

Université de Montréal

**Analyse fonctionnelle de la polycystine-1 et de son  
domaine intracellulaire dans le développement de la  
polykystose rénale autosomique dominante**

par

**Olivier Côté**

Programme de Biologie Moléculaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise (M.Sc.)  
en Biologie Moléculaire

Avril 2009

© Côté, 2009

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Analyse fonctionnelle de la polycystine-1 et de son domaine intracellulaire dans le  
développement de la polykystose rénale autosomique dominante**

présenté par :

**Olivier Côté**

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-François Côté, président-rapporteur

Marie Trudel, directeur de recherche

Michel Bouvier, membre du jury

## Résumé

La polykystose rénale autosomique dominante (PKRAD) est la maladie génétique rénale la plus commune touchant 1/500 personnes. Elle se caractérise principalement par la formation de kystes rénaux dans tous les segments du néphron, entraînant l'insuffisance rénale, et par des manifestations extrarénales kystiques (foie, pancréas, rate) et non-kystiques (anomalies cardiaques, vasculaires et cérébrales). Deux gènes, *PKD1* et *PKD2*, sont responsables de 85 et 15% des cas respectivement. Ces gènes encodent les polycystine-1 (PC-1) et -2 (PC-2) qui forment un complexe à la membrane plasmique et ciliaire des cellules épithéliales rénales. PC-1 est une protéine transmembranaire de 4302 acides aminés possédant un court domaine intracellulaire incluant un motif coiled-coil impliqué dans l'interaction entre PC-1 et PC-2 in-vitro. L'importance du coiled-coil est démontrée par des mutations affectant spécifiquement ce motif chez des patients PKRAD. Le mécanisme pathogénétique responsable de la PKRAD est indéterminé. Chez la souris, la PKRAD se développe suite à l'ablation (*Pkd1*<sup>-/-</sup>) ou lors de la surexpression (*SBPkd1*<sub>TAG</sub>) de *Pkd1*, ce qui suggère un effet de dosage. Des anomalies ciliaires sont aussi souvent associées à PKRAD.

Mon objectif était de déterminer in-vivo le mécanisme pathogénétique de la polycystine-1 dans le développement des symptômes PKRAD rénaux et extrarénaux et plus spécifiquement, le rôle du motif coiled-coil dans le mécanisme de kystogenèse. Pour ce faire, nous avons généré deux constructions, *Pkd1* sauvage (*Pkd1*<sub>TAG</sub>) et *Pkd1* tronquée de son motif coiled-coil (*Pkd1*<sub>ΔCoiled-coil</sub>), par recombinaison homologue à partir du BAC-*Pkd1* sauvage comprenant la séquence murine entière de *Pkd1*. Trois lignées de souris *Pkd1*<sub>TAG</sub> générées par microinjection démontrent un niveau d'expression de *Pkd1* qui corrèle avec le nombre de copie du transgène (2, 5 et 15 copies). Les souris *Pkd1*<sub>TAG</sub> reproduisent la PKRAD en développant des kystes rénaux dans toutes les parties du néphron et des cils primaires plus longs que les contrôles non transgéniques. Les analyses physiologiques supportent que les souris *Pkd1*<sub>TAG</sub> développent une insuffisance rénale et démontrent une augmentation du volume urinaire de même qu'une diminution de l'osmolalité, de la créatinine et des protéines urinaires. De plus, les souris *Pkd1*<sub>TAG</sub> développent des kystes hépatiques, des anomalies cardiaques associées à des dépôts de calcium et des anévrismes cérébraux. La sévérité du phénotype augmente avec l'expression de *Pkd1* appuyant l'hypothèse

d'un mécanisme de dosage. Nous avons aussi déterminé que l'expression du transgène  $Pkd1_{TAG}$  complémente le phénotype létal-embryonnaire des souris  $Pkd1^{-/-}$ . D'autre part, nous avons générés 4 lignées de souris  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$  (2 et 15 copies du transgène) dont le nombre de copies corrèle avec le niveau d'expression du transgène. Ces souris  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$ , contrairement aux  $Pkd1_{TAG}$  de même âge, ne développent pas de kystes et possèdent des cils primaires de longueur normale. Afin d'évaluer le rôle du motif coiled-coil en absence de polycystine-1 endogène, nous avons croisé les souris  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$  avec les souris  $Pkd1^{-/-}$ . Contrairement aux souris  $Pkd1^{-/-}$  qui meurent in-utéro, les souris  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}; Pkd1^{-/-}$  survivent ~10 à 14 jours après la naissance. Elles démontrent des kystes rénaux et pancréatiques sévères, un retard de croissance et des anomalies pulmonaires. Tous les segments du néphron sont affectés.

Mon projet démontre que la surexpression de *Pkd1* est un mécanisme pathogénique de la PKRAD tant au niveau rénal qu'extrarénal. De plus, il démontre que le motif coiled-coil est un élément déterminant dans la kystogenèse/PKRAD *in-vivo*.

**Mots-clés:** PKRAD, *PKDI*, Coiled-coil, kystogenèse

## Abstract

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is a common genetic disorder affecting 1:500 people worldwide, independently from sex and origin. ADPKD is characterized by formation of large bilateral kidney cysts affecting all segments of the nephron and increasing progressively in size and number leading to end stage renal failure by mid-fifty. Moreover, this systemic disease includes several extrarenal symptoms such as intracranial aneurysms, valvular defects and cysts formation in the liver and the pancreas. *PKD1* and *PKD2* genes mutations are involved in 85 and 15 % of the clinical cases. PKD genes encode polycystin-1 (PC-1) and -2 (PC-2), which both form a complex at the cell and ciliary membrane of renal epithelial cells. PC-1 is a large transmembrane protein with a small intracellular tail including a coiled-coil motif implicated in PC-1/PC-2 interaction in-vitro. Interestingly, specific mutations affecting the coiled-coil motif cause ADPKD in humans. The pathogenetic mechanism of ADPKD is unknown. In mice, both ablation (*Pkd1*<sup>-/-</sup>) or overexpression (*SBPkd1*<sub>TAG</sub>) of *Pkd1* cause ADPKD, suggesting a dosage model. Ciliary anomalies are also linked to polycystic kidney disease.

Herein, we evaluated in-vivo the role of *Pkd1* in the development of renal and extrarenal manifestations of ADPKD and more specifically, the role of the coiled-coil motif in cystogenesis. We generated two constructions, wildtype *Pkd1* (*Pkd1*<sub>TAG</sub>) and coiled-coil deleted *Pkd1* (*Pkd1*<sub>ΔCoiled-coil</sub>), by homologous recombination from the wildtype *Pkd1*-BAC comprising the whole *Pkd1* murine sequence. Three *Pkd1*<sub>TAG</sub> mice lines have been generated by microinjection and show expression patterns correlating with the copy number of the transgene (2, 5 and 15 copy). All *Pkd1*<sub>TAG</sub> mice develop renal cysts affecting all nephron segments as in ADPKD and longer primary cilia compared to wildtype mice. Physiologic analysis supports renal failure by increased urinary output and decreased of urinary proteins, osmolality and creatinin levels. *Pkd1*<sub>TAG</sub> mice also show cysts in the liver, cardiac and valvular anomalies associated with calcium deposition and cerebral aneurysms. The severity of the phenotype increased with *Pkd1* expression suggesting a dosage model. Importantly, the *Pkd1*<sub>TAG</sub> transgene rescue embryonic lethality of *Pkd1*<sup>-/-</sup> mice. Furthermore, we generated 4 lines of *Pkd1*<sub>ΔCoiled-coil</sub> mice of 2 and 15 copies of the transgene correlating also to the level of expression. Compared to age-matched *Pkd1*<sub>TAG</sub>, *Pkd1*<sub>ΔCoiled-coil</sub> mice

develop no cysts and show normal cilia length. To gain more insights on the role of coiled-coil motif in absence of endogenous Pc-1, we mated  $Pkd1_{\Delta\text{Coiled-coil}}$  with  $Pkd1^{-/-}$  mice. Compared to the lethal embryonic  $Pkd1^{-/-}$  mice,  $Pkd1_{\Delta\text{Coiled-coil}}; Pkd1^{-/-}$  live ~ 10 to 14 days. They show severe renal and pancreatic cysts as well as growth retardation and pulmonary defects.

My study demonstrates that *Pkd1* overexpression is a pathogenic mechanism to induce ADPKD renal and extrarenal phenotype. Moreover, this work shows that the coiled-coil motif of polycystin-1 is a critical determinant in ADPKD cystogenesis.

**Keywords:** PKRAD, *PKDI*, Coiled-coil, cystogenesis

## Table des matières

Introduction .....	1
La structure et l'organisation du rein .....	1
Le rein .....	1
Le développement rénal chez les mammifères .....	1
La structure du rein adulte .....	3
Le néphron .....	4
Le cil primaire .....	6
La fonction rénale .....	9
L'homéostasie des milieux extracellulaires .....	9
La formation de l'urine et l'excrétion des métabolites .....	9
Les fonctions endocrines du rein .....	10
Les néphropathies .....	11
Les néphropathies congénitales .....	11
La sclérose tubéreuse .....	11
Les maladies kystiques de la médulla .....	12
Les dysplasies kystiques rénales .....	13
La polykystose rénale autosomique récessive .....	14
La polykystose rénale autosomique dominante .....	16
Génétique moléculaire de la PKRAD .....	29
<i>PKD1</i> et <i>PKD2</i> .....	29
La localisation chromosomique .....	29
Les structures .....	29
Les mutations .....	30
Un troisième locus? .....	31
Les polycystines .....	31
La polycystine-1 .....	33
Le domaine extracellulaire .....	33

Les domaines transmembranaires .....	36
Les domaines intracellulaires .....	37
La polycystine-2 .....	39
Les domaines .....	40
L'expression et la localisation des polycystines .....	40
Localisation tissulaire .....	40
Localisation sous-cellulaire .....	42
La fonction des polycystines .....	42
La signalisation cellulaire .....	42
La voie des Wnts .....	42
Les protéines G hétérotrimériques .....	43
Le cycle cellulaire .....	45
Le transport ionique .....	45
Les études murines .....	47
Modèles murins de kystogenèse rénale .....	47
Modèles spontanés et induits .....	47
Orthologues murin de <i>PKD1</i> et <i>PKD2</i> .....	55
Les modèles d'ablation génique .....	57
Les modèles de surexpression de <i>Pkd1</i> et <i>Pkd2</i> .....	60
Les mécanismes pathogénétiques de PKRAD .....	61
L'hypothèse du "two-hit" .....	61
L'hypothèse du "third-hit" .....	64
L'effet dosage .....	64
Mon projet de maîtrise .....	66
Le but .....	66
L'étude des phénotypes extrarénaux de la PKRAD .....	66
Le motif coiled-coil, un domaine important pour la signalisation? .....	67
Hypothèse et approche expérimentale .....	67

Contribution spécifique à l'article .....	69
Article: PKD1 transgenic mice: adult model of polycystic kidney disease with extrarenal and renal phenotypes .....	70
Discussion .....	124
Les souris transgéniques Pkd1 <sub>TAG</sub> .....	125
Analyse d'expression et de localisation du transgène.....	126
Analyse de la fonction rénale .....	127
Le phénotype rénal .....	128
Les mécanismes moléculaires de kystogenèse rénal .....	130
Les phénotypes extrarénaux .....	133
Les études de complémentations géniques.....	135
Le mécanisme pathogénétique PKRAD .....	136
Les souris transgéniques Pkd1 <sub>ΔCoiled-coil</sub> .....	136
Analyse de la fonction rénale .....	137
Le phénotype rénal .....	138
Les études d'expression.....	139
Le croisement Pkd1 <sub>ΔCoiled-coil</sub> ; Pkd1 <sup>-/-</sup> .....	139
Le phénotype rénal et extrarénal .....	140
Le mécanisme pathogénétique .....	143
Les souris transgéniques CUX-1 .....	144
Conclusion .....	145
Bibliographie.....	146
Annexe .....	198

## Liste des tableaux

Tableau 1.0	Les maladies kystiques de la médulla.....	13
Tableau 1.1	Les formes syndromiques de dysplasies kystiques du rein.....	14
Tableau 1.2	Phénotype rénaux et extrarénaux PKRAD.....	15
Tableau 1.3	Anomalies de polarité cellulaire et de sécrétion.....	27
Tableau 1.4	La famille des polycystines.....	32
Tableau 1.5	Les modèles spontanés et induits de polykystose rénale.....	47
Tableau 1.6	Les modèles transgéniques de polykystose rénale.....	50
Tableau 1.7	Les modèles PKD associés aux ciliopathies.....	52
Tableau 1.8	L'étude des gènes modificateurs chez les souris.....	55
Tableau 1.9	Les modèles d'ablation génique <i>Pkd1</i> et <i>Pkd2</i> .....	58

## Liste des figures

Figure 1.0	Le rein adulte.....	1
Figure 1.1	Le développement rénal des mammifères.....	3
Figure 1.2	Structure du rein adulte.....	4
Figure 1.3	Le cil primaire des cellules épithéliales rénales.....	8
Figure 1.4	Phénotype rénal de la PKRAD.....	14
Figure 1.5	La formation de kystes chez les patients PKRAD.....	24
Figure 1.6	La structure des polycystine-1 et -2.....	33
Figure 1.7	Le motif coiled-coil de la polycystine-1.....	39
Figure 1.8	Le mécanisme du two-hit.....	63

## Liste des abréviations

ACE : angiotensin-converting enzyme  
ADN : acides désoxyribonucléiques  
cDNA: acide désoxyribonucléique complémentaire  
ADH: antidiuretic hormone  
ARN: acide ribonucléique  
mARN: acide ribonucléique messenger  
BAC: bacterial artificial chromosome  
bp: base pair  
BUN : blood urea nitrogen  
CAKUT: congenital anomalies of the kidney and urinary track  
EGF: epithelial growth factor  
EM: electron microscopy  
ENU: N-Éthyl-N-Nitrosourée  
Kb: kilobases  
kDa: kilodaltons  
LOH: loss of heterozygosity  
MDCK : maladies kystiques de la médulla  
MHz : mégahertz  
MTOC : centre d'organisation des microtubules  
mTOR: mammalian target of rapamycin  
NPHP: nephronophthisis  
O/N : overnight  
PCP : polarisation cellulaire planaire  
PFGE: pulsed-field gel electrophoresis  
PKRAD, ADPKD: polykystose rénale autosomique dominante  
PKD1: polykystic kidney disease 1 (human)  
Pkd1: polykystic kidney disease 1 (mouse)

PKHD1: polykystic kidney and hepatic disease 1

PC-1: polycystine-1

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis

THP: tamm-Horsfall protein

TRPP: transient receptor potential polycystin

TSC1, TSC2: tuberous sclerosis complex

UB: bourgeon urétérique

µg: microgrammes

*Nous ne cesserons jamais notre exploration  
et au terme de notre quête, nous arriverons là  
d'où nous étions parti, et nous connaissons ce  
lieu pour la première fois.*

## Remerciements

J'aimerais remercier ma directrice de recherche, Dr Marie Trudel, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour son encadrement, son enseignement et son intégrité scientifique. Merci, pour l'aide que vous m'avez apporté tout au long de cette maîtrise.

Je remercie les membres du laboratoire pour leur discussion, leur connaissance, leur soutien et leur bonne humeur. Un merci particulier aux autres étudiants PKD, spécialement Almira et Martin, pour leur temps et sans qui bien des projets n'auraient pas été possibles.

Je remercie les techniciennes à l'animalerie, Mylène et Maryse, pour vous êtres occupés si bien de mes souris tout au long de ma maîtrise.

Je remercie Mme Baggio pour l'aide technique incommensurable qu'elle apporte au laboratoire.

Merci au personnel des plateaux technologiques de l'IRCM pour votre aide et vos discussions; merci Annie, Geneviève, Richard et Dominic!

Finalement, je remercie ma famille et mes amis qui m'ont sans cesse supporté au cours de mes études. Particulièrement, merci à mes parents qui m'ont toujours épaulé et aidé à atteindre mes objectifs.

# Introduction

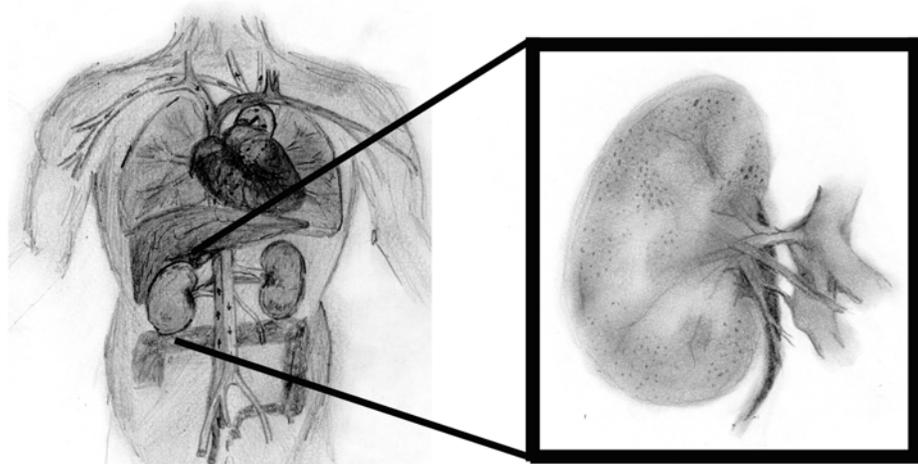
## La structure et l'organisation du rein

### Le rein

Les reins sont des filtres biologiques qui assurent la purification de 180 litres de plasma sanguin par jour, soit près de 100 fois la totalité du volume humain adulte. Ils sont situés dorsalement de part et d'autre de la colonne vertébrale, entre la troisième vertèbre lombaire et la onzième dorsale. Ils mesurent en moyenne 11 cm de longueur et pèsent 150 grammes. Les reins sont alimentés par les artères rénales et distribuent le sang purifié via les veines rénales.

### Figure 1.0 :

#### Le rein adulte



**LÉGENDE :** Les reins sont situés dorsalement au fond de l'abdomen et sont alimentés en sang par les artères rénales.

**Références :** Dessins réalisés par Olivier Côté

### Le développement rénal chez les mammifères

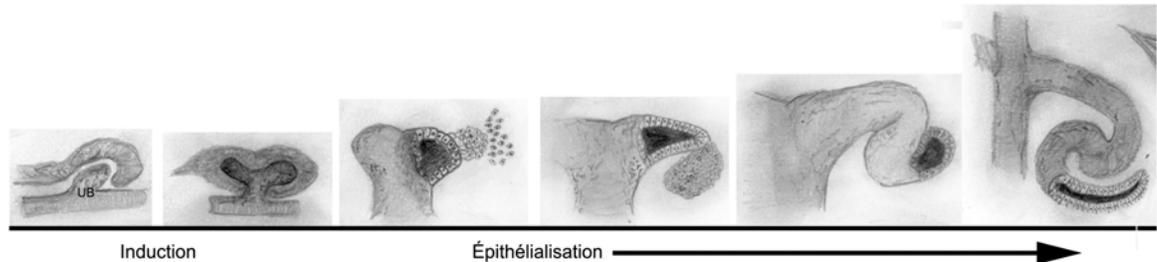
Les reins proviennent du mésoderme intermédiaire de l'embryon de vertébré. Ce tissu subit plusieurs transformations (métamérisation/segmentation) au cours du développement pour générer un rein définitif et fonctionnel. Dans un premier temps, le mésoderme s'élargit pour former le canal pronéphrogénique et

successivement, le pronéphros. Cette ébauche rénale non fonctionnelle s'atrophie rapidement chez l'embryon. Les vestiges du pronéphros sont réutilisés pour ordonner la seconde ébauche rénale correspondant au canal mésonéphrique, ou au conduit de Wolffian. Les différentes régions du conduit de Wolffian seront induites par plusieurs facteurs. Ainsi, l'extrémité caudale, qui est en contact avec la cloaca, forme le bourgeon urétérique destiné à devenir le mésonéphros ou le rein primitif. D'autre part, la partie rostrale forme l'épididyme et les canaux séminifères chez le mâle alors qu'elle dégénère chez la femelle.

