomes artificiels de bactéries) contenant les gènes de *Pkd1* et *Tsc2* est amplifié dans 200 mL de milieu LB à partir d'une pré-culture de 16 h (1/1 000) jusqu'à une densité optique entre 0.5 et 0.8 à 600 nm de longueur d'ondes. La culture est refroidie sur glace et les cellules sont culottées en centrifugeant à 3 000 rpm pendant 10 min à 4 °C. Les cellules sont ensuite resuspendues dans 10 mL de glycérol 10 % et centrifugées à nouveau. Cette dernière étape est répétée une deuxième fois et les cellules sont finalement

resuspendues dans un volume final de 1 mL de glycérol 10 % et conservées à -80°C dans des aliquots de 40 µL.

2.2.2 Premier événement de recombinaison : production de co-intégrats

Afin d'effectuer une recombinaison homologue dans les BAC, le vecteur navette *pld53* a été utilisé. Ce vecteur de 9.4 kb contient le gène de recombinaison RecA et un gène de résistance à l'ampicilline. Le *pld53* est transformé par électroporation dans des cellules de BAC électrocompétentes *E.coli* DH10B (10^{10} cellules/mL). Suite à l'électroporation, les cellules transformées sont incubées à 37 °C toute la nuit dans 5 mL de milieu LB chloramphénicol (12.5 µg/mL) et ampicilline (30 µg/mL). Le lendemain, la culture est diluée mille fois dans 5 mL de milieu LB chloramphénicol (12.5 µg/mL) et ampicilline (50 µg/mL) et incubé à 37 °C pendant 8 h. Le troisième jour, cette culture est diluée d'un facteur cinq mille dans le même milieu qu'au deuxième jour et incubée encore une fois à 37 °C pendant 8 h. Par la suite, une série de dilutions est effectuée et ces différentes dilutions sont étalées sur pétris LB avec une sélection chloramphénicol (12.5 µg/mL) et ampicilline (100 µg/mL) et incubées à 37 °C toute la nuit. Les colonies sont repiquées afin que des mini préparations d'ADN de BAC soit effectuées et les co-intégrats sont identifiés par buvardage Southern.

2.2.3 Deuxième événement de recombinaison : production de BAC recombinants

Deux à trois colonies de co-intégrats sont inoculées dans 5 mL de milieu LB chloramphénicol (12.5 µg/mL) et sucrose 6 % et incubées à 37 °C pendant 8 h. La culture est ensuite diluée cinq mille fois et étalée sur pétris LB chloramphénicol (12.5 µg/mL) et sucrose 6 % et incubée à 37 °C toute la nuit. Le lendemain, les colonies sont repiquées et striées sur deux pétris différents. Un des pétris est incubé immédiatement à 37 °C toute la nuit tandis que l'autre pétri doit être exposé à la lampe UV pendant 30 s avant d'être incubé à 37 °C. Les colonies sensibles aux UV sont repiquées afin d'effectuer des mini préparations d'ADN de BAC et identifier les BAC recombinants par buvardage Southern.

2.2.4 Mini préparation d'ADN de BAC (lyse alcaline)

Pour isoler l'ADN de BAC la technique de lyse alcaline utilisée est similaire à celle utilisée pour isoler l'ADN plasmidique. Contrairement à la technique décrite précédemment, il n'y a aucun temps d'incubation entre l'ajout des différentes solutions I, II et III et les ADN sont séchés à l'air libre.

2.2.5 Maxi préparation d'ADN de BAC (colonnes *Quiagen*)

Pour les grandes préparations d'ADN de BAC, les colonnes *Quiagen* (midi ADN plasmidique) (*Quiagen*, Valencia, CA) sont utilisées en suivant un protocole adapté aux BAC. Tout comme pour la grande préparation d'ADN plasmidique, une colonie isolée de BAC est amplifiée et culottée par

centrifugation à 3 000 rpm pendant 10 min à 4 °C. Le culot bactérien est resuspendu dans 40 mL de solution P1 (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA pH 8.0, RNase A 0.1 mg/mL) et la lyse bactérienne est effectuée en ajoutant 40 mL de solution P2 (0.2 N NaOH, SDS 1 %). Le tout est inversé lentement puis incubé sur glace au maximum 5 min. La lyse est ensuite neutralisée en ajoutant 40 mL de solution P3 (3 M KOAc pH 5.5) et les protéines et autres débris cellulaires sont culottés en centrifugeant à 7 000 rpm pendant 15 min à 4 °C. Le surnageant est transféré dans un bécher à l'aide d'une pipette 10 mL et filtré. Ce dernier est ensuite déposé sur une colonne préalablement équilibrée avec 30 mL de solution QBT (0.75 M NaCl, 50 mM MOPS, isopropanol 15 %, triton X-100 10 %). Il est à noter qu'à cette étape-ci, il est important de ne pas forcer la colonne et de laisser passer le surnageant par gravité seulement. Par la suite, la colonne est lavée avec 50 mL de la solution QC (1 M NaCl, 50 mM MOPS, isopropanol 15 %) et l'ADN est élué avec 15 mL de la solution QF (1.25 M NaCl, 50 mM Tris-Base, isopropanol 15 %) chauffée préalablement à 55 °C. Finalement, l'ADN est précipité avec 10 mL d'isopropanol à -20 °C pour toute la nuit et le lendemain, l'ADN est culotté en centrifugeant pendant 30 min à 9 000 rpm à 4 °C à l'aide d'un rotor SA 600. Le culot est séché à l'air libre et resuspendu dans 100 µL de TE. Un rendement d'environ 50 µg d'ADN est généralement obtenu pour chaque préparation.

2.3 OBTENTION DES LIGNÉES DE SOURIS TRANSGÉNIQUES

2.3.1 Préparation des fragments à microinjecter

Les fragments d'ADN utilisés pour la microinjection doivent être exempts de toutes impuretés. Dans le cas de l'ADN plasmidique, une méthode de purification sur gradient de CICs suivi d'une dialyse est utilisée. L'ADN provenant d'une maxi préparation (25 µg) est digéré afin d'être excisé du vecteur plasmidique. Le tout est purifié sur agarose et précipité pour être resuspendu dans 2.4 mL de TE. Par la suite, 3.2 g de CICs ultrapure (Invitrogen) sont ajoutés et mélangés doucement en inversant jusqu'à dissolution complète. Le tout est centrifugé avec un rotor de type SW 60 à 40 000 rpm pendant 48 h à 22 °C. Par la suite, des fractions de 200 µL sont récoltées et 3 µL de chaque fraction sont mis sur gel d'agarose 1%. Les fractions contenant l'ADN (généralement deux) sont mises ensemble et dialysées. Pour ce faire, les fractions à dialyser sont placées dans une membrane à dialyse *Spectra/Por* et dialysées contre un volume de tampon dix milles fois plus grand (400 µL pour 4 L de tampon) à 4 °C en changeant le tampon (10 mM NaCl, 5 mM Tris pH 7.4, 0.2 mM EDTA) deux fois par jour. Par la suite, l'ADN dialysé est quantifié sur gel d'agarose et dilué dans un tampon d'injection (5-10 mM Tris pH 7.4, 0.1 mM EDTA) à une concentration de 3 ng/µL. Une concentration plus élevée d'EDTA de même que la présence de MgCl₂ est toxique pour les oeufs (Brinster et al., 1985). Il est essentiel de toujours utiliser du matériel stérile et de rincer tout ce qui est utilisé avec de l'eau filtrée.

La préparation des fragments à microinjecter provenant d'ADN de BAC a été effectuée selon la technique de digestion à la β -agarase. Dans un premier temps, une grande préparation d'ADN de BAC (40-50 μ g) est digérée et séparée sur un gel d'électrophorèse à champs pulsés (agarose 1.0 %) dans du TBE 0.5X (44 mM Tris-Base, 44 mM acide borique, 1 mM EDTA). Suite à une migration de 20 h avec un *switch-time* de 5 s à 14 °C, le fragment d'ADN doit être excisé du gel. Étant donné que le fragment à microinjecter ne doit pas avoir été coloré au BrEt, seuls les extrémités du gel sont colorées afin de positionner la hauteur du fragment d'ADN à découper. Ce fragment d'ADN est ensuite transféré dans un gel d'agarose mou 1.0 % LMP également préparé dans du TBE 0.5 X. La migration de ce deuxième gel d'électrophorèse à champs pulsés s'effectue selon les mêmes conditions que le premier. Par la suite, le fragment est excisé du gel, découpé en blocs de 1.5 cm de largeur et chacun des blocs est équilibré dans 50 mL de tampon d'injection (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mM EDTA pH 7.5, 100 mM NaCl) à 4 °C pour la nuit. Le lendemain, les blocs sont déposés sur des filtres *Whatman grade 1* afin d'éliminer le surplus de tampon. Chacun des blocs est ensuite placé dans un tube de 1.5 mL afin de faire fondre l'agarose LMP en incubant 10 min à 65 °C. Par la suite, l'agarose liquifié est digéré avec de la β -agarase (New England Biolabs) (2 U/100 μ L) en incubant 2 h à 42 °C. Si nécessaire, on ajoute de la β -agarase (1 U/100 μ L) à nouveau et on incube à 42 °C pendant 1 h. La digestion est suivie d'une incubation de 10 min sur glace afin de s'assurer que l'agarose est complètement digéré. L'ADN est ensuite concentré sur des filtres *Millipores* (Ultrafree-MC 100000 NMWL Filter unit) en centrifugeant

à 3 500 rpm jusqu'à ce que le volume soit entre 40 et 60 μL . Les filtres sont incubés à 4 °C pour la nuit et le lendemain l'ADN contenu sur chacun des filtres est combiné dans un même tube en utilisant des embouts coupés. Finalement, un aliquot d'environ 10 μL est déposé sur un gel d'électrophorèse à champs pulsés (agarose 1.0 %) afin de vérifier l'intégrité de l'ADN et ce dernier est ensuite dilué à une concentration de 1 ng/ μL . Il est important de noter que tous les tampons utilisés pour la préparation et la migration du gel d'électrophorèse à champs pulsés doivent être préalablement autoclavés et l'appareil à électrophorèse doit être nettoyé avec du tampon stérile.

2.3.2 Microinjection

La production de souris transgéniques implique trois étapes principales : l'obtention d'œufs fertilisés au stade d'une cellule, la microinjection d'ADN dans un des deux pro-noyaux et la réimplantation de ces œufs dans l'oviducte d'une femelle pseudo-gestante (Hogan et al., 1986). Le fond génétique des souris utilisées pour obtenir les œufs dérivent d'un croisement de souris C57Bl/6J et CBA/J. Dans un premier temps, les œufs F2 utilisés pour la microinjection sont obtenus à partir de femelles F1 âgées de trois à cinq semaines et superovulées. Pour ce faire, 5 U d'hormone GSJG (Novormon 5000, Belleville, ON) sont injectées de manière intrapéritonéale 72 h avant la microinjection pour la maturation des follicules. Environ 46 h plus tard, 5 U de HCG (Sigma) sont injectées intrapéritonéalement afin de rompre les follicules matures. Les femelles superovulées et fécondées par des mâles F1 sont ensuite sacrifiées par dislocation

cervicale et les oviductes sont déposés dans un pétris contenant du milieu M2 (Specialty Media, Phillipsburg, NJ). Les œufs sont récupérés des oviductes dans un second pétris contenant 2.5 mL de M2 et 70 μ L d'hyaluronidase 10 mg/mL (Sigma, type IV-S) afin de se débarrasser des cellules cumulus oophorus qui entourent les œufs. Ensuite, les œufs sont subséquemment transférés dans un troisième pétris de M2 puis dans un pétris de M16 (Specialty Media) qui est un milieu plus physiologique pour maintenir les œufs en bon état. Les œufs sont placés dans un incubateur à 37 °C sous 5 % de CO₂ puis, microinjectés un à un avec de l'ADN linéaire évaluée à 3 ng/ μ L pour les plasmides et à 1 ng/ μ L pour les BAC. Finalement, les œufs microinjectés sont transférés (au stade d'une cellule) dans l'oviducte d'une femelle pseudo-gestante anesthésiée avec 0.015-0.017 mL d'avertine 2.5 %/g (poids de la souris). Après 19-21 jours de gestation, les souriceaux naissent et sont analysés à trois semaines pour déterminer si le transgène est présent. Ceux ayant incorporé le gène microinjecté sont appelés souris transgéniques fondatrices.

2.3.3 Établissement des lignées transgéniques

Les souris transgéniques fondatrices sont accouplées avec des souris F1 de même souche (C57Bl/6J X CBA/J). La progéniture issue de chaque souris fondatrice est appelée lignée transgénique et toutes les souris d'une même lignée ont le même nombre de copies du transgène intégré au même locus chromosomique. L'intégration d'un transgène s'effectue souvent en tandem selon une orientation tête-à-tête, queue à queue ou tête-à-queue. Il arrive parfois que le

transgène s'intègre à deux endroits différents dans le génome de la souris. Dans ce cas-ci deux lignées de souris transgéniques sont obtenues avec une seule souris fondatrice.

2.4 ÉTUDE DE LA STRUCTURE DU TRANSGÈNE

2.4.1 Extraction d'ADN

L'ADN génomique est extrait selon la technique de Hogan (Hogan et al., 1986) à partir de 0.5-1.0 cm de queue digérée toute la nuit à 55 °C sur une plateforme agitatrice dans un tampon (10 mM Tris pH 8.0, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, SDS 10 %) en présence de 15 µL de pronase (20 mg/ml) (Roche, Laval, Qc). Une première extraction protéique avec 600 µL de phénol équilibré avec du tampon 1 M Tris pH 8.0 est effectuée en agitant vigoureusement les tubes 3 min puis, en les centrifugeant 3 min à 13 500 rpm. La phase phénolée contient les protéines alors que le surnageant contient l'ADN génomique. Une deuxième extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamyl (24 :24 :1) est effectuée de façon similaire. L'ADN génomique, contenu dans la phase aqueuse prélevée, est précipité en ajoutant 60 µL de NaOAc (3 M pH 6.0) et 600 µL d'EtOH 95 %. Le tout est mélangé par inversion puis centrifugé 3 min. Finalement, le culot d'ADN génomique est lavé avec 100 µL d'EtOH 70 %, séché sous vide et resuspendu dans 100 µL de TE. Un rendement d'environ 1 µg/µL d'ADN génomique est obtenu.

2.4.2 Transfert Southern

Les échantillons d'ADN génomique (~10 µg) sont digérés à 37 °C toute la nuit dans un volume final de 30 µL en présence de tampon 1X correspondant à l'enzyme de restriction utilisé, de BSA (0.1 mg/mL), de spermidine (0.003 M), de RNase A (0.017 M) et d'enzyme (25 U). Les échantillons digérés sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 1.0 %. Les contrôles positifs correspondent à 1 et 10 copies du transgène. Le gel est ensuite traité dans une solution dénaturante (1.0 M NaCl, 0.5 M NaOH) 30 min et dans une solution neutralisante (3.0 M NaCl, 0.5 M Tris pH 7.4) 1 h. L'ADN est transféré sur des membranes Hybond-N (Amersham) avec du SSC 10X (3.0 M NaCl, 0.15 M sodium citrate pH 7.0) selon la technique de buvardage Southern (Southern, 1975). L'ADN est ensuite fixé à la membrane par exposition aux UV à l'aide d'un appareil *UV Stratalinker*, 2 400. Les membranes sont préhybridées à 65 °C dans une solution de SSC 5X, de Denhart 10X (1 g de ficoll, type 400, Pharmacia; 1 g de polyvinylpyrrolidone; 1 g de BSA, fraction V dans 50 mL d'eau), de SDS 0.1 % et d'ADN de sperme de saumon (0.1 mg/mL) pour au moins 4 h. L'hybridation est effectuée dans les mêmes conditions pendant 16 h avec des sondes spécifiques au transgène. Ces sondes sont marqués au ³²P par *Nick translation* (Ausubel et al., 1987) ou par amorces aléatoires pour les fragments d'ADN de moins de cinq cent paires de bases. Dans le cas de la technique d'amorces aléatoires, l'ADN (100 ng) et les amorces aléatoires pd(N)₆ (600 ng) sont incubés à 100 °C pendant 3 min et déposés sur glace 5 min. Par la suite, du tampon *Nick mix* 1X (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 10 mM β-mercaptoéthanol), des dATGTP (0.6 mM), du α-

^{32}P -dCTP (92.5 kBq) et de la Klenow (4 U) sont ajoutés et le tout est incubé à 37 °C pendant 30 min. Finalement, l'enzyme est inactivé en chauffant à 65 °C pendant 5 min. Les sondes doivent avoir un taux d'incorporation de radioactivité de 30-60 %. Ce dernier est déterminé par le ratio d'incorporation spécifique sur l'incorporation totale. Pour ce faire, une petite quantité de sonde est mélangée à 100 μL de TE et déposée sur deux filtres *Whatman grade 1*. Le premier filtre est lavé deux fois dans une solution de phosphate (0.25 M NaH_2PO_4 , 0.25 M Na_2HPO_4) tandis que le second est placé directement dans un tube à compteur à scintillation. Suite à l'hybridation, les membranes sont lavées dans la solution I (SSC 2X, SDS 0.1%) 30 min à 65 °C, dans la solution II (SSC 1X, SDS 0.1 %) 30 min à 65 °C et dans la solution III (SSC 0.1X, SDS 0.1 %) 1 h à 65 °C. Les membranes sont ensuite exposées avec des films *X-Omat blue XB-1* (Eastman Kodak, Rochester, NY) pendant au moins 24 h à -80 °C.

Exemple de calcul des copies d'ADN linéaire:

Construction *SBPkdI β* : 15.8 kb

10 μg ADN génomique/puits \longrightarrow 6×10^6 kb d'ADN génomique diploïde

1 copie = ? pg ADN linéaire \longrightarrow 15.8 kb d'ADN linéaire (construction)

1 copie = 26.3 pg

2.4.3 PCR

Le génotypage de certaines souris ainsi que la détection de polymorphismes ont été effectués par PCR selon la technique décrite précédemment. Les tableaux II-III et II-IV décrivent les différentes amorces et conditions de PCR utilisées.

TABLEAU II-III :

Séquences des amorces utilisées pour le génotypage et la détection de polymorphismes.

Allèles	Amorces	Séquence 5'-3'	Position	Taille (pb)
Neo	97-11	gggaggaggagctgg	<i>Pkd1</i> exon 1	800
	98-5	gatctctgtcatctcaccttgct	neo	
Sauvage	97-11	gggaggaggagctgg	<i>Pkd1</i> exon 1	419
	03-02	ctagcgtctggatccagcggc	<i>Pkd1</i> exon 1	
Transgénique	03-46	catttgcttctgacacaactgtgttc	Pr β -globine	253
	03-02	ctagcgtctggatccagcggc	<i>Pkd1</i> exon 1	
Polymorphisme	02-47	ctgcacccatgtcaggtgta	Pr <i>Pkd1</i>	199
	02-48	gttctaggccagccaactc	Pr <i>Pkd1</i>	

LÉGENDE :

Le tableau présente les différentes amorces utilisées pour différencier les allèles néo, sauvages et transgéniques.

TABLEAU II-IV :

Description des tampons et cycles de PCR utilisés (génotypage et polymorphismes).

Amorces	Tampon 10X	Cycle
97-11		
98-5	100 mM Tris-HCl pH 8.8, 500 mM KCl,	94 °C 50 s, 63 °C 50 s,
03-02	10 mM MgCl ₂ , 5% DMSO	72 °C 50s
03-46		
02-47	100 mM Tris-HCl pH 8.8, 500 mM KCl,	94 °C 30 s, 54 °C 30 s,
02-48	10 mM MgCl ₂	72 °C 50s

LÉGENDE :

Le tableau présente les conditions de PCR utilisées.

2.5 VÉRIFICATION DE L'EXPRESSION DU TRANSGÈNE**2.5.1 Extraction de l'ARN**

L'ARN total est extrait des organes en utilisant la méthode d'extraction au thiocyanate de guanidium (Chirgwin et al., 1979). Les cellules sont lysées au polytron dans 3 mL d'une solution de GuSCN 4 M dans de l'eau DEPC (diéthylpolycarbonate) contenant du sarcosyl 0.5 %, du citrate de sodium (25 mM pH 7.5) et du β -mercaptoéthanol (0.1 M). Ensuite, le lysat (2.5 mL) est déposé sur un coussin de 1.4 mL de ClCs (5.7 M) contenant du NaOAc (25 mM pH 5.0), de l'EDTA (10 mM) et du DEPC 0.2 %. La centrifugation de l'ARN sur un coussin de ClCs est effectuée dans un rotor SW 60 à 36 000 rpm pendant 16 h à 20 °C. Le culot d'ARN est resuspendu quatre à cinq fois dans 100 μ L de GuHCl (7.5 M

pH 7.0). Cette solution de GuHCl contient également du citrate de sodium (25 mM pH 7.0) et du DTT (5 mM). L'ARN contenu dans ces 100 μ L est transféré dans un tube stérile et 100 μ L de GuHCl 7.5 M sont ajoutés sur le culot pour une deuxième resuspension. Les 200 μ L d'ARN resuspendus sont précipités avec 5 μ L d'acide acétique (1 M) DEPC et 102 μ L d'EtOH 95 % froid pendant 1 h à -20 °C. L'ARN précipité est centrifugé à 13 000 rpm pendant 45 min à 4 °C et lavé avec 100 μ L d'EtOH 95 % froid. Le culot d'ARN séché est resuspendu avec 50 μ L d'eau DEPC, centrifugé et le surnageant contenant l'ARN est récolté. La resuspension du culot d'ARN est poursuivie avec 25 μ L d'eau DEPC jusqu'à resuspension complète ou au maximum quatre fois. L'ARN obtenu est précipité avec du NaOAc (0.1 M final pH 5.0) et deux volumes d'EtOH 95 % froid à -20 °C toute la nuit. L'ARN est centrifugé, lavé et resuspendu dans 25–100 μ L d'eau DEPC selon la taille du culot. La quantification de l'ARN est faite par densité optique dans du triéthanolamine (0.01 M) et l'intégrité de l'ARN (~ 0.5 μ g) est vérifiée sur gel d'agarose 1.5 %/formaldéhyde (2.2 M) par l'identification des ARN ribosomiques 28S et 18S.

2.5.2 RT-PCR

Avant la synthèse de l'ADNc un traitement à la DNaseI est d'abord effectuée sur les ARN afin d'éviter les contaminations d'ADN. Pour ce faire, 3 μ g d'ARN sont combinés à 0.1 U de DNaseI (sans RNase) et 15 U de RNasin dans un tampon de DNaseI 1X (40 mM Tris pH 7.4, 6 mM $MgCl_2$). La réaction est incubée pendant 1 h à 37 °C et l'arrêt de la réaction se fait par une extraction

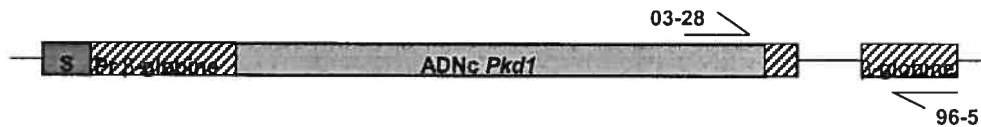
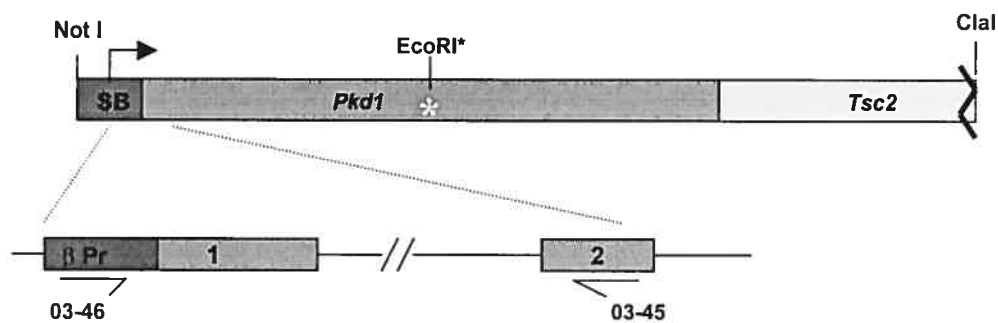
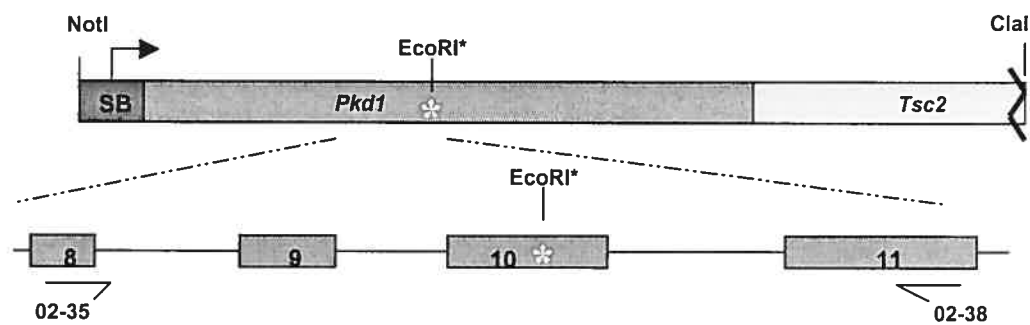
phénol/chloroforme/alcool isoamyl (24 : 24 : 1). L'ARN est ensuite précipité avec du NaOAc (0.25 M final pH 5) et 2 volumes d'EtOH 95 % froid.

Pour effectuer la synthèse de l'ADNc, l'ARN est combiné à 500 ng d'amorces aléatoires pd(N)₆ (Amersham) et le tout est chauffé à 65 °C pendant 5 min. Ensuite, la réaction de transcription inverse est effectuée en ajoutant 2 mM dNTP, 10 mM DTT, 1 U/μL RNasin (Amersham) et 10U/μL de transcriptase inverse M-MLV (Invitrogen) dans un tampon de RT-PCR 1X (50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂). La réaction est incubée à 37 °C pendant 1 h et l'enzyme est inactivé en chauffant à 65 °C pendant 10 min. La figure 2.2 et les tableaux II-V et II-VI décrivent la séquence des amorces utilisées ainsi que la description des tampons et des cycles de PCR. Les échantillons de PCR ont été déposés sur gel d'acrylamide 8 %. Le gel a ensuite été coloré au BrEt et les échantillons ont été quantifiés avec le logiciel *Image Quant 5.0*.

FIGURE 2.2:

Position relative des amorces sens et antisens sur les différents gènes.

SBP:

SBP*Pkd1*_{TAG}:

S16:

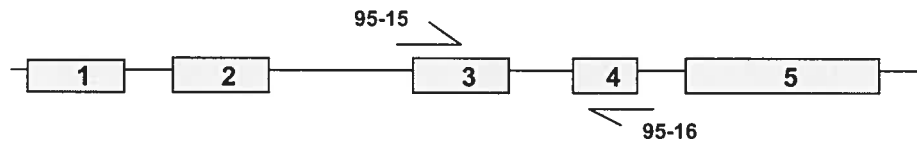


TABLEAU II-V :

Séquences des amorces et taille des amplifications pour les analyses d'expression (RT-PCR).

Transcrit	Amorces	Séquence 5'-3'	ADNc (pb)	ADN (pb)
SBP	03-28	aatgcctgagcttcacactgg	264	1113
	96-5	tgacagcaagaaagcgagc		
SBP <i>kdl</i> _{TAG}	02-35	cctctgcatcgattggcacag	370/385	2000
	02-38	gtttgcctggatccgctgttg		
SBP <i>kdl</i> _{TAG}	03-46	catttgcttctgacacaactgtgttc	300	13 971
	03-45	ccagcgtctgaagtaggtgtggg		
<i>S16</i>	95-15	aggagcggattgctggtgtgga	104	194
	95-16	gctaccaggcctttgagatgga		

LÉGENDE:

Séquences des amorces sens et antisens qui ont été utilisées pour l'analyse de l'expression des transgènes SBP et SBP*kdl*_{TAG} de même que pour le contrôle interne *S16*.

TABLEAU II-VI :

Description des tampons et des cycles de PCR utilisés (RT-PCR).