Par la suite, le développement du rein définitif, le métanéphros, se résume à deux étapes importantes; l'induction du bourgeon urétérique (UB) par le mésenchyme métanéphrique et l'épithélialisation (Figure 1.1).

L'induction du bourgeon urétérique par le mésenchyme métanéphrique initie le développement du système collecteur du rein comprenant le pelvis, les calices rénaux, les tubules collecteurs et l'uretère. Le branchement du bourgeon est sous le contrôle de certains facteurs de croissance et de transcription exprimés par le mésenchyme ainsi que par des éléments de la matrice extracellulaire. De façon réciproque, le bourgeon influence la condensation du mésenchyme. Ces événements déclenchent les mécanismes d'épithélialisation et la formation successive des corps en virgule, des corps en S et de la structure épithéliale du glomérule. Les tubules proximaux et distaux sont formés plus tardivement par ce même épithélium. Cette dernière étape termine la formation des néphrons, ou des unités fonctionnelles du rein définitif.

**Figure 1.1 :**  
**Le développement rénal des mammifères**



**LÉGENDE :**

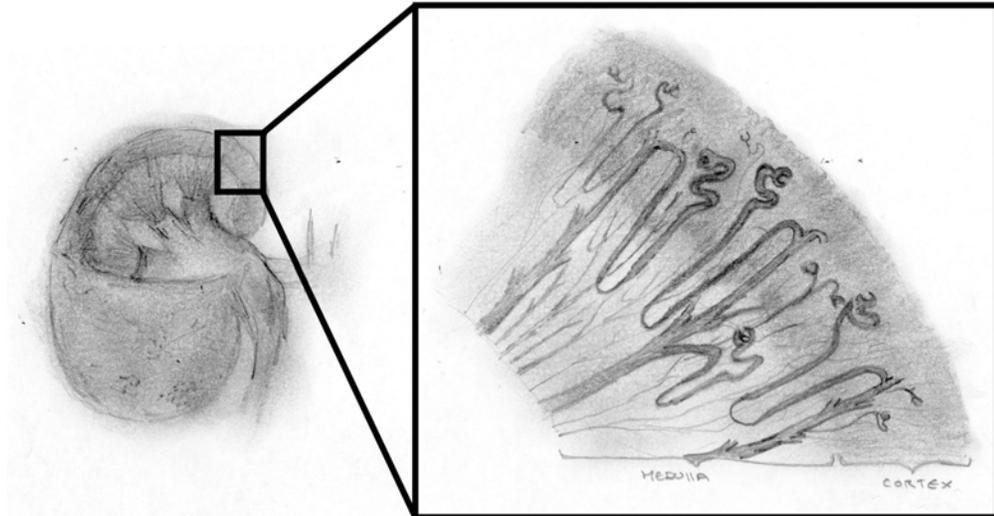
Le développement du rein définitif débute par l'induction du bourgeon urétéral (UB) par les cellules du mésenchyme métanéphrique. La période d'induction est suivie par plusieurs étapes d'épithélialisation permettant la formation des différentes composantes du néphron. Les trois derniers panneaux correspondent aux structures des corps en virgule (panneau 4) et des corps en "S" (panneau 5-6).

**Références : Dessins réalisés par Olivier Côté**

**La structure du rein adulte**

Une coupe sagittale de rein adulte révèle deux régions distinctes nommée cortex et médulla. Le cortex correspond à la région périphérique du rein alors que la médulla représente une zone moins dense située sous le cortex (Figure 1.2). Ces deux zones se distinguent par la présence des différents segments des unités de filtration, ou néphrons, qui les constituent.

**Figure 1.2 :**  
**Structure du rein adulte**



**LÉGENDE :**

La coupe sagittale d'un rein adulte démontre une région foncée externe et une couche pâle interne correspondant au cortex et à la médulla.

**Références :** Dessins réalisés par Olivier Côté

### **Le néphron**

Le néphron est l'unité structurelle et fonctionnelle de base du rein. Chaque rein possède un million de néphrons destinés à établir l'équilibre hydrique du corps en excréant 1% du volume sanguin qu'il filtre. La composition du liquide circulant dans le néphron subit plusieurs modifications dont certaines sont propres à différents segments du néphron. La transformation progressive de l'urine primaire permet de garder un contrôle précis de sa composition jusqu'à son élimination vers la vessie par le système collecteur du rein.

La structure du néphron est unique. Elle comporte deux sections nommées le corpuscule rénal et les tubules rénaux. Le corpuscule rénal comprend un glomérule et une capsule de Bowman. On nomme glomérule l'ensemble de

capillaires sanguins qui sont situés à l'extrémité du réseau sanguin afférent. La capsule de Bowman est une enveloppe cellulaire hermétique qui recouvre le glomérule. Elle est constituée d'une bicouche cellulaire viscérale et pariétale. La couche viscérale comprend les podocytes, des cellules spécialisées de la barrière de filtration glomérulaire. Le sang qui circule dans le glomérule est redirigé dans la circulation systémique par les artéioles rénales efférentes. Le liquide résiduel, ou filtrat primaire, qui s'est formé dans la capsule de Bowman est guidé dans un réseau tubulaire qui assure la complétion de la filtration via deux mécanismes ; la réabsorption et la sécrétion. Le réseau succédant le glomérule comporte 4 segments différents; le tubule proximal, l'anse de Henlé, le tubule distal et le tubule collecteur.

1. Le tubule proximal est le site majeur de réabsorption des ions dissous dans le filtrat glomérulaire comme le sodium, le potassium et le chlore. C'est aussi à ce niveau qu'est synthétisé le calcitrol (métabolite de la vitamine D) destiné à contrôler l'absorption du calcium par l'intestin. C'est le seul tubule à posséder une bordure en brosse, ce qui lui donne un aspect particulier permettant sa distinction des autres tubules en histologie.
2. L'anse de Henlé est située dans la région cortico-médullaire et assure la deuxième vague d'absorption des ions. Ce mécanisme est effectué de façon dynamique par des pompes Na/K/Cl.
3. Le tubule distal assure le dernier contrôle avant que l'urine primaire soit délivrée dans les canaux collecteurs de façon passive. Sa fonction est influencée par l'aldostérone.
4. Les canaux collecteurs sont majoritairement situés dans la région médullaire du rein. Ils sont sensibles à la vasopressine et réabsorbent une grande quantité d'eau via un mécanisme de relocalisation des canaux aquaporines.

Enfin, il est bien de noter l'existence de deux populations de néphrons dans le rein. Les plus nombreux sont les néphrons corticaux, nommé ainsi puisque la plus grande partie de leur structure se situe dans le cortex du rein. Leurs fonctions primaires sont l'excrétion et la filtration du sang. D'autre part, une faible quantité de néphrons juxta médullaires assurent une fonction secondaire de contrôle de la composition de l'urine primaire.

### **Le cil primaire**

Le cil est une organelle qui se projette vers l'extérieur de la cellule à partir de la membrane apicale. Cette structure fut longtemps considérée comme un vestige cellulaire (Latta *et al*, 1961) bien que plusieurs études récentes l'associent aux mécanismes de transduction cellulaire lors du développement et dans la régulation de l'homéostasie cellulaire post-développementale (Wang *et al*, 2006). Deux types de cils se distinguent par leur structure et par leur fonction; le cil primaire et le flagelle.

Le cil primaire est présent dans la plupart des cellules rénales de vertébrés tapissant la capsule de Bowman, les tubules proximaux, distaux et collecteurs, l'anse de Henlé, les conduits papillaires mais absents des cellules intercalées (Lin *et al*, 2003; Roth *et al*, 1988). Il est situé à la surface apicale des cellules épithéliales rénales. On retrouve normalement un seul cil par cellule. De manière importante, le cil primaire n'est pas motile; il ne génère pas de mouvement par lui-même comme le font les flagelles. La propriété principale du cil est la flexibilité. En effet, sa situation intra-tubulaire l'expose aux variations de flot créé par le passage de l'urine primaire. Le stress mécanique exercé par l'urine sur le cil permet sa flexion et l'activation de voies de signalisation intracellulaires. Ce mécanisme se nomme mécanosensation. Il est suggéré que la mécanosensation a un rôle dans la morphogenèse des tissus comme l'établissement du diamètre des tubules rénaux (Davies, 1995; Shiba *et al*, 2005; Tulis *et al*, 1998). De plus, il serait actif dans

différents types cellulaires et organes, comme exemple l'os (Whitfield, 2008; Xiao *et al*, 2008). Les maladies associées au défaut de formation et/ou structure du cil, nommée ciliopathies, seront abordées dans la section des modèles murins PKD.

#### *La formation et la structure du cil*

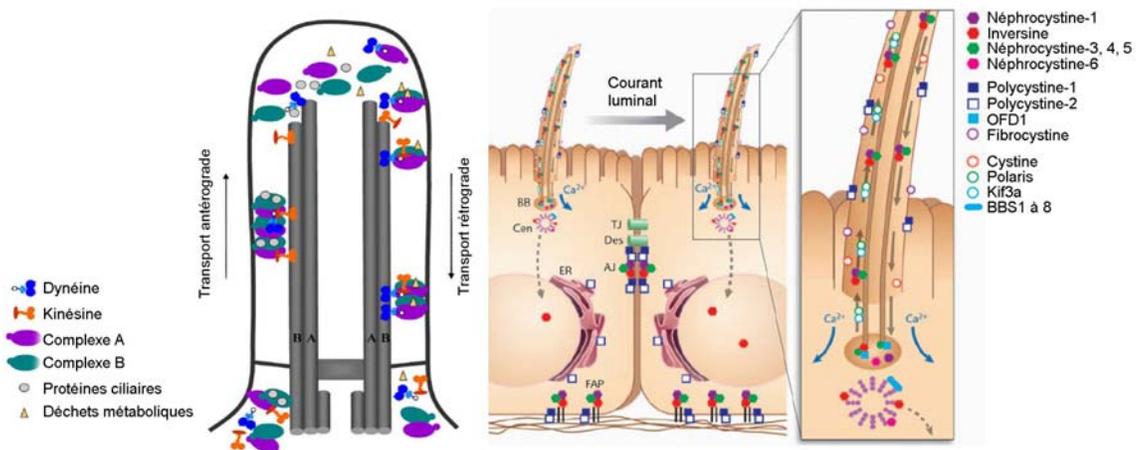
Le cil comprend deux composantes principales. La première se nomme axonème et représente la charpente du cil. Il est formé de 9 doublets de microtubules circulaires (conformation 9+0) qui prennent racine dans le centre d'organisation des microtubules (MTOC) nommé corps basaux. Ils correspondent au réarrangement des centrioles en une structure circulaire de neuf triplets de microtubules. Par analogie, les corps basaux exercent sur le cil la même fonction que les fondations à une maison. La deuxième composante est une membrane plasmique spécialisée qui recouvre l'axonème. Il est proposé que cette membrane possède des éléments et une fonction différente de la membrane plasmique cellulaire (Raychowdhury *et al*, 2005). Cette différence serait expliquée par un enrichissement de protéines spécifiques possédant des signaux de localisation ciliaire. En effet, la base du cil est constituée d'une zone de transition délimitée par un réseau de fibre en Y. Avec l'aide des corps basaux, la zone de transition participerait activement à la sélection des éléments qui entrent et sortent du cil. La membrane située à la base du cil primaire serait aussi un lieu important de formation de vésicules sécrétoires dont la fonction est à ce jour inconnue (Hogan *et al*, 2009).

Le cil est une organelle post-mitotique. Il doit être démantelé et reconstruit à chaque cycle cellulaire puisque les cellules en division nécessitent les centrioles pour la formation des fuseaux mitotiques et la ségrégation des chromosomes. La construction du cil, ou ciliogenèse, reprend lorsque les centrioles ne sont plus associés au fuseau mitotique et que la formation d'un nouveau MTOC est complétée. De manière importante, il n'y a pas de synthèse protéique dans le cil. Tous les éléments nécessaires à sa formation doivent être transportés. Le

mécanisme macromoléculaire par lequel les protéines ciliaires sont emballées et envoyées le long de l'axonème est nommé transport intraflagellaire (IFT)(Cole et al, 1998). Les cargos protéiques circulent le long des microtubules de l'axonème grâce à deux types de protéines. Les premières se nomment kinésines et contrôlent le transport antérograde, alors que les dynéines exercent le transport rétrograde. Un intérêt particulier est apporté à ces protéines puisque l'ablation génique de la kinésine alpha entraîne l'absence de cils primaires et la formation de kystes rénaux chez la souris. De plus, l'ablation génique de protéines structurales du cil, tel que polaris, entraîne des maladies polykystiques rénales (Bisgrove and Yost, 2006).

### FIGURE 1.3 :

#### Le cil primaire des cellules épithéliales rénales



### LÉGENDE :

Structure et localisation du cil primaire. À gauche, la structure du cil primaire et le mécanisme de transport antérograde et rétrograde responsable de sa formation. À droite, la localisation apicale du cil primaire et le mécanisme de mécanotransduction via la stimulation du cil par le courant luminal.

**Références :** Modifié de (Hildebrandt and Zhou, 2007; Pedersen and Rosenbaum, 2008).

## **La fonction rénale**

Les principales fonctions du rein sont d'assurer l'homéostasie des milieux extracellulaires de l'organisme, l'excrétion des métabolites et la régulation de la pression artérielle systémique. Ces fonctions sont effectuées via des mécanismes de filtration, de réabsorption et de sécrétion dans les différents compartiments du néphron. La perte progressive des fonctions excrétrices et endocrines du rein mène à l'insuffisance rénale chronique.

### **L'homéostasie des milieux extracellulaires**

L'homéostasie extracellulaire est en étroite relation avec le système digestif qui apporte la nourriture et les nutriments essentiels. Le rôle du rein est d'assurer une composition du milieu interstitiel et un volume corporel constant. Il assure aussi l'homéostasie en régulant la quantité d'eau éliminée.

### **La formation de l'urine et l'excrétion des métabolites**

L'organisme évacue les produits de dégradation du métabolisme par un mécanisme de filtration non sélectif prenant place dans le glomérule. À ce niveau, le sang retient les macromolécules dans la circulation et perd les électrolytes, les déchets azotés (BUN) et les molécules de petite taille qui traversent la barrière de filtration glomérulaire. Les électrolytes principaux correspondent au sodium, au potassium et au chlore. Parmi les autres molécules du filtrat primaire, on note l'urée qui provient de la dégradation des protéines et des pyrimidines, l'acide urique, du métabolisme des purines, la créatinine venant des muscles, la bilirubine du catabolisme de l'hémoglobine et les métabolites hormonaux comme les stéroïdes. Ces molécules circulent ensuite dans les tubules rénaux où s'établit la concentration finale de l'urine par des mécanismes de réabsorption sélective ou d'excrétion. Le dosage des déchets azotés, de la créatinine et de l'osmolalité urinaire est un paramètre clinique important pour déterminer l'état de la fonction rénale.

## **Les fonctions endocrines du rein**

Le rein possède trois fonctions endocrines. Premièrement, il influence la pression sanguine via le système rénine-angiotensine-aldostérone. Lorsque la pression sanguine baisse dans l'artère rénale, le rein sécrète la rénine. Cette hormone active une cascade d'évènement comprenant une interaction avec l'angiotensinogène produite par le foie, son clivage en angiotensine-I, la modification de l'angiotensine-I par l'enzyme de conversion (ACE) et finalement, la formation de l'angiotensine-II. Cette dernière influence la pression systémique de plusieurs façons; la vasoconstriction des artérioles, la stimulation de la soif, la sécrétion de vasopressine (hormone antidiurétique, ADH) ou la sécrétion d'aldostérone. Au niveau hormonal, la vasopressine agit sur l'expression et la localisation des canaux aquaporines qui réabsorbe l'eau de l'urine alors que l'aldostérone augmente le passage de sodium dans les tubules distaux et collecteurs pour favoriser une augmentation d'eau vers les vaisseaux sanguins.

Deuxièmement, le rein régule l'érythropoïèse via la sécrétion d'environ 90% de l'érythropoïétine totale par les fibroblastes du cortex rénal. Cette hormone agit sur la moëlle osseuse pour stimuler la production et la maturation des globules rouges. La production de l'érythropoïétine par le rein est stimulée lorsqu'il y a une diminution du niveau d'oxygène dans les artères rénales. De manière intéressante, la perte de fonction rénale est souvent associée à une anémie hypoplasique.

Troisièmement, le rein régule la réabsorption du calcium par les intestins en sécrétant le calcitrol, une hormone activée par la 1- $\alpha$ -hydrolase. La régulation des niveaux de calcium et de phosphate par le rein contribue au métabolisme général des minéraux ainsi qu'à la formation et au maintien des os.

## Les néphropathies

Néphropathies est le terme général utilisé pour désigner l'ensemble des anomalies et des maladies rénales. Elles sont généralement classées en fonction de la partie du néphron ou des autres composantes rénales qu'elles affectent. On distingue ainsi les néphropathies glomérulaires, tubulaires, interstitielles et vasculaires. La classification comprend aussi les néphropathies congénitales ou héréditaires qui regroupent les polykystoses rénales autosomiques dominante et récessive, les néphronopathies, le syndrome d'Alport, la maladie de von Hippel-Lindau, la sclérose tubéreuse, la maladie kystique de la médullaire et le syndrome de Bardet-Biedl.

### Les néphropathies congénitales

#### La sclérose tubéreuse

La sclérose tubéreuse est une maladie autosomique dominante caractérisée par la formation de tumeurs bénignes, ou hamartomes, dans plusieurs organes. En fait, le terme "tubéreuse" souligne l'aspect caractéristique des projections des tumeurs qui se compare aux tubercules de la pomme de terre. Les symptômes des patients sont très variables et dépendent de la localisation, du nombre et de la grosseur des lésions. Les patients démontrent des anomalies rénales pouvant mener à l'hypertension et à l'insuffisance rénale dans 70 à 90% des cas. Des mutations affectant les gènes *TSC1* et *TSC2* sont responsables de la pathogénèse. *TSC1* est situé sur le chromosome 9 (9q34) et encode la protéine hamartine. Seulement 15 à 30% des mutations sont associées à *TSC1*. Pour sa part, *TSC2* est localisé en position tête à queue avec le gène *PKD1* et encode une protéine nommée tubérine. Les mutations affectant *TSC2* sont reliées à un pronostic sévère comparativement à *TSC1* (Curatolo *et al*, 2008).