Amorces	Tampon 10X	Cycle
03-28	100 mM Tris-HCl pH 8.5, 500	94 °C 30 s, 62 °C 30 s, 72 °C 1 min
96-5	mM KCl, 15 mM MgCl ₂	
02-35	100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500	95 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 2 min
02-38	mM KCl, 7.5 mM MgCl ₂	
03-45	100 mM Tris-HCl pH 8.5, 500	95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 50 s
03-46	mM KCl, 7.5 mM MgCl ₂	(X 26)
95-15	100 mM Tris-HCl pH 8.5, 500	95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 50 s
95-16	mM KCl, 7.5 mM MgCl ₂	(X 26)

LÉGENDE :

Le tableau présente les différentes conditions de PCR utilisées.

2.5.3 Protection à la RNase

L'ARN total extrait des reins des souris transgéniques est hybridé avec une sonde ARN radioactive afin de former un ARN double-brin qui sera révélé sur un gel dénaturant. Tout d'abord, la matrice d'ADN linéarisée (1 µg/µL) est transcrite en sonde ARN, selon la méthode de Melton (Melton et al., 1984). La transcription se fait en présence d'un tampon de transcription 1X (50 mM Tris pH 8.0, 6 mM MgCl₂, 10 mM spermidine, 0.02 M DTT), de RNasin (32.6 U), de XTP (A,G,C) (0.5 mM chacun), d'UTP (25 µM), d' α -³²P-UTP (1.85 MBq) et de T7 RNA polymérase (120 U). Cette réaction de polymérisation est incubée à 37 °C pendant 1 h et un taux d'incorporation de plus de 80 % doit être obtenu. La matrice d'ADN est ensuite digérée, afin d'éviter que cet ADN non-marqué hybride avec l'ARN, en incubant ce mélange avec de la DNase I (10 µg/µL) et de la RNasin (32.6 U) à 37 °C pendant 10 min. Après une extraction au phénol pour enlever les protéines, la sonde d'ARN est purifiée sur une colonne de Séphadex G-100 (Amersham) à l'aide d'un tampon d'élution (10 mM Tris pH 7.0, 1 mM EDTA, SDS 0.1 %). La fraction récoltée contenant la sonde est précipitée avec un dixième de volume de NaOAc (3 M), de l'ARNt de levure (50 µg/mL) et deux volumes d'EtOH 95 % froid. Chaque échantillon d'ARN (10-15 µg) est préalablement séché sous vide et hybridé dans une solution de formamide 80 %, tampon d'hybridation 1X (40 mM Pipes pH 6.8, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA) et 4 ng de sonde. La réaction d'hybridation est effectuée à 45 °C pendant 16 h. Après l'hybridation, l'ARN simple-brin est digéré à 37 °C pendant 1 h avec de la RNase A (40 µg/mL) (Roche) et de la RNase T1 (2 µg/mL) (Sigma) dans 300 µL d'un

tampon de digestion (10 mM Tris pH 7.5, 5 mM EDTA, 0.3 M NaCl). Cette réaction est arrêtée en incubant 15 min à 37 °C avec 20 µL d'une solution de SDS 10 % et 50 µg de protéinase K (Roche). Après une extraction au phénol/chloroforme/isoamyl suivie d'une précipitation de l'ARN double-brin, les échantillons sont séchés puis, resuspendus dans une solution de formamide 80 % et de colorant (bleu de bromophénol 0.5 %, bleu de xylène cyanol 0.5 %, TBE 2.5X). Les échantillons préalablement chauffés à 90 °C pendant 1 min sont soumis à une électrophorèse sur un gel d'acrylamide 6 %, d'urée 7 M et de TBE 1X. Après une polymérisation d'au moins une heure à la température de la pièce, une migration préliminaire à 1 600 V dans du TBE 1X est effectuée afin de réchauffer le gel. Suite à l'électrophorèse, le gel est couvert d'une pellicule transparente puis exposé sur un film *X-Omat blue XB-1* à -80 °C pendant au moins 16 h.

Pour la préparation du marqueur de poids moléculaire marqué au ^{32}P , 500 ng de pBR322 digéré MspI sont incubés 15 min à température pièce en présence de tampon *Nick translation* 1X, d' $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP (111 kBq) et de la Klenow (5 U). La réaction est ensuite arrêtée en précipitant avec quatre volumes d'EtOH 95 %, de NH_4OAc (3.75 M final) et d'ARNt de levure (20 µg) à -80 °C pendant 30 min. Le culot est ensuite resuspendu dans un tampon 80 % formamide et colorant (décrit précédemment).

2.6 PATHOLOGIE

2.6.1 Analyse des protéines urinaires par SDS-PAGE

L'essai de *Bradford* est utilisé afin de quantifier les protéines urinaires. Pour ce faire, 1 mL du réactif de Bradford (dilué 1 : 4 dans H₂O) est ajouté aux échantillons d'urines (10 µL dilués dans 250 µL d'H₂O) et le tout est mélangé par inversion. Les échantillons sont ensuite incubés 1 h à température pièce et la densité optique de chaque échantillon est mesurée à 595 nm.

Les protéines urinaires (50 µg) sont précipitées à l'aide du TCA 10 % (acide trichloroacétique) et resuspendues dans 40 µL de tampon d'échantillon 1X (800 mM M Tris-SDS pH 6.8, 10 % glycérol, 0.5 % SDS, 5 % 2-mercaptoéthanol, 0.001 % bleu de bromophénol). Afin de solubiliser le culot protéique, les échantillons sont bouillis pendant 5 min avant d'être déposés sur un gel de SDS-PAGE. Le gel de séparation contient 8% de polyacrylamide, du Tris (0.38 M pH 8,8) et du SDS (3.5 mM) et le gel de concentration est fait de polyacrylamide 4 %, de Tris (25 mM pH 6.8) et de SDS (0.7 mM). La migration des échantillons se fait à 50 V pendant 16 h dans un tampon d'électrophorèse 0.5X (12.5 mM Tris, 100 mM glycine, 1.7 mM SDS). Suite à la migration, le gel est coloré au bleu de coomassie 1 h et décoloré plusieurs heures dans une solution de décoloration (acide acétique 5 %, MeOH 25 %).

2.7.2 Prélèvement des organes

Les organes tels que les reins, la rate, le cœur, les poumons, le foie, le cerveau et les os sont prélevés chez des souris transgéniques de même que chez des souris contrôles du même âge afin d'effectuer une analyse morphologique au niveau tissulaire et cellulaire.

2.7.3 Fixation des organes prélevés

Les organes prélevés sont fixés 16 h dans une solution de formaline (formaldéhyde 10 % dans du PBS 1X (v/v)) ou paraformaldéhyde 4 % (paraformaldéhyde 4 % dans du PBS 1X (v/v)) avant d'être inclus en paraffine et utilisés pour faire des coupes histologiques.

Chapitre 3

RÉSULTATS

3.1 SOURIS TRANSGÉNIQUES SBP

Notre objectif est de vérifier que la surexpression du gène de *Pkd1* murin (*Pkd1*) peut être un mécanisme pathogénétique et causer la kystogénèse rénale *in vivo*. Pour ce faire, nous avons généré des souris surexprimant *Pkd1* à l'aide de l'ADN complémentaire de ce gène (ADNc). Afin de cibler l'expression du transgène spécifiquement aux reins, les éléments régulateurs rénaux spécifiques SB soit l'*enhancer SV40* et le promoteur du gène de β -globine humain ont été insérés en amont du gène (Trudel et al., 1991). De plus, la partie 3' du gène de β -globine humain comprenant un intron et le signal de polyadénylation a été ajoutée en aval afin de conférer un épissage approprié et une plus grande stabilité au transcrit.

3.1.1 Production du plasmide *SBPkd1 β*

Nous avons obtenu du Dr Frischauf (Harvard Medical School) un plasmide contenant l'ADNc de *Pkd1* et ce dernier a été utilisé comme matériel de départ afin de produire le plasmide final *SBPkd1 β* . Les jonctions de ce plasmide ont été séquencées et nous avons déterminé que l'ADNc du gène de *Pkd1* utilisée commence 17 pb avant le codon d'initiation de la traduction et se termine 128 pb après le codon de terminaison pour un total de 13.3 kb.

Suite au séquençage, deux étapes de clonage ont été nécessaires pour insérer les éléments régulateurs rénaux spécifiques SB et le 3' du gène de β -globine. Pour la première étape de clonage, nous avons inséré en aval de *Pkd1* la partie 3' du gène de β -globine humain comprenant une partie de l'exon 2, l'intron 2, l'exon 3 et le 3'UTR. Pour ce faire, un fragment de 1.6 kb digéré BamHI-MscI a été inséré dans le site SphI suite à une réaction de polymérase afin de rendre toutes les extrémités franches. Par la suite, les éléments régulateurs SB ont été insérés en amont de l'ADNc de *Pkd1* et pour ce faire, un fragment de 0.9 kb digéré XbaI-EcoRV a été inséré dans le site XbaI. Pour cette deuxième étape de clonage, la polymérase a également été utilisée afin que toutes les extrémités produites par les digestions enzymatiques soient compatibles. Suite à ces deux étapes de clonage le plasmide obtenu a été surnommé *SBPkd1 β* et toutes ces jonctions ont été séquencées afin de vérifier l'intégrité du transgène. Finalement, le transgène de 15.8 kb a été excisé du vecteur procaryote par une digestion NotI et a ensuite été microinjecté dans des œufs fertilisés (C57Bl/6J X CBA/J) F2 afin de générer des souris transgéniques SBP.

3.1.2 Détection et intégrité du transgène SBP

La microinjection du fragment *SBPkd1 β* nous a permis d'obtenir six souris fondatrices SBP. La présence et l'intégrité du transgène dans le génome de la souris ont été déterminées par une analyse de type Southern (figures 3.1 et 3.2).

Pour la détection du transgène, une sonde interne couvrant les exons 7 à 15 de *Pkd1* a été utilisée. L'utilisation de cette sonde combinée à la digestion EcoRI de l'ADN génomique produit un doublet de 6.3 et 7.6 kb dans le cas du transgène (ADNc) tandis que dans le cas de l'endogène (ADN génomique) une bande à 9.4 kb est observée. Cette analyse nous a également permis d'évaluer le nombre de copies du transgène qui ont été intégrées dans le génome de chacune des souris fondatrices en comparant le transgène aux copies préalablement calculées. Les caractéristiques moléculaires de chacune des lignées de souris SBP sont présentées dans le tableau III-I.

TABLEAU III-I :

Caractéristiques moléculaires des souris SBP.

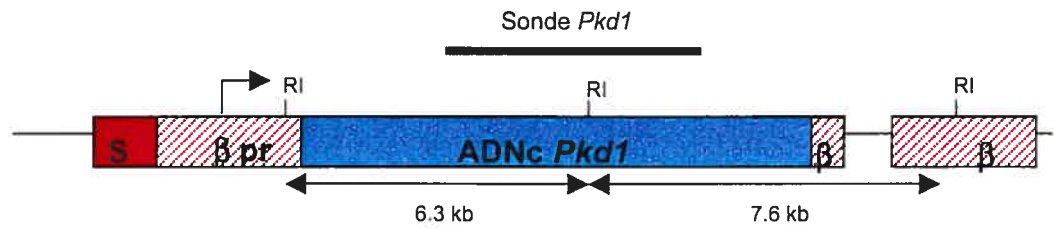
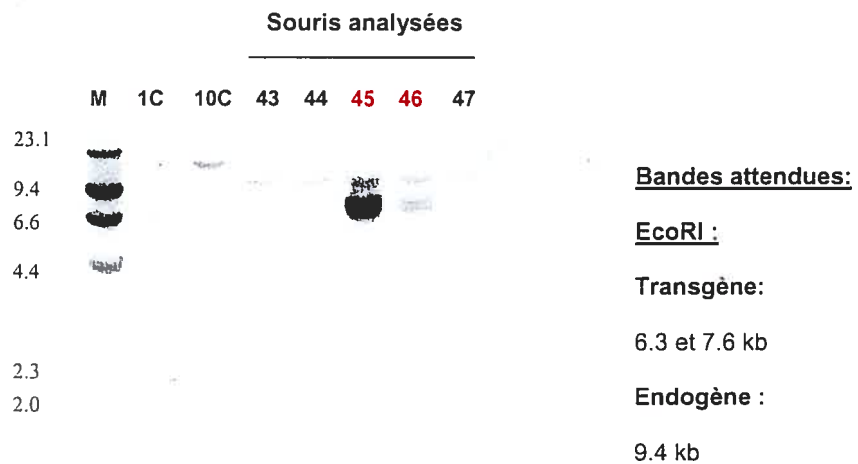
Lignées de souris	# Copies	Intégrité	Expression
42	2	√	Non-déTECTable
45	5	√	Oui
46	2	√	Non-déTECTable
63A	10	√	Oui
63B	5	√	Oui
65	40	√	Oui
68A	10	√	Oui
68B	40	√	Non-déTECTable

LEGENDE :

Huit lignées de souris SBP ont été générées à partir de six souris fondatrices. Le nombre de copies, l'intégrité et l'expression du transgène ont été déterminés pour chacune des lignées de souris SBP.

FIGURE: 3.1

Détection génomique du transgène SBP.

Sonde *Pkd1* (exons 7-15)

LÉGENDE :

La présence du transgène a été déterminée par Southern suite à une digestion EcoRI. Une sonde interne couvrant les exons 7 à 15 de *Pkd1* a été utilisée.

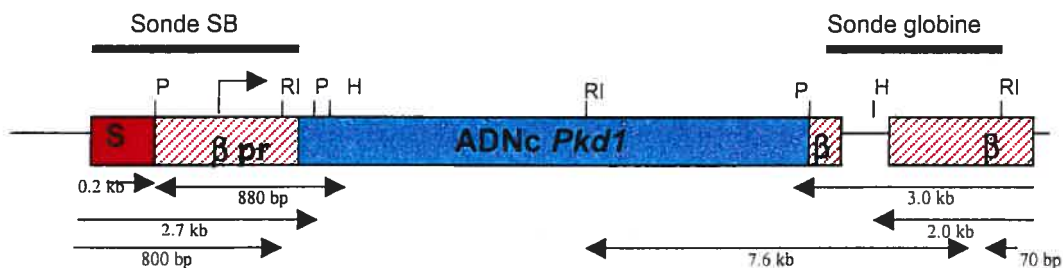
M- marqueur λ HindIII; 1C et 10C- une copie et dix copies du transgène; S- *enhancer SV 40*; β Pr- promoteur du gène de β -globine; β - exons 2-3 et 3'UTR du gène de β -globine; RI- EcoRI.

Le transgène étant relativement grand (15.8 kb), nous avons également employé des sondes spécifiques au transgène aux extrémités 5' et 3' afin de vérifier l'intégrité des jonctions. Pour l'extrémité 5', nous avons utilisé une sonde de 0.9 kb couvrant les éléments régulateurs SB (figure 3.2) alors que pour l'extrémité 3', une sonde couvrant les exons 2 à 3 et le 3' UTR du gène de β -globine a été employée (figure 3.2). Selon l'orientation dans laquelle le transgène s'est intégré dans le génome, les bandes attendues peuvent différer d'une lignée à l'autre. En effet, le transgène s'intègre généralement en tandem dans une orientation tête à queue, mais il peut aussi s'intégrer en tête-à-tête, et/ou queue-à-queue. Les bandes additionnelles observées avec les sondes en 5' et 3' sur le Southern représentent probablement les jonctions du transgène avec le génome de la souris. Les analyses de type Southern aux extrémités 5' et 3' du transgène SBP nous ont permis de conclure qu'une à plusieurs copies du transgène sont intègres pour toutes les lignées de souris SBP (tableau III-I).

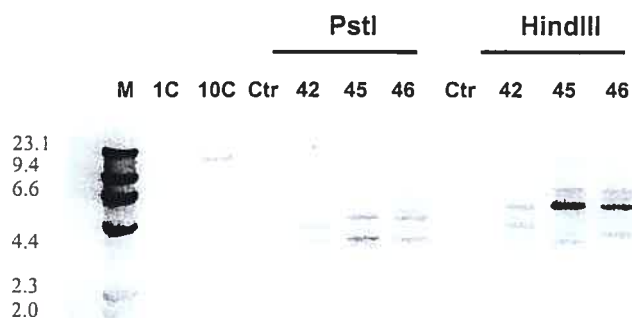
Grâce à cette analyse, nous avons également observé que chez les souris fondatrices 63 et 68 le transgène s'est intégré à deux sites différents (A et B) dans le génome de la souris. En effet, lorsque cela se produit, des jonctions différentes sont observées à l'intérieur d'une même lignée de souris transgéniques. Les intégrations de type A et B ont été séparées pour chacune de ces lignées par des croisements avec des souris C57Bl/6J X CBA/J et quatre lignées de souris SBP ont été générées avec ces deux souris fondatrices. Les analyses Southern avec les souris 63 et 68 ne sont pas présentées.

FIGURE: 3.2

Intégrité du transgène SBP.



Sonde SB: Analyse de l'extrémité 5'

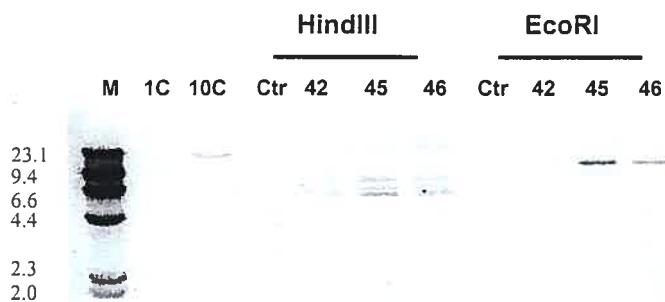
**Bande attendues:****Transgène:****PstI:**

880 pb
Tête à queue: 3.2 kb

HindIII: > 2.7 kb

Tête à tête: 5.4 kb
Tête à queue: 4.7 kb

Sonde Globine: Analyse de l'extrémité 3'

**Bande attendues:****Transgène:****HindIII:** > 2 kb

Tête à queue: 4.7 kb
Queue à queue: 4 kb

EcoRI:

7.6 kb
Tête à queue: 870 bp

LEGENDE :

Le transgène peut être inséré dans une orientation tête-à-tête, tête à queue et/ou queue-à-queue.

M- marqueur λ HindIII; 1C et 10C- une copie et dix copies du transgène; S- *enhancer SV 40*; β Pr- promoteur du gène de β -globine; β - exons 2-3 et 3'UTR du gène de β -globine; P-PstI; RI- EcoRI; H-HindIII.

3.1.3 Analyses d'expression du transgène SBP

3.1.3.1 Essais de protection à la RNase

Afin d'analyser l'expression du transgène chez les souris SBP, nous avons effectué un essai de protection à la RNase. Pour ce faire, nous avons utilisé une sonde antisens à l'extrémité 3' du transgène couvrant les exons 2 et 3 du gène de β -globine humain. Cette sonde est spécifique au gène humain et protège un fragment de 210 pb si le transgène est exprimé. Afin de s'assurer que l'essai a bien fonctionné, les souris transgéniques YAC- β -globine humaine ont été utilisées comme contrôle positif. Les résultats de cet essai ne sont pas présentés parce que le transcrit n'était détectable pour aucune des lignées de souris transgéniques SBP.

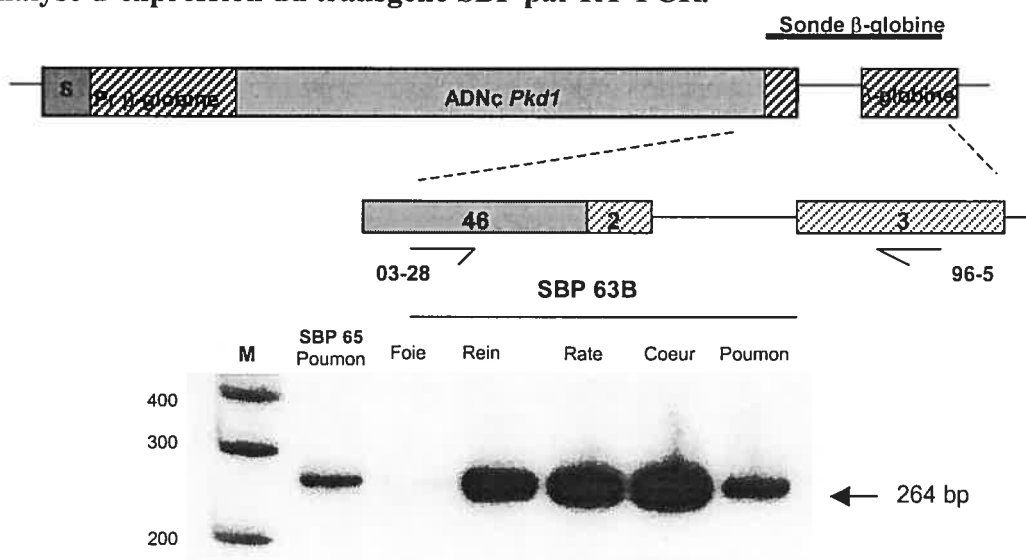
3.1.3.2 Essais de RT-PCR

Étant donné que nous n'avons pas réussi à détecter le transcrit SBP avec la protection à la RNase, nous avons effectué un essai de RT-PCR. Cette technique est généralement plus sensible que la protection à la RNase et permet de détecter des niveaux d'expression plus faibles. L'analyse a été effectuée dans la partie 3' du transgène en utilisant des oligos situés de part et d'autre de l'intron 2 du gène de β -globine. Le choix de ces oligos, nous permet d'amplifier un produit de PCR spécifique à l'ARN et ainsi éviter les contaminations d'ADN. Dans ce cas-ci, un produit de PCR de 264 pb est observé si le transgène est exprimé et en cas de contamination avec de l'ADN un produit de 1.2 kb est amplifié. Le transcrit de 264 pb a été observé très faiblement sur un gel d'acrylamide et nous avons dû

utiliser une sonde couvrant le gène de β -globine pour mieux le détecter. Étant donné les très faibles niveaux d'expression détectés avec l'essai de RT-PCR nous n'avons pas réussi à être quantitatif et aucune comparaison avec le gène de *Pkd1* endogène n'a été effectuée. En plus des faibles niveaux d'expression obtenus, il semble que l'expression ne soit pas spécifique aux reins. En effet, le transcrite SBP a été observé dans la plupart des organes testés soit le rein, la rate, le cœur et les poumons chez la majorité des lignées de souris SBP (figure 3.3 et tableau III-I).

FIGURE : 3.3

Analyse d'expression du transgène SBP par RT-PCR.



LÉGENDE :

L'expression du transgène SBP a été déterminée par RT-PCR en utilisant les oligos 03-28 (*Pkd1* exon 46) et 96-5 (exon 3 β -globine). Le transcrite de 264 pb a été hybridé avec une sonde couvrant le gène de β -globine. S- enhancer SV40

3.1.4 Analyses phénotypiques des souris SBP

Des coupes histologiques ont été effectuées sur la plupart des organes des souris SBP adultes. Au niveau du rein, les analyses ont d'abord été effectuées sur dix-neuf souris âgées de 2 à 4 mois ainsi que sept souris âgées de 8 à 10 mois et ces dernières ne présentaient aucune anomalie. Par la suite, des analyses ont été faites sur neuf souris de plus de douze mois et un phénotype de kystogénèse rénale a été observé chez deux souris âgées de dix-huit mois. Chez toutes les autres souris analysées, les reins semblaient normaux (résultats non-montrés).

Par ailleurs, un phénotype au niveau de la rate a été observé chez cinq souris SBP âgées de plus de dix mois (figure 3.4 et tableau III-II). Au niveau macroscopique, nous avons observé que la rate était foncée et que sa taille était augmentée par rapport à une rate contrôle de même fond génétique. En effet, dans certains cas, le poids de la rate par rapport au poids total de la souris est augmentée de plus de dix fois par rapport aux souris contrôles. Ces splénomégalias ont été observées chez plusieurs souris des lignées SBP 45, 63A, 63B et 65 et dans plusieurs cas une tumeur solide à l'abdomen était également présente. Nous n'avons pas documenté en détail l'origine et la taille de ces tumeurs, mais dans la plupart des cas nous avons observé que le diamètre de la tumeur était supérieur à 1 cm. Des coupes histologiques de la rate ont montré une désorganisation des pulpes blanches et des pulpes rouges ainsi qu'une augmentation importante des foyers hématopoïétiques tels que démontré par la présence de mégacaryocytes (figure 3.4).

TABLEAU III-II :
Splénomégalies et tumeurs chez les souris SBP.

Souris	Age (mois)	Rate %	Tumeurs (abdomen)
Contrôle	10	0.2	
SBP 45-6	14	1.3	
SBP 45-31	11	2.7	√
SBP 63A-3	16	3.9	√
SBP 63B-2	10	2.9	
SBP 63B-23	10	N.D.	√
SBP 65	11	0.5	√

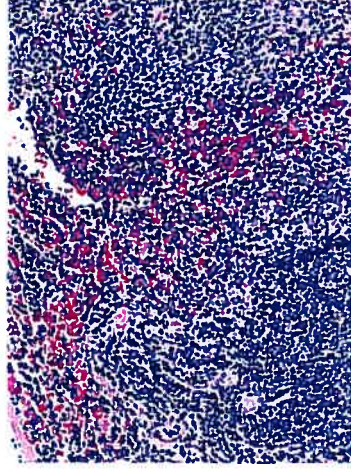
LÉGENDE :

Chez la plupart des souris SBP âgées de plus de dix mois et issues des lignées 45, 63 A et B et 65, des splénomégalies et tumeurs à l'abdomen ont été observées. Contrôle- (C57Bl/6J x CBA/J) F1; N.D. – valeur non-disponible.

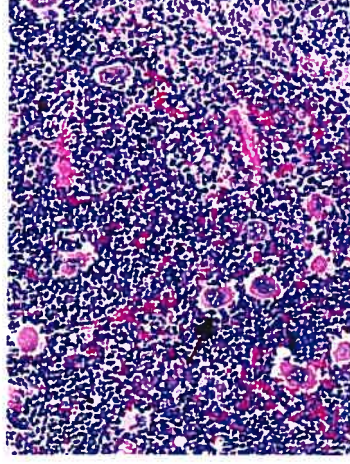
FIGURE: 3.4

Analyses histologiques de la rate chez les souris SBP.

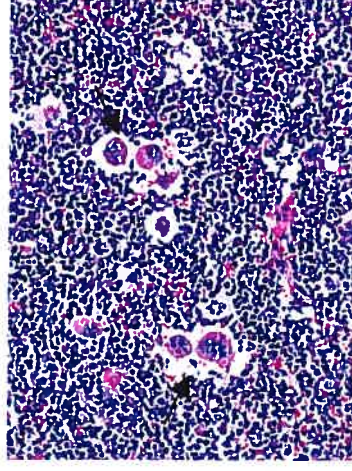
Contrôle



SBP 63B-2



SBP 45-6



LÉGENDE :

Coupes histologiques de rates chez des souris SBP âgées de plus de 12 mois. Grossissement 20X. Contrôle- (C57Bl6/J X CBA/J) F1; flèche- mégacaryocytes

3.2 SOURIS TRANSGÉNIQUES SBPKD1_{TAG}

Basé sur les résultats obtenus avec les souris transgéniques SBP, nous ne pouvons pas conclure avec certitude si la surexpression de *Pkd1* est un mécanisme pathogénétique de la polykystose rénale. Dans le but de confirmer cette hypothèse, une deuxième approche expérimentale a été employée. Celle-ci consiste à utiliser la séquence génomique de *Pkd1* au lieu de l'ADNc afin d'obtenir un niveau d'expression plus élevé du transcrit. Ainsi, un second transgène visant à surexprimer le gène de *Pkd1* spécifiquement aux reins a été généré et nous l'avons surnommé SB*Pkd1*_{TAG}. Puisque *Pkd1* est un gène de plus de 50 kb, nous avons utilisé un BAC *Pkd1-Tsc2* de 130 kb pour produire le transgène. Ce BAC provient d'une librairie 129sv (Research Genetics) et a été criblé par PCR à l'aide de deux paires d'oligos couvrant les extrémités 5' et 3' du gène de *Pkd1*. Le clone isolé contient les gènes de *Pkd1* et *Tsc2* en entier ainsi que les séquences régulatrices en 5' et 3' et son intégrité a été vérifiée par une analyse Southern avec sept sondes couvrant la totalité du gène de *Pkd1* (analyse non-montrée). Deux événements de recombinaison homologues successifs ont été effectués afin d'insérer les éléments régulateurs SB et une mutation silencieuse (TAG) qui permet de différencier le transgène du gène endogène aux niveaux ADN et ARN. Le transgène a ensuite été digéré et purifié sur gel de PFGE afin d'éliminer le vecteur, le 5'UTR et la séquence promotrice du gène de *Pkd1* ainsi que la partie 5' du gène de *Tsc2*.