Peu de patients *TSC* démontrent des kystes rénaux. Toutefois, on observe un phénotype très précoce similaire à celui de la polykystose rénale nommé syndrome contigu *PKD1-TSC2* dans 3% des cas. Il est généralement causé par un réarrangement chromosomique causant la délétion d'une partie des gènes *TSC2* et *PKD1*. Moins fréquemment, des mutations affectant les deux gènes provoquent aussi le syndrome contigu (Longa *et al*, 1997; Sampson *et al*, 1997). Le syndrome contigu entraîne un phénotype sévère qui regroupe les anomalies observées individuellement chez les patients *PKD* et *TSC2*, telles que la formation de kystes massifs et de tumeurs (Martignoni *et al*, 2002).

Les gènes *TSC* régulent des voies de signalisation cellulaires importantes. Premièrement, le complexe *TSC1/TSC2* module la voie mTOR responsable des mécanismes de traduction, de régulation du métabolisme, de la croissance et du cycle cellulaire. D'autre part, le complexe agit sur la voie des Wnts en inhibant la  $\beta$ -caténine et la transcription d'oncogène tel que *c-myc*. Les mutations et la perte de la fonction de *TSC2* pourraient contribuer à la progression du phénotype rénal dans la polykystose rénale.

### **Les maladies kystiques de la médulla**

Les néphronopathies (NPHP) et les maladies kystiques de la médulla (MCDK) représentent un groupe de néphropathies congénitales caractérisées par une polyurie, une polydipsie, une perte chronique de la fonction rénale et la formation de rein hypoplasique possédant des kystes à la jonction médullo-corticale. Une élévation marquée de fibrose tubulo-interstitielle et des anomalies de la membrane basale sont dénotées chez les patients. Les NPHP se distinguent des MCDK puisqu'elles sont transmises de manière récessive et qu'elles démontrent une progression très rapide vers l'insuffisance rénale (Tableau 1.0). Inversement au NPHP, les MCDK possèdent un mode de transmission dominant et ne présentent peu ou pas de phénotypes extrarénaux.

Le clonage positionnel a permis l'identification d'au moins 7 gènes (*NPHP1*, 2, 3, 4, 5, 6 et *AHI1*) générant les symptômes rénaux classiques de NHPH ainsi que des phénotypes extrarénaux variables. Parmi ces symptômes, citons les anomalies hépatiques comme la fibrose hépatique congénitale, la fibrose périportale et la prolifération des canaux biliaires.

Les MCDK sont associées aux loci *MCKD1* et *MCKD2* situés sur les chromosomes 1 et 16. Récemment, une mutation affectant le gène *UMOD* codant pour la protéine Tamm-Horsfall a été associée à un phénotype similaire aux MCDK, suggérant la présence d'un troisième locus.

**Tableau 1.0 :**  
**Les maladies kystiques de la médulla.**

Localisation	Gène	Protéine	Insuffisance rénale	Kystes rénaux	Phénotypes extrarénaux	Références
Néphronopathies (NHPH)						
2q12-q13	NPHP1	Néphrocystine-1	13 ans	100%	Cervelet, Foie, Os, Oeil	1
9q22-q31	NPHP2	Inversine	1-3 ans	100%	Situs inversus, Cœur	2
3q21-q22	NPHP3	Néphrocystine-3	19 ans	100%	Syndromes neurologiques	3
1p36.22	NPHP4	Néphrocystine-4	13 ans	100%	Oeil	4
3q13.33	NPHP5	Néphrocystine-5	13 ans	100%	Oeil	5
12q21.32	NPHP6	Néphrocystine-6	13 ans	100%	Cerveau, Oeil	6
6q23.3	AHI1	Joubertine	?	?	Cerveau	6
Maladies kystiques de la médulla (MCDK)						
1q21	MCKD1	?	62 ans	100%	Hyperuricémie, goutte	7
16p12	MCKD2	?	32 ans	100%	Hyperuricémie, goutte	8
16p12.3	UMOD	Tamm-Horsfall	30 ans	?	Hyperuricémie	9

**LÉGENDE :** Liste des principaux gènes et protéines responsables des néphronopathies et des maladies kystiques de la médulla.

**Références :** 1- (Hildebrandt *et al*, 1997) 2- (Otto *et al*, 2003) 3- (Olbrich *et al*, 2003) 4- (Mollet *et al*, 2002) 5- (Otto *et al*, 2005) 6- (Hildebrandt *et al*, 2007) 7- (Christodoulou *et al*, 1998) 8- (Scolari *et al*, 1999) 9- (Rohatgi, 2008)

### Les dysplasies kystiques rénales

La formation de reins dysplasiques est une anomalie juvénile fréquente diagnostiquée chez 1/1000 personnes (Winyard and Chitty, 2008; Woolf *et al*,

2004). Un rein dysplasique démontre une quantité anormalement élevée de tissus interstitiels, peut parfois contenir des kystes et du tissu matriciel comme le cartilage mais se caractérise par la présence de néphrons et de tubules collecteurs très peu segmentés et/ou différenciés. Les dysplasies kystiques rénales regroupent un large spectre de maladies figurant parmi les anomalies congénitales du rein et du système urinaire, ou CAKUT (Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Track). Quelques formes syndromiques intéressantes associées à la formation de kystes sont décrites dans le tableau suivant.

**Tableau 1.1 :**

**Les formes syndromiques de dysplasies kystiques du rein.**

Syndrome	Gène	Fonction	Symptomes rénaux
Acidurie glutarique type II	GCDH	Déhydrogénase	Kystes et dysplasie
Bardet Biedl	BBS	Chaperone et centrosome	Dysplasie
Beckwith-Wiedemann	P57KIP2	Cycle cellulaire	Kystes et dysplasie
Fraser	FRAS1	Molécule d'adhésion	Agenèse et dysplasie
Kallmann	KAL1	Molécule d'adhésion	Agenèse et dysplasie
Meckel	MKS	? Importante au cil primaire	Kystes et dysplasie
Nail-Patella	LMX1B	Facteur de transcription	Agenèse et malformation glomérulaire
Oro-facio-digital type I	OFD1	Protéine du centrosome	Kystes glomérulaires
Kystes rénaux et diabète	HNF1β	Facteur de transcription	Kystes, hypoplasie et dysplasie
Simpson-Golabi-Behmel	GPC3	Protéoglycane	Kystes et dysplasie
Smith-Lemli-Optiz	DHCR7	Réductase	Kystes et dysplasie
von Hippel Lindau	VHL	Suppresseur de tumeur	Kystes et tumeurs
Zellweger	PEX	Peroxisome	Kystes et dysplasie

**LÉGENDE :** Liste des formes syndromiques de dysplasies kystiques du rein qui entraînent la formation de kystes rénaux. On observe aussi les gènes impliqués ainsi que la fonction cellulaire des protéines qu'ils encodent.

**Références :** Adapté de (Woolf *et al*, 2004).

**La polykystose rénale autosomique récessive**

La polykystose rénale autosomique récessive (PKRAR; ARPKD) est une néphropathie congénitale juvénile affectant 1 :20000 personnes. Elle se

caractérise par la formation de reins massifs présentant des kystes au niveau des tubules collecteurs. Les cas les plus sévères sont associés à une hypoplasie pulmonaire et des anomalies osseuses qui entraînent la mort après la naissance. L'amélioration des techniques respiratoires palliatives et le remplacement rénal ont amélioré le taux de survie des patients qui est maintenant de 82% pour les enfants de 10 ans (Sweeney and Avner, 2006). Les autres signes pathognomoniques sont la dysgénésie biliaire menant à la fibrose hépatique congénitale et les dilatations des conduits biliaires intrahépatiques (Harris and Torres, 2008). Le pronostic des rares patients qui survivent à l'enfance est plus optimiste (Roy *et al*, 1997). Ceux-ci démontrent un élargissement moins prononcé des reins bien que s'additionnent d'autres symptômes dont les spléno- et hépato-mégalies (Sweeney *et al*, 2006).

Dans tous les cas, ARPKD est causé par des mutations dans le gène *PKHD1*. Ce gène situé dans la région chromosomique 6p21.2-p12 possède au moins 86 exons et couvre 470 kb d'ADN génomique. La littérature suggère que *PKHD1* posséderait de nombreux transcrits et serait soumis à l'épissage alternatif. Cette hypothèse est toutefois remise en question. Les 300 mutations de *PKHD1* rapportées à ce jour sont hétérogènes. Plusieurs d'entre elles entraînent des protéines tronquées (Bergmann *et al*, 2003). Les patients homozygotes présentent des phénotypes beaucoup plus sévères.

Le plus long cadre de lecture de *PKHD1* permet la synthèse de la protéine fibrocystine, ou polyductine, une protéine membranaire avec des multidomains de fonction inconnue (Onuchic *et al*, 2002; Ward *et al*, 2002). La fibrocystine possède au-delà de 4000 acides aminés (aa) ; elle a un large domaine extracellulaire de plus de 3000 aa glycosylés, un domaine transmembranaire et une courte région intracellulaire d'environ 200 aa. Plusieurs motifs extracellulaires suggèrent que la fibrocystine possède un rôle d'adhésion cellulaire ou de récepteur membranaire.

La région intracellulaire possède un site consensus de phosphorylation par PKA ou PKC.

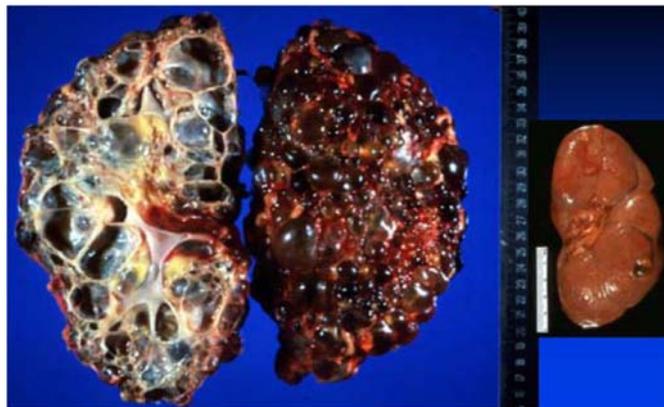
La fibrocystine est fortement exprimée dans les structures épithéliales du rein, du foie et du pancréas pendant l'embryogenèse (Ward *et al*, 2003). Elle est présente dans le centrosome, dans les corps basaux et dans le cil primaire des cellules épithéliales rénales. La relation entre la localisation et la fonction reste toujours à déterminer.

### **La polykystose rénale autosomique dominante**

La polykystose rénale autosomique dominante (PKRAD; ADPKD) est la maladie génétique la plus commune affectant 1:500 à 1:1000 personnes dans le monde. Cette maladie peu connue, souvent appelée silencieuse, affecte un plus grand nombre de gens que l'ensemble des patients atteints de fibrose kystique, de dystrophie musculaire, d'hémophilie, du syndrome de Down et d'anémie falciforme. La PKRAD affecte autant les hommes que les femmes, sans prédisposition ethnique (Grantham, 2008).

**Figure 1.4 :**

**Phénotype rénal de la polykystose rénale autosomique dominante.**



**LÉGENDE :** La polykystose rénale entraîne la formation de reins hypertrophiés (à gauche) dont le remodelage affecte la fonction et entraîne progressivement l'insuffisance rénale.

**Référence :** Perrone R.D., 2007, What every patient should know about ADPKD, [http://www.pkdcure.org/Portals/0/files/documents/Dr. Perrone What Every Patient Should Know About PKD.pdf](http://www.pkdcure.org/Portals/0/files/documents/Dr._Perrone_What_Every_Patient_Should_Know_About_PKD.pdf)

### *Le phénotype rénal*

La polykystose rénale autosomique dominante est caractérisée par le développement de kystes rénaux bilatéraux qui entraînent le remodelage complet de l'architecture rénale menant à l'insuffisance (Anderson's pathology, Edition Mosby, tenth edition, 1996, vol.2, p.2079-2082, ISBN 0-8016-7236-8). Les kystes peuvent occasionnellement se manifester in-utéro bien que de manière générale, ils se développent progressivement et entraînent l'insuffisance vers l'âge de 50 ans. Tous les segments du néphron sont affectés par les kystes qui sont normalement remplis de liquide. Il a été postulé que les kystes proviennent de cellules clonales en prolifération qui se détachent des tubules rénaux normaux (Grantham, 1983). Fréquemment, la pression interne peut générer la rupture de vaisseaux sanguins expliquant la présence d'hémorragies. L'expansion des kystes crée la compression du parenchyme et favorise l'ischémie et la mort du tissu fonctionnel périphérique (Ettinger *et al*, 1969). En conséquence, on observe la génération de tissus cicatriciels, ou fibrose, une caractéristique associée aux tissus PKRAD. De manière intéressante, la présence de fibrose et de kystes ne corrèle pas toujours suggérant que la fibrose puisse favoriser l'ischémie et la kystogenèse. La formation de kystes génère des défauts de concentration de l'urine et d'autres problèmes associés dont la polyurie, les protéinuries, les hématuries et les infections. Les lithiases rénales et la calcification des kystes sont aussi des phénotypes communs (Levine and Grantham, 1992; Torres *et al*, 1993). Peu de cas de formation de néoplasmes sont rapportés bien que leur incidence chez les patients PKRAD semble comparable à la population générale (Grantham, 2008).

### *Les phénotypes extrarénaux*

PKRAD est une maladie systémique et comporte plusieurs phénotypes extra-rénaux (Tableau 1.3). Les principales manifestations seront traitées ici en fonction de l'organe qu'elles ciblent.

**Tableau 1.2:**  
**Phénotypes rénaux et extrarénaux PKRAD.**

Phénotypes	Manifestations	Références	
Rénaux	Kystes	1	
	Hypertrophie rénale	1	
	Lésion hyperplasique de l'épithélium (80%)	1	
		Hyperplasie	
		Polypes	
		Atrophie tubulaire	
		Fibrose interstitielle	
		Sclérose glomérulaire	
		Accumulation interstitielle de lymphocytes	
		Ischémie rénale	1
		Hématurie 42%	2, 3, 4
		Protéinurie, Oligurie, Urémie, Azotémie	5, 6
Hépatiques	Infections rénales/urinaires	5	
	Lithiases et calcifications (50%)	95,96	
	Kystes hépatiques 10-88%	4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17	
	Hépatomégalie (asymptomatique)	18, 19, 20	
Pancréatiques	Fibrose hépatique congénitale	21, 22	
	Kystes pancréatiques	23, 24	
	Résistance à l'insuline/glucose variable	25	
	Diabète	26, 27	
	Pancréatite	23, 24, 28	
	Tumeur papillaire intraductale (mucine)	28	
	Cystadénocarcinome	29	
	Pancreas divisum	23	
	Hyperinsulinémie	30, 31	
	Cardiaques/ Cardiovasculaires	Anévrisme, Dilatation, Coarctation, Dissection aortique	32, 33, 34, 35, 36
Régurgitation des valves aortiques 8-19%		10, 37, 38, 39	
Sténose aortique et calcification		36., 40	
Congenital bicuspid aortic valve		36., 40	
Régurgitation valve tricuspide 15%		37, 38, 39	
Prolapse valve tricuspide 6%		37, 38, 39	
Insuffisance aortique et/ou régurgitation mitrale 18-31%		36, 37, 40	
Prolapse valve mitrale 26%		37, 38, 39	
Hypertrophie du ventricule gauche 23-46%		41, 42, 43, 44, 45	
Murmures cardiaques en systole 10%		46	
Annuloaortic ectasia		47	
Malformations aertério-veineuses viscérales		36	
Remodelage vasculaire		48, 49	
		Épaississement de la fibre élastique	
		Calcification des lamelles élastiques	
Cérébraux		Anévrismes	
			Rupture 6-12 %
		Asymptomatique 5- 41 %	16, 52, 55, 56, 57, 58, 59, 60
	Kystes arachnoïdes 8%	61, 62	
	Hémorragies sous-arachnoïde 1.6%	56, 63, 64, 65, 66, 67	
	Malformations cérébrales artéroveineuses	68, 69	
	Maladie de Moyamoya	70	
	Dissection intracrâniale	71	
Autres	Maladies diverticulaires du colon 30-80%	10, 16, 35, 72, 73, 74, 75	
	Rupture spontanée du colon	16, 35, 72, 74, 75	
	Hernie inguinale	16, 35, 72, 74, 75	
	Douleur abdominales/lombaires 60-71%	16, 76, 77, 78	
	Hypertension 29-60%	6, 77, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86	
	Kystes épiphysaire (pinéal)	46, 52	
	Kystes ovaire, utérus, testicules	46, 87	
	Hypoplasie pulmonaire (enfant)	6	
	Hypercholestérolémie (62%)	82	
	Anomalies de la vessie	46	
	Problèmes musculo-squelettique	16	
		Goutte	88, 89, 90, 91
		Hernie	85
	Cavum septum pellucidum	52	
	Anastomose de la carotide	92, 93	
Selle turcique vide	52		
Dermato-polymyosites	94		

**LÉGENDE** : Listes des phénotypes extrarénaux rapportés chez les patients PKRAD.

**Références** : 1-(Ettinger *et al*, 1969) 2-(Ravich *et al*, 1976) 3-(Gabow *et al*, 1992) 4-(Dalgaard, 1957) 5-(Chapman *et al*, 1994) 6-(McDonald and Avner, 1991) 7-(Kissane, 1990) 8-(Grantham, 1988) 9-(Niv *et al*, 1997) 10-(Kaehny and Everson, 1991) 11-(Milutinovic *et al*, 1980) 12-(Grunfeld *et al*, 1985) 13-(Thomsen and Thaysen, 1988) 14-(Cobben *et al*, 1990) 15-(Ul Haque and Moatasim, 2008) 16-(Gabow *et al*, 1990) 17-(D'Agata *et al*, 1994) 18-(Que *et al*, 1995) 19-(Sherstha *et al*, 1997) 20-(Everson *et al*, 1988) 21-(Tamura *et al*, 1994) 22-(Cobben *et al*, 1990) 23-(Basar *et al*, 2006) 24-(Malka *et al*, 1998) 25-(Kokot *et al*, 1990) 26-(Ducloux *et al*, 1999) 27-(de Mattos *et al*, 2005) 28-(Naitoh *et al*, 2005) 29-(Niv *et al*, 1997) 30-(Fliser *et al*, 1998) 31-(Vareesangthip *et al*, 1997) 32-(Chapman and Hilson, 1980) 33-(Montoliu *et al*, 1980) 34-(Okamoto *et al*, 1983) 35-(Torres, 1999) 36-(Leier *et al*, 1984) 37-(Hossack *et al*, 1988) 38-(Timio *et al*, 1992) 39-(Martinez-Vea *et al*, 1999) 40-(George, 1992) 41-(Chapman and Gabow, 1997) 42-(Ecder and Schrier, 2001) 43-(Bardaji *et al*, 2001) 44-(Zeier *et al*, 1993) 45-(Martinez-Vea *et al*, 2004) 46-(Gabow *et al*, 1984) 47-(Nunez *et al*, 1986) 48-(Ibels *et al*, 1979) 49-(Amann *et al*, 1995) 50-(Gibbs *et al*, 2004) 51-(Chapman *et al*, 1992) 52-(Huston *et al*, 1993) 53-(Ruggieri *et al*, 1994) 54-(Schievink *et al*, 1992) 55-(van Dijk *et al*, 1995) 56-(Butler *et al*, 1996) 57-(Rinkel *et al*, 1998) 58-(Levey *et al*, 1983) 59-(Ishibashi, 1981) 60-(Wakabayashi *et al*, 1983) 61-(Allen *et al*, 1986) 62-(Schievink *et al*, 1995) 63-(Schievink *et al*, 1992) 64-(Wiebers and Torres, 1992) 65-(Juvola *et al*, 1993) 66-(Asari and Ohmoto, 1993) 67-(Gieteling and Rinkel, 2003) 68-(Banerjee and Rana, 1976) 69-(Proesmans *et al*, 1982) 70-(Pracyk and Massey, 1989) 71-(Kulla *et al*, 1982) 72-(Scheff *et al*, 1980) 73-(Faber and Kupin, 1987) 74-(Iglesias *et al*, 1983) 75-(Gabow and Schrier, 1989) 76-(Milutinovic *et al*, 1984) 77-(Milutinovic *et al*, 1990) 78-(Bajwa *et al*, 2004) 79-(Chapman *et al*, 1990) 80-(Chapman *et al*, 1991) 81-(Handa, 2006) 82-(Errasti *et al*, 2003) 83-(Kelleher *et al*, 2004) 84-(Schrier *et al*, 2003) 85-(Sedman *et al*, 1987) 86-(Chapman *et al*, 1997) 87-(Grantham *et al*, 1987) 88-(Martinez-Maldonado, 1974) 89-(Mejias *et al*, 1989) 90-(Newcombe, 1973) 91-(Rivera *et al*, 1965) 92-(Kobayashi *et al*, 1984) 93-(Matsumura *et al*, 1985) 94-(Bahceci *et al*, 2004) 95-(Levine *et al*, 1992) 96-(Torres *et al*, 1993).