3.2.1 Modification du BAC *Pkd1-Tsc2* par recombinaison homologue

3.2.1.1 Insertion des éléments régulateurs rénaux spécifiques SB

Afin d'insérer les éléments régulateurs SB en amont du gène de *Pkd1*, une cassette de recombinaison contenant les éléments régulateurs SB et deux bras d'homologies situés de part et d'autre du site d'insertion a été clonée dans le vecteur navette *pld53*. Pour faciliter le clonage de la cassette de recombinaison, cette dernière a d'abord été clonée dans le vecteur *pbluescript* avant d'être transférée dans le *pld53*. Lors de la première étape de clonage, le 5'UTR, la séquence promotrice et une partie de l'exon 1 de *Pkd1* ont été insérés en amont des éléments régulateurs SB préalablement clonés dans le vecteur *pbluescript*. Ainsi, un fragment de 8,7 kb, excisé par SstII d'un plasmide contenant la séquence promotrice et l'exon 1 de *Pkd1*, a été inséré dans le site SstII juste en amont de l'*enhancer SV40* afin de former le premier bras d'homologie. Pour le deuxième bras d'homologie, une région couvrant une partie de l'exon 1 et de l'intron 1 et commençant avec le codon d'initiation de la traduction de *Pkd1* a été amplifiée par PCR. Le produit de PCR de 1.3 kb a été inséré dans un site HindIII franc en aval des éléments régulateurs SB. Suite au clonage de la cassette de recombinaison dans *pbluescript*, une digestion KpnI bouts francs nous a permis de la transférer dans le site SmaI du *pld53*. Avec la digestion KpnI, la taille de la première région d'homologie a été réduite de 8.7 kb à 1 kb.

Le vecteur navette ainsi produit a été employé pour effectuer la première recombinaison homologue dans les BAC et insérer les éléments régulateurs SB en amont du gène *Pkd1*. Les BAC recombinants obtenus ont été analysés par

Southern à l'aide d'une sonde SB combinée à la digestion EcoRI. La sonde SB est spécifique au BAC recombinant et dans le cas des clones positifs des bandes à 5.6 kb et 700 pb sont observées (figure 3.5).

3.2.1.2 Ajout d'une mutation silencieuse (TAG)

Un second vecteur navette a été produit afin d'insérer un site EcoRI dans l'exon 10 de *Pkd1* et ainsi différencier le transgène *Pkd1* du gène endogène. Ce site a pu être inséré grâce à une mutation ponctuelle où une guanine a été substituée par une adénine. Cette mutation ponctuelle a été effectuée par mutagenèse dirigée et n'affecte en rien la séquence protéique.

Comme pour le premier vecteur navette, la cassette de recombinaison a d'abord été clonée dans le vecteur *pbluescript* avant d'être transférée dans le *pld53*. Dans ce cas-ci, la première région d'homologie couvre une partie des exons 8 à 10 de *Pkd1* (1.2 kb) et la deuxième région inclut une partie des exons 10 à 11 de *Pkd1* (850 pb). Ces deux régions d'homologies ont été amplifiées par PCR et clonées ensemble dans les sites ClaI et BamHI du vecteur *pbluescript* suite à la double digestion ClaI-EcoRI de la première région d'homologie et EcoRI-BamHI de la seconde. La cassette de recombinaison a ensuite été transférée dans le site SmaI du *pld53* par une digestion ClaI-BamHI bouts francs.

L'analyse Southern des BAC recombinants obtenus suite à la recombinaison homologue est présentée à la figure 3.6. Une sonde couvrant les exons 7 à 15 de *Pkd1* combinée à une digestion EcoRI nous permet d'observer deux bandes de 2.5 et 6.9 kb avec le BAC recombinant grâce à l'insertion du

nouveau site EcoRI dans l'exon 10. Une seule bande à 9.4 kb est observée dans le cas du BAC original.

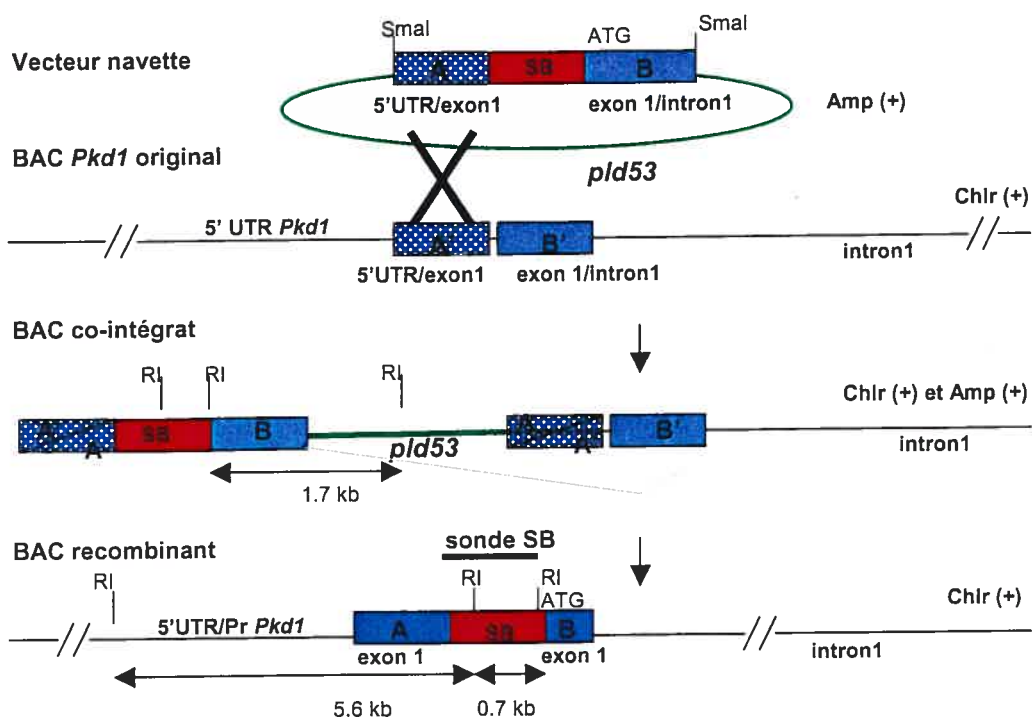
3.2.1.3 Analyse complète du BAC modifié et microinjection

Le BAC recombinant de 130 kb a été analysé en détail par Southern afin de s'assurer qu'il n'a pas subi de modifications lors de la recombinaison homologe. Les figures 3.7A et B présentent les analyses Southern effectuées avec sept sondes (a-g) couvrant le gène de *Pkd1* en entier. Cette analyse confirme l'intégrité des BAC recombinants.

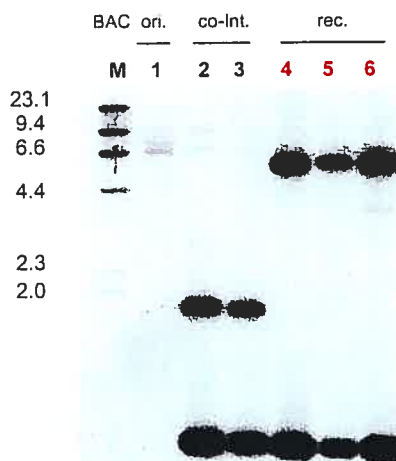
Par la suite, le BAC recombinant a été digéré afin d'éliminer le 5'UTR et la séquence promotrice du gène de *Pkd1*, 20 kb en 5' du gène de *Tsc2* ainsi que le vecteur procaryote du BAC (figure 3.8). Le fragment de 70 kb obtenu suite à une digestion ClaI et NotI, a été purifié sur un gel d'électrophorèse à champs pulsés et microinjecté dans des œufs fertilisés (C57Bl/6J X CBA/J) F2 afin de générer des souris transgéniques SB*Pkd1*_{TAG}.

FIGURE: 3.5

Insertion des éléments régulateurs SB.



Sonde SB: Analyse des recombinants

**Bandes attendues:****EcoRI:**

BAC *Pkd1* original (BAC ori.):
(clone1)
aucune bande

BAC co-intégrats (BAC co-Int.):
(clones 2 et 3)
700 pb et 1.7 kb

BAC recombinants (BAC rec.):
(clones 4-6)
700 pb et 5.6 kb

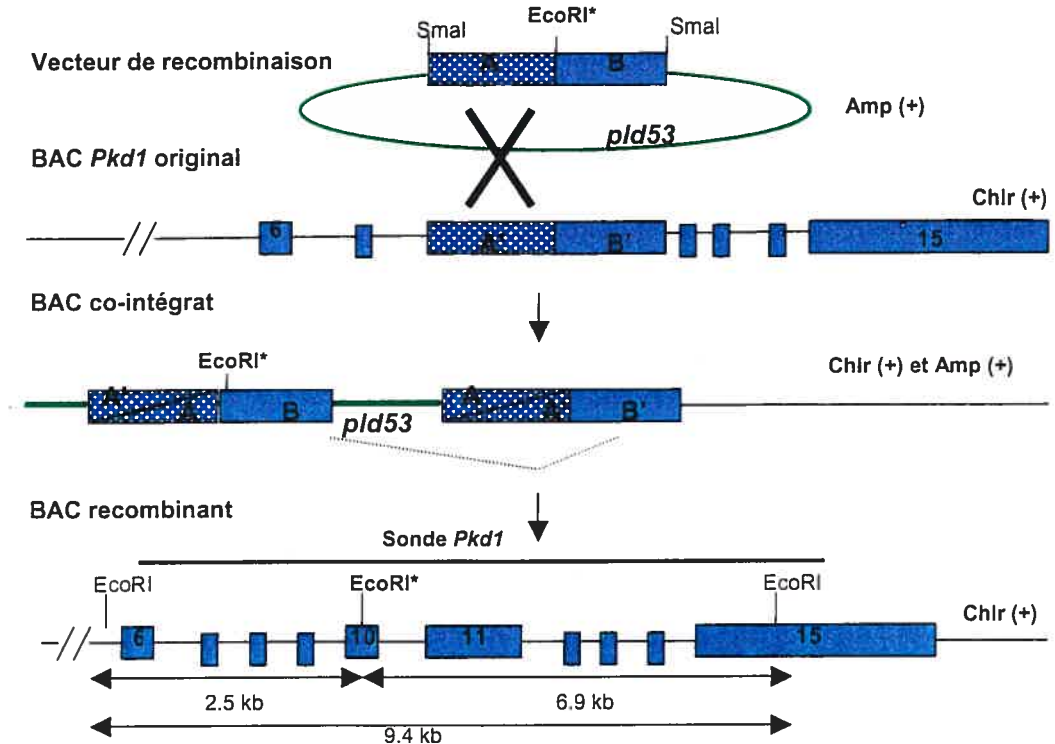
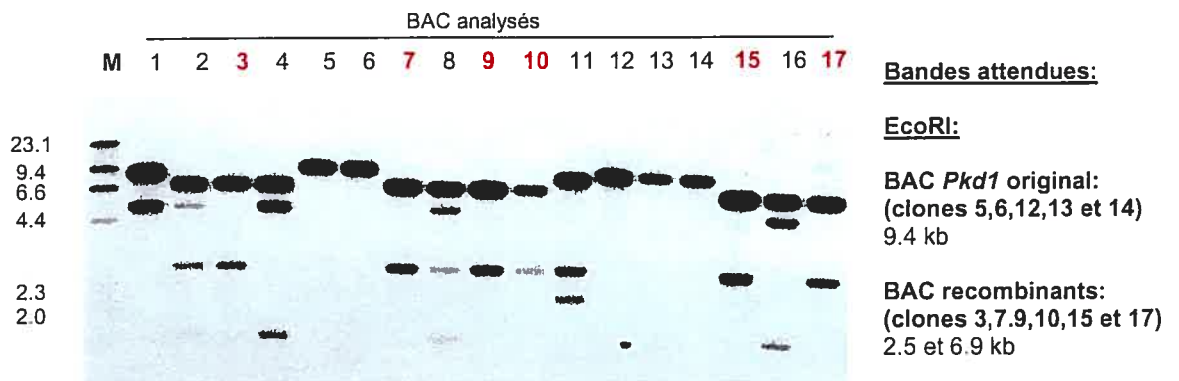
LEGENDE :

Les éléments régulateurs SB ont été insérés en amont de l'ATG du gène de *Pkd1* par recombinaison homologue dans les BAC.

A- une partie du 5'UTR, promoteur et exon1 en amont de l'ATG du gène de *Pkd1* (1 kb);
SB- enhancer *SV40* et promoteur du gène de β -globine (0.9 kb); B- exon1 à partir de l'ATG et une partie de l'intron 1 du gène de *Pkd1*; M- marqueur λ HindIII.

FIGURE: 3.6

Ajout d'une mutation silencieuse (TAG).

Sonde *Pkd1* exon7-15: Analyse des recombinants

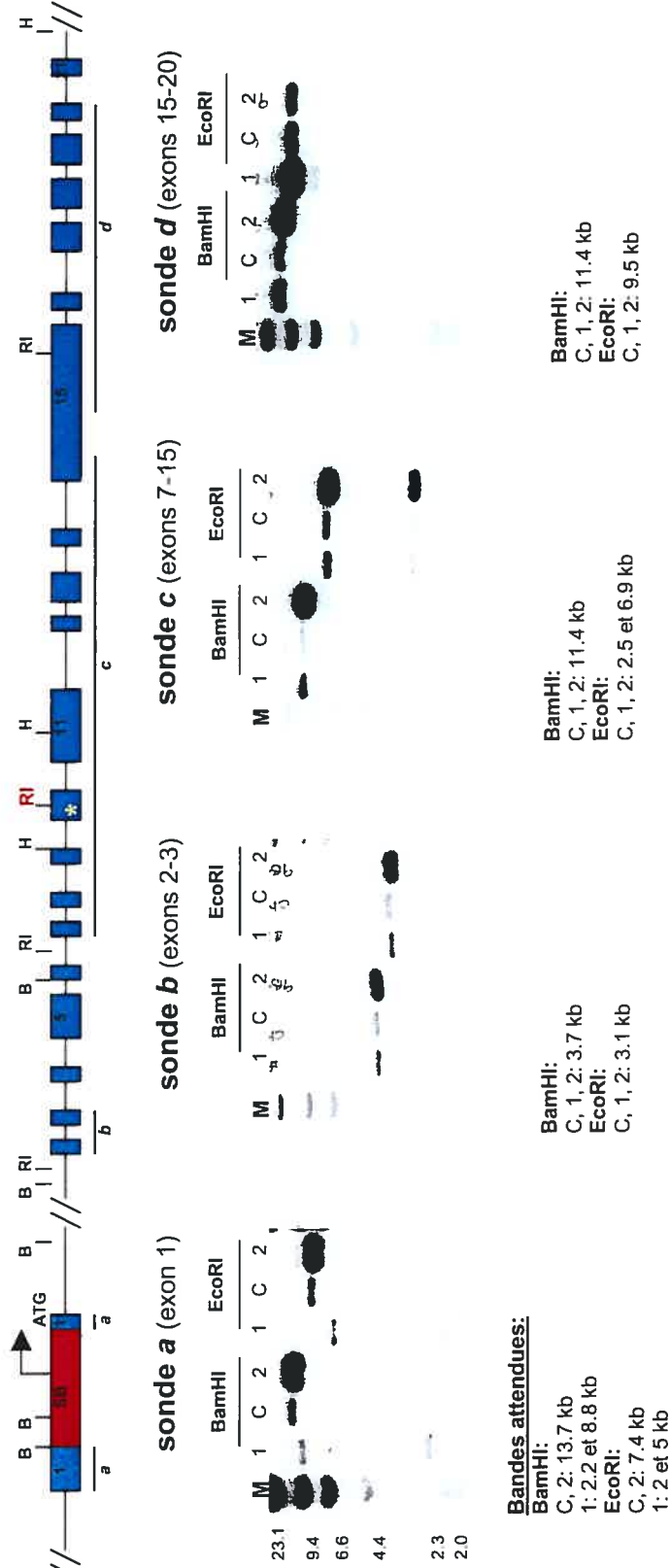
LEGENDE :

Insertion d'un site *EcoRI* dans l'exon 10 du gène de *Pkd1* par recombinaison homologue dans les BAC.

A- région couvrant les exons/introns 8-10 du gène de *Pkd1* (1.2 kb); B- région couvrant les exons/introns 10-11 du gène de *Pkd1* (850 pb); M- marqueur λ HindIII;

FIGURE: 3.7A

Analyse détaillée des BAC recombinants SBP*pkdI*_{TAG}, *pkdI*_{TAG} et *pkdI*_{TAG} Δ *Tsc2*.



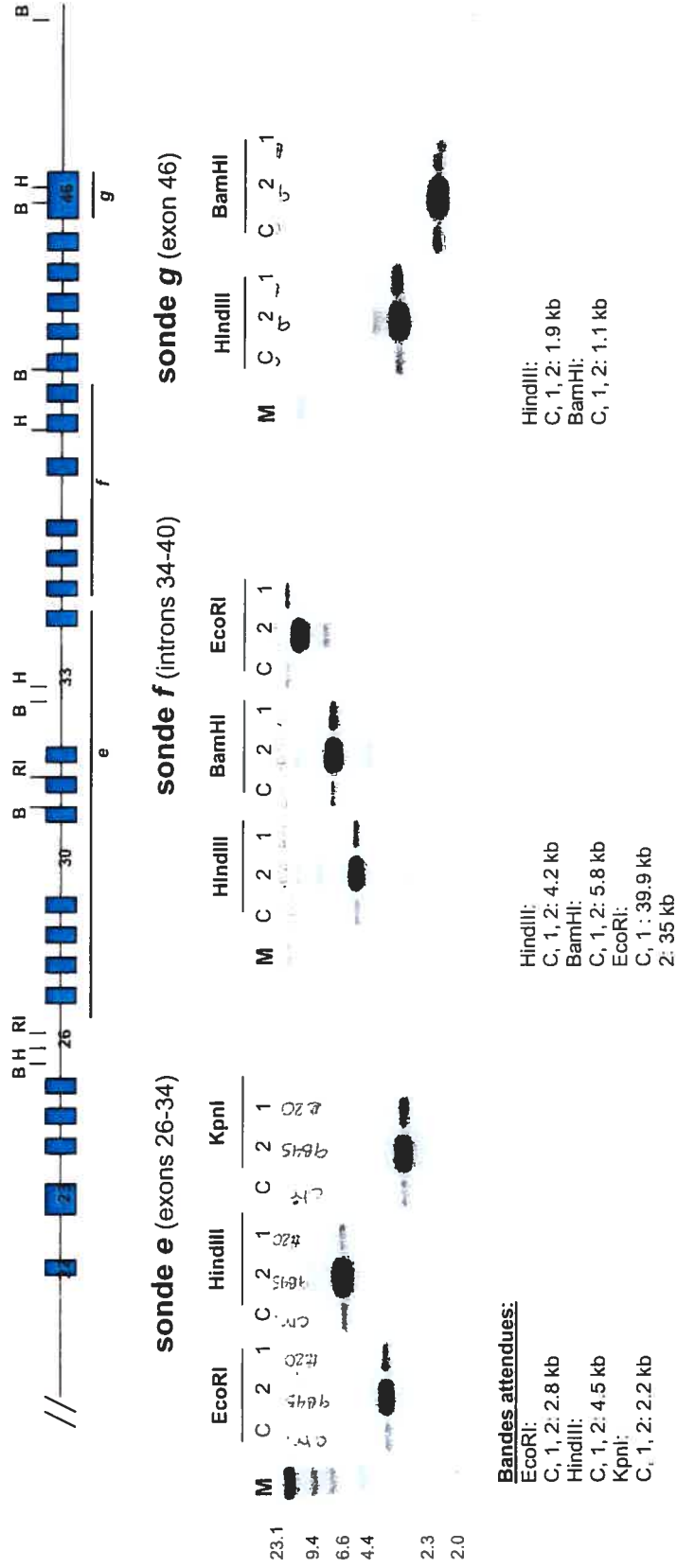
LÉGENDE:

L'intégrité des BAC recombinants a été vérifiée par une analyse Southern. Des sondes couvrant le BAC *PkdI* en entier ont été utilisées combinées à des digestions enzymatiques : BamHI, EcoRI, KpnI et HindIII.

1- BAC SBP*pkdI*_{TAG}; 2- BAC *PkdI*_{TAG} Δ *Tsc2* (ce BAC sera présenté à la section 3.4); C- BAC contrôle *pkdI*_{TAG}

FIGURE: 3.7B

Analyse détaillée des BAC recombinants SBP*pkd*_{TAG}, *Pkd*_{TAG} et *Pkd*_{TAG} Δ *Tsc2*.



LÉGENDE:

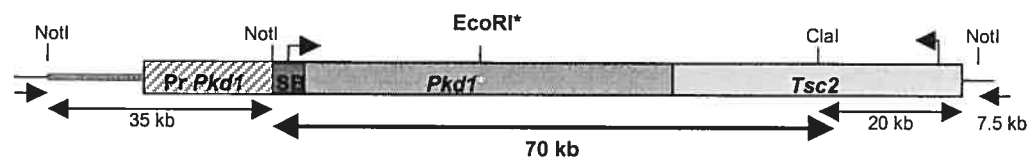
L'intégrité des BAC recombinants a été vérifiée par une analyse Southern. Des sondes couvrant le BAC *Pkd* en entier ont été utilisées combinées à des digestions enzymatiques : BamHI, EcoRI, KpnI et HindIII.

1- BAC SBP*pkd*_{TAG}; 2- BAC *Pkd*_{TAG} Δ *Tsc2*; C- BAC contrôle *Pkd*_{TAG}

FIGURE : 3.8

Purification du fragment $SBPkd1_{TAG}$ pour la microinjection.

Digestion Clal-NotI :

**LÉGENDE :**

Un fragment de 70 kb a été purifié sur PFGE afin d'éliminer le vecteur du BAC, le 5'UTR et la séquence promotrice du gène de *Pkd1* ainsi que la partie 5' du gène de *Tsc2*.

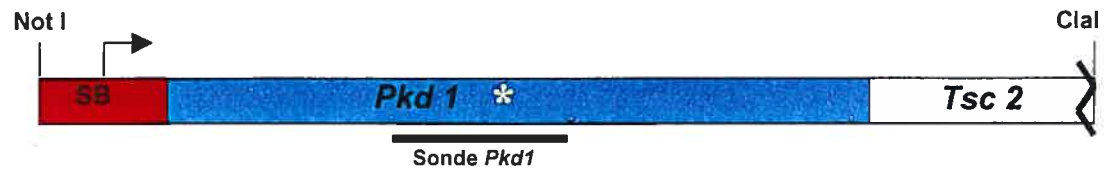
SB- *enhancer* SV40 et promoteur β -globine.

3.2.2 Détection et intégrité du transgène $SBPkd1_{TAG}$

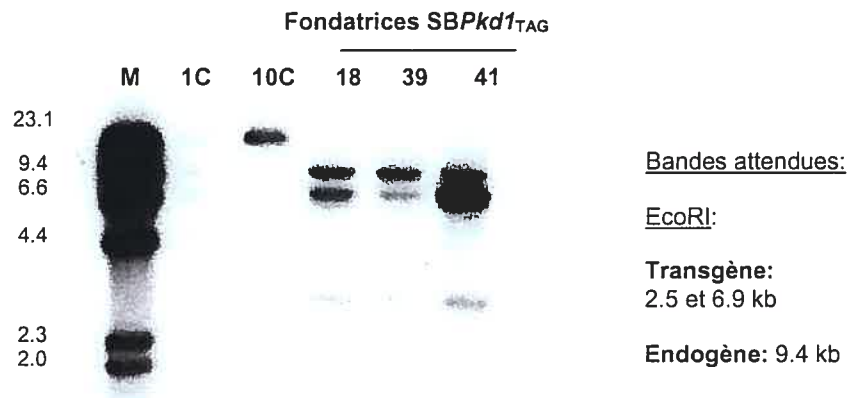
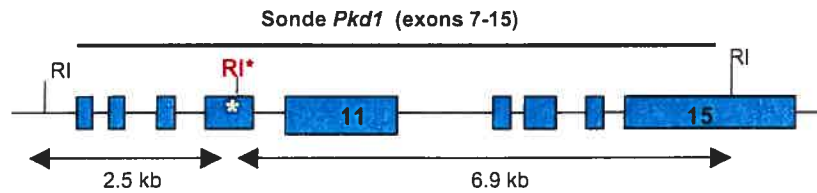
Suite à la microinjection du fragment purifié de 70 kb, cinq souris fondatrices $SBPkd1_{TAG}$ ont été obtenues. La présence du transgène chez les souris fondatrices a été détectée par une analyse Southern en utilisant le nouveau site EcoRI inséré dans l'exon 10 de *Pkd1* pour différencier le transgène du gène endogène. Chez les souris transgéniques la bande endogène est observée à 9.4 kb et le transgène produit deux bandes additionnelles de 2.5 et 6.9 kb (figure 3.9). Le nombre de copies du transgène intégré dans le génome de la souris a pu être déterminé en comparant le transgène avec le gène endogène (2 copies).

Afin de vérifier l'intégrité du transgène, une analyse Southern avec des sondes aux extrémités 5' et 3' a été effectuée. À l'extrémité 5', une sonde couvrant les éléments régulateurs SB a été utilisée. Avec une digestion HindIII, nous pouvons observer une bande à 10.9 kb si le transgène est intégré en tête à queue et une intégration en tête à tête produit une bande à 3.8 kb (figure 3.10).

FIGURE: 3.9

Détection génomique du transgène SB*Pkd1*_{TAG}.

Détection du transgène:



LEGENDE :

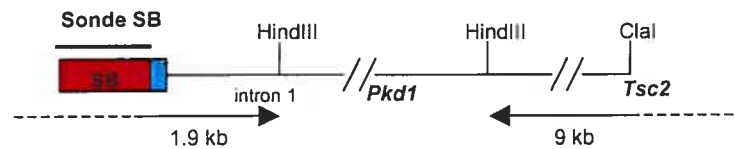
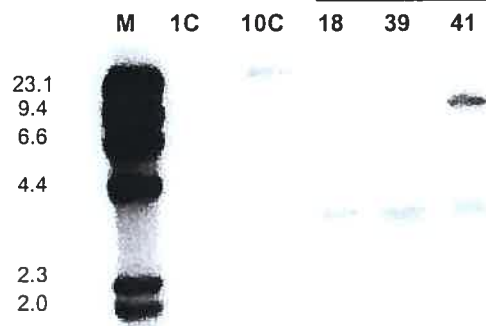
La présence du transgène a été déterminée par Southern en utilisant le site EcoRI dans l'exon 10 de *Pkd1* pour différencier le transgène du gène endogène.

M- marqueur λ HindIII; 1C et 10C- une copie et dix copies du transgène; SB- enhancer *SV40* et promoteur β -globine; RI- site EcoRI.

FIGURE: 3.10

Intégrité du transgène *SBPkd1*_{TAG}.

Intégrité du transgène: Extrémité 5'

Fondatrices *SBPkd1*_{TAG}

Bandes attendues:

HindIII:

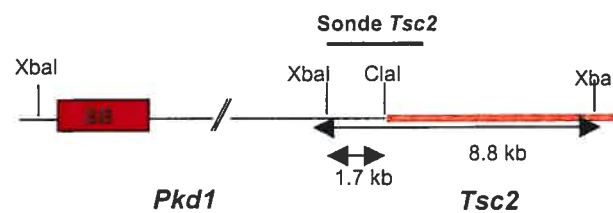
Transgène:

Tête à queue: 10.9 kb

Tête à tête: 3.8 kb

Endogène: N/A

Intégrité du transgène: Extrémité 3'



Bandes attendues:

XbaI:

Transgène:

> 1.7 kb

Tête à queue: 1.7 kb

Queue-à-queue: 3.4 kb

Endogène:

8.8 kb

LEGENDE :

L'intégrité du transgène a été déterminée par Southern en utilisant des sondes spécifiques au transgène. L'insertion du transgène peut se faire dans une orientation tête-à-tête, tête à queue et/ou queue-à-queue.

M- marqueur λ HindIII; 1C et 10C- une copie et dix copies du transgène; SB- *enhancer SV40* et promoteur β -globine.