### Le foie

La principale manifestation extra-rénale dans la PKRAD correspond à la formation de kystes hépatiques. Ils surviennent indépendamment des kystes rénaux, bien qu'ils soient plus fréquents chez les patients possédants des kystes rénaux. Les femmes sont plus sujettes à la formation de kystes hépatiques que les hommes. Cette prédisposition augmente encore plus pour les femmes exposées aux hormones stéroïdiennes, de façon naturelle ou thérapeutique (Gabow *et al*, 1990; Grunfeld *et al*, 1985; Sulikowski *et al*, 2006). Généralement, la fonction hépatique est conservée ; les niveaux d'enzymes hépatiques et de bilirubine restent dans les valeurs normales (Everson, 1990; Telenti *et al*, 1990). Des hépatomégalies sont aussi fréquentes mais asymptomatiques (Que *et al*, 1995; Sherstha *et al*, 1997). Des cas de fibrose hépatique congénitale ont été rapportés dans des familles PKRAD (Cobben *et al*, 1990; Tamura *et al*, 1994).

### Les anomalies cardiaques et cardiovasculaires

Les anomalies cardiaques représentent la principale cause de mortalité des patients PKRAD (Fick *et al*, 1995; Huston *et al*, 1996; Nakajima *et al*, 2000; Schievink *et al*, 1992). En fait, une étude épidémiologique rapporte les maladies cardiovasculaires comme principales responsables du décès de 20 patients PKRAD suite à leur autopsie (Iglesias *et al*, 1983). De plus, il est proposé que l'âge moyen de décès des patients ne corrèle pas avec la présence d'insuffisance rénale (Fick *et al*, 1995). De manière intéressante, 25% des patients PKRAD normotensifs et 46% des patients hypertendus démontrent une l'hypertrophie du ventricule gauche (Bardaji *et al*, 2001; Chapman *et al*, 1997; Ecdet *et al*, 2001; Martinez-Vea *et al*, 2004; Zeier *et al*, 1993). Cette hypertrophie corrèle avec l'augmentation significative du poids du cœur chez les patients décédés d'anomalies cardiaques primaires ou secondaires (Fick *et al*, 1995). L'incompétence aortique et la régurgitation de la valve mitrale sont présentes chez 18 à 31% des patients (Hossack *et al*, 1988; Martinez-Vea *et al*, 1999; Timio *et al*, 1992). Des sténoses aortiques dues à la calcification sont aussi rapportées dans la littérature (George, 1992; Leier *et al*, 1984).

### Le pancréas

Le pancréas est affecté par les kystes chez environ 10% des patients PKRAD (Basar *et al*, 2006; Malka *et al*, 1998). Leur présence est associée à une dilatation des conduits pancréatiques et une fibrose interstitielle faible (Malka *et al*, 1998). L'incidence de pancréatite liée ou non à un défaut de fusion des conduits pancréatiques (Pancreatic divisum), de tumeur papillaire mucoïde intraductale et d'adénocarcinome kystique semble augmentée comparativement à la population générale (Basar *et al*, 2006; Malka *et al*, 1998; Naitoh *et al*, 2005; Niv *et al*, 1997). Certains patients démontrent une résistance à l'insuline dû à l'hypertrophie cardiaque (Hjelmesaeth and Hartmann, 1999; Lumiaho *et al*, 2003). Au niveau fonctionnel, le taux de résistance au glucose est affecté chez certains individus et

un diabète est à craindre suite à une transplantation (de Mattos *et al*, 2005; Ducloux *et al*, 1999; Kokot *et al*, 1990). Curieusement, le diabète n'est pas un phénotype classique des patients PKRAD. Toutefois, la littérature présente plusieurs cas de diabète associés aux maladies polykystiques des reins. En effet, les mutations humaines de *HNF-1 $\beta$*  entraînent des kystes rénaux et le diabète (Gong *et al*, 2009). *HNF-1 $\beta$*  active l'expression de *Kif12*, une kinésine impliquée dans le cycle cellulaire. D'autres anomalies rénales associées au diabète sont rapportées dans les syndromes d'Ivemark et d'Alagille (Bernstein, 1987; Devriendt *et al*, 1996).

#### Le cerveau

La complication la plus sérieuse de la PKRAD représente les anévrismes cérébraux. Ils sont asymptomatiques chez 10% des patients mais provoquent des ruptures dans 6 % des cas (Kaehny *et al*, 1991). Les ruptures entraînent la mort immédiate suite à une hémorragie méningée ou un hématome cérébral. La présence d'une prédisposition familiale augmente l'incidence des anévrismes à 22% dans certaines familles PKRAD (Huston *et al*, 1993). La susceptibilité familiale semble plus grande chez les patients *PKD1* (Gibbs *et al*, 2004; Gieteling *et al*, 2003). Les sites principaux d'anévrisme sont l'artère cérébrale intermédiaire (38%) et l'artère communicante antérieure (30 %) (Gieteling *et al*, 2003). Les anévrismes sont associés à l'hypertension (Chauveau *et al*, 1994).

On observe aussi des kystes arachnoïdes chez 8% des patients PKRAD (Schievink *et al*, 1995). Cette accumulation de liquide cérébro-spinal à l'extérieur du parenchyme provoquerait un effet dysgénique de diminution du cortex cérébral associée à un retard de croissance (Alehan *et al*, 2002).

Moins fréquemment, des études rapportent des hémorragies sous-arachnoïdes, des malformations cérébrales artério-veineuses ainsi que des symptômes de la maladie de Moyamoya (Asari *et al*, 1993; Butler *et al*, 1996; Juvela *et al*, 1993; Pracyk *et al*, 1989; Schievink *et al*, 1992; Wiebers *et al*, 1992).

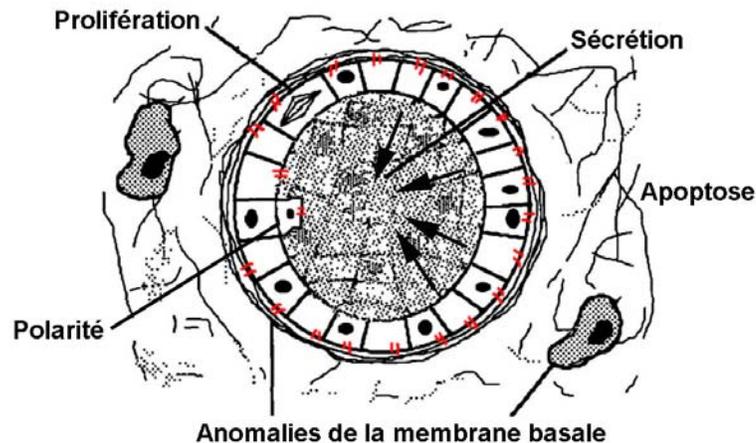
### Le colon

Les maladies diverticulaires du colon sont probablement la deuxième manifestation PKRAD en terme de fréquence (Kaehny *et al*, 1991). Celle-ci varie énormément, soit de 30 à 83% selon les études (Faber *et al*, 1987; Scheff *et al*, 1980). Les diverticuloses coliques sont asymptomatiques mais prédisposent à des infections ou des hémorragies. D'ailleurs, quelques cas de rupture spontanée du colon sont rapportées dans la littérature (Gabow *et al*, 1990; Gabow *et al*, 1989; Iglesias *et al*, 1983; Scheff *et al*, 1980; Torres, 1999).

### *La pathogenèse PKRAD*

Le mécanisme pathogénique de la polykystose rénale n'est pas déterminé. Plusieurs observations suggèrent des anomalies de la membrane basale et de prolifération des cellules épithéliales tubulaires dans les tissus sains et kystiques. Dans les kystes, on retrouve des anomalies de polarité et de prolifération cellulaire, d'apoptose, de formation de la matrice extracellulaire et de sécrétion de l'épithélium tubulaire. Il est intéressant de noter que certains patients présentent des variations intrafamiliales importantes du phénotype suggérant un rôle particulier des facteurs environnementaux et génétiques, comme les gènes modificateurs, dans la progression de la PKRAD.

**Figure 1.5 :**  
**La formation de kystes chez les patients PKRAD.**



**LÉGENDE :** Mécanismes cellulaires affectées dans l'épithélium rénal kystique.

**Référence :** Adapté de (Martinez and Grantham, 1995).

#### La prolifération

La prolifération participe activement au développement et à la progression des maladies kystiques des reins (Lanoix *et al*, 1996; Nadasdy *et al*, 1995). Le niveau de prolifération augmente de 10 à 100 fois dans l'épithélium rénal PKRAD indépendamment de la présence de kystes. Cette élévation dans les tubules d'apparence normale suggère que la prolifération est une cause primaire de formation des kystes. Plus tardivement, les tubules dilatés sont composés de cellules hyperplasiques et de polypes, suggérant que la prolifération participe aussi à la progression et à l'expansion des kystes.

Au niveau moléculaire, les tissus rénaux expriment plusieurs proto-oncogènes (*c-myc*, *c-ErbB2*), facteurs de croissance (TGF- $\alpha$  et EGF) ainsi que d'autres gènes associés à la prolifération (*c-fos*, *c-Ki-ras*, *c-jun*) (Herrera, 1991; Mochizuki *et al*, 1996; Trudel *et al*, 1991). De manière intéressante, certains de ces facteurs génèrent des mécanismes de rétro activation tel que le facteur de croissance EGF (Epithelial Growth Factor) et son récepteur EGFr. En effet, les tissus PKRAD surexpriment le récepteur EGFr et provoque le changement de sa

localisation basale normale vers la membrane apicale. Conséquemment, la sécrétion apicale d'EGF dans les kystes active le récepteur délocalisé et crée une boucle de régulation autocrine qui stimule la prolifération. Récemment, une autre étude propose un modèle autocrine d'induction de la prolifération via la périostine sécrétée par la membrane apicale de l'épithélium kystique. Celle-ci augmenterait le taux de prolifération via le récepteur  $\alpha$ v-intégrine (Wallace *et al*, 2008). Enfin, des concepts plus récents suggèrent que la polycystine-1 pourrait induire la prolifération via la régulation du niveau de calcium intracellulaire (Aguari *et al*, 2008).

#### L'apoptose

L'apoptose est un mécanisme par lequel une cellule peut entraîner sa mort de façon organisée via des facteurs intrinsèques ou extrinsèques. L'apoptose induit la fragmentation de l'ADN et la destruction de la cellule sans interférer avec le tissu avoisinant. Dans le cas de la nécrose, lors de la lyse cellulaire, les cellules déversent anormalement leur contenu dans l'environnement cellulaire créant une réponse inflammatoire. Lors du développement normal d'un organisme, plusieurs cellules sont destinées à mourir par apoptose dans le but de définir, remodeler ou de corriger certaines structures. L'organogenèse rénale est un bon exemple (Kuure *et al*, 2000). Toutefois, une variation trop prononcée du niveau d'apoptose peut interférer avec le développement normal et entraîner une pathogenèse. C'est le cas de la polykystose rénale. En effet, les cellules situées en périphérie des tubules rénaux normaux et kystiques démontrent un taux élevé d'apoptose (Lanoix *et al*, 1996; Nadasdy *et al*, 1995; Wilson and Falkenstein, 1995; Woo, 1995). Cette élévation survient tôt dans la pathogenèse, avant la dilatation significative des tubules et le développement de fibrose. Pour cette raison, la littérature suggère que les niveaux élevés d'apoptose expliquent le remodelage des tissus périphériques et contribuent au développement des kystes (Ibrahim, 2007). Il est démontré que la variation du niveau d'apoptose est conséquente à une

augmentation des facteurs extrinsèques de l'apoptose dans les tissus PKRAD humain (Goilav *et al*, 2008).

Les évidences moléculaires de l'apoptose dans les tissus humains correspondent au taux d'expression anormalement élevés des gènes *c-myc* et *Bcl-2* (Lanoix *et al*, 1996). Le gène *c-myc* possède une activité double qui, selon le contexte cellulaire, induit la prolifération ou l'apoptose. Pour sa part, le gène *Bcl-2* régule négativement la voie apoptotique.

#### Les anomalies de la membrane basale

L'épithélium bordant les kystes possède une membrane basale laminée et anormalement élargie. On y dénote une quantité inhabituelle de laminine, fibronectine, collagène de type IV et de protéoglycanes. Le collagène de type I est aussi retrouvé dans le liquide interstitiel (Klingel *et al*, 1993; Wilson *et al*, 1992).

La réorganisation de la membrane basale et la formation de fibrose interstitielle suggèrent un taux élevé de remodelage de la matrice extracellulaire (Zhang *et al*, 2004). De manière intéressante, le niveau d'endopeptidases permettant la dégradation et la réorganisation de la matrice, les métalloprotéinases (MMP), augmente dans les tissus rénaux PKRAD (Nakamura *et al*, 2000). Une autre classe de protéases nommées cathepsines est aussi impliquée dans le remodelage de la membrane extracellulaire. L'activité des cathepsines B, L et H diminue dans les tissus PKRAD (Hartz and Wilson, 1997). Il est proposé que l'utilisation d'inhibiteur de métalloprotéinase aurait un potentiel thérapeutique chez les patients PKRAD (Obermuller *et al*, 2001).

#### La polarité cellulaire et la sécrétion

La polarité cellulaire est un facteur déterminant de la morphogénèse. L'établissement d'un axe cellulaire permet la ségrégation et la localisation adéquate des protéines apicales, latérales ou basales. Dans le rein, la distribution des protéines assure la qualité des mécanismes de réabsorption et de sécrétion.

La polarité cellulaire anormale des cellules PKRAD entraîne la localisation aberrante de plusieurs protéines membranaires (Du and Wilson, 1995). La pompe cellulaire Na-K-ATPase régule normalement l'établissement d'un gradient d'ion nécessaire à la réabsorption via un mécanisme d'osmose. Dans les tissus PKRAD, cette pompe est anormalement distribuée à la surface apicale de l'épithélium. Puisqu'elle est toujours active, elle établit un nouveau gradient osmotique qui active la sécrétion de liquide dans les kystes et favorise leur expansion (Wilson, 1997). Nous avons déjà cité le cas des récepteurs à l'EGF qui sont localisés anormalement à la membrane apicale. La liste des autres protéines dont la localisation est affectée chez PKRAD est illustrée dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 1.3:**  
**Anomalies de polarité cellulaire et de sécrétion.**

Protéines	Localisation normale	Localisation ADPKD	Références
<b>Polarité cellulaire</b>			
Na-K-ATPase $\alpha_1$	Baso-latérale	Apicale	Wilson et al., 1991
Na-K-ATPase $\beta_1$	Baso-latérale	Intracellulaire	Wilson et al., 1997
Na-K-ATPase $\beta_2$		Apicale	Wilson et al., 1993
Transporteur Na-K-Cl	Apicale	Basale	Wilson et al., 1992
EGFr	Baso-latérale	Apicale et baso-latérale	Wilson et al., 1993; Du et al., 1995
Calpactine 1	Baso-latérale	Apicale	Wilson et al., 1991
Calpactine-2	Baso-latérale	Apicale	Wilson et al., 1991
Ankyrine	Baso-latérale	Apicale	Wilson et al., 1991 et 1992
$\alpha$ -Fodrine	Baso-latérale	Apicale	Wilson et al., 1991 et 1992
Uvomoruline	Baso-latérale	Apicale et baso-latérale	Wilson et al., 1995
Cathepsine B et H	Intracellulaire	Apicale	Hartz et al., 1997
Gélatinase A	Intracellulaire	Apicale	Norman et al., 1995; Wilson et al., 1996
TIMP	Intracellulaire	Apicale	Norman et al., 1995; Wilson et al., 1996
<b>Sécrétion</b>			
Sodium	Basale	Apicale	Wilson et al., 1991
Liquide	Basale	Apicale	Mangoo-Karim et al., 1989 et 1995
EGF	Basale	Apicale	Du et al., 1995
Acide arachidonique	Basale	Apicale	Wilson et al., 1991 et 1992
Cathepsines B et L	Apicale	Basale	Hartz et al., 1997

**LÉGENDE :** Liste des protéines anormalement localisée dans l'épithélium rénal kystique.

**Référence :** Adapté de (Wilson, 1997).

### *Le diagnostique et les traitements*

Le diagnostique de la PKRAD est établi par des évidences radiologiques chez les patients possédant une histoire familiale. Pour les patients sans histoire familiale, les médecins utilisent une charte corrélant le nombre de kystes par tranche d'âge en plus des paramètres cliniques classiques distinguant les différents types de maladies polykystiques du rein. Récemment, un groupe d'étude, nommé CRISP (Consortium for Radiologic Imaging Studies of PKD), a été créé dans le but de développer des techniques de visualisation qui permettraient la détermination et le suivi du volume des reins et des kystes chez les patients. Leurs résultats démontrent une étroite corrélation entre l'augmentation du volume et la perte de fonction rénale, suggérant une nouvelle approche pour l'étude de thérapies (Chapman *et al*, 2003). Au niveau clinique, l'évaluation de la progression de la PKRAD reste une tâche difficile puisqu'il n'existe pas de marqueur biologique qui varie en fonction de la perte de la fonction rénale. Le développement de l'hypertension artérielle est un indice important qui doit être pris en charge rapidement. Le taux de créatinine dans le sang est un autre outil essentiel pour évaluer le taux de filtration glomérulaire. Il est toutefois démontré que le taux de créatinine peut rester stable malgré l'expansion rénale et varier seulement lorsque plus de 50% du parenchyme rénal a été détruit, soit tardivement lors de l'insuffisance rénale (Torres, 2008). Les signes cliniques caractéristiques d'une insuffisance rénale sont l'élévation de l'urée, une acidose métabolique et une anémie.