TABEAU III-III:

Caractéristiques moléculaires des souris SBPkd1_{TAG}.

Lignées de souris	# Copies	Intégrité	Expression					
			Rein	Rate	Coeur	Poumon	Foie	Cerveau
3	1	✓	✓					✓
7	20	✓	✓					
18	2	✓						Non-déterminée
39	2	✓	✓	✓				✓
41	10	✓	✓	✓		✓		✓

LEGENDE :

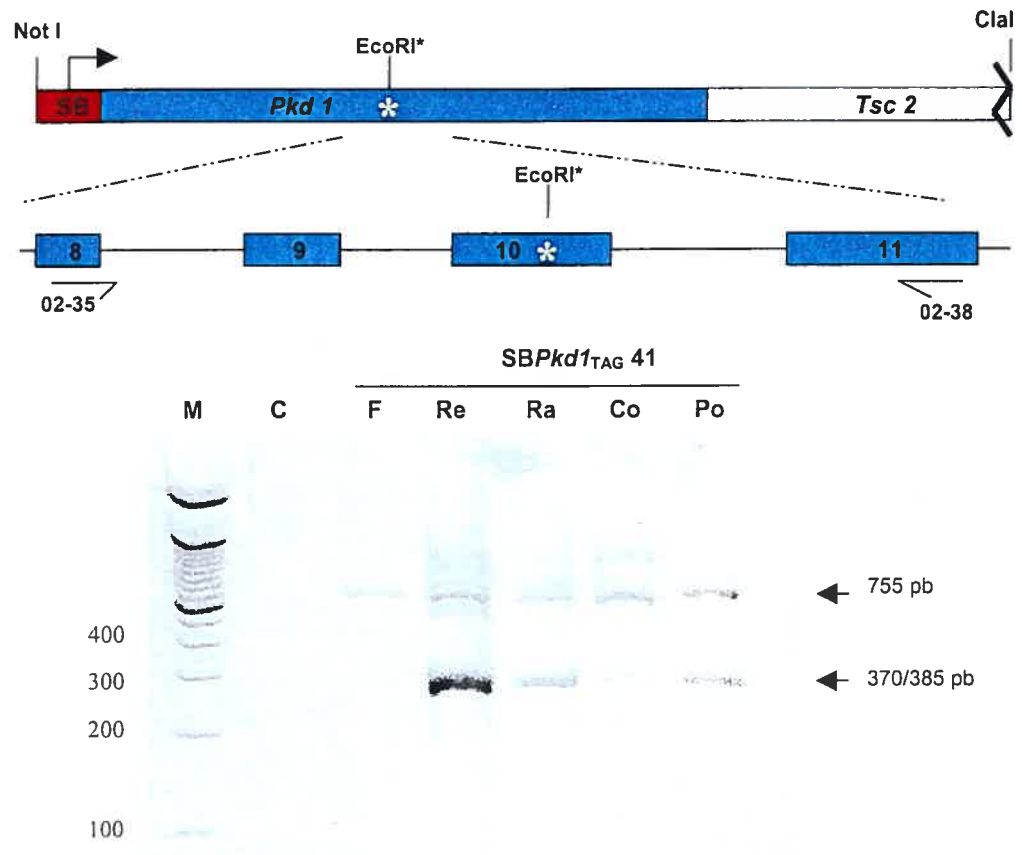
Le nombre de copies, l'intégrité et le niveau d'expression du transgène ont été détectés pour chacune des lignées de souris SBPkd1_{TAG}.
Fin des lignées 7 et 18 suite au décès des souris fondatrices.

Pour ce qui est de l'analyse en 3', une sonde couvrant une partie de l'intron 16 du gène de *Tsc2* a été employée (figure 3.10). Cette sonde nous permet de différencier le transgène du gène endogène puisque nous avons délété la partie 5' du gène de *Tsc2* avant de microinjecter le fragment. Le gène endogène donne une bande à 8.8 kb et en présence du transgène, des bandes à plus de 1.7 kb sont attendues. Cette analyse Southern n'est pas présentée ici parce que nous avons utilisé une sonde dans un intron et que cette dernière hybride de manière non-spécifique avec l'ADN génomique. Toutefois, nous pouvons quand même observer les bandes attendues et conclure que le transgène est intègre pour toutes les lignées de souris *SBPkd1*_{TAG} produites. Les caractéristiques moléculaires des souris *SBPkd1*_{TAG} sont présentées dans le tableau III-III.

3.2.3 Analyses d'expression du transgène *SBPkd1*_{TAG}

Les analyses d'expression du transgène chez les souris *SBPkd1*_{TAG} ont été effectuées par RT-PCR. Nous avons d'abord fait une analyse avec des oligos situés de part et d'autre du nouveau site EcoRI dans l'exon 10 de *Pkd1*. Une digestion EcoRI du fragment de 755 pb donne un doublet de 370 et 385 pb si le transgène est exprimé. Cet essai de PCR a été effectué sur plusieurs organes de toutes les lignées de souris *SBPkd1*_{TAG} et nous a permis de conclure que le transgène est exprimé dans le rein de ces souris (figure 3.11).

FIGURE: 3.11

Analyse d'expression du transgène *SBPkd1*_{TAG} par RT-PCR.**LEGENDE :**

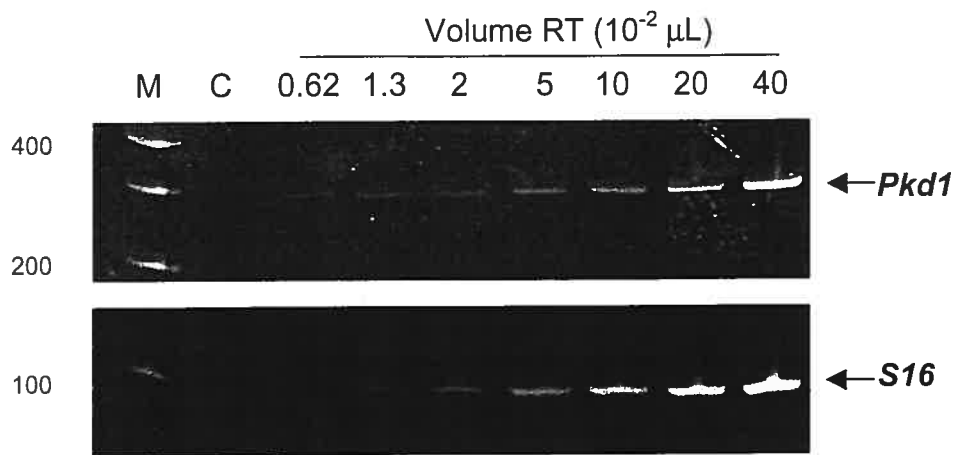
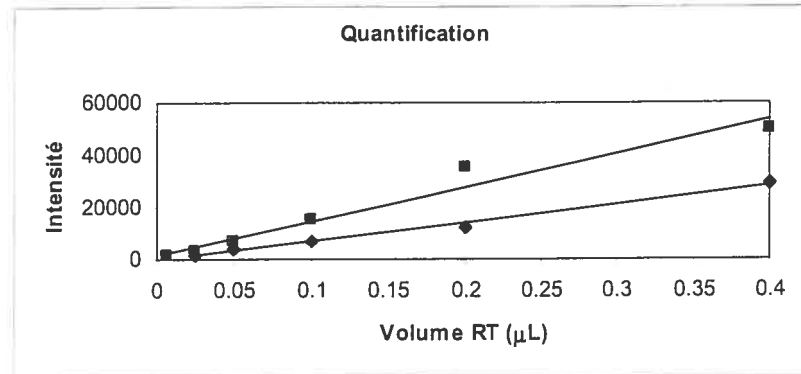
L'expression du transgène a été déterminée par RT-PCR en utilisant les oligos 03-35 (*Pkd1* exon8) et 03-28 (*Pkd1* exon11). Un fragment de 755 pb est observé pour le gène endogène et dans le cas du transgène la digestion *EcoRI* produit un doublet à 370/385 pb.

M- marqueur 100 pb; C- contrôle négatif; F- foie; Re- rein; Ra- rate; Co- cœur; Po- poumon; *- site *EcoRI* ajouté par recombinaison homologue.

Cette analyse d'expression n'est pas quantitative et un essai de RT-PCR semi-quantitatif a été effectué en utilisant un oligo dans le promoteur du gène de β -globine afin de pouvoir différencier le transgène du gène endogène. Avec cet essai de PCR, l'expression du transgène produit un transcrit de 300 pb et son niveau d'expression est comparé au contrôle interne *S16* qui lui produit un transcrit de 104 pb. Les analyses d'expression ont été effectuées sur la plupart des organes de souris adultes provenant des lignées 3, 39 et 41 et les niveaux d'expression ont été quantifiés à l'aide du logiciel *Image Quant*. La courbe de linéarité ainsi que les analyses d'expression sont présentées aux figures 3.12A et B. Les rapports des niveaux d'expression de *Pkd1* sur *S16* ont été calculés pour chacun des organes analysés et sont présentés dans le tableau III-IV. Nous avons comparé le niveau d'expression du transgène dans le rein adulte entre les différentes lignées et nous avons observé que la lignée 41 démontre la plus forte expression. En effet, par rapport aux lignées 39 et 3 le niveau d'expression du transgène chez les souris de la lignée 41 est augmenté respectivement d'une fois et demi et de trois fois. Le niveau d'expression du transgène dans plusieurs organes a également été comparé à l'intérieur d'une même lignée de souris. En ce qui concerne les lignées 3 et 39, il n'y a pratiquement pas d'expression extrarénale. Toutefois, pour la lignée 41 le transgène est également exprimé dans la rate, les poumons et le cœur (tableau III-IV).

FIGURE: 3.12 A

Démonstration de linéarité du RT-PCR semi-quantitatif.

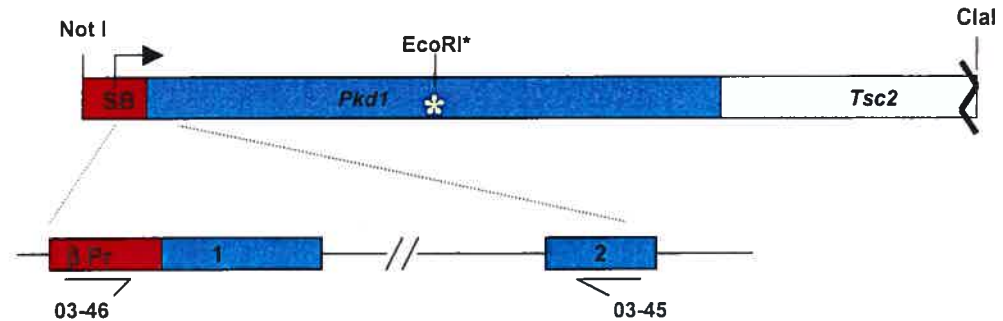
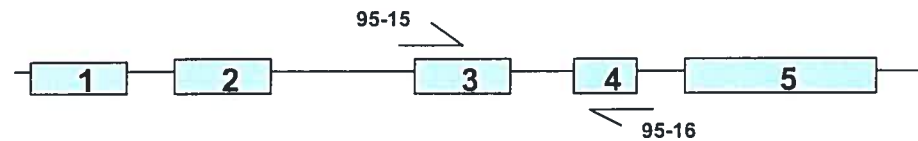
**LEGENDE :**

L'intensité du BrEt de chaque réaction de PCR a été mesurée à l'aide du logiciel *Image Quant 5.0*. Une courbe de linéarité a été produite à partir des valeurs obtenues.

Courbes de linéarité- ■ - *S16* ; ◆ - *Pkd1*

Volume de RT utilisé pour la PCR (fig. 3.12B): *Pkd1*- 10(10^{-2} µL); *S16*- 5(10^{-2} µL)

FIGURE: 3.12 B

Analyse d'expression du transgène *SBPkd1*_{TAG} par RT-PCR .***SBPkd1*_{TAG}:*****S16*:****LEGENDE :**

Le niveau d'expression du transgène a été comparé au contrôle interne *S16* par RT-PCR semi-quantitatif. Les oligos 03-46 (Pr β -globine) et 03-52 (*Pkd1* exon 2) ont été utilisés pour déterminer l'expression du transgène et produit un fragment de 300 pb. Dans l'expérience du contrôle interne *S16*, une bande de 104 pb a été obtenu à l'aide des oligos 95-15 (*S16* exon 3) et 95-16 (*S16* exon 4).

TABEAU III-IV :

Analyses d'expression semi-quantitatives du transgène *SBPkd1*_{TAG}.

Lignées de souris	Niveau d'expression : rapport Pkd1/S16						
	Rein	Cœur	Poumon	Cerveau	Foie	Rate	
<i>SBPkd1</i>_{TAG 3}	0.35	0.00	0.53	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>SBPkd1</i>_{TAG 39}	0.64	0.00	0.12	0.00	0.00	0.00	0.09
<i>SBPkd1</i>_{TAG 41}	0.89	0.56	1.20	0.12	0.02	0.16	1.16

LEGENDE :

Analyse semi-quantitative de l'expression par RT-PCR. Les rapports ont été calculés à partir des valeurs obtenues avec le logiciel de quantification *Image Quant*. Les reins des lignées 3, 39 et 41 ont été comparés entre eux et avec les autres organes de leur lignée respective.

3.2.4 Analyses physiologiques des souris *SBPkd1*_{TAG}

Dans le but d'étudier les fonctions rénales de nos souris transgéniques *SBPkd1*_{TAG}, des analyses physiologiques au niveau de l'urine, du sérum, et du sang ont été effectuées (tableaux III-V à III-VII et figure 3.13).

Le BUN (déchets azotés sanguins (urée)), la créatinine, les protéines, l'osmolalité et les électrolytes (ions de sodium, potassium et chlore) ont été mesurés dans l'urine et une diminution significative de tous ces paramètres a été observée chez toutes les souris issues des lignées 3, 39 et 41 (tableau III-V). Une partie de l'urine récoltée a également été déposée sur un gel de SDS-PAGE afin de déterminer si l'albumine, une protéine de 66 kDa, est excrétée. Les protéines urinaires majeures (MUPs) sont normalement présentes dans l'urine de la souris, mais la présence de protéines de hauts poids moléculaires telle que l'albumine indique généralement un défaut glomérulaire. L'albumine a été détectée dans l'urine des souris *SBPkd1*_{TAG} et à titre de contrôle, nous pouvons constater qu'une quantité comparable de cette protéine est observée dans l'urine des souris SBM en insuffisance rénale (figure 3.13). La souris SBM est un modèle transgénique de la polykystose autosomique dominante qui surexprime l'oncogène *c-myc* spécifiquement aux reins. Ces analyses urinaires nous ont montré que les fonctions rénales de nos souris sont altérées.

Par la suite, nous avons vérifié si les anomalies observées au niveau de l'urine avaient un impact au niveau du sang. Plusieurs paramètres ont été mesurés au niveau du sérum dont le BUN, la créatinine, les ions de calcium et le phosphate inorganique. Dans ce cas-ci, nous avons noté une augmentation importante du

TABEAU III-V :

Analyses urinaires chez les souris SBPkd1_{TAG}.

Souris	n	BUN mmol/L	Créatinine mmol/L	Protéines g/L	Osmolalité mosm/kg	Na ⁺ mmol/L	K ⁺ mmol/L	Cl ⁻ mmol/L
Contrôle	2	1250 ± 130	5.81 ± 0.08	17.23 ± 0.13	2393 ± 288	286 ± 19.1	291.5 ± 8.5	241.5 ± 20.5
SBPkd1 _{TAG} 3	4	280 ± 20 ^e	1.09 ± 0.04 ^h	2.56 ± 0.40 ^g	494 ± 21 ^e	39.8 ± 18.1 ^d	69.0 ± 5.8 ^f	51.8 ± 13.5 ^e
SBPkd1 _{TAG} 39	4	230 ± 60 ^e	0.81 ± 0.33 ^e	1.11 ± 0.96 ^f	391 ± 73 ^e	37.0 ± 11.2 ^e	50.5 ± 5.3 ^f	42.8 ± 5.6 ^e
SBPkd1 _{TAG} 41	3	550 ± 180 ^d	2.35 ± 0.52 ^c	10.05 ± 5.31	826 ± 349 ^b	70.7 ± 40.1 ^b	132.1 ± 44.3 ^a	42.7 ± 24.2 ^c

LÉGENDE:

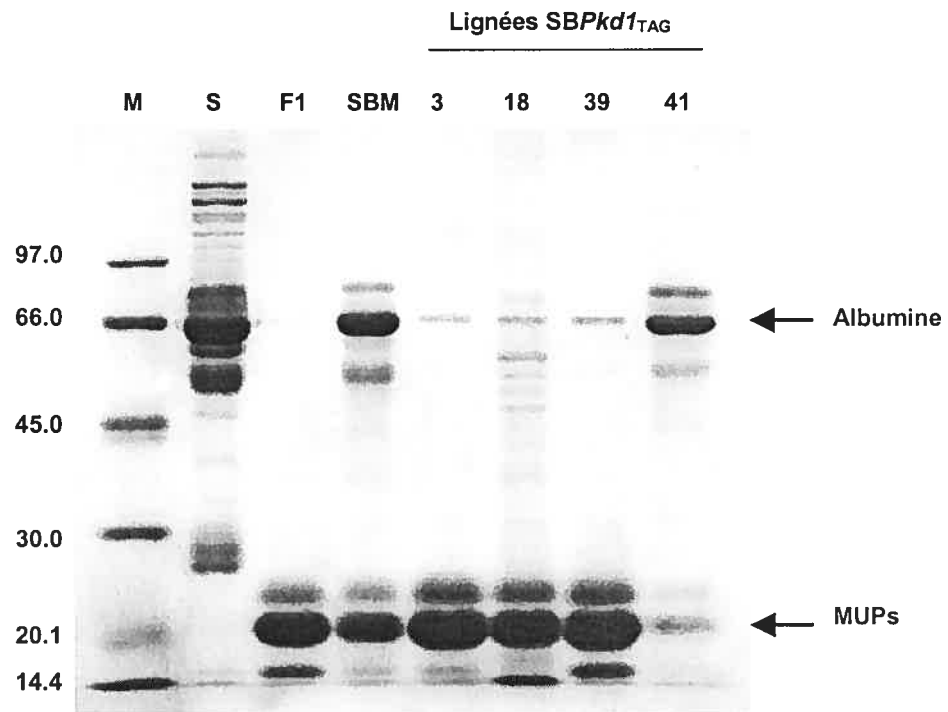
Contrôle- (C57Bl/6J X CBA/J) F1; BUN- urée; Na⁺- ions de sodium, K⁺- ions de potassium; Cl⁻- ions de chlore ; n- nombre de souris analysées

Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± déviation standard.

a: p ≤ 0.05, b: p ≤ 0.01, c: p ≤ 0.005, d: p ≤ 0.001, e: p ≤ 1x10⁻⁴, f: p ≤ 1x10⁻⁵, g: p ≤ 1x10⁻⁶, h: p ≤ 1x10⁻⁷; valeurs de p: Student's t-test

FIGURE: 3.13

Analyse qualitative des protéines urinaires chez les souris *SBPkd1*_{TAG}.

**LEGENDE :**

L'albumine est détectée dans l'urine des souris *SBPkd1*_{TAG} par un gel de SDS-PAGE en colorant au bleu de Coomassie.

M- marqueur de protéines LMW; S- sérum; F1- (C57Bl/6J X CBA/J); SBM- souris transgéniques en insuffisance rénale; MUPs- protéines urinaires majeures.

BUN et de la créatinine pour toutes les lignées de souris étudiées. Plus particulièrement au niveau de la lignée 39 où la créatinine et le BUN sont augmentés respectivement de trois et cinq fois. Toutefois, aucune différence significative n'a été observée pour les autres paramètres mesurés dans le sérum. Ces résultats confirment que les souris *SBPkd1*_{TAG} sont en insuffisance rénale chronique (tableau III-VI).

TABLEAU III-VI :

Analyses de sérum chez les souris *SBPkd1*_{TAG}.

Souris	n	BUN (sérum) μmol/L	Créatinine (sérum) μmol/L
Contrôle	5	6.6 ± 0.2	25.5 ± 0.7
<i>SBPkd1</i>_{TAG} 3	4	9.3 ± 1.4	31.8 ± 4.4
<i>SBPkd1</i>_{TAG} 39	8	35.3 ± 9.3^a	76.3 ± 16.3^a
<i>SBPkd1</i>_{TAG} 41	3	18.3 ± 2.0^b	43.0 ± 1.7^c

LÉGENDE :

Contrôle- (C57Bl/6J x CBA/J) F1; BUN- urée; n- nombre de souris analysées.

Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± déviation standard.

a : $p \leq 0.05$, b : $p \leq 0.005$, c: $p \leq 0.001$; valeurs de p: *Student's t-test*.

Finalement, dans le but de déterminer si les souris en insuffisance rénale souffrent également d'anémie, les paramètres hématologiques ont été analysés. Ces analyses montrent une diminution significative du nombre de globules rouges, de la concentration en hémoglobine et de l'hématocrite. En effet, ces trois paramètres sont diminués jusqu'à deux fois chez les souris de la lignée 39.

TABEAU III-VII:

Analyses des paramètres hématologiques chez les souris SBPkd1_{TAG}.

Souris	n	RBC X10. ⁶ /μL	HGB g/dL	HCT %	MCV fL	MCHC g/dL	RDW %	Retic %
Contrôle	4	10.2 ± 0.4	16.3 ± 0.4	53.5 ± 1.8	52.7 ± 0.7	30.4 ± 0.8	13.8 ± 0.7	2.8 ± 0.2
SBPkd1 _{TAG} 3	4	7.2 ± 1.3 ^b	11.2 ± 2.9 ^b	38.6 ± 9.9 ^a	53.3 ± 4.8	29.1 ± 0.8 ^a	19.4 ± 8.7	3.4 ± 0.7
SBPkd1 _{TAG} 39	4	5.3 ± 0.3 ^e	7.8 ± 1.3 ^c	25.6 ± 4.0 ^d	47.8 ± 5.2	30.4 ± 1.6	17.2 ± 5.7	2.6 ± 0.5
SBPkd1 _{TAG} 41	3	8.3 ± 1.3 ^a	13.3 ± 2.0 ^a	45.5 ± 6.4	55.1 ± 0.9 ^b	29.0 ± 0.3 ^a	15.5 ± 1.2	3.7 ± 1.5

LEGENDE:

Contrôle- (C57Bl/6J X CBA/J) F1; RBC- numération des globules rouges ; HGB- concentration en hémoglobine ; HCT- hématocrite ; MCV- volume globulaire moyen ; MCHC- concentration globulaire moyenne en hémoglobine ; RDW- indice d'anisocytose ; retic- réticulocyte; n- nombre de souris analysées

Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± déviation standard.

a: $p \leq 0.05$, b: $p \leq 0.01$, c: $p \leq 1 \times 10^{-4}$, d : $p \leq 1 \times 10^{-5}$, e : $p \leq 1 \times 10^{-6}$; valeurs de p: *Student's t-test*

Par contre, le volume globulaire moyen, la concentration globulaire moyenne en hémoglobine, l'indice d'anisocytose et les réticulocytes sont demeurés inchangés par rapport aux contrôles. Ces analyses confirment que les souris *SBPkd1*_{TAG} en insuffisance rénale sont anémiques (tableau III-VII).

3.2.5 Analyses morphologiques des souris *SBPkd1*_{TAG}

Nous avons sacrifié des souris de chacune des trois lignées étudiées (3, 39 et 41) et des anomalies au niveau des reins, de la rate, du cœur et des poumons ont été observées (figures 3.14 à 3.16). En effet, tous les reins analysés étaient anémiques, kystiques en surface et hypoplasiques par rapport aux contrôles (figure 3.14). Chez une souris 39 en phase terminale, soit moins de quelques heures avant son décès, la taille du cœur et des poumons nous a semblée augmentée. Nous avons également perçu de l'œdème au niveau des poumons (figure 3.15). Dans le cas des souris issues de la lignée 41, la rate nous est apparue beaucoup plus grosse qu'à l'habitude en plus d'être foncée et parfois kystique en surface (figure 3.16). Un kyste pancréatique est également observé à la figure 3.16, mais d'autres analyses devront être effectuées pour déterminer si la présence de kystes au niveau du pancréas est un défaut général chez ces souris.

FIGURE: 3.14

Laparotomie des reins chez les souris *SBPkd1*_{TAG}.

Contrôle



***SBPkd1*_{TAG} 39**



LÉGENDE :

Photo numérique montrant les reins d'une souris *SBPkd1*_{TAG} 39 et d'une souris contrôle du même fond génétique. Les deux souris sont âgées de quatre mois.

Contrôle- (C57Bl/6J X CBA/J) F1

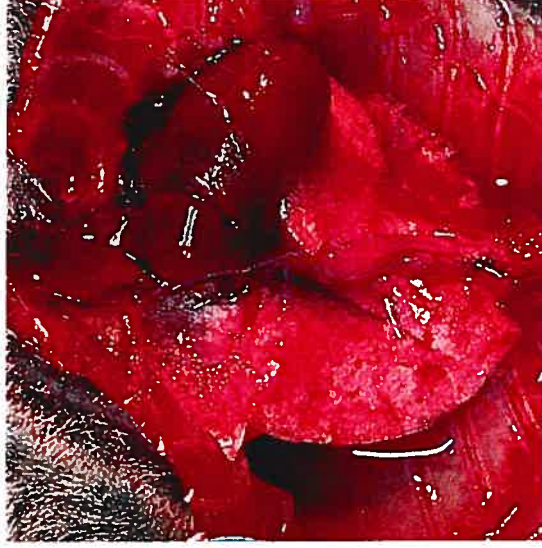
FIGURE: 3.15

Laparotomie du cœur et des poumons chez les souris *SBPkd1*_{TAG}.

Contrôle



***SBPkd1*_{TAG} 39**

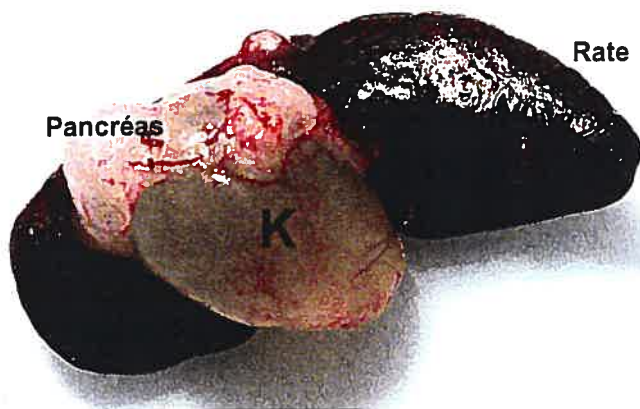


LÉGENDE :

Photo numérique montrant le cœur et les poumons d'une souris *SBPkd1*_{TAG} 39 et d'une souris contrôle du même fond génétique. Les deux souris sont âgées de quatre mois. Contrôle- (C57Bl6/J X CBA/J) F1

FIGURE: 3.16

Splénomégalie et kystes spléniques et pancréatiques chez les souris *SBPkd1*_{TAG}.



*SBPkd1*_{TAG} 41

LÉGENDE :

Photo numérique montrant la rate et le pancréas d'une souris *SBPkd1*_{TAG} 41.

Puisque la taille de plusieurs organes nous a semblée altérée, nous avons déterminé le ratio de ces organes par rapport au poids total de la souris (tableau III-VIII). Les ratios obtenus pour les souris *SBPkd1*_{TAG} nous indiquent que les reins de ces souris peuvent être diminués jusqu'à quatre fois. Pour ce qui est du cœur, de la rate, et des poumons, une augmentation respective de trois fois, trois fois et demi et cinq fois est observée.

Lorsque nous avons effectué une coupe transversale sur les reins afin de les fixer, nous avons constaté que l'anatomie interne des reins était anormale. En effet, nous avons observé une régression de la papille et une perte presque totale de la médulla (figure 3.17).

TABLEAU III-VIII :

Poids des organes par rapport au poids total chez les souris SBPkd1_{TAG}.

Souris	Age mois	Rein %	Cœur %	Poumon %	Rate %
Contrôle n = 4	4	0.76 ± 0.02 0.74 ± 0.04	0.61 ± 0.08	0.57 ± 0.09	0.28 ± 0.03
SBPkd1 _{TAG} 39-10	5	0.45 – 0.18	1.00	0.68	0.60
SBPkd1 _{TAG} 39-15	4	0.33 – 0.33	2.00	3.00	0.26
SBPkd1 _{TAG} 39-16	5	0.50 – 0.21	1.10	0.60	0.33
SBPkd1 _{TAG} 41F	7	0.52 – 0.65	0.97	N.D.	1.00
SBPkd1 _{TAG} 41-4	4	0.80 – 0.78	N.D.	N.D.	0.70

LEGENDE :

Contrôle – (C57Bl/6J X CBA/J) F1; N.D.- valeur non-disponible; n- nombre de souris analysées.

Pour les contrôles, les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± déviation standard.

FIGURE: 3.17

Régression de la papille chez les souris *SBPkd1*_{TAG}.



Contrôle

***SBPkd1*_{TAG} 39**



***SBPkd1*_{TAG} 41**

LÉGENDE :

Photo montrant la régression de la papille et de la médulla dans les reins des souris *SBPkd1*_{TAG} et d'une souris contrôle du même fond génétique. Toutes les souris sont âgées de quatre mois. Contrôle- (C57Bl6/J X CBA/J) F1

Afin d'étudier plus en détail la pathologie des souris *SBPkd1*_{TAG} au niveau microscopique nous avons effectué des coupes histologiques sur tous les organes où des anomalies avaient été observées soit le rein, la rate, les poumons et le cœur (figures 3.18 à 3.21). Chez les souris adultes, les analyses rénales montrent la présence de kystes tubulaires et glomérulaires au niveau du cortex et de la médulla. Nous avons également observé de l'hyperplasie cellulaire, de la fibrose interstitielle, des infiltrats lymphocytaires ainsi que des dépôts protéiques. De plus, nous avons noté un épaississement important de la paroi vasculaire à tel point que la lumière de certains vaisseaux était presque complètement obstruée (figures 3.18A et B).

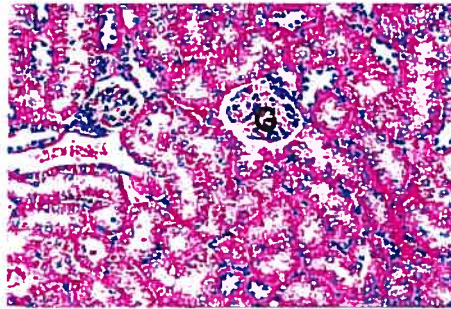
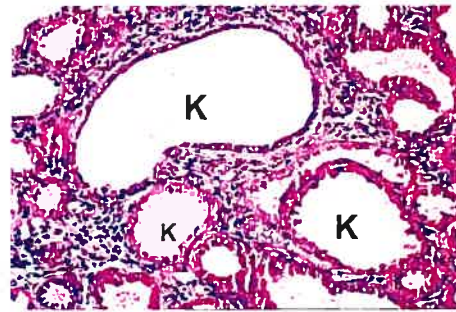
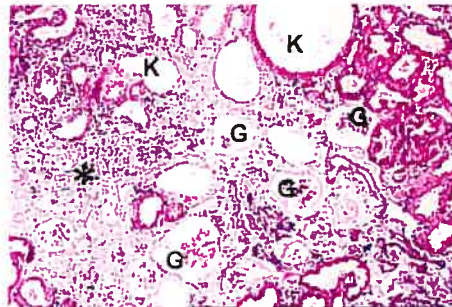
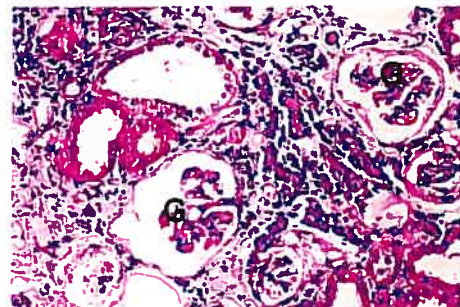
Dans le but de mieux comprendre la progression de la maladie, nous avons effectué des coupes de reins sur des souris âgées entre un et quarante-cinq jours (figure 3.19). Dès la naissance, nous pouvons observer des dilatations tubulaires et glomérulaires. Ces dernières vont progresser pour former des microkystes à quarante-cinq jours et des kystes à quatre mois. Chez les souris âgées de dix jours, nous avons observé un début de fibrose interstitielle. À vingt jours, des zones beaucoup plus importantes de fibrose sont observées principalement autour des glomérules et ce phénotype continue de progresser jusqu'à quatre mois. À partir de trente-cinq jours, nous pouvons observer de la glomérulosclérose totale et partielle soit une perte progressive du système capillaire et des cellules mésangiales. Éventuellement le glomérule disparaît complètement et un kyste est formé. Un épaississement de la capsule de Bowman avec une hyperplasie des cellules pariétales a également été observé chez ces souris. Finalement, à

quarante-cinq jours, la paroi vasculaire des vaisseaux sanguins commence à s'épaissir et de l'hyperplasie cellulaire est observée. Ces analyses effectuées à différents âges chez les souris *SBPkdI_{TAG}* nous montrent qu'initialement le rein est formé correctement et que la pathologie rénale progresse avec le temps.

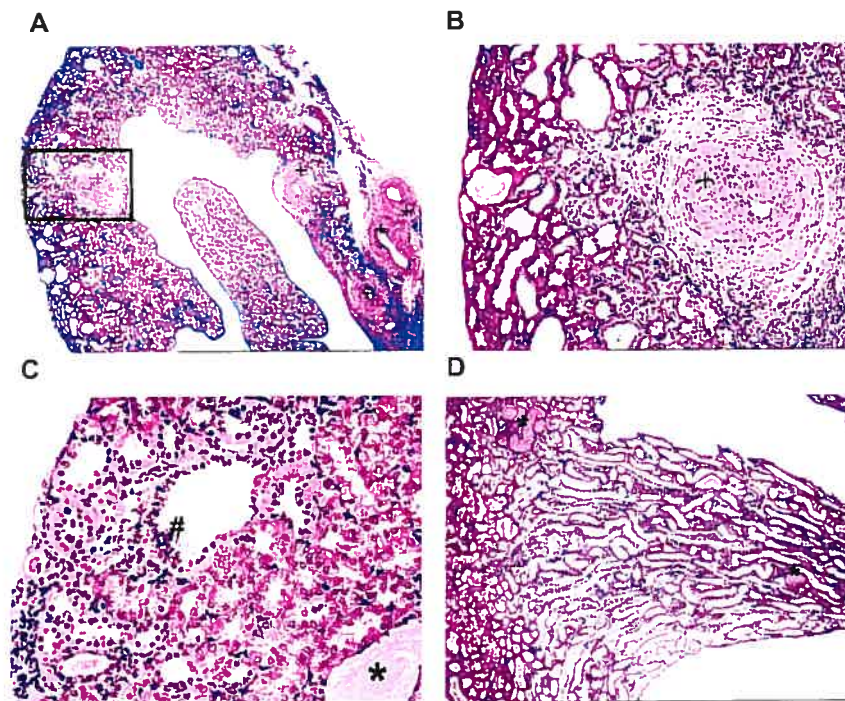
Au niveau de la rate, une pathologie a été observée seulement chez les souris *SBPkdI_{TAG}* de la lignée 41. Tout comme chez les souris SBP, nous avons observé une augmentation importante des foyers hématopoïétiques ainsi qu'une légère désorganisation de la pulpe blanche (résultat non-montrée).

Au niveau des poumons, les analyses nous montrent un épaississement des structures alvéolaires chez une souris en phase terminale souffrant d'œdème pulmonaire. Par contre, chez les autres souris *SBPkdI_{TAG}* analysées, les poumons ne semblent pas être affectés (figure 3.20).

Au niveau du cœur, il ne semble pas y avoir d'anomalie même si ce dernier était hypertrophié par rapport aux contrôles (résultat non-montré).

FIGURE : 3.18A**Analyses histologiques des reins chez les souris *SBPkd1*_{TAG} adultes.****Contrôle****A****B****C****LÉGENDE :**

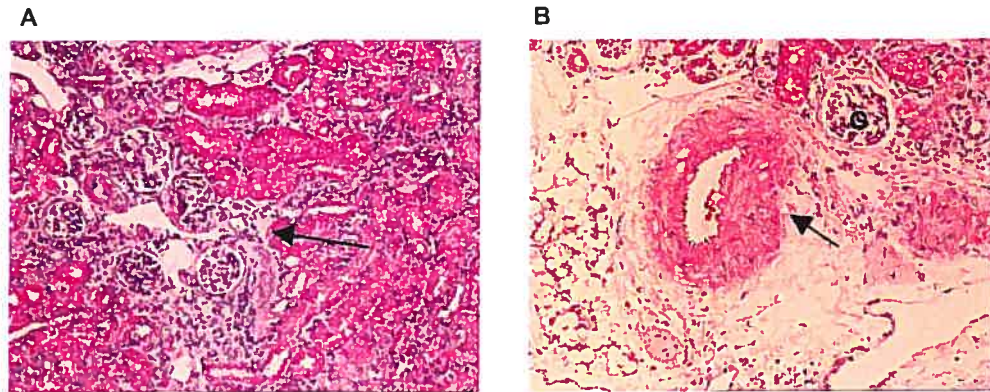
Coupes histologiques des reins des souris *SBPkd1*_{TAG} et d'une souris contrôle du même âge et du même fond génétique. A- kyste tubulaires (K) (200X); B- fibrose interstitielle et infiltrats lymphocytaires (*); kystes glomérulaires (G); kystes tubulaires (K) (100X); C- grossissement de B montrant des kystes glomérulaires (G) (200X). Contrôle- (C57B16/J X CBA/J) F1.

FIGURE: 3.18 B**Analyses histologiques des reins chez les souris *SBPkd1*_{TAG} adultes.****LÉGENDE :**

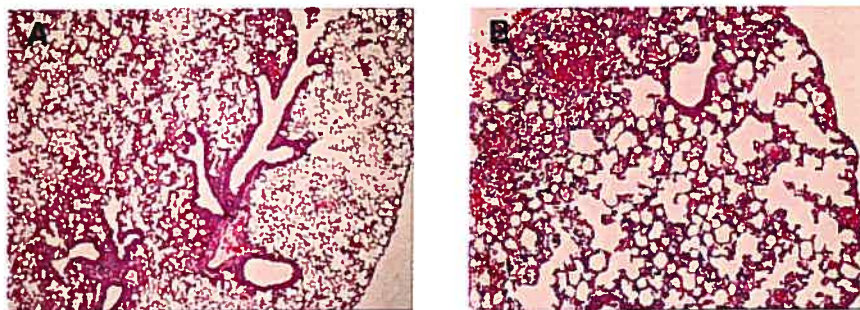
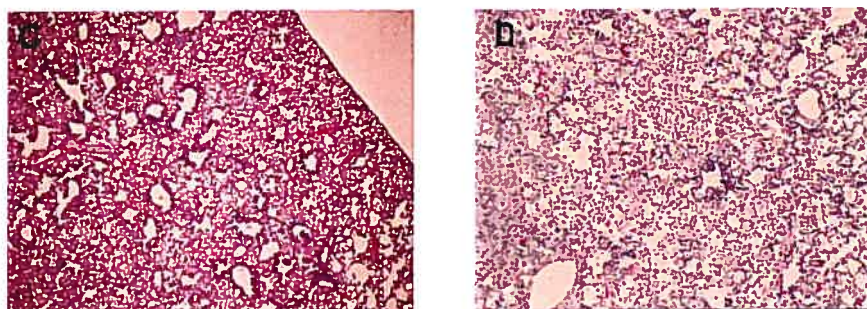
Coupes histologiques des reins des souris *SBPkd1*_{TAG}. A- dilatation du pelvis (25X); B- grossissement de A montrant un épaississement de la paroi vasculaire (+) (100X); C- hyperplasie cellulaire (#) et dépôts protéiques dans les kystes (*) (200X); D- dilatation des tubules collecteurs et dépôts protéiques * (50X).

FIGURE: 3.19

Analyses histologiques des reins chez les souris *SBPkd1*_{TAG} âgées de 20 et 45 jours.

**LÉGENDE :**

Coupes histologiques des reins des souris *SBPkd1*_{TAG} à différents âges. A- fibrose interstitielle entourant les glomérules à 20 jours (100X); B- dilatation glomérulaire (G) et épaissement de la paroi vasculaire à 45 jour (200X).

FIGURE: 3.20**Analyses histologiques des poumons chez les souris *SBPkd1*_{TAG}.****Contrôle*****SBPkd1*_{TAG} 39****LÉGENDE :**

Coupes histologiques des poumons des souris *SBPkd1*_{TAG} 39. A et C- grossissement 50X; B et D- grossissement 100X; Contrôle- (C57Bl6/J X CBA/J) F1.

3.3 CROISEMENTS AVEC LES SOURIS *PKD1 KNOCK-OUT*

Nous avons effectué des études de fonctionnalité protéique par des croisements entre nos souris transgéniques *SBPkd1_{TAG}* et des souris *Pkd1 knock-out* hétérozygotes. Les souris *Pkd1 knock-out* utilisées nous ont été fournies par le Dr Stephan Somlo (Yale University, School of Medicine). Ces souris ont le gène de la résistance à la néomycine inséré dans le codon 4 de l'exon 1, empêchant la transcription de *Pkd1*. Les souris *Pkd1^{-/-}* meurent *in utero* autour de E16.5 et des kystes aux reins et au pancréas sont observés à partir de E15.5 et E13.5 respectivement. Toutefois, la cause exacte de leur décès n'a pas été déterminée (Wu et al., 2002). Par le croisement de nos souris *SBPkd1_{TAG}* avec ces souris, nous avons voulu vérifier si le transgène *SBPkd1_{TAG}* est suffisant pour permettre la survie des souris *Pkd1 knock-out* homozygotes.

3.3.1 Croisements et génotypage des souris *SBPkd1_{TAG} Pkd1^{-/-}*

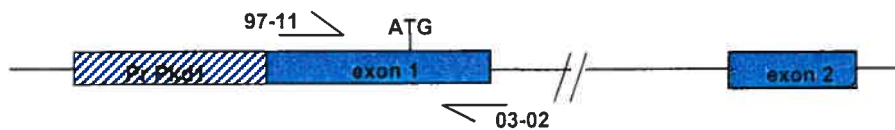
Les souris transgéniques des lignées *SBPkd1_{TAG}* 3, 39 et 41 ont été croisées avec les souris *Pkd1^{+/-}*. Les souris transgéniques *Pkd1^{+/-}* de la génération F1 ont ensuite été croisées entre elles dans le but d'obtenir des souris transgéniques *Pkd1^{-/-}*, génération F2.

Le génotypage des souris transgéniques *knock-out* a été effectué par un essai de PCR (figure 3.21). Jusqu'à présent, une seule souris *SBPkd1_{TAG} 3 Pkd1^{-/-}* a été obtenue sur un total de douze souris de la génération F2. Cette même analyse pour les lignées *SBPkd1_{TAG}* 39 et 41 est présentement en cours. Ainsi, cette étude confirme la fonctionnalité de la protéine produite par le transgène *SBPkd1_{TAG}*.

FIGURE: 3.21

Génotypage des souris *SBPkd1*_{TAG 3} *Pkd1*^{-/-}.

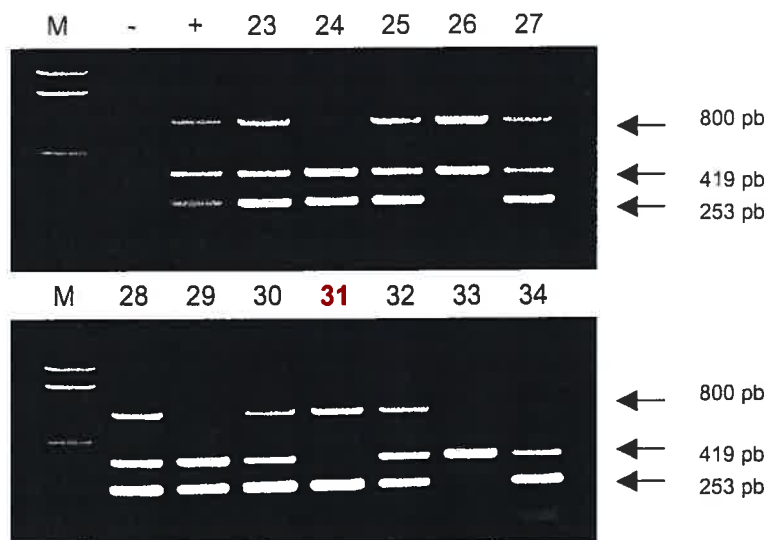
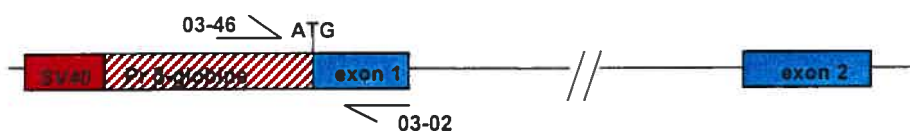
Endogène: 419 pb



Néo: 800 pb



Transgène: 253 pb



LEGENDE :

Le génotypage des souris *SBPkd1*_{TAG 3} *Pkd1* knock-out a été effectué par PCR avec les oligos 97-11, 03-02, 98-5 et 03-46.

M- marqueur 100 pb ; - : contrôle négatif ; + : contrôle positif.

3.3.2 Analyses physiologiques des souris *SBPkd1_{TAG} Pkd1^{-/-}*

Afin de vérifier les fonctions rénales des souris *SBPkd1_{TAG} Pkd1^{-/-}*, nous avons effectué des analyses d'urine et de sérum sur la seule souris que nous avons obtenue jusqu'à maintenant. Au moment où les analyses ont été effectuées, la souris était âgée de quatre semaines (tableaux III-IX et III-X). Au niveau des analyses urinaires, le BUN, la créatinine, les protéines et l'osmolalité sont diminués (tableau III-IX). Même si les analyses ont été effectuées sur une seule souris, les valeurs obtenues nous indiquent que les fonctions rénales de cette souris sont altérées et ces résultats sont confirmés par les analyses de sérum. En effet, la créatinine et le BUN sont augmentés respectivement de deux et quatre fois dans le sérum (tableau III-X). De plus, la souris *SBPkd1_{TAG3} Pkd1^{-/-}* avait une hémocrite de 22 %, comparativement à 50 % pour les souris contrôles.

Dans le cas des souris *SBPkd1_{TAG} 3* et *SBPkd1_{TAG} 3 Pkd1^{+/-}*, les analyses d'urine et de sérum montrent que les fonctions rénales de ces souris sont également affectées. Cependant, elles le sont de façon moins importante que chez les souris *SBPkd1_{TAG} 3 Pkd1^{-/-}*. Avec le transgène *SBPkd1_{TAG}*, nous avons permis la survie d'une souris *Pkd1^{-/-}*. Toutefois, dès l'âge de quatre semaines les fonctions rénales de cette souris *SBPkd1_{TAG} 3 Pkd1^{-/-}* sont gravement affectées.

TABEAU III-IX :

Analyses urinaires chez les souris SBP*kd1*_{TAG3} P*kd1*^{-/-}.

Souris	n	BUN mmol/L	Créatinine mmol/L	Protéines g/L	Osmolalité mosm/kg
Contrôle	2	1279 ± 248	5.1 ± 0.3	2.1 ± 0.5	2090 ± 400
SBP<i>kd1</i>_{TAG 3} P<i>kd1</i> +/+	2	318 ± 58	1.6 ± 0.0	0.2 ± 0.0	675 ± 150
SBP<i>kd1</i>_{TAG 3} P<i>kd1</i> +/-	2	488 ± 165	1.3 ± 0.0	0.1 ± 0.1	1005 ± 249
SBP<i>kd1</i>_{TAG 3} P<i>kd1</i> -/-	1	234	0.6	0.4	497

LEGENDE :

Contrôle- (C57Bl/6J X CBA/J) F1 ; BUN- urée ; n- nombre de souris analysées.

Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± déviation standard.

TABLEAU III-X :

Analyses de sérum chez les souris *SBPkd1*_{TAG 3} *Pkd1*^{-/-}.

Souris	n	BUN μmol/L	Créatinine μmol/L
Contrôle	2	6.1 ± 0.6	26.5 ± 0.7
<i>SBPkd1</i> _{TAG 3} <i>Pkd1</i> +/+	2	7.7 ± 2.4	35 ± 2.8
<i>SBPkd1</i> _{TAG 3} <i>Pkd1</i> +/-	2	11.2 ± 3.5	35 ± 2.8
<i>SBPkd1</i> _{TAG 3} <i>Pkd1</i> -/-	1	26.7	56

LÉGENDE :

Contrôle- (C57Bl/6J X CBA/J) F1; BUN- urée; n- nombre de souris analysées.

Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± déviation standard.

3.4 SOURIS TRANSGÉNIQUES *PKD1*_{TAG} Δ *TSC2*

Dans un deuxième temps, nous avons vérifié si la surexpression ubiquitaire du gène *Pkd1* peut causer une pathogénèse ADPKD complète, soit des kystes rénaux et extrarénaux, des anévrismes cérébraux et des anomalies des valves cardiaques. Pour ce faire, nous avons produit un troisième modèle de souris transgéniques appelées *Pkd1*_{TAG} Δ *Tsc2*. Le transgène provient du BAC *Pkd1-Tsc2* et contient le gène de *Pkd1* en entier ainsi que ces éléments régulateurs en 5' et en 3'. Le marquage du transgène a été effectué de la même façon que chez les souris SB*Pkd1*_{TAG} soit par l'ajout d'un site EcoRI dans l'exon 10 du gène de *Pkd1*. Dans ce cas-ci, un second événement de recombinaison homologue dans les BAC a été nécessaire pour éliminer une partie du gène de *Tsc2*.

3.4.1 Modification du BAC *Pkd1* : Délétion du gène *Tsc2* (Δ *Tsc2*)

Nous avons d'abord essayé de microinjecter un fragment *Pkd1*_{TAG} de 95 kb digéré MluI-ClaI. Toutefois, nous avons eu des problèmes de dégradation lors de la purification de ce fragment sur gel d'électrophorèse à champs pulsés.

Pour remédier à la situation, nous avons délété le gène de *Tsc2* par recombinaison homologue dans les BAC afin de diminuer la taille du fragment à microinjecter. Suite à ce deuxième événement de recombinaison homologue, la région couvrant l'intron 2 à l'exon 42 du gène de *Tsc2* a été délétée. Deux bras d'homologies situées de part et d'autre de la région délétée ont été amplifiées par PCR et clonées dans le *pld53*. La première région couvre le promoteur et l'intron 2 de *Tsc2* et la seconde commence avec l'exon 42 de *Tsc2* et va jusque dans le

3'UTR de *Pkd1*. Cette délétion de 37 kb nous a permis de diminuer la taille du fragment à purifier sur gel et ainsi éviter les problèmes de dégradation.

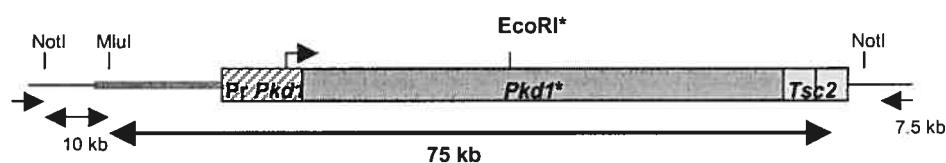
Les analyses d'intégrité du BAC recombinant *Pkd1*_{TAG} Δ *Tsc2* sont présentées aux figures 3.7A et B avec celles du BAC recombinant SB*Pkd1*_{TAG}.

Le transgène *Pkd1*_{TAG} Δ *Tsc2* de 75 kb digéré MluI-NotI (figure 3.22) a ensuite été purifié selon la technique décrite précédemment et microinjecté dans des œufs fertilisés (C57Bl/6J X CBA/J) F2.

FIGURE : 3.22

Purification du fragment *Pkd1*_{TAG} Δ *Tsc2* pour la microinjection.

Digestion MluI-NotI :



LÉGENDE :

Un fragment de 75 kb a été purifié sur PFGE afin d'éliminer le vecteur du BAC.

3.4.2 Détection et intégrité du transgène *Pkd1*_{TAG} Δ *Tsc2*

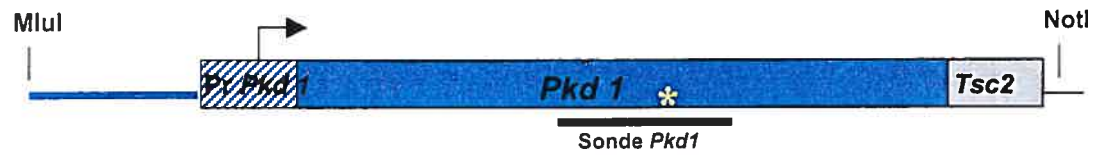
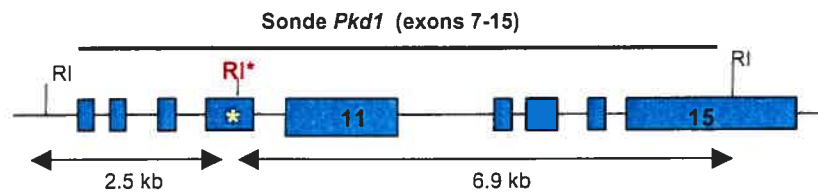
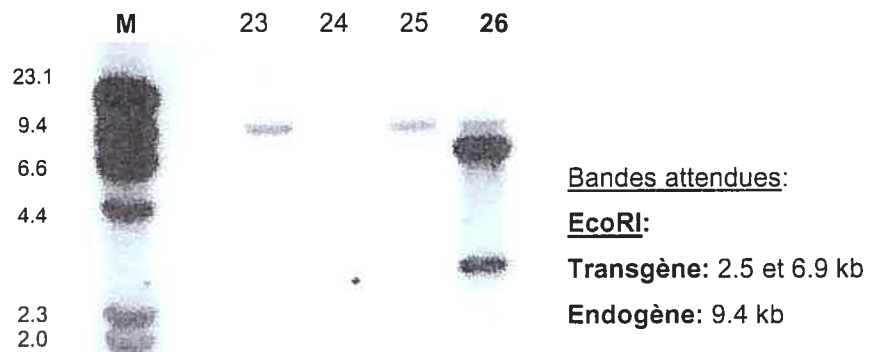
Afin de détecter la présence du transgène chez les souris fondatrices obtenues suite à la microinjection, nous avons utilisé la même stratégie qu'avec les souris SB*Pkd1*_{TAG}. Les résultats de cette analyse sont présentés à la figure 3.23 et jusqu'à maintenant trois souris fondatrices *Pkd1*_{TAG} Δ *Tsc2* ont été obtenues. Le nombre de copies pour chacune des souris fondatrices a été déterminé en

comparant le transgène au gène endogène (2 copies). Les caractéristiques moléculaires des souris *Pkd1*_{TAG} Δ *Tsc2* sont présentées dans le tableau III-XI.

Par la suite, nous avons vérifié l'intégrité du transgène par des analyses aux extrémités 5' et 3' (figures 3.24A et B). Pour l'analyse en 5', nous avons bénéficié du fait que les génotypes des donneurs et receveurs sont différents. En effet, la souche du BAC utilisé est 129/sv tandis que les œufs de souris dans lesquels l'ADN est microinjecté sont de souches hybrides (C57Bl/6J X CBA/J) F2. Un polymorphisme dans la région promotrice du gène de *Pkd1* a donc été employé. Un produit de PCR de 232 pb est amplifié chez les souris C57Bl/6J et un produit supplémentaire de 199 pb est observé si le transgène est présent (figure 3.24A).

Dans le cas de l'extrémité 3', une analyse Southern a été effectuée avec une sonde couvrant les exons 45 et 46 du gène de *Pkd1*. Grâce à la délétion du gène de *Tsc2*, nous pouvons facilement différencier le transgène de l'endogène. En effet, la digestion KpnI de l'ADN génomique donne une bande à 5.0 kb si le transgène est intègre et la bande endogène apparaît à 7.1 kb (figure 3.24B). Le transgène semble être intègre pour toutes les souris *Pkd1*_{TAG} Δ *Tsc2* analysées. Toutefois, le fond génétique de la souris fondatrice *Pkd1*_{TAG} Δ *Tsc2* 6 devra être vérifié parce que l'amplification du polymorphisme en 5' ne donne pas le produit de PCR attendu avec le fond génétique hybride (C57Bl/6J X CBA/J) F2. Les caractéristiques moléculaires des souris *Pkd1*_{TAG} Δ *Tsc2* sont présentées au tableau III-XI.