Il n'existe aucun traitement pour prévenir la formation de kystes. Les thérapies palliatives actuelles visent à réduire les symptômes cliniques comme l'hypertension, les hématuries, les infections et la douleur lombaire associée au développement des kystes. Les patients qui atteignent l'insuffisance rénale nécessitent la dialyse ou la transplantation. Les thérapies de remplacement des reins surviennent chez 50% des patients avant 60 ans (Grantham, 2008).

## **Génétique moléculaire de la PKRAD**

Les gènes *PKD1* et *PKD2* sont responsables de la polykystose rénale autosomique dominante dans environ 85 et 15% des cas respectivement. Seulement quelques familles ne sont pas associées à ces deux gènes, suggérant la présence d'un locus non identifié. Les mutations affectant *PKD1* entraînent un phénotype plus précoce que *PKD2*. La présence d'un plus grand nombre de kystes serait à l'origine de cette différence puisque la croissance des kystes est indépendante du locus affecté (Harris *et al*, 2006).

### ***PKD1* et *PKD2***

#### **La localisation chromosomique**

La recherche de la position du gène *PKD1* par clonage positionnel a débuté en 1985. L'identification du site exact de *PKD1* ne fut pas révélée avant 1995, année où les chercheurs ont découvert le gène *TSC2* responsable de la sclérose tubéreuse sur le chromosome 16, à proximité de *PKD1*. L'étude d'une famille portugaise comportant des individus PKRAD et TSC a permis d'associer le site d'une cassure chromosomique à la localisation de *PKD1* (Harris *et al*, 1995b). Le gène *PKD1* est situé à la position 13.3 du bras court du chromosome 16 humain (16p13.3). Il est situé en position queue à queue avec le gène *TSC2*.

Le gène *PKD2* est situé sur le chromosome 4 (Kimberling *et al*, 1993; Peters *et al*, 1993). La localisation exacte, 4q21-23, a aussi été découverte par la méthode du clonage positionnel (Mochizuki *et al*, 1996).

#### **Les structures**

La caractérisation de la structure du gène *PKD1* fut laborieuse. En effet, le chromosome 16 possède au moins 4 répétitions des 30 premiers exons de *PKD1* (~97% d'homologie) ainsi qu'une région dupliquée comprenant 3 gènes

homologues (nommés HG) (Harris *et al*, 1995a; Peral *et al*, 1997). *PKD1* comprend 52 kb d'ADN génomique et se divise en 46 exons générant un transcrit de 14.3 kb. Les gènes homologues peuvent être transcrits bien qu'ils ne soient pas traduits en protéines (Bogdanova *et al*, 2001). *PKD2* couvre 68 kb d'ADN génomique, possède 15 exons et génère un transcrit de 5,1 kb (Hayashi *et al*, 1997).

### **Les mutations**

La banque de la fondation PKD rapporte au-delà de 600 mutations/variants humains de *PKD1* dont environ 300 sont considérés pathogéniques. On dénombre plusieurs types de mutations ; délétions, non-sens, décalages du cadre de lecture, insertions et substitutions. Étonnamment, *PKD1* n'a pas de site spécifique où les mutations seraient plus fréquentes malgré la présence de région polypurines-polypyrimidines qui prédisposent aux mutations (Blaszak *et al*, 1999; Kozlowski *et al*, 2008). Aucune corrélation entre le type de mutations et la sévérité du phénotype n'a été rapportée. Toutefois, les mutations affectant la région 5' serait plus sévère que ceux de la région 3', provoquant l'insuffisance rénale 3 ans plus tôt (Rossetti *et al*, 2002; Rossetti and Harris, 2007; Starremans *et al*, 2008). Les mutations en 5' sont aussi associées à une prédisposition aux anévrismes cérébraux (Rossetti *et al*, 2003). Il est à noter que plusieurs mutations *PKD1* sont spécifiques à une seule famille et que 10% des mutations détectées représentent des variations de séquence de novo (Rossetti *et al*, 2007). La variabilité des phénotypes observés dans les familles PKRAD suggère que des facteurs environnementaux et génétiques pourraient influencer le développement et la progression de la maladie.

L'analyse des mutations affectant le gène *PKD2* s'est effectuée plus rapidement que ceux de *PKD1* puisqu'il n'y a pas de duplication de ce gène (Germino and Somlo, 1992). La banque de mutations de la fondation PKD répertorie au-delà de 120 mutations dont 90 semblent associés au développement

de la PKRAD. Il n'existe pas de corrélation entre le type ou la position des mutations *PKD2* et la sévérité du phénotype (Magistrini *et al*, 2003).

### **Un troisième locus?**

Quelques familles PKRAD ne possèdent pas de mutations dans les locus *PKD1* et *PKD2*, suggérant la présence d'un troisième locus (Bachner *et al*, 1990; Bogdanova *et al*, 1995; Daoust *et al*, 1995; de Almeida *et al*, 1995; Tighe *et al*, 1995). Un homologue de *PKD2* nommé *PKDL* est associé à des anomalies rénales dans un modèle d'ablation murin, mais n'est toujours pas identifié comme candidat de l'allèle humain *PKD3* (Nomura *et al*, 1998; Wilson, 2001). Il existe plusieurs loci candidats, ou gènes modificateurs, associés à une progression plus sévère chez la souris (Voir la section études murines).

### **Les polycystines**

Les gènes *PKD1* et *PKD2* encodent les protéines membranaires nommées polycystine-1 et -2. Ces protéines font partie de la superfamille des canaux TRP (Transient Receptor Potential) qui comprend plus de 50 canaux regroupés en fonction de leur homologie structurelle. Les canaux TRP possèdent minimalement 6 domaines transmembranaires (TM) et un pore situé entre le 5<sup>e</sup> et le 6<sup>e</sup> segment qui permet le passage des ions. Généralement, ces canaux sont perméables aux cations de manière non spécifique. Toutefois, différents canaux TRP sont plus spécifiques à certains cations, comme la polycystine-2 qui favorise le passage du calcium (Vassort and Fauconnier, 2008).

Il existe 7 familles de récepteur TRP dont les TRPP qui regroupent l'ensemble des polycystines (Tableau 1.4). Les TRPP (TRP-polycystine) se divisent en deux sous familles, soit celle de la polycystine-1 et de la polycystine-2. Les membres de la sous-famille de la polycystine-1 sont caractérisés par la présence d'un long domaine extracellulaire et de 11 domaines transmembranaires. Les six derniers segments transmembranaires (6 à 11) correspondent à la structure minimale pour

être classé dans la famille TRP. Plusieurs motifs protéiques comme le motif coiled-coil sont conservés et présents dans tous les membres de cette sous-famille. La sous-famille de la polycystine-2 regroupe 3 membres qui possèdent 6 domaines transmembranaires et une structure similaire aux canaux ioniques (Kottgen, 2007).

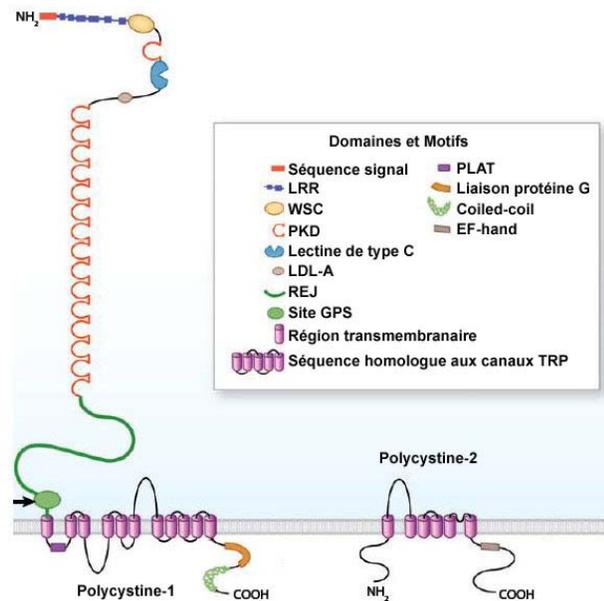
**Tableau 1.4:**  
**La famille des polycystines.**

Nom	Gène	Protéine	Localisation chromosomique	Expression
			Sous-famille de la polycystine-1	
TRPP1	PKD1	Polycystine-1	16p13.3	Ubiquitaire
-	PKDREJ	Polycystine-REJ	22q13	Testicules
-	PKD1L1	Polycystine-1L1	7p12-p12	Testicules, cœur
-	PKD1L2	Polycystine-1L2	16q22-q23	Ubiquitaire
-	PKD1L3	Polycystine-1L3	16q22-q23	Ubiquitaire
			Sous-famille de la polycystine-2	
TRPP2	PKD2	Polycystine-2	4q21-q23	Ubiquitaire
TRPP3	PKDL	Polycystine-2L	10q24-q25	Ubiquitaire
TRPP5	PKD2L	Polycystine-2L2	5q31	Reins, cerveau, testicules

**LÉGENDE :** Les membres de la famille TRPP (Transient Receptor Potential Polycystin). Cette famille se divise en deux sous-familles correspondant aux homologues de la polycystine-1 et de la polycystine-2.

**Références :** Adapté de (Vassort *et al*, 2008).

**FIGURE 1.6 :**  
**La structure des polycystine-1 et -2**



**LÉGENDE :** Structure des polycystine-1 et -2. Les différents motifs des protéines sont énumérés dans l'encadré. La flèche indique le site de clivage de la polycystine-1 dans le site GPS.

**Références :** Adapté de (Harris *et al*, 2008).

### La polycystine-1

La polycystine-1 est une glycoprotéine transmembranaire de 4302 acides aminés (460 kDa) possédant un large domaine extracellulaire, 11 domaines transmembranaires et une courte région cytoplasmique (Harris *et al*, 1995a; Nims *et al*, 2003). Elle possède un signal peptide qui suggère son passage dans la voie sécrétoire. La fonction exacte de la protéine est inconnue bien que les études de structure suggèrent qu'elle représente un récepteur membranaire ou une molécule d'adhésion importante pour le développement rénal.

#### Le domaine extracellulaire

Le domaine extracellulaire de la polycystine-1 comporte plus de 3000 acides aminés et sa structure est unique en ce qui concerne l'aspect modulaire de ses

motifs (Wilson, 2001). Certains motifs sont fortement conservés dans différentes espèces (Sandford *et al*, 1997).

#### *Les motifs LRR*

Les domaines riches en leucines (LRR) consistent en des séquences de 24 acides aminés qui possèdent une leucine ou un acide aminé aliphatique à 7 différentes positions consensus. Ils sont associés aux fonctions d'adhésion cellulaire et d'interactions protéines-protéines (Wilson, 2001). Certains membres de cette famille sont impliqués dans les voies de transduction cellulaire (Windisch *et al*, 1995). La polycystine-1 possède deux motifs LRR entourés de régions riches en cystéine, une caractéristique des protéines extracellulaires. La spécificité de l'interaction protéine-protéine que confèrent les LRR dépendrait des résidus/domaines avoisinants et du nombre de répétition des motifs (Kobe and Deisenhofer, 1994). Il est intéressant de noter que comparativement à *PKD1*, les protéines d'adhésion qui arborent normalement ces motifs possèdent plusieurs répétitions de LRR.

In-vitro, les motifs LRR de la polycystine-1 interagissent avec les composantes de la matrice extracellulaire comme le collagène de type-1, la laminine et la fibronectine (Malhas *et al*, 2002). Ces interactions auraient un effet suppresseur de prolifération sur les cellules épithéliales rénales embryonnaires humaines (293). Ces motifs dicteraient aussi la liaison à l'annexine-5 (Markoff *et al*, 2007).

#### *Le motif lectine de type C*

Les motifs homologues aux lectines de type C (ou WSC) sont impliqués dans les liaisons protéines-carbohydrates. In-vitro, ce motif de PC1 lie le collagène de type I, II, et IV de manière calcium dépendante (Pletnev *et al*, 2007). Il est suggéré que ce motif est important pour la liaison de PC1 avec les protéines ubiquitaires de la matrice extracellulaires (Weston *et al*, 2001).

### *Le motif LDL-A*

Le motif LDL-A (Low-Density Lipoprotein) représente un motif hydrophobe aussi impliqué dans la liaison de ligand.

### *Les domaines PKD*

Les domaines PKD représentent 1/3 de la région extracellulaire de la polycystine-1. Leur structure unique et distinctive forme la signature de cette protéine. Ils sont au nombre de 16 copies dont 14 sont alignés et séparés par des séquences de seulement 5 à 7 acides aminés. Des analyses de structure démontrent une homologie avec les immunoglobulines, suggérant une fois de plus un motif de liaison pour les ligands extracellulaires (Bycroft *et al*, 1999). L'utilisation in-vitro de peptides synthétiques correspondant aux motifs PKD entraîne des défauts de branchement du bourgeon urétérique et suggère un rôle pour ces motifs dans le développement rénal (van Adelsberg, 1999).

### *Le domaine REJ*

Les milles derniers acides aminés du domaine extracellulaire précédant le premier domaine transmembranaire sont homologues au domaine REJ (sea urchin Receptor for Egg Jelly). Ce domaine est conservé et, à titre d'exemple, possède 10 homologues chez le *Strongylocentrotus purpuratus* (Gunaratne *et al*, 2007). Il participe à la réaction acrosomale et permet la formation d'un courant de calcium favorisant le remodelage et la liaison du spermatozoïde à l'ovule (Hughes *et al*, 1999). Plusieurs mutations humaines touchent le domaine REJ et suggèrent qu'elles affecteraient l'ancrage normal de la protéine à la membrane plasmique (Bouba *et al*, 2001).

### *Le site de clivage GPS*

Le site de clivage des récepteurs couplés aux protéines G (GPS) contient 50 acides aminés (Qian *et al*, 2002). Il est commun à un groupe de protéines à 7 domaines transmembranaires qui ont la propriété de posséder un grand domaine extracellulaire (Stacey *et al*, 2000). Une des fonctions du GPS serait de réguler l'activation de la polycystine-1 par le clivage de son domaine extracellulaire (Qian *et al*, 2002). In-vitro, les mutations qui affectent le clivage entraînent des défauts d'activation de la voie JAK2/STAT. D'autre part, les souris possédant un site GPS muté et non-clivable survivent 1 mois après la naissance mais démontrent des kystes rénaux massifs, suggérant aussi un rôle de la protéine non-clivée dans le développement rénal (Yu *et al*, 2007). Le site exact et le mécanisme de clivage ne sont pas encore déterminés. Il est d'ailleurs suggéré que la protéine régulerait son clivage selon un mécanisme d'autoprotéolyse partiel (Wei *et al*, 2007).

### **Les domaines transmembranaires**

Des analyses informatiques suggèrent que la polycystine-1 possède 11 domaines transmembranaires (1995; Hughes *et al*, 1995; Nims *et al*, 2003; Sandford *et al*, 1997). Quelques motifs intéressants ont été découverts entre les différents domaines transmembranaires, soit une tyrosine à la position 3614 et une séquence riche en proline à 3524, suggérant un domaine SH3 (Src homology 3) important pour la transduction de signaux extracellulaires (Hughes *et al*, 1995; Kay *et al*, 2000).

### *Le domaine PLAT/LH2*

Le domaine PLAT/LH2 (Polycystin-1, Lipoxygenase and Alpha Toxin/Lipoxygenase homology 2) est un domaine d'homologie au site de liaison non-catalytique de la famille des lipoxygénases. Ce motif d'interaction suggère un domaine de liaison aux lipides entre les deux premiers domaines transmembranaires de PC1 (Gillmor *et al*, 1997).

### **Les domaines intracellulaires**

La polycystine-1 possède une courte région cytoplasmique de 225 acides aminés correspondant à un module de transduction de signaux extracellulaires qui comporte plusieurs sites potentiels de phosphorylation.

#### *Les domaines PKA*

Les sites potentiels de phosphorylation apparaissent dans le domaine C-terminal de la polycystine-1. Les régions 4162-4167 et 4250-4253 comportent des motifs RSSR, cibles des kinases PKA et PKC. Les positions 4110, 4118, 4127, 4237 sont occupées par des tyrosines potentiellement activables par différentes kinases. Un article décrit que la sérine 4252 est un site majeur de phosphorylation par PKA et que la tyrosine 4237 est phosphorylée par c-scr (Li *et al*, 1999). Chez la souris, c'est la sérine 4159 qui est le site principal de phosphorylation par la PKA (Parnell *et al*, 1999).

#### *Le motif WW*

Le motif WW possède deux résidus tryptophane et représente un autre motif impliqué dans les fonctions de signalisation du domaine intracellulaire via des partenaires encore indéterminés (Sudol *et al*, 1995).

#### *Le site d'activation des protéines G hétérotrimériques*

La région intracellulaire de la polycystine-1 possède un domaine d'activation des protéines G capable d'activer de façon constitutive 4 types de sous-unité alpha nommées  $G\alpha_{i/o}$ ,  $G\alpha_{q/11}$ ,  $G\alpha_s$  et  $G\alpha_{12/13}$  (Delmas *et al*, 2002; Parnell *et al*, 2002). De manière générale, les membres de la famille PKD interagissent préférentiellement avec les sous-unités  $G\alpha_s$  ou  $G\alpha_i$  (Delmas, 2005). Cette observation corrèle avec les voies de signalisation impliquées dans le développement des kystes comme la voie de l'adénylate cyclase.

Cette région interagit aussi avec RGS7, un régulateur des protéines G (Kim *et al*, 1999a; Parnell *et al*, 1998).

### *Le motif coiled-coil*

Le motif coiled-coil découvert par Linus Pauling en 1953 est associé à plusieurs activités cellulaires comme le transport et la transcription. Il est conservé dans les homologues de *PKD1* des organismes téléostéens jusqu'aux humains, suggérant une fonction très importante (Sandford *et al*, 1997).

Le coiled-coil de la polycystine-1 a été détecté avec le programme informatique d'analyse de structure COILS. Il correspond à une région qui s'étend des acides aminés 4214 à 4248 (Qian *et al*, 1997a). Sa structure moléculaire comprend 5 répétitions d'heptades formant une hélice alpha bipolaire. Le motif coiled-coil peut interagir avec des structures bipolaires ou non. Par exemple, plusieurs évidences suggèrent l'interaction entre la polycystine-1 et -2 via le motif coiled-coil de PC1 mais pas celui de PC2.