FIGURE: 3.23

Détection génomique du transgène *Pkd1*_{TAG} Δ *Tsc2*.Détection du transgène:Fondatrices *Pkd1*_{TAG} Δ *Tsc2***LÉGENDE :**

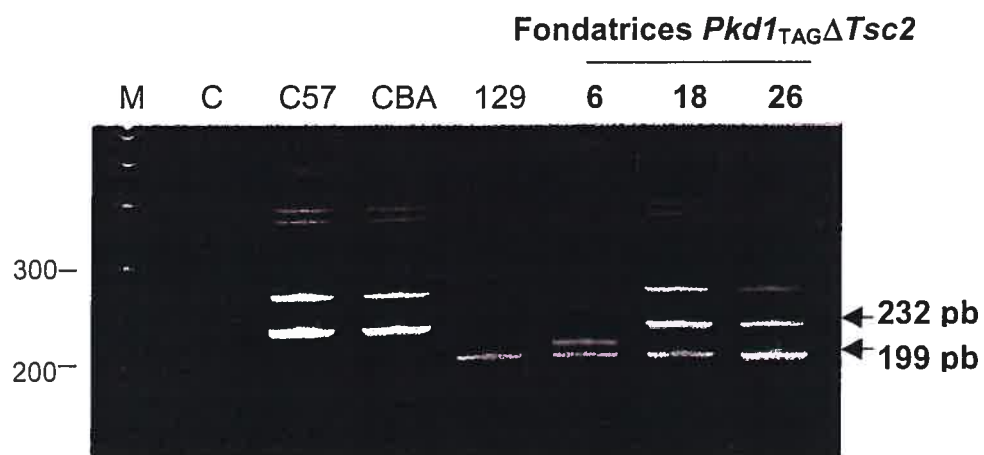
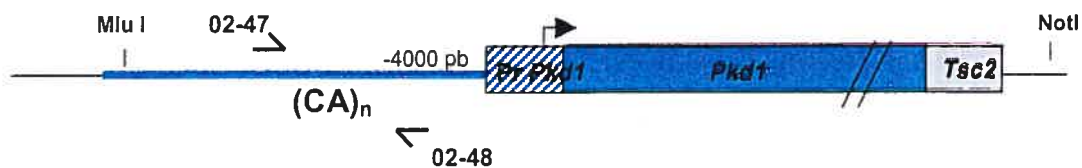
La détection du transgène a été effectuée par Southern avec une sonde couvrant les exons 7-15 de *Pkd1*. La digestion EcoRI produit une bande à 9.4 kb dans le cas du gène endogène et deux bandes additionnelles à 2.5 et 6.9 kb en présence du transgène.

M- marqueur λ HindIII

FIGURE: 3.24A

Intégrité du transgène *Pkd1*_{TAG} Δ *Tsc2*.

Extrémité 5' :

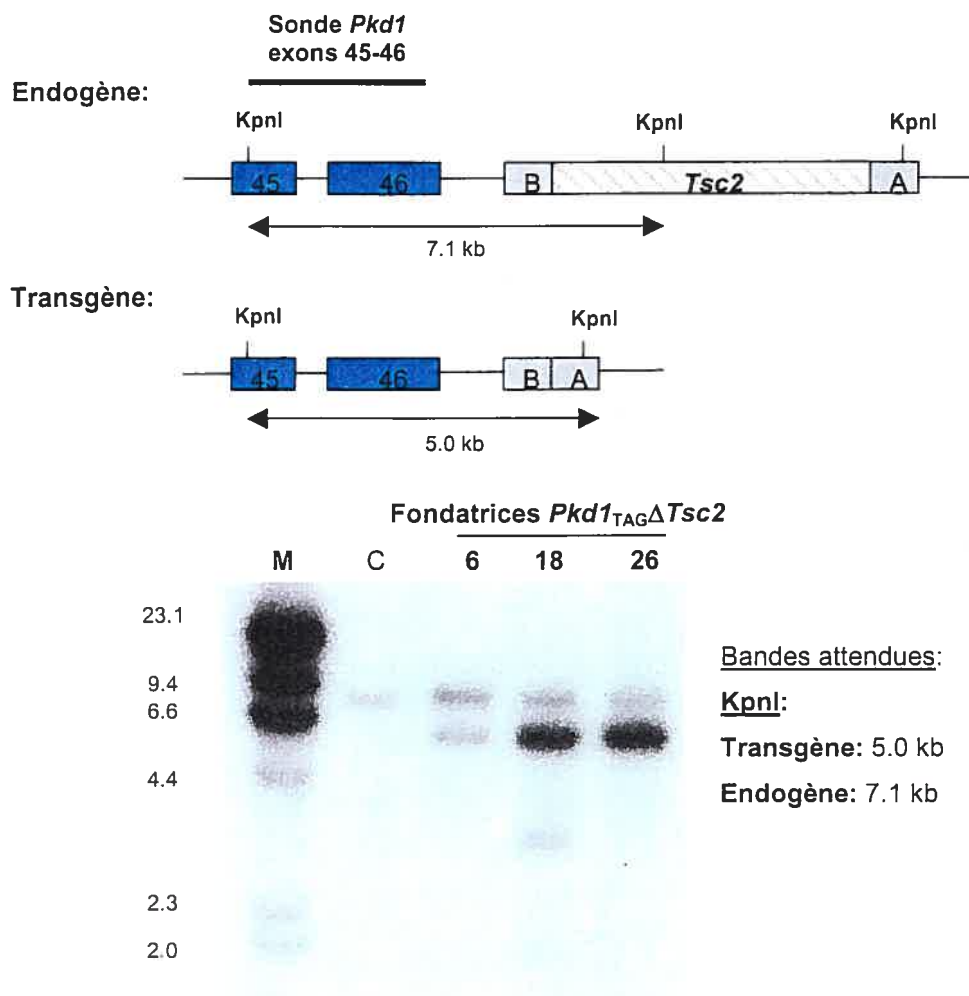
**LEGENDE :**

L'intégrité du transgène *Pkd1*_{TAG} Δ *Tsc2* a été vérifiée à l'extrémité 5' en utilisant un polymorphisme. Le transgène BAC *Pkd1*_{TAG} Δ *Tsc2* provient d'un fond génétique 129/sv tandis que le fond génétique du receveur est C57Bl/6J et CBA/J. Les oligos 02-47 et 02-48 sont utilisés pour amplifier le polymorphisme. Un produit de 232 pb est observé dans le cas des C57Bl/6J et CBA/J et 199 pb sont amplifiés avec les souris 129/sv. M-marqueur 100 pb ; C- contrôle négatif.

FIGURE: 3.24B

Intégrité du transgène *Pkd1*_{TAGΔTsc2}.

Extrémité 3' :

**LÉGENDE :**

L'intégrité du transgène a été déterminée par buvardage de type Southern en utilisant une sonde *Pkd1* exons 45-46. La digestion KpnI produit une bande à 7.1 kb pour le gène endogène et une bande additionnelle à 5.0 kb pour le transgène.

M- marqueur λ HindIII; C- contrôle souris sauvage (C57Bl/6J X CBA/J).

TABLEAU III-XI :**Caractéristiques moléculaires des souris *Pkd1*_{TAG} Δ *Tsc2*.**

Lignées de souris	# Copies	Intégrité	Expression
6	2	√	N.D.
18	10	√	N.D.
26	10	√	N.D.

LÉGENDE :

Trois souris fondatrices *Pkd1*_{TAG} Δ *Tsc2* ont été obtenues jusqu'à maintenant. Le nombre de copies et l'intégrité du transgène ont été déterminés pour chacune des souris. N.D.- non-déterminé

Chapitre 4

DISCUSSION ET CONCLUSION

4.1 DISCUSSION

Avec le séquençage du génome humain, les modèles murins sont de plus en plus utilisés pour étudier des maladies génétiques telle que la polykystose rénale. Ces modèles peuvent être des mutants spontanés, mais avec le développement des techniques de transgénèse et d'ablation génique des centaines de nouveaux modèles ont pu être générés pour l'étude de maladies spécifiques.

Dans ce cas-ci, notre objectif initial était de vérifier si la surexpression du gène *Pkd1* peut être un mécanisme pathogénétique de la polykystose rénale autosomique dominante (ADPKD). Pour ce faire, deux approches expérimentales ont été employées pour générer des souris surexprimant le gène de *Pkd1* spécifiquement aux reins. Le phénotype rénal observé chez les souris *SBPkd1*_{TAG} montre pour la première fois que la surexpression du gène de *Pkd1* est suffisante pour causer une kystogénèse rénale *in vivo* similaire à celle observée chez les patients ADPKD. Notre hypothèse initiale a donc été confirmée et un nouveau modèle murin transgénique de polykystose rénale a été produit.

4.1.1 Souris transgéniques SBP

Pour générer nos souris SBP, nous avons utilisé une construction plasmidique contenant l'ADNc de *Pkd1* et les éléments régulateurs rénaux spécifiques SB (*enhancer* SV40 et promoteur β -globine).

L'utilisation de l'ADNc a été favorisée parce que *Pkd1* est un gène de plus de 50 kb et est donc beaucoup plus difficile à manipuler que son ADNc de 14 kb. En plus d'être rapide et directe, l'utilisation de l'ADNc nous permet de différencier plus facilement le transgène du gène endogène.

Quant aux éléments régulateurs SB, ils ont été employés dans le passé devant la séquence d'ADN génomique des oncogènes *c-myc* et *c-fos* ainsi que devant l'ADNc de *bcl-2* et causent une surexpression spécifiquement ciblée aux cellules épithéliales rénales (Trudel et al., 1991; Trudel et al., 1997; Trudel et al., 1998). Cependant, dans certaines lignées de souris, le transgène est également détecté au niveau de la rate et des poumons (Trudel et al., 1997). Huit lignées de souris SBP ont été établies et le transgène est exprimé chez les souris issues des lignées 45, 63A, 63B, 65 et 68A. Jusqu'à maintenant un phénotype rénal similaire à ADPKD a été observé chez deux souris SBP (63A et 68A) et ces souris étaient âgées de plus de dix-huit mois. D'après les analyses histologiques, toutes les autres souris analysées avant dix-huit mois ne présentaient aucune anomalie rénale. Malgré l'utilisation des éléments régulateurs SB, des splénomégalies et des tumeurs à l'abdomen ont été observées chez plusieurs souris âgées de plus de dix mois.

4.1.1.1 Expression et spécificité du transgène

L'absence de phénotype rénal observé chez la plupart des souris SBP analysées suggère que le niveau d'expression du transgène est insuffisant pour causer la formation de kystes rénaux. Ce que nous avons observé avec notre première approche expérimentale est en fait un des principaux problèmes rapportés dans la littérature par rapport à l'utilisation de l'ADNc en transgénèse. En effet, des études ont montré que la présence d'introns permet d'obtenir une plus grande proportion de souris transgéniques qui expriment le transgène et que les niveaux d'expression moyens de l'ARNm sont plus élevés (Brinster et al., 1988). Des résultats similaires ont été obtenus lorsque les éléments régulateurs SB ont été placés devant l'ADNc de *bcl-2* par rapport aux séquences génomiques de *c-myc* et *c-fos* (Trudel et al., 1997). Il a également été montré que la présence d'introns hétérologues à l'intérieur de l'ADNc peut augmenter les niveaux d'expression du transgène chez la souris. Dans le cas des souris SBP nous avons un intron en aval de l'ADNc de *Pkd1*, mais il semble que les introns placés en 3' de la séquence codante n'ont aucun effet sur la transcription (Palmiter et al., 1991). De plus, des études de transfection cellulaires ont montré que la présence d'un site donneur d'épissage à proximité du promoteur augmente de manière significative le niveau d'expression du transgène. Ces études suggèrent que la maturation des ARN messagers et la transcription sont interdépendants et que l'utilisation de séquences introniques devrait toujours être favorisée (Furger et al., 2002).

Les analyses d'expression par RT-PCR suggèrent également une perte de spécificité des éléments régulateurs SB puisque le transgène a été détecté dans la plupart des organes testés. Cette perte de spécificité pourrait être expliquée par l'utilisation de l'ADNc du gène de *Pkd1* puisque c'est la principale différence avec les souris *SBPkd1_{TAG}* où l'expression du transgène est ciblée aux reins. Toutefois, l'utilisation des éléments régulateurs SB devant l'ADNc de *bcl-2* semble indiquer le contraire et aucune expérience effectuée jusqu'à maintenant ne permet d'expliquer en quoi la présence d'introns dans le gène de *Pkd1* pourrait influencer la spécificité d'expression du transgène.

4.1.2 Souris transgéniques *SBPkd1_{TAG}*

Étant donné que nous n'avons pas confirmé notre hypothèse de départ avec les souris SBP, une seconde souris transgénique surnommée *SBPkd1_{TAG}* a été générée. Pour ce faire, nous avons employé la séquence d'ADN génomique du gène *Pkd1* contenue dans un BAC puisque la présence d'introns permet d'obtenir des niveaux d'expression plus élevés en transgénèse. Comme pour les souris SBP, le transgène a été placé sous le contrôle des éléments régulateurs SB, mais dans ce cas-ci, ils ont dû être insérés par recombinaison homologue dans les BAC. Avec les souris *SBPkd1_{TAG}*, le transgène semble être exprimé plus fortement et une pathologie rénale avec une pénétrance complète a été observée chez les trois lignées de souris analysées. Le phénotype rénal observé est donc causé par la surexpression du transgène et non par son site d'intégration dans le génome.

4.1.2.1 Expression du transgène

Les analyses d'expression du transgène ont été effectuées par un essai de RT-PCR semi-quantitatif sur des reins de souris adultes issues des lignées 3, 39 et 41. D'après ces analyses, le niveau d'expression du transgène chez les souris de la lignée 41 est une fois et demi et trois fois plus élevé que chez les souris des lignées 39 et 3 respectivement. Par contre, pour les lignées 39 et 41 les résultats de ces analyses ne corrélaient pas avec la sévérité du phénotype. En effet, d'après les analyses physiologiques et morphologiques les souris 39 ont la pathologie rénale la plus sévère.

Il est fort probable que le transgène *Pkd1* soit exprimé dans l'épithélium des tubules rénaux puisque les éléments régulateurs SB sont reconnus pour cibler l'expression du transgène à cet endroit (Trudel et al., 1991; Trudel et al., 1997). La perte de structures tubulaires où *Pkd1* est exprimé pourrait expliquer le manque de corrélation entre le niveau d'expression et le phénotype observé. En effet, les analyses morphologiques effectuées sur des souris *SBPkd1*_{TAG} âgées entre un jour et quatre mois ont montré que la majorité de la médulla est compressée due à une régression de la papille. De plus, les structures tubulaires sont progressivement remplacées par des infiltrats lymphocytaires et de la fibrose interstitielle. Il serait intéressant de vérifier, par hybridation *in situ*, si l'expression de *Pkd1* est ciblée principalement où le phénotype est le plus apparent, soit au niveau de la papille. De plus, les analyses d'expression par RT-PCR pourraient être refaites à un stade plus précoce de la maladie.

4.1.2.2 Insuffisance rénale chronique

Les fonctions rénales des souris *SBPkd1*_{TAG} ont été évaluées par des analyses urinaires et sanguines. Nous avons d'abord noté une diminution importante du BUN, de la créatinine et de l'osmolalité dans l'urine de nos souris. Des anomalies similaires au niveau de la concentration de l'urine ont également été observées chez les patients ADPKD et cela indique que le système collecteur est probablement affecté (Martinez-Maldonado et al., 1972).

De plus, une protéinurie a été observée chez nos souris par des analyses de type SDS-PAGE. Chez la souris, seules les protéines de faible poids moléculaire appelées protéines urinaires majeures (MUPs) peuvent traverser la barrière de filtration glomérulaire (Szoka and Paigen, 1978). Lorsque les protéines de haut poids moléculaire, normalement présentes en grande quantité dans le plasma sanguin, sont excrétées dans l'urine cela indique que la barrière est endommagée. L'excrétion de ces protéines diminue la pression oncotique et cela peut avoir des conséquences importantes au niveau pathologique.

Afin de déterminer l'impact de ces résultats au niveau systémique, des analyses sanguines ont également été effectuées. Au niveau du sérum, une augmentation significative du BUN et de la créatinine a été observée. L'urée et la créatinine constituent des déchets métaboliques qui sont acheminés aux reins afin d'être excrétés et une augmentation de ces paramètres dans le sérum signifie généralement que les fonctions rénales sont diminuées.

De plus, les résultats des paramètres hématologiques nous ont permis de conclure que les souris sont anémiques puisque les globules rouges et

l'hémoglobine sont diminués par rapport aux contrôles. L'anémie est une complication fréquemment observée chez les patients souffrant d'insuffisance rénale chronique et est généralement causée par une diminution de l'érythropoïétine (EPO) (Eschbach, 1989; Segal et al., 1988). Cette hormone synthétisée dans le rein influence la production de globules rouges dans la moelle osseuse. Il y a donc moins de nouveaux globules rouges produits lorsque les fonctions rénales sont altérées. Toutefois, le taux d'EPO devra être évalué afin de pouvoir conclure qu'une diminution de cette hormone est la cause de l'anémie observée chez les souris *SBPkd1*_{TAG}. Dans ce cas-ci, l'anémie pourrait également être causée par l'hémolyse des globules rouges et la rétention d'inhibiteurs de l'érythropoïèse (Eschbach, 1989).

4.1.2.3 Kystogénèse rénale

Les reins des souris *SBPkd1*_{TAG} sont kystiques, anémiques et hypotrophiés comparativement aux contrôles. Suite aux analyses histologiques, nous avons noté des kystes glomérulaires et tubulaires, de la glomérulosclérose totale et partielle, des tubules atrophiés, de la fibrose interstitielle, une régression de la papille et un épaississement de la paroi des vaisseaux sanguins. De plus, les analyses effectuées sur des souris de la lignée 39 âgées entre un et quarante-cinq jours nous ont montré que le développement de la maladie se fait de manière progressive.

Même si la pathogénèse rénale de notre modèle de souris transgéniques est similaire à celle observée chez les patients ADPKD, ont note quelques différences au niveau de la taille des reins et la sévérité du phénotype. L'hypoplasie rénale

observée chez nos souris transgéniques suggère un rôle distinct pour l'orthologue murin de *PKDI* et/ou différents mécanismes compensatoires selon la maturité de l'épithélium rénal. Une hypoplasie rénale a également été observée chez les souris *bcl-2 knock-out*, un modèle murin ADPKD. En fait, les reins des souris *bcl-2*^{-/-} peuvent être petits et pâles comme chez les souris *SBPkd1*_{TAG} ou hypertrophiés et kystiques en surface. Chez ces souris, l'hypoplasie rénale peut être expliquée par des taux anormalement élevés d'apoptose (Veis et al., 1993). Pour ce qui est de la sévérité du phénotype, il semble qu'un déséquilibre plus prononcé de la protéine entraîne un phénotype plus sévère. Ainsi, une ablation complète ou une surexpression de *Pkd1* cause un développement précoce de la maladie alors qu'un déséquilibre moins prononcé, tel que l'haploinsuffisance, cause un phénotype beaucoup moins sévère.

Des similarités ont également été observées avec les autres modèles murins de la maladie. Par exemple, chez les souris *PKDI-TSC2*, de la glomérulosclérose, de la fibrose interstitielle, une dilatation du pelvis et une atrophie tubulaire ont également été observées. Toutefois, même si ces souris surexpriment l'orthologue humain de *Pkd1*, leur phénotype diverge de celui de nos souris à plusieurs niveaux. En effet, les reins sont hypertrophiés et les kystes rénaux, majoritairement glomérulaires, sont présents seulement chez 38 % des souris analysées. De plus, contrairement à nos souris aucune pathologie vasculaire n'a été observée et le phénotype rénal apparaît beaucoup plus tardivement. Ces différences phénotypiques entre les souris *PKDI-TSC2* et nos souris *SBPkd1*_{TAG} peuvent s'expliquer par l'emploi de séquences régulatrices différentes,

l'utilisation du gène humain et la surexpression de *TSC2*, un gène possiblement impliqué dans le développement des kystes rénaux (Pritchard et al., 2000).

4.1.2.4 Oedème pulmonaire et problèmes cardiovasculaires

De l'œdème pulmonaire a été observé chez une souris de la lignée 39 âgée de 4 mois. Cette souris est la seule que nous avons sacrifiée et analysée au moment où elle était en phase terminale d'insuffisance rénale. Ainsi, d'autres souris au même stade de la maladie devront être analysées pour confirmer la pathologie pulmonaire. L'accumulation de liquides dans les tissus est souvent observée chez les patients en insuffisance rénale et peut être causée par plusieurs facteurs (Rocker et al., 1988). Dans ce cas-ci, l'œdème pourrait être causé par une diminution de la pression oncotique due à l'excrétion de protéines comme l'albumine et/ou une augmentation de la perméabilité capillaire qui survient suite à l'urémie.

En comparant les ratios organe/poids de nos souris avec les souris contrôle nous avons également noté une hypertrophie cardiaque chez plusieurs souris des lignées 39 et 41. Il est connu que l'anémie causée par l'insuffisance rénale peut entraîner des problèmes cardiovasculaires et plus particulièrement une hypertrophie du ventricule gauche (Frank et al., 2004). Des analyses histologiques plus approfondies devront être effectuées afin de vérifier si le ventricule gauche est effectivement hypertrophié. L'épaississement de la paroi des vaisseaux sanguins observé au niveau des reins, pourrait également amener de

l'hypertension, mais les analyses de pression sanguine ne nous ont pas permis de conclure que les souris étaient hypertendues (résultats non-montrés).

4.1.2.5 Rôle de *Pkd1* dans l'hématopoïèse?

Une splénomégalie et des kystes à la rate ont été observés chez les souris *SBPkd1*_{TAG} de la lignée 41 et cette pathologie corrèle avec les niveaux d'expression du transgène. Contrairement aux souris SBP, nous n'avons pas observé de tumeur à l'abdomen chez les souris *SBPkd1*_{TAG}, mais ces souris sont encore jeunes. L'expression de *PKD1* a été détectée dans les cellules rouges nucléées de la rate au stade fœtal (Ong et al., 1999b). De plus, des kystes à la rate ont été rapportés chez un faible pourcentage de patients ADPKD, mais aucune splénomégalie n'a été observée chez ces patients (Ha et al., 1997; Martinez and Grantham, 1995; Mosetti et al., 2003). Ces résultats suggèrent pour la première fois que *Pkd1* pourrait jouer un rôle au niveau de l'hématopoïèse et des analyses plus approfondies devront être effectuées pour confirmer cette hypothèse.

4.1.2.6 La protéine produite avec le transgène *SBPkd1*_{TAG} est fonctionnelle.

En croisant nos souris *SBPkd1*_{TAG} 3, 39 et 41 avec des souris *Pkd1* *knock-out*, nous avons réussi à sauver une souris *Pkd1*^{-/-} d'une létalité *in utero*. Jusqu'à maintenant, la seule souris *SBPkd1*_{TAG} *Pkd1*^{-/-} que nous avons obtenu provient d'un croisement avec les souris de la lignée 3. D'après les analyses effectuées, c'est la lignée de souris *SBPkd1*_{TAG} qui exprime le transgène le plus faiblement et dont la pathologie rénale est la moins sévère. Il sera donc intéressant de voir si

nous pourrions obtenir des souris *Pkd1*^{-/-} avec les lignées de souris 39 et 41 et si le phénotype sera plus ou moins sévère chez ces souris.

Même si nous avons complété la létalité embryonnaire de la souris *SBPkd1*_{TAG 3} *Pkd1*^{-/-}, un phénotype rénal a été observé. D'après les analyses effectuées à l'âge de quatre semaines, nous avons pu constater que les fonctions rénales de ces souris sont affectées davantage que celles des souris *SBPkd1*_{TAG 3} *Pkd1*^{+/-} et *SBPkd1*_{TAG 3}. Cela pourrait s'expliquer par une différence entre les patrons d'expression spatio-temporels des éléments régulateurs SB et de *Pkd1* endogène. De plus, étant donné que l'expression endogène de *Pkd1* est pratiquement ubiquitaire, un phénotype extrarénal sera probablement observé chez ces souris.

4.1.2.7 Mécanismes moléculaires de kystogénèse rénale

La pathologie rénale observée chez les souris *SBPkd1*_{TAG} montre que la surexpression de *Pkd1* est suffisante pour causer une kystogénèse rénale *in vivo*. Nos études appuient les résultats obtenus avec les souris transgéniques *PKDI-TSC2* et montrent pour la première fois que la surexpression de *TSC2* n'est pas requise.

Plusieurs études chez l'humain et la souris appuient l'hypothèse du *two-hit* ou de perte de fonction protéique pour expliquer les mécanismes moléculaires de la kystogénèse. En effet, chez l'humain des mutations somatiques et des pertes d'hétérozygoté au niveau de l'allèle normale de *PKDI* ont été observées tandis que chez la souris la délétion de *Pkd1* cause la formation de kystes rénaux

(Brasier and Henske, 1997; Kim et al., 2000; Koptides et al., 1998; Koptides et al., 1999; Lu et al., 1997; Lu et al., 2001; Pei et al., 1999; Qian et al., 1996; Torra et al., 1999; Watnick et al., 2000; Watnick et al., 1998; Wu et al., 2000). Toutefois, dans ce cas-ci, l'hypothèse de la perte de fonction protéique est peu probable puisque le gène endogène n'est pas muté et notre transgène semble produire une protéine fonctionnelle.

Les résultats obtenus avec les souris *SBPkd1*_{TAG} suggèrent que le dosage de la polycystine-1 pourrait être un facteur important dans le développement de la kystogénèse rénale. Ainsi, un déséquilibre de la polycystine-1 pourrait affecter la formation et/ou le rôle d'un complexe multiprotéiques actif. Des études réalisées sur d'autres maladies génétiques telles que la maladie de Pelizaeus-Merzbacher (PMD) ont montré que le dosage de la protéine peut effectivement jouer un rôle important dans le développement de la pathologie (Woodward K et al., 1999). L'effet de dosage de la protéine suggéré par notre modèle de souris corrèle également avec les études d'immunohistochimie effectuées sur des reins de patients ADPKD où l'allèle normal est exprimé dans plus de 80 % des kystes rénaux (Geng et al., 1996; Ong et al., 1999a; Ong et al., 1999b; Peters et al., 1996; Ward et al., 1996).

Un des mécanismes moléculaires potentiels serait que la surexpression de *Pkd1* cause une dérégulation des mécanismes d'apoptose et de prolifération cellulaire. Ce qui entraînerait éventuellement la formation de kystes et l'hypotrophie rénale. Une kystogénèse rénale a été observée chez plusieurs modèles de souris transgéniques qui surexpriment des gènes impliqués dans la

prolifération cellulaire tels que *c-myc*, *rasT24*, *c-erbB2*, *TGF- α* , *KGF* et *HGF* (Lowden et al., 1994; Nguyen et al., 1996; Schaffner et al., 1993; Stocklin et al., 1993; Takayama et al., 1997; Trudel et al., 1991). De plus, tel que mentionné précédemment, l'ablation génique de *bcl-2*, un membre anti-apoptotique, peut également causer une kystogénèse rénale chez la souris (Veis et al., 1993). L'hyperplasie cellulaire et les figures mitotiques observée avec les analyses d'histologie ainsi que l'hypotrophie rénale suggèrent une augmentation de la prolifération et de l'apoptose, mais des analyses devront être effectuées pour confirmer cette hypothèse.

4.1.3 Souris transgéniques *Pkd1*_{TAG} Δ *Tsc2*

Une troisième souris transgénique surnommée *Pkd1*_{TAG} Δ *Tsc2* a été générée afin de vérifier si la surexpression de *Pkd1* est suffisante pour causer une pathogénèse ADPKD complète. Pour ce faire, nous avons utilisé la séquence d'ADN génomique de *Pkd1* contenu dans un BAC ainsi que ses éléments régulateurs en 5' et 3'. Si notre hypothèse de départ est confirmée, ces souris seront utiles pour étudier les manifestations cliniques extrarénales normalement observées chez les patients ADPKD telles que des kystes au foie et au pancréas, des anévrismes cérébraux et des anomalies au niveau des valves cardiaques. La pathologie rénale pourra également être comparée avec celle observée chez les souris SB*Pkd1*_{TAG} ainsi que les patients ADPKD. Cette étude sera donc complémentaire aux souris SB*Pkd1*_{TAG} où le transgène était ciblé spécifiquement aux reins. Jusqu'à maintenant, trois souris fondatrices *Pkd1*_{TAG} Δ *Tsc2* ont été

obtenues et l'intégrité du transgène a été vérifiée par des analyses PCR et Southern.