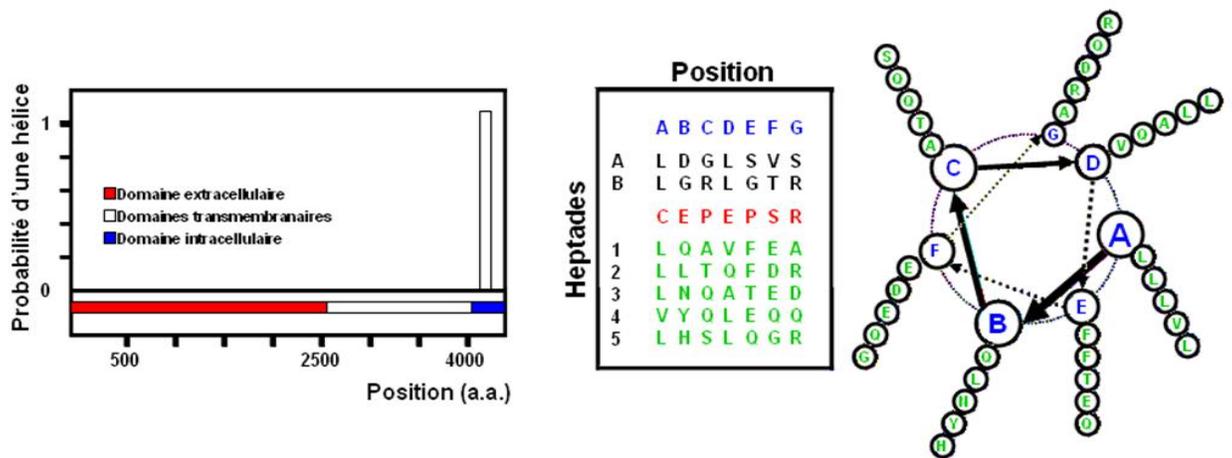
In vitro, l'interaction entre PC1 et PC2 dépend de l'intégrité du motif coiled-coil de la polycystine-1 ; la liaison est perdue si on reproduit une mutation non-sens humaine (Peral *et al*, 1996) ou lorsqu'on induit une mutation comprenant seulement 2 des 5 heptades du motif coiled-coil (Qian *et al*, 1997a). Une analyse intéressante suggère que le motif coiled-coil de la polycystine-1 interagirait avec un motif différent du coiled-coil et du site d'homodimérisation de la polycystine-2 (Tsiokas *et al*, 1997). Plusieurs études démontrent la perte d'activité de partenaires potentiels de PC1 lorsqu'une région comprenant le motif coiled-coil est tronquée (Chernova *et al*, 2005; Vandorpe *et al*, 2002; Xiao *et al*, 2008; Xu *et al*, 2007). Au niveau fonctionnel, le coiled-coil est un élément clé dans le mécanisme de régulation de la polycystine-2. In-vitro, l'activité de la polycystine-2 tronquée de son domaine C-terminal n'est plus régulée par PC1 et inversement, une construction PC1 possédant une mutation ponctuelle Q4215P entraîne la dérégulation du canal PC2 (Xu *et al*, 2003).

Enfin, les polycystines forment des complexes protéiques in-vivo via la région C-terminale de la polycystine-1 (Newby *et al*, 2002). Il est suggéré que le

motif coiled-coil soit responsable des problèmes de polarité des protéines membranaires observées dans l'épithélium PKRAD (Wilson, 2001).

**FIGURE 1.7 :**

**Le motif coiled-coil de la polycystine-1.**



**LÉGENDE :** Le motif coiled-coil de la polycystine-1. Le graphique à gauche démontre la probabilité informatique (relative de 0 à 1) de la présence d'une hélice alpha dans la séquence de la polycystine-1. Cette analyse suggère qu'une seule région située dans le domaine intracellulaire (a.a. 4214-4248) possède une hélice. La figure de droite démontre une vue de face de la structure de l'hélice alpha. En encadré, on observe de gauche à droite la position des acides aminés de la polycystine-1 des positions A à G (en bleu) dans une heptade. De haut en bas, on observe deux heptades potentielles (A et B) séparées du groupe de 5 heptades principales (en vert) par un groupe d'acides aminés riche en proline (en rouge).

**Références :** Adapté de (Qian *et al*, 1997a).

## La polycystine-2

La polycystine-2 est une protéine de 968 acides aminés possédant 6 domaines transmembranaires homologues aux canaux  $\text{Ca}^{2+}$  voltage dépendant de la famille TRP.

La famille des canaux TRP rassemble une vingtaine de protéines qui ont en commun 6 domaines transmembranaires et une région « pore » ou perméable de

forte homologie entre les domaines 5 et 6 (Birnbaumer *et al*, 1996; Minke and Cook, 2002). De manière générale, ces canaux non-sélectifs possèdent différentes propriétés de sélection des cations. Par exemple, la polycystine-2 a une plus grande sélectivité pour les cations bivalents  $\text{Ca}^{2+}$ . En effet, des études in-vitro démontrent que ce canal favorise le passage du calcium de 1,3 à 6 fois plus que les autres ions monovalents ou bivalents, comme le sodium (Gonzalez-Perrett *et al*, 2001; Hanaoka *et al*, 2000). La structure est aussi similaire à 50% avec les domaines transmembranaires 7 à 11 de la polycystine-1 (Mochizuki *et al*, 1996). Il est proposé que la polycystine-2 agisse sous forme de dimère avec la polycystine-1.

### **Les domaines**

Les deux extrémités de la polycystine-2 sont orientées vers le cytoplasme cellulaire. L'extrémité amino-terminale comprend un motif RVXP important pour la localisation de la protéine dans le cil primaire (Geng *et al*, 2006). Elle possède aussi un site de phosphorylation par la GSK3-b (Glycogen Synthase Kinase 3 bêta) qui régule le positionnement du pool membranaire intracellulaire indépendamment du mécanisme de localisation dans le cil (Streets *et al*, 2006).

L'extrémité carboxy-terminale de 288 a.a. possède un domaine EF-Hand, un site d'interaction avec la polycystine-1, un groupe d'acides aminés acides (Acid cluster) et un domaine de polymérisation TRPP2 (Giamarchi *et al*, 2006; Qian *et al*, 1997a). La polycystine-2 possède aussi un motif coiled-coil. Comparativement à la polycystine-1, le coiled-coil de la polycystine-2 ne possède pas de structure bipolaire comprenant des sections hydrophobe et hydrophile (Qian *et al*, 1997a).

## **L'expression et la localisation des polycystines**

### **Localisation tissulaire**

L'établissement du patron d'expression et de localisation de la polycystine-1 s'est avéré difficile dû à la variabilité des résultats obtenus par plusieurs groupes à l'aide de différents anticorps. Toutefois, de manière consensus, il est accepté que

l'expression de la polycystine-1 soit régulée de manière développementale. Le niveau d'expression est au maximum durant la période de néphrogenèse et diminue de manière significative suite à la formation du rein adulte. Lors du développement rénal, elle est fortement exprimée dans le bourgeon urétérique, les corps en virgule, les corps en S, les tubules collecteurs et corticaux ainsi que dans l'épithélium pariétal de la capsule de Bowman. L'expression dans les tubules proximaux diminue après la 24<sup>e</sup> semaine. (Geng *et al*, 1996; Nauta *et al*, 2000; Ong *et al*, 1999a; Palsson *et al*, 1996; Peters *et al*, 1999). Chez l'adulte, l'expression est détectable tout au long du néphron, soit dans les tubules proximaux, distaux et collecteurs, l'endothélium glomérulaire ainsi que dans l'épithélium vasculaire (Geng *et al*, 1996; Ibraghimov-Beskrovnaya *et al*, 1997; Nauta *et al*, 2000; Ong *et al*, 1999a; Peters *et al*, 1999). Le signal disparaît cependant de l'endothélium vasculaire des reins adultes (Ibraghimov-Beskrovnaya *et al*, 1997; Palsson *et al*, 1996). Dans le foie adulte, l'expression est évidente dans l'épithélium des canaux biliaires. Il n'y a pas d'expression dans les hépatocytes et les vaisseaux sanguins tel que l'artère hépatique et la veine porte (Geng *et al*, 1996; Peters *et al*, 1999). L'épithélium des canaux pancréatiques et les cellules  $\beta$  du pancréas démontrent un signal alors que les cellules  $\alpha$ ,  $\delta$  et PP sont négatives. La polycystine-1 est exprimée dans la fibre musculaire cardiaque et le muscle lisse vasculaire (Peters *et al*, 1999).

Comparativement à la polycystine-1, la polycystine-2 possède un niveau d'expression constant au cours de la vie. Elle est localisée dans la majorité des structures épithéliales rénales en développement. Chez l'adulte, elle est exprimée dans les tubules distaux, collecteurs et dans l'anse de Henlé (Foggensteiner *et al*, 2000). De façon générale, les sections du néphron qui expriment la polycystine-2 expriment aussi la polycystine-1. La polycystine-2 est détectée de façon ubiquitaire dans les différents tissus extrarénaux.

Chez les patients PKRAD, l'expression de la polycystine-1 est égale ou augmentée dans l'épithélium autour des kystes rénaux et hépatiques. En fait, 80% des kystes conservent l'expression des deux polycystines chez PKRAD et même d'avantage chez les patients *PKD1-TSC2*. Les tubules non affectés démontrent une expression normale (Geng *et al*, 1996; Ong *et al*, 1999a; Ong *et al*, 1999b; Palsson *et al*, 1996).

### **Localisation sous-cellulaire**

Dans les cellules rénales, la polycystine-1 localise à la membrane plasmique apicale, basale et latérale. Elle serait plus concentrée à la membrane apicale (Geng *et al*, 1996) où on lui suggère un rôle important dans le cil primaire (Yoder *et al*, 2002). Une fraction de polycystine-1 est détectée dans le cytoplasme cellulaire suggérant une fonction d'internalisation et de recyclage (Geng *et al*, 1996; Peters *et al*, 1999). Récemment, la polycystine-1 a été découverte dans des vésicules sécrétées à partir de la base du cil primaire et ressemblant à des exosomes (Hogan *et al*, 2009).

La polycystine-2 se localise majoritairement au niveau du réticulum endoplasmique. Elle présente aussi un niveau d'expression accentuée à la membrane basolatérale (Foggensteiner *et al*, 2000). La polycystine-2 se retrouve aussi dans le cil primaire et les vésicules sécrétées à sa base.

## **La fonction des polycystines**

### **La signalisation cellulaire**

#### **La voie des Wnts**

Les mécanismes de transduction cellulaire par lesquels les polycystines agissent ne sont pas connus. Il est évident qu'elles affectent les mécanismes de prolifération, de polarité et de morphogenèse cellulaire. Un régulateur important de ces différents mécanismes cellulaires correspond à la voie des Wnts. La  $\beta$ -

caténine semble particulièrement impliqué dans la pathogenèse PKRAD (Kim *et al*, 1999b).

La  $\beta$ -caténine est normalement contenue dans les complexes d'adhésion cellulaires avec l'E-cadhérine. Sa relâche dans le cytoplasme peut induire deux évènements. Premièrement, elle peut interagir avec le complexe APC (Adenomatous Polyposis Coli) qui entraîne rapidement sa dégradation via le protéasome. Deuxièmement, la  $\beta$ -caténine libre peut interagir avec les facteurs transcriptionnels de la famille TCF/LEF dans le cytoplasme. La translocation de ce complexe au noyau active une série de gènes dont l'oncogène *c-Myc*. Dans les tissus PKRAD, il est rapporté que les niveaux de  $\beta$ -caténine augmentent dans le cytoplasme et au noyau (van Adelsberg, 2000). Cette augmentation serait la conséquence de l'interaction et de la stabilisation de la  $\beta$ -caténine via le domaine C-terminal de la polycystine-1 (Huan and van Adelsberg, 1999; Lal *et al*, 2008). De plus, la présence de sites TCF/LEF sur le promoteur de *PKD1* suggère une régulation par la  $\beta$ -caténine (Rodova *et al*, 2002). De manière intéressante, l'expression du gène *c-Myc* est aussi élevée dans les tissus PKRAD (Lanoix *et al*, 1996).

D'autre part, la  $\beta$ -caténine régule la polarité cellulaire dans un complexe avec l'E-cadhérine et l' $\alpha$ -caténine (Yeaman *et al*, 1999). La variation du niveau de  $\beta$ -caténine pourrait être liée aux problèmes de polarité observée chez PKRAD. L'E-cadhérine est une molécule d'adhésion dont la fonction est dépendante de la présence de calcium (van Adelsberg, 2000).

### **Les protéines G hétérotrimériques**

Les protéines G hétérotrimériques représentent une famille d'interrupteurs situées à la membrane cellulaire qui sont activés par les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). La stimulation des GPCRs par des ligands extracellulaires module une variété de programmes cellulaires. Plusieurs évidences suggèrent que

la polycystine-1 pourrait agir à titre de récepteur couplé aux protéines G hétérotrimériques.

Premièrement, la polycystine-1 possède une séquence d'activation des protéines G dans son motif intracellulaire. In vitro, il est démontré qu'une séquence de 20 aa de PC1 est capable d'activer la sous-unité  $G\alpha$ . La liaison de la polycystine-1 au protéine G est favorisée en présence du site d'interaction aux protéines G, du motif coiled-coil, et du site de phosphorylation par les PKA (Parnell *et al*, 1998). L'effet de la polycystine-1 sur les protéines G serait modulée par son interaction avec la polycystine-2, suggérant une activation anormale des protéines G en absence de complexe PC1-2 (Delmas *et al*, 2002). Les voies de signalisation JNK/AP-1 et calcineurine/NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells) sont des cibles de la modulation des protéines G par la polycystine-1 (Parnell *et al*, 2002; Puri *et al*, 2004).

Deuxièmement, le domaine extracellulaire de la polycystine-1 possède un site de clivage des récepteurs couplés aux protéines G (GPS) homologues à la famille B des récepteurs à sept domaines transmembranaires possédant un long domaine N-terminal (LNB-TM7). Le clivage de la polycystine-1 à ce site est nécessaire à sa fonction normale (Qian *et al*, 2002). In vivo, l'expression d'une protéine non-clivable dû à la mutation du site GPS entraîne une kystogénèse rénale (Yu *et al*, 2007).

Troisièmement, la polycystine est capable d'interagir avec un régulateur de la signalisation des protéines G (RGS). Les protéines RGS régulent l'activité GTPase des sous-unités  $G\alpha$ . Elles sont normalement dégradées rapidement bien qu'une étude démontre la stabilisation de la protéine RGS7 par le motif intracellulaire de la polycystine-1. Cette interaction nécessite la présence du motif coiled-coil (Kim *et al*, 1999a).

Enfin, des homologues de la polycystine-1, dont la polycystine-1L2, seraient aussi associées à la régulation des protéines G (Yuasa *et al*, 2004).

### **Le cycle cellulaire**

L'épithélium kystique possède des niveaux de prolifération et d'apoptose anormaux ainsi qu'une élévation du taux de mitose cellulaire. Ces observations ont suggéré que la polycystine-1 avait un rôle de modulateur du cycle cellulaire. En fait, in-vitro, la polycystine-1 active la voie JAK-STAT, entraîne l'expression de p21<sup>waf1</sup> et bloque le cycle cellulaire en position G0/G1 (Bhunja *et al*, 2002). Ce mécanisme dépend de l'intégrité du complexe PC1/2 puisque des mutations affectant l'interaction entre ces partenaires inhibent ce processus. La diminution de l'expression de *PKD1* par interférence par des petits oligonucléotides (siRNA) augmente le taux de prolifération et active la transition de la phase G1 à la phase S (Kim *et al*, 2004). Inversement, la surexpression d'une protéine de fusion comprenant le domaine intracellulaire de PC1 accroît le taux de calcium intracellulaire des cellules HEK293 et activerait la prolifération cellulaire via la dérégulation de p21<sup>waf1</sup> (Manzati *et al.*, 2005). Ces observations suggèrent que l'élévation et la diminution de l'expression de *PKD1* pourrait entraîner des phénotypes d'hyperprolifération.

De manière intéressante, la polycystine-2 interagit avec un membre de la famille HLH (Helix-Loop-Helix) nommé Id2 qui régule l'activité de l'inhibiteur de kinase cycline-dépendant p21<sup>waf1</sup>. L'utilisation d'interférence par siRNA contre Id2 corrige le phénotype d'hyperprolifération dans les cellules *Pkd1* mutantes (Li *et al*, 2005b). Une étude suggère p21 comme cible thérapeutique afin de prévenir la kystogenèse (Park *et al*, 2007).

### **Le transport ionique**

Plusieurs hypothèses suggèrent que la déficience du transport ionique serait en partie responsable de l'expansion des kystes chez PKRAD. Plusieurs équipes ont tenté de déterminer le rôle des polycystines dans le transport ionique. Ce domaine de recherche est actuellement controversé et démontre des résultats

contradictoires en fonction des techniques et des modèles cellulaires utilisés par les différents chercheurs.

Initialement, il a été démontré que les polycystine-1 et -2 forment un canal à cation non-sélectif capable de produire des courants  $\text{Ca}^{2+}$  (Hanaoka *et al*, 2000). L'activité était observée seulement en présence d'un complexe puisque individuellement, les polycystines étaient incapables de générer des courants. De plus, la phosphorylation de sites spécifiques du domaine intracellulaire de la polycystine-1 était important pour cette fonction (Vandorpe *et al*, 2001). Par la suite, une autre équipe a démontré que la polycystine-2 endogène localisant majoritairement au réticulum endoplasmique était capable de générer des courants  $\text{Ca}^{2+}$  indépendant de la présence de PC1 (Koulen *et al*, 2002). La mutation R742X affectant le motif C-terminal de PC2 entraînait une élévation de la quantité de polycystine-2 à la membrane plasmique et la perte de sélectivité pour les courants  $\text{Ca}^{2+}$  (Chen *et al*, 2001). Plus tard, une étude a apporté des évidences de l'activité de la polycystine-2 à la membrane plasmique sans toutefois exclure sa présence et sa fonction à la membrane du réticulum endoplasmique (Luo *et al*, 2003).

Dans le cas de la polycystine-1, elle agirait à titre de modulateur de l'activité et de la stabilité de la polycystine-2 (Xu *et al*, 2003). Plusieurs études démontrent que la polycystine-1 régule des mécanismes de signalisation du calcium sans toutefois mettre la polycystine-2 en évidence, suggérant l'influence de la polycystine-1 sur plusieurs types de canaux (Aguari *et al*, 2008; Babich *et al*, 2004; Nauli *et al*, 2008; Xu *et al*, 2007).

## Les études murines

### Modèles murins de kystogénèse rénale

Les modèles animaux permettent d'étudier les maladies génétiques humaines rapidement et efficacement dans le but de découvrir les mécanismes moléculaires qui les causent et d'établir leurs cibles thérapeutiques. Bien avant l'apparition des techniques modernes permettant les modifications génétiques des organismes modèles, les chercheurs avaient recours à un nombre restreint de techniques pour générer des modèles. Les premiers modèles utilisés pour étudier les maladies polykystiques des reins étaient soit spontanés ou générés par induction chimique.

### Modèles spontanés et induits

Plusieurs modèles murins spontanés reproduisent des kystes rénaux similaires aux pathologies PKRAD, ARPKD ou NPHP. De manière intéressante, la majorité de ces modèles possèdent des mutations qui n'affectent pas *Pkd1* et *Pkd2*. Ils ont aussi la particularité commune d'affecter des protéines localisées dans le cil primaire.

#### Tableau 1.5:

#### Les modèles spontanés et induits de polykystose rénale.

Modèles	Types de mutation	Gène	Protéine	Néphropathie associée	Références
Cpk	Spontanée	Cpk	Cystine	ARPKD	1
Pcy	Spontanée	Nphp-3	Néphrocystine-3	NPHP	2
Bpk	Spontanée	Bicc1	Bicc1	ARPKD	3
Kat	Spontanée	Nek1	NEK1	ADPKD	4
Jck	Spontanée	Nek8	NEK8	ADPKD	5
Jcpk	Induit	Bicc1	Bicc1	ARPKD	3

**LÉGENDE** : Liste des modèles spontanés et induits de polykystose rénale.

**Références** : 1-(Hou *et al*, 2002) 2-(Olbrich *et al*, 2003) 3-(Cogswell *et al*, 2003) 4-(Upadhyia *et al*, 2000) 5-(Smith *et al*, 2006).