4.2 CONCLUSION

Afin de vérifier si la surexpression de *Pkd1* peut causer une kystogénèse rénale et une pathogénèse ADPKD, trois souris transgéniques ont été générées.

La première souris surnommée SBP a été produite à l'aide de l'ADNc du gène de *Pkd1* et des éléments régulateurs SB. Deux souris SBP analysées présentaient des kystes rénaux et cela corrèle avec les faibles niveaux d'expression du transgène détectés dans le rein. Par contre, nous avons noté la présence de splénomégalies et de tumeurs à l'abdomen chez des souris adultes issues des lignées 45, 63A, 63B et 65.

Afin d'augmenter le niveau d'expression du transgène dans le rein, une deuxième approche expérimentale a été employée. Pour ce faire, nous avons utilisé la séquence génomique de *Pkd1* contenue dans un BAC pour générer les souris *SBPkd1*_{TAG}. Dans un premier temps, des analyses physiologiques des fonctions rénales ont été effectuées au niveau de l'urine et du sang. Les résultats de ces analyses ont montré une protéinurie, de l'urémie et de l'anémie chez ces souris. Par la suite, les analyses d'histologie ont confirmé la présence de kystes tubulaires et glomérulaires chez toutes les souris *SBPkd1*_{TAG} analysées. En plus de la pathologie rénale, des anomalies au niveau du cœur et des poumons ont été observées chez certaines souris en insuffisance rénale. Tout comme chez les souris SBP, nous avons également constaté une augmentation de la taille de la rate

chez les souris de la lignée 41 et cette pathologie corrèle avec les niveaux d'expression du transgène détectés dans cet organe.

La pathologie rénale observée chez les souris *SBPkd1*_{TAG} montre pour la première fois que la surexpression du gène *Pkd1* est suffisante pour causer la formation de kystes rénaux. Ce nouveau modèle de souris ADPKD sera fort utile pour étudier les mécanismes moléculaires de la kystogénèse et tester des traitements potentiels.

Dans le but d'étudier également les manifestations cliniques extrarénales observées chez les patients ADPKD, les souris transgéniques *Pkd1*_{TAG} Δ *Tsc2* ont été générées. Pour ce faire, la séquence génomique de *Pkd1* ainsi que ses éléments régulateurs en 5' et en 3' ont été employés. L'établissement des lignées est présentement en cours et des analyses seront effectuées sous peu. Si notre hypothèse initiale est confirmée, ces souris seront un nouveau modèle murin de la ADPKD et elles pourront être utilisées pour étudier la pathogénèse complète de la maladie.

LISTE DES RÉFÉRENCES

(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, 881-894.

(1995). Polycystic kidney disease: the complete structure of the PKD1 gene and its protein. The International Polycystic Kidney Disease Consortium. *Cell* 81, 289-298.

Arnould, T., Kim, E., Tsiokas, L., Jochimsen, F., Gruning, W., Chang, J.D., and Walz, G. (1998). The polycystic kidney disease 1 gene product mediates protein kinase C alpha-dependent and c-Jun N-terminal kinase-dependent activation of the transcription factor AP-1. *J. Biol. Chem.* 273, 6013-6018.

Atala, A., Freeman, M.R., Mandell, J., and Beier, D.R. (1993). Juvenile cystic kidneys (jck): a new mouse mutation which causes polycystic kidneys. *Kidney Int.* 43, 1081-1085.

Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. *Current Protocols in Molecular Biology*, vol.1. Etobicoke, Ontario, Canada. John Wiley and Sons, Inc., 1987.

Babich, V., Zeng, W.Z., Yeh, B.I., Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Cai, Y., Somlo, S., and Huang, C.L. (2004). The amino-terminal extracellular domain is required for polycystin-1-dependent channel activity. *J. Biol. Chem.*

Bargmann, C.I. and Horvitz, H.R. (1991). Chemosensory neurons with overlapping functions direct chemotaxis to multiple chemicals in *C. elegans*. *Neuron* 7, 729-742.

Bateman, A. and Sandford, R. (1999). The PLAT domain: a new piece in the PKD1 puzzle. *Curr. Biol.* 9, R588-R590.

Benzing, T., Gerke, P., Hopker, K., Hildebrandt, F., Kim, E., and Walz, G. (2001). Nephrocystin interacts with Pyk2, p130(Cas), and tensin and triggers phosphorylation of Pyk2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 9784-9789.

Bergmann, C., Senderek, J., Sedlacek, B., Pegiazoglou, I., Puglia, P., Eggermann, T., Rudnik-Schneborn, S., Furu, L., Onuchic, L.F., De Baca, M., Germino, G.G., Guay-Woodford, L., Somlo, S., Moser, M., Buttner, R., and Zerres, K. (2003). Spectrum of Mutations in the Gene for Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease (ARPKD/PKHD1). *J. Am. Soc. Nephrol.* 14, 76-89.

Bhunja, A.K., Piontek, K., Boletta, A., Liu, L., Qian, F., Xu, P.N., Germino, F.J., and Germino, G.G. (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, 157-168.

Blaszak,R.T., Potaman,V., Sinden,R.R., and Bissler,J.J. (1999). DNA structural transitions within the PKD1 gene. *Nucleic Acids Res.* 27, 2610-2617.

Bogdanova,N., Markoff,A., Gerke,V., McCluskey,M., Horst,J., and Dworniczak,B. (2001). Homologues to the first gene for autosomal dominant polycystic kidney disease are pseudogenes. *Genomics* 74, 333-341.

Boletta,A., Qian,F., Onuchic,L.F., Bragonzi,A., Cortese,M., Deen,P.M., Courtoy,P.J., Soria,M.R., Devuyst,O., Monaco,L., and Germino,G.G. (2001). Biochemical characterization of bona fide polycystin-1 in vitro and in vivo. *Am. J. Kidney Dis.* 38, 1421-1429.

Boulter,C., Mulroy,S., Webb,S., Fleming,S., Brindle,K., and Sandford,R. (2001). Cardiovascular, skeletal, and renal defects in mice with a targeted disruption of the Pkd1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 12174-12179.

Boulter,C.A., Aguzzi,A., Evans,M.J., and Affara,N. (1992). A chimaeric mouse model for autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Contrib. Nephrol.* 97, 60-70.

Brasier,J.L. and Henske,E.P. (1997). Loss of the polycystic kidney disease (PKD1) region of chromosome 16p13 in renal cyst cells supports a loss-of-function model for cyst pathogenesis. *J. Clin. Invest* 99, 194-199.

Brinster,R.L., Allen,J.M., Behringer,R.R., Gelinas,R.E., and Palmiter,R.D. (1988). Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85, 836-840.

Brinster,R.L., Chen,H.Y., Trumbauer,M.E., Yagle,M.K., and Palmiter,R.D. (1985). Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 82, 4438-4442.

Brook-Carter,P.T., Peral,B., Ward,C.J., Thompson,P., Hughes,J., Maheshwar,M.M., Nellist,M., Gamble,V., Harris,P.C., and Sampson,J.R. (1994). Deletion of the TSC2 and PKD1 genes associated with severe infantile polycystic kidney disease--a contiguous gene syndrome. *Nat. Genet.* 8, 328-332.

Burrow,C.R., Devuyst,O., Li,X., Gatti,L., and Wilson,P.D. (1999). Expression of the beta2-subunit and apical localization of Na⁺-K⁺-ATPase in metanephric kidney. *Am. J. Physiol* 277, F391-F403.

Bycroft,M., Bateman,A., Clarke,J., Hamill,S.J., Sandford,R., Thomas,R.L., and Chothia,C. (1999). The structure of a PKD domain from polycystin-1: implications for polycystic kidney disease. *EMBO J.* 18, 297-305.

Cai, Y., Maeda, Y., Cedzich, A., Torres, V.E., Wu, G., Hayashi, T., Mochizuki, T., Park, J.H., Witzgall, R., and Somlo, S. (1999). Identification and characterization of polycystin-2, the PKD2 gene product. *J. Biol. Chem.* *274*, 28557-28565.

Carone, F.A., Makino, H., and Kanwar, Y.S. (1988). Basement membrane antigens in renal polycystic disease. *Am. J. Pathol.* *130*, 466-471.

Chauvet, V., Qian, F., Boute, N., Cai, Y., Phakdeekitacharoen, B., Onuchic, L.F., Attie-Bitach, T., Guicharnaud, L., Devuyst, O., Germino, G.G., and Gubler, M.C. (2002). Expression of PKD1 and PKD2 transcripts and proteins in human embryo and during normal kidney development. *Am. J. Pathol.* *160*, 973-983.

Chen, X.Z., Vassilev, P.M., Basora, N., Peng, J.B., Nomura, H., Segal, Y., Brown, E.M., Reeders, S.T., Hediger, M.A., and Zhou, J. (1999). Polycystin-L is a calcium-regulated cation channel permeable to calcium ions. *Nature* *401*, 383-386.

Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J., and Rutter, W.J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* *18*, 5294-5299.

Christodoulou, K., Tsingis, M., Stavrou, C., Eleftheriou, A., Papapavlou, P., Patsalis, P.C., Ioannou, P., Pierides, A., and Constantinou, D.C. (1998). Chromosome 1 localization of a gene for autosomal dominant medullary cystic kidney disease. *Hum. Mol. Genet.* *7*, 905-911.

Cogswell, C., Price, S.J., Hou, X., Guay-Woodford, L.M., Flaherty, L., and Bryda, E.C. (2003). Positional cloning of jcpk/bpk locus of the mouse. *Mamm. Genome* *14*, 242-249.

Cuppige, F.E., Huseman, R.A., Chapman, A., and Grantham, J.J. (1980). Ultrastructure and function of cysts from human adult polycystic kidneys. *Kidney Int.* *17*, 372-381.

Delmas, P., Nomura, H., Li, X., Lakkis, M., Luo, Y., Segal, Y., Fernandez-Fernandez, J.M., Harris, P., Frischauf, A.M., Brown, D.A., and Zhou, J. (2002). Constitutive activation of G-proteins by polycystin-1 is antagonized by polycystin-2. *J. Biol. Chem.* *277*, 11276-11283.

Donaldson, J.C., Dempsey, P.J., Reddy, S., Bouton, A.H., Coffey, R.J., and Hanks, S.K. (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*, 168-178.

Donaldson, J.C., Dise, R.S., Ritchie, M.D., and Hanks, S.K. (2002). Nephrocystin-conserved domains involved in targeting to epithelial cell-cell junctions, interaction with filamins, and establishing cell polarity. *J. Biol. Chem.* *277*, 29028-29035.

- Dressler,G.R., Wilkinson,J.E., Rothenpieler,U.W., Patterson,L.T., Williams-Simons,L., and Westphal,H. (1993). Deregulation of Pax-2 expression in transgenic mice generates severe kidney abnormalities. *Nature* 362, 65-67.
- Dwyer,N.D., Troemel,E.R., Sengupta,P., and Bargmann,C.I. (1998). Odorant receptor localization to olfactory cilia is mediated by ODR-4, a novel membrane-associated protein. *Cell* 93, 455-466.
- Eschbach,J.W. (1989). The anemia of chronic renal failure: pathophysiology and the effects of recombinant erythropoietin. *Kidney Int.* 35, 134-148.
- Evan,G.I., Wyllie,A.H., Gilbert,C.S., Littlewood,T.D., Land,H., Brooks,M., Waters,C.M., Penn,L.Z., and Hancock,D.C. (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69, 119-128.
- Foggensteiner,L., Bevan,A.P., Thomas,R., Coleman,N., Boulter,C., Bradley,J., Ibraghimov-Beskrovnaya,O., Klinger,K., and Sandford,R. (2000). Cellular and subcellular distribution of polycystin-2, the protein product of the PKD2 gene. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11, 814-827.
- Frank,H., Heusser,K., Hoffken,B., Huber,P., Schmieder,R.E., and Schobel,H.P. (2004). Effect of erythropoietin on cardiovascular prognosis parameters in hemodialysis patients. *Kidney Int.* 66, 832-840.
- Furger,A., O'Sullivan,J.M., Binnie,A., Lee,B.A., and Proudfoot,N.J. (2002). Promoter proximal splice sites enhance transcription. *Genes Dev.* 16, 2792-2799.
- Gabow,P.A. (1993). Autosomal dominant polycystic kidney disease. *N. Engl. J. Med.* 329, 332-342.
- Gallagher,A.R., Cedzich,A., Gretz,N., Somlo,S., and Witzgall,R. (2000). The polycystic kidney disease protein PKD2 interacts with Hax-1, a protein associated with the actin cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 4017-4022.
- Geng,L., Burrow,C.R., Li,H.P., and Wilson,P.D. (2000). Modification of the composition of polycystin-1 multiprotein complexes by calcium and tyrosine phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* 1535, 21-35.
- Geng,L., Segal,Y., Peissel,B., Deng,N., Pei,Y., Carone,F., Rennke,H.G., Glucksmann-Kuis,A.M., Schneider,M.C., Ericsson,M., Reeders,S.T., and Zhou,J. (1996). Identification and localization of polycystin, the PKD1 gene product. *J. Clin. Invest* 98, 2674-2682.
- Gilbert,E., Morel,A., Tulliez,M., Maunoury,R., Terzi,F., Miquerol,L., and Kahn,A. (1997). In vivo effects of activated H-ras oncogene expressed in the liver and in urogenital tissues. *Int. J. Cancer* 73, 749-756.

Gilbert S.F. *Developmental Biology*, 6th Edition. Sunderland, MA, USA. Sinauer Associates Inc., 2000.

Gogusev,J., Murakami,I., Doussau,M., Telvi,L., Stojkoski,A., Lesavre,P., and Droz,D. (2003). Molecular cytogenetic aberrations in autosomal dominant polycystic kidney disease tissue. *J. Am. Soc. Nephrol.* *14*, 359-366.

Gong,S., Yang,X.W., Li,C., and Heintz,N. (2002). Highly efficient modification of bacterial artificial chromosomes (BACs) using novel shuttle vectors containing the R6Kgamma origin of replication. *Genome Res.* *12*, 1992-1998.

Grantham,J.J., Geiser,J.L., and Evan,A.P. (1987). Cyst formation and growth in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int.* *31*, 1145-1152.

Guillaume,R., D'Agati,V., Daoust,M., and Trudel,M. (1999). Murine Pkd1 is a developmentally regulated gene from morula to adulthood: role in tissue condensation and patterning. *Dev. Dyn.* *214*, 337-348.

Guillaume,R. and Trudel,M. (2000). Distinct and common developmental expression patterns of the murine Pkd2 and Pkd1 genes. *Mech. Dev.* *93*, 179-183.

Guo,L., Schreiber,T.H., Weremowicz,S., Morton,C.C., Lee,C., and Zhou,J. (2000). Identification and characterization of a novel polycystin family member, polycystin-L2, in mouse and human: sequence, expression, alternative splicing, and chromosomal localization. *Genomics* *64*, 241-251.

Ha,S.K., Park,C.H., Kna,J.S., Lee,S.Y., Lee,J.I., Kim,S.J., Seo,J.K., Lee,H.Y., and Han,D.S. (1997). Extrarenal manifestations of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Yonsei Med. J.* *38*, 111-116.

Haider,N.B., Carmi,R., Shalev,H., Sheffield,V.C., and Landau,D. (1998). A Bedouin kindred with infantile nephronophthisis demonstrates linkage to chromosome 9 by homozygosity mapping. *Am. J. Hum. Genet.* *63*, 1404-1410.

Hanaoka,K., Qian,F., Boletta,A., Bhunia,A.K., Piontek,K., Tsiokas,L., Sukhatme,V.P., Guggino,W.B., and Germino,G.G. (2000). Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents. *Nature* *408*, 990-994.

Hartz,P.A. and Wilson,P.D. (1997). Functional defects in lysosomal enzymes in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD): abnormalities in synthesis, molecular processing, polarity, and secretion. *Biochem. Mol. Med.* *60*, 8-26.

Hateboer,N., Dijk,M.A., Bogdanova,N., Coto,E., Sagar-Malik,A.K., San Millan,J.L., Torra,R., Breuning,M., and Ravine,D. (1999a). Comparison of

- phenotypes of polycystic kidney disease types 1 and 2. European PKD1-PKD2 Study Group. *Lancet* 353, 103-107.
- Hateboer,N., Lazarou,L.P., Williams,A.J., Holmans,P., and Ravine,D. (1999b). Familial phenotype differences in PKD11. *Kidney Int.* 56, 34-40.
- Hayashi,T., Mochizuki,T., Reynolds,D.M., Wu,G., Cai,Y., and Somlo,S. (1997). Characterization of the exon structure of the polycystic kidney disease 2 gene (PKD2). *Genomics* 44, 131-136.
- Haycraft,C.J., Swoboda,P., Taulman,P.D., Thomas,J.H., and Yoder,B.K. (2001). The *C. elegans* homolog of the murine cystic kidney disease gene *Tg737* functions in a ciliogenic pathway and is disrupted in *osm-5* mutant worms. *Development* 128, 1493-1505.
- Herrera,G.A. (1991). C-erb B-2 amplification in cystic renal disease. *Kidney Int.* 40, 509-513.
- Hildebrandt,F. and Otto,E. (2000). Molecular genetics of nephronophthisis and medullary cystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11, 1753-1761.
- Hildebrandt,F., Otto,E., Rensing,C., Nothwang,H.G., Vollmer,M., Adolphs,J., Hanusch,H., and Brandis,M. (1997a). A novel gene encoding an SH3 domain protein is mutated in nephronophthisis type 1. *Nat. Genet.* 17, 149-153.
- Hildebrandt,F., Strahm,B., Nothwang,H.G., Gretz,N., Schnieders,B., Singh-Sawhney,I., Kutt,R., Vollmer,M., and Brandis,M. (1997b). Molecular genetic identification of families with juvenile nephronophthisis type 1: rate of progression to renal failure. APN Study Group. Arbeitsgemeinschaft für Padiatrische Nephrologie. *Kidney Int.* 51, 261-269.
- Hogan B., Costantini F., Lacy E. *Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, NY, USA. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986.
- Horikoshi,S., Kubota,S., Martin,G.R., Yamada,Y., and Klotman,P.E. (1991). Epidermal growth factor (EGF) expression in the congenital polycystic mouse kidney. *Kidney Int.* 39, 57-62.
- Hossack,K.F., Leddy,C.L., Johnson,A.M., Schrier,R.W., and Gabow,P.A. (1988). Echocardiographic findings in autosomal dominant polycystic kidney disease. *N. Engl. J. Med.* 319, 907-912.
- Hou,X., Mrug,M., Yoder,B.K., Lefkowitz,E.J., Kremmidiotis,G., D'Eustachio,P., Beier,D.R., and Guay-Woodford,L.M. (2002). Cystin, a novel cilia-associated protein, is disrupted in the *cpk* mouse model of polycystic kidney disease. *J. Clin. Invest* 109, 533-540.

Huan, Y. and van Adelsberg, J. (1999). Polycystin-1, the PKD1 gene product, is in a complex containing E-cadherin and the catenins. *J. Clin. Invest* 104, 1459-1468.

Hughes, J., Ward, C.J., Aspinwall, R., Butler, R., and Harris, P.C. (1999). Identification of a human homologue of the sea urchin receptor for egg jelly: a polycystic kidney disease-like protein. *Hum. Mol. Genet.* 8, 543-549.

Hughes, J., Ward, C.J., Peral, B., Aspinwall, R., Clark, K., San Millan, J.L., Gamble, V., and Harris, P.C. (1995). The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nat. Genet.* 10, 151-160.

Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Bukanov, N.O., Donohue, L.C., Dackowski, W.R., Klinger, K.W., and Landes, G.M. (2000). Strong homophilic interactions of the Ig-like domains of polycystin-1, the protein product of an autosomal dominant polycystic kidney disease gene, PKD1. *Hum. Mol. Genet.* 9, 1641-1649.

Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Dackowski, W.R., Foggensteiner, L., Coleman, N., Thiru, S., Petry, L.R., Burn, T.C., Connors, T.D., Van Raay, T., Bradley, J., Qian, F., Onuchic, L.F., Watnick, T.J., Piontek, K., Hakim, R.M., Landes, G.M., Germino, G.G., Sandford, R., and Klinger, K.W. (1997). Polycystin: in vitro synthesis, in vivo tissue expression, and subcellular localization identifies a large membrane-associated protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 6397-6402.

Janaswami, P.M., Birkenmeier, E.H., Cook, S.A., Rowe, L.B., Bronson, R.T., and Davisson, M.T. (1997). Identification and genetic mapping of a new polycystic kidney disease on mouse chromosome 8. *Genomics* 40, 101-107.

Kelley, K.A., Agarwal, N., Reeders, S., and Herrup, K. (1991). Renal cyst formation and multifocal neoplasia in transgenic mice carrying the simian virus 40 early region. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2, 84-97.

Kim, E., Arnould, T., Sellin, L., Benzing, T., Comella, N., Kocher, O., Tsiokas, L., Sukhatme, V.P., and Walz, G. (1999a). Interaction between RGS7 and polycystin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 6371-6376.

Kim, E., Arnould, T., Sellin, L.K., Benzing, T., Fan, M.J., Gruning, W., Sokol, S.Y., Drummond, I., and Walz, G. (1999b). The polycystic kidney disease 1 gene product modulates Wnt signaling. *J. Biol. Chem.* 274, 4947-4953.

Kim, K., Drummond, I., Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Klinger, K., and Arnaout, M.A. (2000). Polycystin 1 is required for the structural integrity of blood vessels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 1731-1736.

Knudson, A.G., Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 68, 820-823.

Kobe,B. and Kajava,A.V. (2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 725-732.

Koptides,M., Constantinides,R., Kyriakides,G., Hadjigavriel,M., Patsalis,P.C., Pierides,A., and Deltas,C.C. (1998). Loss of heterozygosity in polycystic kidney disease with a missense mutation in the repeated region of PKD1. *Hum. Genet.* 103, 709-717.

Koptides,M., Hadjimichael,C., Koupepidou,P., Pierides,A., and Constantinou,D.C. (1999). Germinal and somatic mutations in the PKD2 gene of renal cysts in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hum. Mol. Genet.* 8, 509-513.

Koptides,M., Mean,R., Demetriou,K., Pierides,A., and Deltas,C.C. (2000). Genetic evidence for a trans-heterozygous model for cystogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hum. Mol. Genet.* 9, 447-452.

Koulen,P., Cai,Y., Geng,L., Maeda,Y., Nishimura,S., Witzgall,R., Ehrlich,B.E., and Somlo,S. (2002). Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel. *Nat. Cell Biol.* 4, 191-197.

Krasnoperov,V., Lu,Y., Buryanovsky,L., Neubert,T.A., Ichtchenko,K., and Petrenko,A.G. (2002). Post-translational proteolytic processing of the calcium-independent receptor of alpha-latrotoxin (CIRL), a natural chimera of the cell adhesion protein and the G protein-coupled receptor. Role of the G protein-coupled receptor proteolysis site (GPS) motif. *J. Biol. Chem.* 277, 46518-46526.

Kuure,S., Vuolteenaho,R., and Vainio,S. (2000). Kidney morphogenesis: cellular and molecular regulation. *Mech. Dev.* 92, 31-45.

Lanoix,J., D'Agati,V., Szabolcs,M., and Trudel,M. (1996). Dysregulation of cellular proliferation and apoptosis mediates human autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). *Oncogene* 13, 1153-1160.

Lee,D.C., Chan,K.W., and Chan,S.Y. (1998). Expression of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor in adult polycystic kidney disease. *J. Urol.* 159, 291-296.

Lehtonen,S., Ora,A., Olkkonen,V.M., Geng,L., Zerial,M., Somlo,S., and Lehtonen,E. (2000). In vivo interaction of the adapter protein CD2-associated protein with the type 2 polycystic kidney disease protein, polycystin-2. *J. Biol. Chem.* 275, 32888-32893.

Li,A., Tian,X., Sung,S.W., and Somlo,S. (2003a). Identification of two novel polycystic kidney disease-1-like genes in human and mouse genomes. *Genomics* 81, 596-608.

- Li,H.P., Geng,L., Burrow,C.R., and Wilson,P.D. (1999). Identification of phosphorylation sites in the PKD1-encoded protein C-terminal domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 259, 356-363.
- Li,Q., Dai,Y., Guo,L., Liu,Y., Hao,C., Wu,G., Basora,N., Michalak,M., and Chen,X.Z. (2003b). Polycystin-2 associates with tropomyosin-1, an actin microfilament component. *J. Mol. Biol.* 325, 949-962.
- Li,Q., Shen,P.Y., Wu,G., and Chen,X.Z. (2003c). Polycystin-2 interacts with troponin I, an angiogenesis inhibitor. *Biochemistry* 42, 450-457.
- Lin,F., Hiesberger,T., Cordes,K., Sinclair,A.M., Goldstein,L.S., Somlo,S., and Igarashi,P. (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, 5286-5291.
- Liu,Z.Z., Carone,F.A., Nakumara,S., and Kanwar,Y.S. (1992). Altered synthesis of proteoglycans by cyst-derived cells from autosomal-dominant polycystic kidneys. *Am. J. Physiol* 263, F697-F704.
- Lo,S.H., Yu,Q.C., Degenstein,L., Chen,L.B., and Fuchs,E. (1997). Progressive kidney degeneration in mice lacking tensin. *J. Cell Biol.* 136, 1349-1361.
- Lohning,C., Nowicka,U., and Frischauf,A.M. (1997). The mouse homolog of PKD1: sequence analysis and alternative splicing. *Mamm. Genome* 8, 307-311.
- Longa,L., Scolari,F., Brusco,A., Carbonara,C., Polidoro,S., Valzorio,B., Riegler,P., Migone,N., and Maiorca,R. (1997). A large TSC2 and PKD1 gene deletion is associated with renal and extrarenal signs of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 12, 1900-1907.
- Lowden,D.A., Lindemann,G.W., Merlino,G., Barash,B.D., Calvet,J.P., and Gattone,V.H. (1994). Renal cysts in transgenic mice expressing transforming growth factor-alpha. *J. Lab Clin. Med.* 124, 386-394.
- Lu,W., Fan,X., Basora,N., Babakhanlou,H., Law,T., Rifai,N., Harris,P.C., Perez-Atayde,A.R., Rennke,H.G., and Zhou,J. (1999). Late onset of renal and hepatic cysts in Pkd1-targeted heterozygotes. *Nat. Genet.* 21, 160-161.
- Lu,W., Peissel,B., Babakhanlou,H., Pavlova,A., Geng,L., Fan,X., Larson,C., Brent,G., and Zhou,J. (1997). Perinatal lethality with kidney and pancreas defects in mice with a targeted Pkd1 mutation. *Nat. Genet.* 17, 179-181.
- Lu,W., Shen,X., Pavlova,A., Lakkis,M., Ward,C.J., Pritchard,L., Harris,P.C., Genest,D.R., Perez-Atayde,A.R., and Zhou,J. (2001). Comparison of Pkd1-targeted mutants reveals that loss of polycystin-1 causes cystogenesis and bone defects. *Hum. Mol. Genet.* 10, 2385-2396.