D'autre part, des agents chimiques ont aussi permis de générer des modèles d'étude des kystes rénaux. La première technique consiste à induire des mutations génétiques aléatoires dans le génome à l'aide d'un agent chimique nommé N-Éthyl-N-Nitrosourée (ENU). Ces mutations, nommées "induites", sont irréversibles et transmises de génération en génération. La souris Jcpk fut obtenu de cette façon (Cogswell *et al*, 2003). Étonnamment, la mutation affectant les souris Jcpk affecte le même gène que le modèle spontané Bpk. La deuxième technique consiste à administrer des glucocorticoïdes comme l'acétate méthylprednisolone, la diphénylamine et l'hydrocortisone. Ces agents entraînent la formation de kystes dans les systèmes de culture cellulaire ou in-vivo (Avner *et al*, 1984; Evan and Gardner, 1976; Ojeda *et al*, 1986). De façon importante, les mutants "chimiques" ne sont pas affectés au niveau génétique. Les descendants doivent être réexposés aux glucocorticoïdes pour induire à nouveau les kystes.

Il est aussi possible de générer une néphropathie obstructive pour étudier les maladies rénales sans modifier le contexte génétique du modèle d'étude. L'obstruction urétérale unilatérale par chirurgie est une méthode efficace pour induire la prolifération, l'apoptose ainsi que la fibrose rénale (Rodriguez-Pena *et al*, 2008). Elle a l'avantage de générer un rein affecté et un rein contrôle dans le même organisme expérimental.

#### *La prolifération et l'apoptose*

L'importance des mécanismes de prolifération et d'apoptose dans le développement de la PKRAD chez l'humain est soutenue par une littérature abondante utilisant plusieurs modèles murins. Par exemple, il est démontré que la surexpression d'une forme oncogénique, ou constitutivement active, de la  $\beta$ -caténine reproduit le phénotype PKRAD dans les souris (Saadi-Kheddouci *et al*, 2001). Les kystes affectent tous les segments du néphron et présentent des niveaux de prolifération et d'apoptose de 3 à 5 fois plus élevés que la normale. Un

second modèle surexprimant l'oncogène *c-myc*, une cible de la  $\beta$ -caténine, génère la formation de kystes rénaux et d'hyperplasie (Trudel *et al*, 1998). Les souris transgéniques exprimant la *prothymosine-T*, régulée par *c-myc*, ont des reins polykystiques, des taux anormaux de prolifération et surexpriment le récepteur EGFr (Li *et al*, 2005a).

De manière intéressante, l'expression du récepteur EGFr est augmentée dans les souris cpk (Orellana *et al*, 1995). La localisation anormale du récepteur et la sécrétion d'EGF dans les kystes rénaux de divers modèles murins supportent les observations faites chez l'humain (Jiang *et al*, 2006; Okada *et al*, 2008; Ricker *et al*, 2000). L'accumulation des évidences suggérant un rôle d'EGF/EGFr dans la croissance des kystes a mené à l'essai de thérapies chez la souris. L'inhibition d'EGFr démontre un potentiel thérapeutique pour diminuer la progression des kystes chez les rat Han:SPRD, les souris Bpk et orpk/waved-2 (Richards *et al*, 1998; Sweeney *et al*, 2003; Torres *et al*, 2003).

Plusieurs autres modèles murins ciblant des gènes associés à la prolifération, à l'apoptose, au cycle cellulaire et à la différenciation entraînent des maladies polykystiques des reins. Ces gènes sont cités dans le tableau 1.6.

**Tableau 1.6:**  
**Les modèles transgéniques de polykystose rénale.**

Gènes	Fonctions	Phénotype rénal	Références
$\beta$ -caténine	Adhésion cellulaire	ADPKD kystes	1
c-myc	Oncogène	ADPKD kystes	2
ProT	Cycle cellulaire	ADPKD kystes	3
v-src	Oncogène	?	4
SV40	Oncogène	ADPKD? kystes, hyperplasie	5, 6
HrasT24	Oncogène	ADPKD? kystes, hyperplasie	7
c-erbB2	Oncogène	ADPKD? hyperplasie	8
TGF- $\alpha$	FC	ADPKD kystes	9
KGF	FC	ARPKD? kystes, hyperplasie	10
HGF	FC	ADPKD? kystes, hyperplasie	11
ALK3	Récepteur de FC	ARPKD? kystes, hyperplasie	12
Pax-2	FT	SNC	13
Cux-1	FT	ADPKD kystes	14
HNF-1 $\beta$	FT	ARPKD? kystes, hyperplasie	15
ET-1	Prolifération	ADPKD? Kystes	16, 17
MAL	Protéolipide	ADPKD? Kystes	18

**LÉGENDE** : Modèles transgéniques qui développent des kystes rénaux.

**Abréviations** : ProT; Prothymosine- $\alpha$ , TGF-  $\alpha$ ; Transforming Growth Factor alpha, KGF; Keratinocyte Growth Factor, HGF; Hepatocyte Growth Factor, ALK3; Activin-Like Kinase 3, HNF-1 $\beta$ ; Hepatocyte Nuclear Factor-1beta, ET-1; Endothelin-1, MAL; Myelin And Lymphocyte protein, FC ; Facteur de Croissance, FT ; Facteur de Transcription, SNC; Syndrome Néphrotique Congénital.

**Références** : 1-(Saadi-Kheddouci *et al*, 2001) 2-(Trudel *et al*, 1991) 3-(Li *et al*, 2005a) 4-(Boulter *et al*, 1992) 5-(MacKay *et al*, 1987) 6-(Kelley *et al*, 1991) 7-(Schaffner *et al*, 1993) 8-(Stocklin *et al*, 1993) 9-(Lowden *et al*, 1994) 10-(Nguyen *et al*, 1996) 11-(Takayama *et al*, 1997) 12-(Hu *et al*, 2003) 13-(Dressler *et al*, 1993) 14-(Cadieux *et al*, 2008) 15-(Hiesberger *et al*, 2005) 16-(Shindo *et al*, 2002) 17-(Hoche *et al*, 1997) 18-(Frank *et al*, 2000).

### *L'hypothèse des ciliopathies*

Les ciliopathies englobent une panoplie de pathologies qui ont en commun des anomalies de formation, de structure ou de fonction du cil primaire. Elles étaient initialement associées aux problèmes respiratoires bien que les anomalies ciliaires ne soient pas spécifiques à l'épithélium pulmonaire. En effet, la littérature rapporte une liste impressionnante de ciliopathies rénales, pancréatiques et osseuses pour ne nommer que ceux-là (Afzelius, 2004; Cano *et al*, 2006; Gorivodsky *et al*, 2009; Kolb and Nauli, 2008; Xiao *et al*, 2006).

La première évidence suggérant l'importance des cils primaires dans les maladies polykystiques des reins a été apporté par le modèle orpk (Murcia *et al*, 2000). Ces souris possèdent une mutation affectant le gène *Tg737* qui encode Polaris, une protéine structurelle du cil primaire. Le modèle murin d'ablation génique de Polaris ne possède pas de cil et développe des kystes rénaux. De façon similaire, l'inactivation spécifique au rein d'une protéine de transport ciliaire, la sous-unité Kif3a, entraîne un phénotype rénal (Lin *et al*, 2003). Ces observations suggéraient que l'inhibition de la ciliogenèse par le manque de protéine structurelle ou l'inactivation du transport intraflagellaire était responsable de la kystogenèse rénale. Étonnamment, les polycystine-1 et -2 qui cause la PKRAD localisent toutes deux dans le cil primaire suggérant la participation du complexe à la fonction ciliaire (Yoder *et al*, 2002). In vitro, l'absence de polycystine-1 dans le cil affecte la réponse aux stress circulatoires des cellules rénales qui ne produisent plus de courant  $Ca^{2+}$  (Nauli *et al*, 2003). De manière intéressante, l'ablation génique de *Pkd1* génère des cils de longueur normale ou plus courte que les souris non transgéniques.

Certains affirment que les ciliopathies s'ajoutent simplement à la liste d'anomalies associées à la PKRAD comme la prolifération, l'apoptose, la différenciation, la sécrétion, la polarité et l'adhésion cellulaire, les anomalies de la membrane basale et le transport ionique. Toutefois, l'importance du cil primaire dans les maladies rénales a récemment retenu l'attention puisque la plupart des protéines impliquées chez PKRAD, PKRAR, Bardet-Biedel, le syndrome de Meckel et dans les NHPH localisent aussi au niveau du cil primaire, des centrioles ou des corps basaux (Hildebrandt *et al*, 2007; Yoder, 2007).

**Tableau 1.7:**  
**Les modèles PKD associés aux ciliopathies.**

Gènes	Protéines	Localisation	Fonction	Phénotype rénal	Autres phénotype
Kif3a	Kif3a	Cil primaire	Transport intraflagellaire	Kystes rénaux	SI
Tg737	Polaris	Cil primaire, CB	Complexe/Transport	Kystes rénaux	Hydrocéphalie, SI
hippi	Ift57	Cil primaire	Complexe/Transport	Kystes rénaux	Hydrocéphalie, SI
PKD1	Polycystine-1	Cil primaire, CB	Récepteur protéine G	Kystes rénaux	FH
PKD2	Polycystine-2	Cil primaire	Canal Ca <sup>2+</sup>	Kystes rénaux	SI
PKHD1	Fibrocystine	Cil primaire, CB	?	Kystes rénaux	FH
Cys1	Cystine	Cil primaire, CB	?	Kystes rénaux	
Nphp1	Néphrocystine-1	Cil primaire, CB, C	?	Kystes rénaux	FH
Nphp2	Inveersine	Cil primaire, CB, C	?	Kystes rénaux	SI
Nphp3	Néphrocystine-3	Cil primaire, CB, C	?	Kystes rénaux	
Nphp4	Néphrorétinine	Cil primaire, CB	?	Kystes rénaux	RP
Nphp5	Néphrocystine-5	Cil primaire	?	Kystes rénaux	RP
Nphp6	Néphrocystine-6	C	?	Kystes rénaux	RP
Nek1	Nek1	Cil primaire, CB, C	Kinase	Kystes rénaux	
Nek8	Nek8	Cil primaire	Kinase	Kystes rénaux	
Bbs1-Bbs11	Bbs1-Bbs11	CB, C	Transport intraflagellaire	Kystes rénaux	SI, Diabète
Alms1	Alms1	Cil primaire, C	?		Diabète
Ofd1	Ofd1	CB	Transport intraflagellaire	Kystes rénaux	
Mks1, Mks3	Mks1, Mks3	?	?	Kystes rénaux	

**LÉGENDE :** Liste des gènes associés à des néphropathies dont l'expression est localisée au niveau du cil primaire des cellules épithéliales rénales.

**Abréviations :** C; Centrosome, CB; Corps Basaux, SI; Situs Inversus, RP; Retinis Pigmentosa, FH; Fibrose Hépatique.

**Références :** Adapté de (Bisgrove *et al*, 2006).

### *La polarité cellulaire planaire*

Le rôle de la polarité apico-basale des cellules épithéliales rénales dans le développement des maladies polykystiques a été abordé précédemment. En plus de la polarité cellulaire, il existe une polarité tissulaire permettant aux cellules de s'orienter et de générer des tissus complexes tels que les tubules rénaux. Cette polarité tissulaire, nommée polarité cellulaire planaire (PCP), correspond à la propriété d'une cellule possède pour se diviser dans un axe perpendiculaire à l'axe apico-basal. Par exemple, la PCP permet l'allongement des tubules rénaux plutôt que leur élargissement.

De manière intéressante, le développement normal des tubules nécessite deux mécanismes; les mouvements d'extension convergent et la division cellulaire polarisée (Simons and Mlodzik, 2008). Plusieurs études rapportent que ces mécanismes sont contrôlés par la PCP (Baena-Lopez *et al*, 2005; Gong *et al*, 2004; Keller, 2002). Plus spécifiquement, une équipe a déterminé que l'orientation de l'axe du fuseau mitotique des cellules rénales en division était critique à la formation de tubules de diamètre normal. Inversement, ils ont observé une distribution aléatoire de cet axe dans les tissus kystiques (Fischer *et al*, 2006). De nouvelles études suggèrent aussi le rôle du cil primaire dans l'établissement de la PCP et associent la PCP aux maladies polykystiques des reins (Patel *et al*, 2008).

### *Les gènes modificateurs*

Les gènes modificateurs ne causent pas de maladies mais peuvent influencer de façon significative leur progression. La variabilité des phénotypes intra et inter familial observée chez les patients PKRAD suggère l'influence du fond

génétique et l'effet de gènes modificateurs dans cette pathologie. Plusieurs groupes ont tenté de déterminer la présence et l'impact de différents gènes modificateurs dans les modèles murins PKD. Les résultats obtenus jusqu'à maintenant sont énumérés dans le tableau 1.8.

Un gène modificateur hypothétique, nommé *Cux-1*, représente un membre de la famille « homeobox » connu pour son rôle dans la régulation du cycle cellulaire. Il est un répresseur de l'inhibiteur de la cycline kinase p21 (Coqueret *et al*, 1998). De plus, il inhibe l'expression de *p27* et entraîne un phénotype hyperplasique dans plusieurs organes de manière similaire au modèle d'ablation conditionnel de *p27* (Ledford *et al*, 2002). De manière intéressante, *Cux-1* est exprimée de façon ectopique dans les reins polykystiques des souris cpk. Il est exprimé dans la zone néphrogénique, les tubules en maturation et les cellules bordant les kystes des souris *Pkd1*<sup>-/-</sup>, soutenant un rôle de *Cux-1* dans la prolifération (Sharma *et al*, 2005). Son expression qui est normalement diminuée chez l'adulte est même réactivée dans les cellules bordant les kystes. Tout comme *Cux-1*, *Pkd1* module aussi l'expression de p21 (Bhunja *et al*, 2002). Étonnamment, les souris transgéniques surexprimant *Cux-1* ne développent pas de kystes rénaux.

**Tableau 1.8:**  
**Étude des gènes modificateurs chez la souris.**

Modèles murins	Gènes	Position du loci modificateur	Références
Kat2J	Bcl2	Chromosome 1	1
	?	Chromosome 10	1
	?	Chromosome 14	1
	?	Chromosome 19	1
bpk	RGS7?	Chromosome 1	2
	$\beta$ 3-laminine	Chromosome 1	2
	TGF- $\beta$ 2	Chromosome 1	2
Pkd1+/- ; Pkd2+/-	Pkd2	Chromosome 5	3
Krd	Pax-2	Chromosome 19	3
Pcy	?	Chromosome 4	4
	?	Chromosome 16	4
cpk		Chromosome 4	4
jck	?	Chromosome 1	5
	?	Chromosome 10	5

**LÉGENDE :** Liste des loci associés à un phénotype rénal précoce ou plus sévère chez différents modèles murins. Certaines des régions chromosomiques ciblées couvrent des gènes reconnus pour induire la formation de kystes dont *Pkd2*, *TGF* et *Pax-2*.

**Références :** 1-(Upadhyia *et al*, 1999) 2-(Guay-Woodford *et al*, 2000) 3-(Wu, 2001) 4-(Woo *et al*, 1997) 5-(Iakoubova *et al*, 1995).

### **Orthologues murin de *PKD1* et *PKD2***

Les modèles murins spontanés et induits n'affectent pas les gènes associés à la PKRAD et ne reproduisent pas exactement le phénotype humain. Pour caractériser la pathogenèse causée par les gènes *PKD1* et *PKD2*, les orthologues murins nommés *Pkd1* et *Pkd2* ont été clonés.

#### *Structure de Pkd1 et Pkd2*

Les souris possèdent une seule copie du gène *Pkd1* localisée sur le chromosome 17 (Olsson *et al*, 1996). De manière similaire à l'humain, *Pkd1* est située en position queue à queue avec le gène *Tsc2*. La séquence codante conserve ~ 79% d'homologie avec *PKD1* (Lohning *et al*, 1997). La différence majeure qui existe entre les deux gènes est l'absence de régions polypurines-polypyrimidines dans les introns 21 et 22 de *Pkd1* (Piontek and Germino, 1999). Les protéines encodés par *Pkd1* et *PKD1* possèdent aussi 79% d'homologie (Lohning *et al*, 1997). Tous les motifs protéiques présents dans la protéine humaine se retrouvent dans la protéine murine.

Le gène *Pkd2* est localisé sur le chromosome 5. La polycystine-2 murine possède 98% d'homologie avec la protéine humaine et une identité de séquence de 91% (Wu *et al*, 1998). Cette différence s'explique par la perte d'un site de phosphorylation et de N-glycosylation à l'extrémité de la section C-terminale. Il est rapporté que ces motifs ne sont pas importants à la fonction de la protéine humaine.

#### *Expression et localisation cellulaire de Pkd1 et Pkd2*

Le profil d'expression de *Pkd1* et *Pkd2* est similaire à celui décrit pour l'humain. Les études d'hybridation in-situ démontrent l'expression de *Pkd1* dans plusieurs tissus comme le rein, le cerveau, le foie et le pancréas. Comme chez l'humain, l'expression de *Pkd1* est régulée de manière temporelle, suggérant une implication développementale particulière dans le rein (Guillaume *et al*, 1999). Au cours de la néphrogenèse, *Pkd1* est exprimé de façon égale dans tous les segments du néphron alors que *Pkd2* est plus intense dans les tubules corticaux. Ce profil est aussi observé au niveau protéique (Griffin *et al*, 1997; Markowitz *et al*, 1999). Chez l'adulte, l'expression de *Pkd1* diminue significativement dans tous les segments alors que *Pkd2* reste élevé dans l'épithélium tubulaire (Guillaume and Trudel, 2000).

### **Les modèles d'ablation génique**

Plusieurs modèles d'ablation génique *Pkd1* ont été produits. Ces modèles démontrent des niveaux d'expression variables de *Pkd1* allant de la perte complète d'expression jusqu'à l'expression faible d'une quantité de protéines tronquées. Conséquemment, le phénotype des différents modèles murins varie légèrement. De manière générale, les souris homozygotes mutantes meurent entre le jour embryonnaire 12.5 et la naissance. Les souris démontrent des kystes pancréatiques et rénaux, des hémorragies et de l'œdème. Les causes exactes de la létalité embryonnaire ne sont pas connues. Les kystes pancréatiques massifs se développent avant la formation de kystes rénaux et proviennent de l'épithélium des canaux pancréatiques (Lu *et al*, 1997). Des anomalies squelettiques sont rapportées dans certains modèles (Boulter *et al*, 2001; Lu *et al*, 2001). De manière intéressante, aucun modèle d'ablation génique de *Pkd1* ne démontre la formation de kystes hépatiques (Tableau1.9).