- Luo, Y., Vassilev, P.M., Li, X., Kawanabe, Y., and Zhou, J. (2003). Native polycystin 2 functions as a plasma membrane Ca²⁺-permeable cation channel in renal epithelia. *Mol. Cell Biol.* *23*, 2600-2607.
- MacKay, K., Striker, L.J., Pinkert, C.A., Brinster, R.L., and Striker, G.E. (1987). Glomerulosclerosis and renal cysts in mice transgenic for the early region of SV40. *Kidney Int.* *32*, 827-837.
- Malhas, A.N., Abuknesha, R.A., and Price, R.G. (2002). Interaction of the leucine-rich repeats of polycystin-1 with extracellular matrix proteins: possible role in cell proliferation. *J. Am. Soc. Nephrol.* *13*, 19-26.
- Markowitz, G.S., Cai, Y., Li, L., Wu, G., Ward, L.C., Somlo, S., and D'Agati, V.D. (1999). Polycystin-2 expression is developmentally regulated. *Am. J. Physiol* *277*, F17-F25.
- Marszalek, J.R., Ruiz-Lozano, P., Roberts, E., Chien, K.R., and Goldstein, L.S. (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*, 5043-5048.
- Martinez, J.R. and Grantham, J.J. (1995). Polycystic kidney disease: etiology, pathogenesis, and treatment. *Dis. Mon.* *41*, 693-765.
- Martinez-Maldonado, M., Yium, J.J., Eknayan, G., and Suki, W.N. (1972). Adult polycystic kidney disease: studies of the defect in urine concentration. *Kidney Int.* *2*, 107-113.
- Melton, D.A., Krieg, P.A., Rebagliati, M.R., Maniatis, T., Zinn, K., and Green, M.R. (1984). Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res.* *12*, 7035-7056.
- Michaud, J., Russo, P., Grignon, A., Dallaire, L., Bichet, D., Rosenblatt, D., Lamothe, E., and Lambert, M. (1994). Autosomal dominant polycystic kidney disease in the fetus. *Am. J. Med. Genet.* *51*, 240-246.
- Milutinovic, J., Fialkow, P.J., Rudd, T.G., Agodoa, L.Y., Phillips, L.A., and Bryant, J.I. (1980). Liver cysts in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am. J. Med.* *68*, 741-744.
- Milutinovic, J., Rust, P.F., Fialkow, P.J., Agodoa, L.Y., Phillips, L.A., Rudd, T.G., and Sutherland, S. (1992). Intrafamilial phenotypic expression of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am. J. Kidney Dis.* *19*, 465-472.
- Mochizuki, T., Wu, G., Hayashi, T., Xenophontos, S.L., Veldhuisen, B., Saris, J.J., Reynolds, D.M., Cai, Y., Gabow, P.A., Pierides, A., Kimberling, W.J., Breuning, M.H., Deltas, C.C., Peters, D.J., and Somlo, S. (1996). PKD2, a gene for

polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* 272, 1339-1342.

Mollet,G., Salomon,R., Gribouval,O., Silbermann,F., Bacq,D., Landthaler,G., Milford,D., Nayir,A., Rizzoni,G., Antignac,C., and Saunier,S. (2002). The gene mutated in juvenile nephronophthisis type 4 encodes a novel protein that interacts with nephrocystin. *Nat. Genet.* 32, 300-305.

Moser,M., Dahmen,S., Kluge,R., Grone,H., Dahmen,J., Kunz,D., Schorle,H., and Buettner,R. (2003). Terminal renal failure in mice lacking transcription factor AP-2 beta. *Lab Invest* 83, 571-578.

Moser,M., Pscherer,A., Roth,C., Becker,J., Mucher,G., Zerres,K., Dixkens,C., Weis,J., Guay-Woodford,L., Buettner,R., and Fassler,R. (1997). Enhanced apoptotic cell death of renal epithelial cells in mice lacking transcription factor AP-2beta. *Genes Dev.* 11, 1938-1948.

Mosetti,M.A., Leonardou,P., Motohara,T., Kanematsu,M., Armao,D., and Semelka,R.C. (2003). Autosomal dominant polycystic kidney disease: MR imaging evaluation using current techniques. *J. Magn Reson. Imaging* 18, 210-215.

Moy,G.W., Mendoza,L.M., Schulz,J.R., Swanson,W.J., Glabe,C.G., and Vacquier,V.D. (1996). The sea urchin sperm receptor for egg jelly is a modular protein with extensive homology to the human polycystic kidney disease protein, PKD1. *J. Cell Biol.* 133, 809-817.

Moyer,J.H., Lee-Tischler,M.J., Kwon,H.Y., Schrick,J.J., Avner,E.D., Sweeney,W.E., Godfrey,V.L., Cacheiro,N.L., Wilkinson,J.E., and Woychik,R.P. (1994). Candidate gene associated with a mutation causing recessive polycystic kidney disease in mice. *Science* 264, 1329-1333.

Murcia,N.S., Richards,W.G., Yoder,B.K., Mucenski,M.L., Dunlap,J.R., and Woychik,R.P. (2000). The Oak Ridge Polycystic Kidney (orpk) disease gene is required for left-right axis determination. *Development* 127, 2347-2355.

Muto,S., Aiba,A., Saito,Y., Nakao,K., Nakamura,K., Tomita,K., Kitamura,T., Kurabayashi,M., Nagai,R., Higashihara,E., Harris,P.C., Katsuki,M., and Horie,S. (2002). Pioglitazone improves the phenotype and molecular defects of a targeted Pkd1 mutant. *Hum. Mol. Genet.* 11, 1731-1742.

Nadasdy,T., Laszik,Z., Lajoie,G., Blick,K.E., Wheeler,D.E., and Silva,F.G. (1995). Proliferative activity of cyst epithelium in human renal cystic diseases. *J. Am. Soc. Nephrol.* 5, 1462-1468.

Newby,L.J., Streets,A.J., Zhao,Y., Harris,P.C., Ward,C.J., and Ong,A.C. (2002). Identification, characterization, and localization of a novel kidney polycystin-1-polycystin-2 complex. *J. Biol. Chem.* 277, 20763-20773.

Nguyen,H.Q., Danilenko,D.M., Bucay,N., DeRose,M.L., Van,G.Y., Thomason,A., and Simonet,W.S. (1996). Expression of keratinocyte growth factor in embryonic liver of transgenic mice causes changes in epithelial growth and differentiation resulting in polycystic kidneys and other organ malformations. *Oncogene* 12, 2109-2119.

Nims,N., Vassmer,D., and Maser,R.L. (2003). Transmembrane domain analysis of polycystin-1, the product of the polycystic kidney disease-1 (PKD1) gene: evidence for 11 membrane-spanning domains. *Biochemistry* 42, 13035-13048.

Nomura,H., Turco,A.E., Pei,Y., Kalaydjieva,L., Schiavello,T., Weremowicz,S., Ji,W., Morton,C.C., Meisler,M., Reeders,S.T., and Zhou,J. (1998). Identification of PKDL, a novel polycystic kidney disease 2-like gene whose murine homologue is deleted in mice with kidney and retinal defects. *J. Biol. Chem.* 273, 25967-25973.

Nonaka,S., Tanaka,Y., Okada,Y., Takeda,S., Harada,A., Kanai,Y., Kido,M., and Hirokawa,N. (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, 829-837.

Norman,J.T., Gatti,L., Wilson,P.D., and Lewis,M. (1995). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases expression by tubular epithelia and interstitial fibroblasts in the normal kidney and in fibrosis. *Exp. Nephrol.* 3, 88-89.

Olbrich,H., Fliegau,M., Hoefele,J., Kispert,A., Otto,E., Volz,A., Wolf,M.T., Sasmaz,G., Trauer,U., Reinhardt,R., Sudbrak,R., Antignac,C., Gretz,N., Walz,G., Schermer,B., Benzing,T., Hildebrandt,F., and Omran,H. (2003). Mutations in a novel gene, NPHP3, cause adolescent nephronophthisis, tapeto-retinal degeneration and hepatic fibrosis. *Nat. Genet.* 34, 455-459.

Olsson,P.G., Lohning,C., Horsley,S., Kearney,L., Harris,P.C., and Frischauf,A. (1996). The mouse homologue of the polycystic kidney disease gene (Pkd1) is a single-copy gene. *Genomics* 34, 233-235.

Omran,H., Fernandez,C., Jung,M., Haffner,K., Fargier,B., Villaquiran,A., Waldherr,R., Gretz,N., Brandis,M., Ruschendorf,F., Reis,A., and Hildebrandt,F. (2000). Identification of a new gene locus for adolescent nephronophthisis, on chromosome 3q22 in a large Venezuelan pedigree. *Am. J. Hum. Genet.* 66, 118-127.

Ong,A.C., Harris,P.C., Davies,D.R., Pritchard,L., Rossetti,S., Biddolph,S., Vaux,D.J., Migone,N., and Ward,C.J. (1999a). Polycystin-1 expression in PKD1, early-onset PKD1, and TSC2/PKD1 cystic tissue. *Kidney Int.* 56, 1324-1333.

Ong,A.C., Ward,C.J., Butler,R.J., Biddolph,S., Bowker,C., Torra,R., Pei,Y., and Harris,P.C. (1999b). Coordinate expression of the autosomal dominant polycystic

kidney disease proteins, polycystin-2 and polycystin-1, in normal and cystic tissue. *Am. J. Pathol.* 154, 1721-1729.

Onuchic,L.F., Furu,L., Nagasawa,Y., Hou,X., Eggermann,T., Ren,Z., Bergmann,C., Senderek,J., Esquivel,E., Zeltner,R., Rudnik-Schoneborn,S., Mrug,M., Sweeney,W., Avner,E.D., Zerres,K., Guay-Woodford,L.M., Somlo,S., and Germino,G.G. (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, 1305-1317.

Orellana,S.A., Sweeney,W.E., Neff,C.D., and Avner,E.D. (1995). Epidermal growth factor receptor expression is abnormal in murine polycystic kidney. *Kidney Int.* 47, 490-499.

Otto,E., Hoefele,J., Ruf,R., Mueller,A.M., Hiller,K.S., Wolf,M.T., Schuermann,M.J., Becker,A., Birkenhager,R., Sudbrak,R., Hennies,H.C., Nurnberg,P., and Hildebrandt,F. (2002). A gene mutated in nephronophthisis and retinitis pigmentosa encodes a novel protein, nephroretinin, conserved in evolution. *Am. J. Hum. Genet.* 71, 1161-1167.

Otto,E.A., Schermer,B., Obara,T., O'Toole,J.F., Hiller,K.S., Mueller,A.M., Ruf,R.G., Hoefele,J., Beekmann,F., Landau,D., Foreman,J.W., Goodship,J.A., Strachan,T., Kispert,A., Wolf,M.T., Gagnadoux,M.F., Nivet,H., Antignac,C., Walz,G., Drummond,I.A., Benzing,T., and Hildebrandt,F. (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, 413-420.

Palmiter,R.D., Sandgren,E.P., Avarbock,M.R., Allen,D.D., and Brinster,R.L. (1991). Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 478-482.

Parnell,S.C., Magenheimer,B.S., Maser,R.L., Rankin,C.A., Smine,A., Okamoto,T., and Calvet,J.P. (1998). The polycystic kidney disease-1 protein, polycystin-1, binds and activates heterotrimeric G-proteins in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251, 625-631.

Parnell,S.C., Magenheimer,B.S., Maser,R.L., Zien,C.A., Frischauf,A.M., and Calvet,J.P. (2002). Polycystin-1 activation of c-Jun N-terminal kinase and AP-1 is mediated by heterotrimeric G proteins. *J. Biol. Chem.* 277, 19566-19572.

Pazour,G.J., Dickert,B.L., Vucica,Y., Seeley,E.S., Rosenbaum,J.L., Witman,G.B., and Cole,D.G. (2000). Chlamydomonas IFT88 and its mouse homologue, polycystic kidney disease gene *tg737*, are required for assembly of cilia and flagella. *J. Cell Biol.* 151, 709-718.

Pei, Y., Paterson, A.D., Wang, K.R., He, N., Hefferton, D., Watnick, T., Germino, G.G., Parfrey, P., Somlo, S., and George-Hyslop, P. (2001). Bilineal disease and trans-heterozygotes in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 355-363.

Pei, Y., Watnick, T., He, N., Wang, K., Liang, Y., Parfrey, P., Germino, G., and George-Hyslop, P. (1999). Somatic PKD2 mutations in individual kidney and liver cysts support a "two-hit" model of cystogenesis in type 2 autosomal dominant polycystic kidney disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10, 1524-1529.

Peral, B., Ong, A.C., San Millan, J.L., Gamble, V., Rees, L., and Harris, P.C. (1996). A stable, nonsense mutation associated with a case of infantile onset polycystic kidney disease 1 (PKD1). *Hum. Mol. Genet.* 5, 539-542.

Peters, D.J., Spruit, L., Klingel, R., Prins, F., Baelde, H.J., Giordano, P.C., Bernini, L.F., de Heer, E., Breuning, M.H., and Bruijn, J.A. (1996). Adult, fetal, and polycystic kidney expression of polycystin, the polycystic kidney disease-1 gene product. *Lab Invest* 75, 221-230.

Peters, D.J., van de, W.A., Spruit, L., Saris, J.J., Breuning, M.H., Bruijn, J.A., and de Heer, E. (1999). Cellular localization and tissue distribution of polycystin-1. *J. Pathol.* 188, 439-446.

Piontek, K.B. and Germino, G.G. (1999). Murine Pkd1 introns 21 and 22 lack the extreme polypyrimidine bias present in human PKD1. *Mamm. Genome* 10, 194-196.

Ponting, C.P., Hofmann, K., and Bork, P. (1999). A latrophilin/CL-1-like GPS domain in polycystin-1. *Curr. Biol.* 9, R585-R588.

Pritchard, L., Sloane-Stanley, J.A., Sharpe, J.A., Aspinwall, R., Lu, W., Buckle, V., Strmecki, L., Walker, D., Ward, C.J., Alpers, C.E., Zhou, J., Wood, W.G., and Harris, P.C. (2000). A human PKD1 transgene generates functional polycystin-1 in mice and is associated with a cystic phenotype. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2617-2627.

Qian, F., Boletta, A., Bhunia, A.K., Xu, H., Liu, L., Ahrabi, A.K., Watnick, T.J., Zhou, F., and Germino, G.G. (2002). Cleavage of polycystin-1 requires the receptor for egg jelly domain and is disrupted by human autosomal-dominant polycystic kidney disease 1-associated mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 16981-16986.

Qian, F., Germino, F.J., Cai, Y., Zhang, X., Somlo, S., and Germino, G.G. (1997). PKD1 interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain. *Nat. Genet.* 16, 179-183.

- Qian,F., Watnick,T.J., Onuchic,L.F., and Germino,G.G. (1996). The molecular basis of focal cyst formation in human autosomal dominant polycystic kidney disease type I. *Cell* 87, 979-987.
- Qin,H., Rosenbaum,J.L., and Barr,M.M. (2001). An autosomal recessive polycystic kidney disease gene homolog is involved in intraflagellar transport in *C. elegans* ciliated sensory neurons. *Curr. Biol.* 11, 457-461.
- Richards,W.G., Sweeney,W.E., Yoder,B.K., Wilkinson,J.E., Woychik,R.P., and Avner,E.D. (1998). Epidermal growth factor receptor activity mediates renal cyst formation in polycystic kidney disease. *J. Clin. Invest* 101, 935-939.
- Rocker,G.M., Morgan,A.G., and Shale,D.J. (1988). Pulmonary oedema and renal failure. *Nephrol. Dial. Transplant.* 3, 244-246.
- Rodova,M., Islam,M.R., Maser,R.L., and Calvet,J.P. (2002). The polycystic kidney disease-1 promoter is a target of the beta-catenin/T-cell factor pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 29577-29583.
- Rosenbaum,J.L. and Witman,G.B. (2002). Intraflagellar transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 813-825.
- Rossetti,S., Burton,S., Strmecki,L., Pond,G.R., San Millan,J.L., Zerres,K., Barratt,T.M., Ozen,S., Torres,V.E., Bergstralh,E.J., Winearls,C.G., and Harris,P.C. (2002a). The position of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene mutation correlates with the severity of renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 1230-1237.
- Rossetti,S., Chauveau,D., Walker,D., Saggari-Malik,A., Winearls,C.G., Torres,V.E., and Harris,P.C. (2002b). A complete mutation screen of the ADPKD genes by DHPLC. *Kidney Int.* 61, 1588-1599.
- Rossetti,S., Strmecki,L., Gamble,V., Burton,S., Sneddon,V., Peral,B., Roy,S., Bakkaloglu,A., Komel,R., Winearls,C.G., and Harris,P.C. (2001). Mutation analysis of the entire PKD1 gene: genetic and diagnostic implications. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 46-63.
- Roy,S., Dillon,M.J., Trompeter,R.S., and Barratt,T.M. (1997). Autosomal recessive polycystic kidney disease: long-term outcome of neonatal survivors. *Pediatr. Nephrol.* 11, 302-306.
- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd Edition. Cold Spring Harbor, NY, USA. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Sampson,J.R., Maheshwar,M.M., Aspinwall,R., Thompson,P., Cheadle,J.P., Ravine,D., Roy,S., Haan,E., Bernstein,J., and Harris,P.C. (1997). Renal cystic

disease in tuberous sclerosis: role of the polycystic kidney disease 1 gene. *Am. J. Hum. Genet.* *61*, 843-851.

Sandford,R., Sgotto,B., Aparicio,S., Brenner,S., Vaudin,M., Wilson,R.K., Chisoe,S., Pepin,K., Bateman,A., Chothia,C., Hughes,J., and Harris,P. (1997). Comparative analysis of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene reveals an integral membrane glycoprotein with multiple evolutionary conserved domains. *Hum. Mol. Genet.* *6*, 1483-1489.

Schaffner,D.L., Barrios,R., Massey,C., Banez,E.I., Ou,C.N., Rajagopalan,S., Aguilar-Cordova,E., Lebovitz,R.M., Overbeek,P.A., and Lieberman,M.W. (1993). Targeting of the rasT24 oncogene to the proximal convoluted tubules in transgenic mice results in hyperplasia and polycystic kidneys. *Am. J. Pathol.* *142*, 1051-1060.

Scheffers,M.S., van der,B.P., Prins,F., Spruit,L., Breuning,M.H., Litvinov,S.V., de Heer,E., and Peters,D.J. (2000). Polycystin-1, the product of the polycystic kidney disease 1 gene, co-localizes with desmosomes in MDCK cells. *Hum. Mol. Genet.* *9*, 2743-2750.

Scolari,F., Puzzer,D., Amoroso,A., Caridi,G., Ghiggeri,G.M., Maiorca,R., Aridon,P., De Fusco,M., Ballabio,A., and Casari,G. (1999). Identification of a new locus for medullary cystic disease, on chromosome 16p12. *Am. J. Hum. Genet.* *64*, 1655-1660.

Segal,G.M., Eschbach,J.W., Egrie,J.C., Stueve,T., and Adamson,J.W. (1988). The anemia of end-stage renal disease: hematopoietic progenitor cell response. *Kidney Int.* *33*, 983-988.

Sorenson,C.M., Padanilam,B.J., and Hammerman,M.R. (1996). Abnormal postpartum renal development and cystogenesis in the bcl-2 (-/-) mouse. *Am. J. Physiol* *271*, F184-F193.

Southern,E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* *98*, 503-517.

Stillwell,T.J., Gomez,M.R., and Kelalis,P.P. (1987). Renal lesions in tuberous sclerosis. *J. Urol.* *138*, 477-481.

Stocklin,E., Botteri,F., and Groner,B. (1993). An activated allele of the c-erbB-2 oncogene impairs kidney and lung function and causes early death of transgenic mice. *J. Cell Biol.* *122*, 199-208.

Sweeney,W.E., Chen,Y., Nakanishi,K., Frost,P., and Avner,E.D. (2000). Treatment of polycystic kidney disease with a novel tyrosine kinase inhibitor. *Kidney Int.* *57*, 33-40.

Szoka,P.R. and Paigen,K. (1978). Regulation of mouse major urinary protein production by the Mup-A gene. *Genetics* 90, 597-612.

Takayama,H., LaRoche,W.J., Sabnis,S.G., Otsuka,T., and Merlino,G. (1997). Renal tubular hyperplasia, polycystic disease, and glomerulosclerosis in transgenic mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor. *Lab Invest* 77, 131-138.

Torra,R., Badenas,C., San Millan,J.L., Perez-Oller,L., Estivill,X., and Darnell,A. (1999). A loss-of-function model for cystogenesis in human autosomal dominant polycystic kidney disease type 2. *Am. J. Hum. Genet.* 65, 345-352.

Trudel,M., Barisoni,L., Lanoix,J., and D'Agati,V. (1998). Polycystic kidney disease in SBM transgenic mice: role of c-myc in disease induction and progression. *Am. J. Pathol.* 152, 219-229.

Trudel,M., D'Agati,V., and Costantini,F. (1991). C-myc as an inducer of polycystic kidney disease in transgenic mice. *Kidney Int.* 39, 665-671.

Trudel,M., Lanoix,J., Barisoni,L., Blouin,M.J., Desforges,M., L'Italien,C., and D'Agati,V. (1997). C-myc-induced apoptosis in polycystic kidney disease is Bcl-2 and p53 independent. *J. Exp. Med.* 186, 1873-1884.

Tsiokas,L., Arnould,T., Zhu,C., Kim,E., Walz,G., and Sukhatme,V.P. (1999). Specific association of the gene product of PKD2 with the TRPC1 channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 3934-3939.

Tsiokas,L., Kim,E., Arnould,T., Sukhatme,V.P., and Walz,G. (1997). Homo- and heterodimeric interactions between the gene products of PKD1 and PKD2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 6965-6970.

Vainio,S. and Lin,Y. (2002). Coordinating early kidney development: lessons from gene targeting. *Nat. Rev. Genet.* 3, 533-543.

van Adelsberg,J., Chamberlain,S., and D'Agati,V. (1997). Polycystin expression is temporally and spatially regulated during renal development. *Am. J. Physiol* 272, F602-F609.

Vandorpe,D.H., Chernova,M.N., Jiang,L., Sellin,L.K., Wilhelm,S., Stuart-Tilley,A.K., Walz,G., and Alper,S.L. (2001). The cytoplasmic C-terminal fragment of polycystin-1 regulates a Ca²⁺-permeable cation channel. *J. Biol. Chem.* 276, 4093-4101.

Vandorpe,D.H., Wilhelm,S., Jiang,L., Ibraghimov-Beskrovnaya,O., Chernova,M.N., Stuart-Tilley,A.K., and Alper,S.L. (2002). Cation channel regulation by COOH-terminal cytoplasmic tail of polycystin-1: mutational and functional analysis. *Physiol Genomics* 8, 87-98.

Vassilev,P.M., Guo,L., Chen,X.Z., Segal,Y., Peng,J.B., Basora,N., Babakhanlou,H., Cruger,G., Kanazirska,M., Ye,C., Brown,E.M., Hediger,M.A., and Zhou,J. (2001). Polycystin-2 is a novel cation channel implicated in defective intracellular Ca(2+) homeostasis in polycystic kidney disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 341-350.

Veis,D.J., Sorenson,C.M., Shutter,J.R., and Korsmeyer,S.J. (1993). Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 75, 229-240.

Ward,C.J., Hogan,M.C., Rossetti,S., Walker,D., Sneddon,T., Wang,X., Kubly,V., Cunningham,J.M., Bacallao,R., Ishibashi,M., Milliner,D.S., Torres,V.E., and Harris,P.C. (2002). The gene mutated in autosomal recessive polycystic kidney disease encodes a large, receptor-like protein. *Nat. Genet.* 30, 259-269.

Ward,C.J., Turley,H., Ong,A.C., Comley,M., Biddolph,S., Chetty,R., Ratcliffe,P.J., Gattner,K., and Harris,P.C. (1996). Polycystin, the polycystic kidney disease 1 protein, is expressed by epithelial cells in fetal, adult, and polycystic kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 1524-1528.

Watnick,T., He,N., Wang,K., Liang,Y., Parfrey,P., Hefferton,D., George-Hyslop,P., Germino,G., and Pei,Y. (2000). Mutations of PKD1 in ADPKD2 cysts suggest a pathogenic effect of trans-heterozygous mutations. *Nat. Genet.* 25, 143-144.

Watnick,T.J., Torres,V.E., Gandolph,M.A., Qian,F., Onuchic,L.F., Klinger,K.W., Landes,G., and Germino,G.G. (1998). Somatic mutation in individual liver cysts supports a two-hit model of cystogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Mol. Cell* 2, 247-251.

Weston,B.S., Bagneris,C., Price,R.G., and Stirling,J.L. (2001). The polycystin-1 C-type lectin domain binds carbohydrate in a calcium-dependent manner, and interacts with extracellular matrix proteins in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 1536, 161-176.

Wilson,P.D. (1997). Epithelial cell polarity and disease. *Am. J. Physiol* 272, F434-F442.

Wilson,P.D. (2004). Polycystic kidney disease. *N. Engl. J. Med.* 350, 151-164.

Wilson,P.D., Geng,L., Li,X., and Burrow,C.R. (1999). The PKD1 gene product, "polycystin-1," is a tyrosine-phosphorylated protein that colocalizes with alpha2beta1-integrin in focal clusters in adherent renal epithelia. *Lab Invest* 79, 1311-1323.

Wilson,P.D., Hreniuk,D., and Gabow,P.A. (1992). Abnormal extracellular matrix and excessive growth of human adult polycystic kidney disease epithelia. *J. Cell Physiol* 150, 360-369.

- Wilson,P.D., Sherwood,A.C., Palla,K., Du,J., Watson,R., and Norman,J.T. (1991). Reversed polarity of Na(+)-K(+)-ATPase: mislocation to apical plasma membranes in polycystic kidney disease epithelia. *Am. J. Physiol* 260, F420-F430.
- Woo,D. (1995). Apoptosis and loss of renal tissue in polycystic kidney diseases. *N. Engl. J. Med.* 333, 18-25.
- Woolf,A.S., Price,K.L., Scambler,P.J., and Winyard,P.J. (2004). Evolving concepts in human renal dysplasia. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15, 998-1007.
- Wu,G., D'Agati,V., Cai,Y., Markowitz,G., Park,J.H., Reynolds,D.M., Maeda,Y., Le,T.C., Hou,H., Jr., Kucherlapati,R., Edelmann,W., and Somlo,S. (1998). Somatic inactivation of Pkd2 results in polycystic kidney disease. *Cell* 93, 177-188.
- Wu,G., Markowitz,G.S., Li,L., D'Agati,V.D., Factor,S.M., Geng,L., Tibara,S., Tuchman,J., Cai,Y., Park,J.H., van Adelsberg,J., Hou,H., Jr., Kucherlapati,R., Edelmann,W., and Somlo,S. (2000). Cardiac defects and renal failure in mice with targeted mutations in Pkd2. *Nat. Genet.* 24, 75-78.
- Wu,G., Mochizuki,T., Le,T.C., Cai,Y., Hayashi,T., Reynolds,D.M., and Somlo,S. (1997). Molecular cloning, cDNA sequence analysis, and chromosomal localization of mouse Pkd2. *Genomics* 45, 220-223.
- Wu,G., Tian,X., Nishimura,S., Markowitz,G.S., D'Agati,V., Park,J.H., Yao,L., Li,L., Geng,L., Zhao,H., Edelmann,W., and Somlo,S. (2002). Trans-heterozygous Pkd1 and Pkd2 mutations modify expression of polycystic kidney disease. *Hum. Mol. Genet.* 11, 1845-1854.
- Xu,G.M., Gonzalez-Perrett,S., Essafi,M., Timpanaro,G.A., Montalbetti,N., Arnaout,M.A., and Cantiello,H.F. (2002). Polycystin-1 activates and stabilizes polycystin-2 channel function. *J. Biol. Chem.*
- Xu,G.M., Sikaneta,T., Sullivan,B.M., Zhang,Q., Andreucci,M., Stehle,T., Drummond,I., and Arnaout,M.A. (2001). Polycystin-1 interacts with intermediate filaments. *J. Biol. Chem.* 276, 46544-46552.
- Yoder,B.K., Hou,X., and Guay-Woodford,L.M. (2002). The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 2508-2516.
- Yuasa,T., Venugopal,B., Weremowicz,S., Morton,C.C., Guo,L., and Zhou,J. (2002). The sequence, expression, and chromosomal localization of a novel polycystic kidney disease 1-like gene, PKD1L1, in human. *Genomics* 79, 376-386.

Zerres,K., Mucher,G., Becker,J., Steinkamm,C., Rudnik-Schoneborn,S., Heikkila,P., Rapola,J., Salonen,R., Germino,G.G., Onuchic,L., Somlo,S., Avner,E.D., Harman,L.A., Stockwin,J.M., and Guay-Woodford,L.M. (1998). Prenatal diagnosis of autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD): molecular genetics, clinical experience, and fetal morphology. *Am. J. Med. Genet.* 76, 137-144.

Zerres,K., Rudnik-Schoneborn,S., and Deget,F. (1993). Childhood onset autosomal dominant polycystic kidney disease in sibs: clinical picture and recurrence risk. German Working Group on Paediatric Nephrology (Arbeitsgemeinschaft fur Padiatrische Nephrologie. *J. Med. Genet.* 30, 583-588.