L'ablation génique totale de *Pkd2* entraîne un phénotype similaire au modèle *Pkd1* (Wu *et al*, 2000). Elle entraîne la formation d'hémorragies, d'œdème ainsi que des kystes pancréatiques et rénaux. La formation des kystes rénaux débute au jour embryonnaire 15.5, soit après les étapes initiales d'induction des néphrons. Les modèles d'ablation génique de *Pkd1* et *Pkd2* suggèrent donc que les polycystines ont un rôle dans les étapes de maturation des tubules et plus tard dans le maintien de la structure tubulaire. En plus des anomalies rénales et vasculaires, l'ablation génique de *Pkd2* est associée à l'établissement aléatoire de l'assymétrie des organes internes (Left-Right Asymmetry). Le mécanisme par lequel la polycystine-2 contrôlerait la position des organes n'est pas connu mais certaines évidences supportent son rôle dans le cil primaire des cellules nodales (méchanosensation) et dans l'expression de gènes régulant l'asymétrie comme *Nodal*, *Lefty2* et *Pitx2c* (Mercola, 2003).

**Tableau 1.9:**  
**Les modèles d'ablation génique *Pkd1* et *Pkd2*.**

Modèle murin	Exons (insertion néo)	Léthalité embryonnaire	Kystes			Anomalies		Références
			Rein	Foie	Pancréas	Vaisseau sanguin	Os	
<b>Pkd1</b>								
Pkd1 <sup>null</sup>	1	E12.5	E15.5	-	E13.5	H, Oe	-	1
Pkd1 <sup>del2-4</sup>	2-4	?	E15.5	-	E15.5	H, Oe	?	2
Pkd1 <sup>-/-</sup>	2-6	E14.5	E15.5	-	-	H, HF	+	3
Pkd1 <sup>del2-6</sup>	2-7	E12.5	E15.5	-	-	H, Oe	?	4
Pkd1 <sup>null</sup>	4	E13.5	E15.5	-	E13.5	HF, Oe	+	5
Pkd1del17-21geo	17-21	E13.5	?	?	?	H, Oe	+	6
Pkd1del34	34	E18.5	E15.5	-	E13.5	-	+	7
Pkd1L/L	43-45	E14.5	E14.5	-	E14.5	H, Oe	-	8
Pkd1 <sup>del2-4/βgal-null</sup>	-	?	E15.5	-	E15.5	H, Oe	?	2
<b>Pkd2</b>								
Pkd2 (WS25)	1	non	1-3 mois	1-3 mois	?	-	-	9
Pkd2 (WS183)	1	E13.5	E15.5	-	E14.5	H, Oe	-	10
Pkd2-/LacZ	1	E12.5	-	-	-	?	-	11

**LÉGENDE :** Liste des modèles murins d'ablation génique des gènes *Pkd1* et *Pkd2*. Ce tableau démontre pour chaque modèle l'exon ciblé pour induire l'ablation génique, l'âge du décès du fœtus le plus jeune, l'âge d'apparition des kystes dans trois organes caractéristiques ainsi que la présence d'anomalies vasculaires et osseuses.

**Abréviations :** H; Hémorragies, Oe; Œdème, HF; anasarque foeto-placentaire (Hydrop foetalis)

**Références :** 1-(Wu *et al*, 2002) 2-(Piontek *et al*, 2004) 3-(Muto *et al*, 2002) 4-(Starremans *et al*, 2008) 5-(Lu *et al*, 2001) 6-(Boulter *et al*, 2001) 7-(Lu *et al*, 1997) 8-(Kim *et al*, 2000) 9-(Wu *et al*, 1998) 10-(Wu *et al*, 2000) 11-(Pennekamp *et al*, 2002).

### *Les modèles d'ablation génique partielle*

Il existe deux modèles d'ablation génique partielle de *Pkd1* (Jiang *et al*, 2006; Lantinga-van Leeuwen *et al*, 2004). Le premier modèle, nommée Pkd1<sup>nl/nl</sup>, exprime 13 à 20% des niveaux endogènes de *Pkd1*. La perte de plus de 80% des transcrits est due à un phénomène d'interférence de la transcription d'un allèle mutant possédant une cassette de sélection néo dans l'intron 1. De manière

aléatoire, cet allèle induit la lecture d'un codon stop prématuré et arrête la transcription. La diminution de l'expression dans les mutants homozygotes provoque un retard de croissance et un taux élevé de mortalité juvénile. Les souris  $Pkd1^{nl/nl}$  possèdent de nombreux kystes rénaux qui proviennent majoritairement des tubules distaux ou collecteurs. Quelques souris démontrent des kystes hépatiques et pancréatiques. Les hétérozygotes ne présentent pas de phénotype. Le second modèle,  $Pkd1^{L3}$ , possède aussi une cassette néo dans l'intron 34 affectant la transcription et la synthèse protéine. Les souris homozygotes démontrent une expression de *Pkd1* de 4 à 5 fois inférieure aux contrôles. Les souris  $Pkd1^{L3}$  développent des reins kystiques d'origine tubulaire et de la fibrose interstitielle.

L'ensemble de ces résultats démontre que l'expression d'un bas niveau de polycystine-1 permet d'échapper à la létalité embryonnaire causée par l'ablation génique totale mais reste toutefois insuffisant pour protéger les souris contre la formation de kystes.

#### *Les modèles d'ablation génique conditionnels*

Les modèles conditionnels d'inactivation ont permis de découvrir des fonctions de *Pkd1* qui ne pouvaient pas être observées dans les modèles d'ablation géniques dû à leur létalité embryonnaire. Les modèles conditionnels possèdent des séquences de recombinaison lox qui entraînent la perte d'une région d'un gène cible et son inactivation. Ces sites lox se recombinent seulement en présence de recombinaison, une enzyme dont l'expression peut-être contrôlée chimiquement ou génétiquement (Garcia-Otin and Guillou, 2006).

Quelques études utilisant cette approche ont démontré l'existence d'une période précise du développement durant laquelle l'expression de *Pkd1* dans le rein est essentielle. La délétion de *Pkd1* avant 13 jours (Post Partum P13) entraîne la formation de kystes sévères en moins de 3 semaines (Piontek *et al*, 2007). Par ailleurs, la délétion après 14 jours provoque seulement un faible phénotype rénal

plusieurs mois après l'inactivation (Lantinga-van Leeuwen *et al*, 2007; Takakura *et al*, 2008). Ces expériences démontrent que les conséquences de l'inactivation dépendent du moment précis du développement auquel elle est induite.

Par la suite, les approches conditionnelles ont permis d'étudier le rôle de *Pkd1* dans des tissus spécifiques. Par exemple, l'utilisation des *Wnt-1<sup>cre</sup>*, *Osx-1<sup>cre</sup>* et *Dermo<sup>cre</sup>* qui expriment la recombinaison dans les tissus osseux ont démontré le rôle de *Pkd1* dans la prolifération de cellules progénitrices osseuses (Kolpakova-Hart *et al*, 2008). Ces études suggèrent l'activation de la voie Erk1/2 dans un tissu extrarénal suite à l'inactivation de *Pkd1*.

### **Les modèles de surexpression de *Pkd1* et *Pkd2***

Il a été mentionné que la majorité des kystes rénaux humains expriment la polycystine-1 et de la polycystine-2 à des niveaux normaux ou élevés (Ong *et al*, 1999a). Afin de déterminer si cette élévation du taux d'expression peut entraîner la PKRAD, des modèles murins transgéniques ont été générés.

#### *Promoteur endogène Pkd1*

Les premières souris transgéniques *PKD1*, nommées TPK, ont été générées à partir du gène humain. La construction contient 20 kb de région 5' et 46 kb de région 3' contenant aussi la séquence entière du gène TSC2. Les deux lignées établies possèdent environ 30 copies du transgène. L'expression de *Pkd1* endogène dans les transgéniques ne semble pas affectée par la présence du transgène humain qui est exprimé de 2.5 à 14 fois plus. *PKD1* est exprimé de façon spatiale et temporelle aux différents stades de développement chez les TPK. Les analyses histologiques montrent que 40% des souris développent un phénotype kystique de nature glomérulaire majoritairement ainsi que des dilatations tubulaires. Des kystes hépatiques ont aussi été observés. Les auteurs suggèrent que le niveau d'expression serait important au développement de la pathogenèse puisque les souris qui ont un plus bas nombre de copies

(hétérozygotes) semblent démontrer un phénotype plus tardif (Pritchard *et al*, 2000).

#### *Promoteur rein-spécifique Pkd1*

Notre laboratoire a généré le premier modèle véritable de surexpression du gène murin *Pkd1* (Thivierge *et al*, 2006). Les souris SBPkd1<sub>TAG</sub> cible l'expression de *Pkd1* de manière rein-spécifique grâce au promoteur SB constitué de 2 séquences de l'activateur simian virus 40 liées à une région du promoteur de la  $\beta$ -globine (Trudel *et al*, 1991). Cette construction ne possède pas le gène *Tsc2* et permet l'évaluation de l'effet de la surexpression de *Pkd1* spécifiquement. Plusieurs lignées démontrent des niveaux d'expression de 2 à 15 fois supérieurs au niveau endogène. Toutes les souris adultes SBPkd1<sub>TAG</sub> présentent des kystes bilatéraux d'origine glomérulaire et tubulaire. Ce résultat démontre que la surexpression de *Pkd1* seul est suffisante pour induire la kystogénèse rénale.

#### *Les modèles de surexpression de Pkd2*

Les souris transgéniques *Pkd2* démontrent des phénotypes rénaux tardifs décrits comme des anomalies de la fonction tubulaire. Les souris âgées de plus de 12 mois démontrent une désorganisation du cortex rénal associé à un défaut de concentration de l'urine. Il est à noter qu'une seule lignée de souris possédant un faible nombre de copie a été étudiée (Burtey *et al*, 2008).

## **Les mécanismes pathogénétiques de PKRAD**

### **L'hypothèse du "two-hit"**

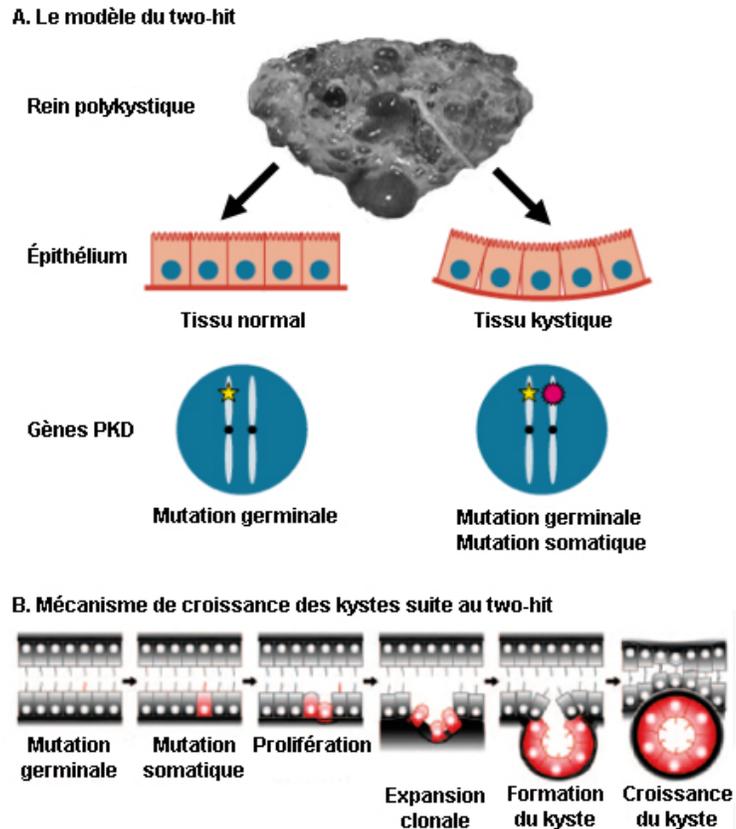
Une maladie à transmission dominante implique que tout individu recevant un gène parental mutant est destiné à développer une pathologie, malgré la présence d'une copie normale de ce gène. Conséquemment, il est logique de croire que l'ensemble des cellules de cet individu réagira de manière similaire à cette modification génétique. De façon surprenante, moins de 1% des néphrons

développent des kystes chez les patients PKRAD. Les cellules qui bordent les kystes seraient monoclonales indiquant que certaines d'entre elles pourraient avoir un avantage de croissance (Grantham, 1983; Loghman-Adham *et al*, 2003). Ces observations suggèrent un mécanisme similaire au modèle Knudson, appelé le "two-hit", qui affecte les gènes suppresseurs de tumeurs (Brasier and Henske, 1997; Qian and Germino, 1997b). Ce mécanisme implique qu'en plus de la mutation germinale, un événement somatique additionnel dans l'allèle normal restant survienne pour induire la kystogenèse (Grantham, 2008; Watnick *et al*, 1998).

Les cellules rénales sont sujettes à un haut taux de mutations somatiques, entre autres, à cause de leur métabolisme qui consomme beaucoup d'oxygène (Martin *et al*, 1996). Ces mutations somatiques auraient des effets ponctuels expliquant la nature focale des kystes observés. Des analyses génétiques supportent la perte d'hétérozygocité (LOH) et la présence de mutations somatiques dans les cellules épithéliales bordant certains kystes *PKD1* et *PKD2* (Badenas *et al*, 2000; Pei *et al*, 1999; Perez-Oller *et al*, 2000; Qian *et al*, 1996; Torra *et al*, 1999).

De manière intéressante, seulement 20 à 30% des kystes n'expriment plus de polycystines alors que la majeure partie des kystes démontre toujours un signal en immunohistochimie (Geng *et al*, 1996; Ong *et al*, 1999b; Torres, 1998; Ward *et al*, 1996). Il est suggéré que les mutations n'affectant pas le cadre de lecture expliqueraient cette observation bien que la nature des mutations humaines semble en désaccord avec cet argument.

**FIGURE 1.8 :**  
**Le mécanisme du two-hit.**



**LÉGENDE :** Le mécanisme du “two-hit”. (A) Le mécanisme du “two-hit” stipule qu’une mutation germinale ne serait pas suffisante pour induire un phénotype (à gauche) et que l’addition d’une mutation somatique sur le second allèle entraînerait un phénotype kystique (à droite). (B) Mécanisme de développement des kystes suite au “two hit”. On remarque que les cellules prolifèrent de façon clonale et que seulement quelques-unes sont affectées, justifiant la nature focale des kystes.

**Références :** Adapté de Nauli et al., 2006 et Yoder et al., 2006.

### **L'hypothèse du “third-hit”**

Les modèles d'ablation génique forment des kystes très tôt lors du développement, suggérant que le “two-hit” est nécessaire à la formation de kystes. Toutefois, les modèles d'ablation conditionnelle à promoteur inductible ont démontré que l'ablation génique de *Pkd1* dans un rein mature n'est pas associée à cette formation rapide de kystes. Cette nouvelle approche propose donc qu'une troisième atteinte, génétique ou environnementale, soit nécessaire à la prolifération et au mécanisme de progression des kystes (Takakura *et al*, 2008).

### **L'effet dosage**

La plupart des mutations humaines forment des polycystines tronquées, suggérant que la PKRAD soit générée par un phénomène d'haploinsuffisance (Badenas *et al*, 2000; Torra *et al*, 1999). De manière surprenante, certains kystes démontrent un niveau constant ou même supérieur de polycystine. Ces observations supportent un modèle de dosage qui stipule que toute variation du niveau d'expression des polycystines, augmentation ou diminution, soit suffisante pour entraîner la kystogenèse.

Plusieurs évidences suggèrent ce mécanisme dans la souris. Les modèles d'ablation génique de *Pkd1* hétérozygotes démontrent peu de kystes et survivent normalement comparativement aux homozygotes mutants qui meurent in utero avec des kystes rénaux massifs. Inversement, le modèle de surexpression de *PKD1* (TPK) démontre un phénotype plus faible chez les hétérozygotes que les homozygotes, suggérant que l'augmentation du niveau de *PKD1* accélère le phénotype (Pritchard *et al*, 2000). La variation observée dans le modèle TPK pourrait toutefois être due à la présence du gène *TSC2* qui est impliqué dans le développement de maladies rénales. Rappelons que ce gène est associé à la sclérose tubéreuse qui entraîne la formation de kystes rénaux chez 30% des patients (Stillwell *et al*, 1987). Notre laboratoire a généré le premier modèle

surexprimant *Pkd1* de manière rein spécifique et validé l'effet dosage à titre de mécanisme pathogénique de la PKRAD (Thivierge *et al*, 2006). En effet, les souris SBPkd1<sub>TAG</sub> reproduisent les kystes rénaux et la sévérité corrèle avec le nombre de copie du transgène.

De manière similaire, l'inactivation de *Pkd2* entraîne la kystogenèse. Le seul modèle de surexpression de *Pkd2* ne permet pas d'évaluer l'aspect dosage puisqu'une seule lignée a été établie avec un faible nombre de copie du transgène.

## Mon projet de maîtrise

### Le but

Afin d'éclaircir les mécanismes rénaux et extrarénaux de développement et de progression de kystes chez les patients PKRAD, nous avons généré un modèle murin de surexpression de *Pkd1*. D'autre part, nous avons aussi généré un second modèle murin surexprimant une protéine polycystine-1 mutante pour caractériser les voies de signalisation et les domaines importants à la transduction cellulaire.

### L'étude des phénotypes extrarénaux de la PKRAD

Les phénotypes extrarénaux sont des facteurs importants dans le développement et la progression de la PKRAD. En effet, le taux d'hospitalisation, d'interventions chirurgicales et de décès des patients PKRAD est fréquemment associé au développement d'anomalies extra rénales, par exemple, cardiaques, cérébrales, hépatiques et pancréatiques. Actuellement, aucun modèle animal ne reproduit l'ensemble des phénotypes PKRAD humains empêchant l'évaluation du rôle de *PKD1* dans le développement de ces anomalies. De plus, l'étude des mécanismes de kystogenèse s'effectue sur des modèles qui ne ciblent pas *PKD1* qui est, rappelons-le, responsable de 85% des cas cliniques. Pour ces raisons, nous avons généré un modèle murin de surexpression de *Pkd1* utilisant son promoteur endogène. Ce modèle permettra d'évaluer plusieurs aspects de la maladie qu'il est impossible d'étudier à l'aide des modèles actuels.

Nous avons déjà démontré que la surexpression de la polycystine-1 entraîne la polykystose rénale dans un modèle transgénique dirigeant l'expression d'un transgène *Pkd1* au rein (Thivierge *et al*, 2006). Les souris SBPkd1<sub>TAG</sub> développent des kystes en surexprimant *Pkd1* uniquement dans les reins. Ce modèle servira de contrôle pour comparer les phénotypes observés suite à la perte de fonction rénale causée par les kystes rénaux comparativement à ceux obtenus spécifiquement par la surexpression de *Pkd1* dans tous les organes.

### **Le motif coiled-coil, un domaine important pour la signalisation?**

Dans un second temps, nous avons généré un modèle de surexpression d'un allèle muté de *Pkd1*. Le transgène possède une délétion interne de 75 nucléotides et permet l'expression d'une polycystine-1 tronquée seulement de son motif coiled-coil. Ce modèle nous permettra d'obtenir des informations sur les mécanismes de signalisation et de transduction de la polycystine-1 in vivo pour plusieurs raisons.

Premièrement, le motif coiled-coil représente le site d'interaction entre la polycystine-1 et la polycystine-2 in-vitro. Plusieurs études suggèrent que cette liaison régulerait la fonction du canal calcique polycystine-2. Chez l'humain, une mutation qui affecte le motif coiled-coil cause la polykystose rénale.

Deuxièmement, le motif coiled-coil est un domaine d'interaction important à la fonction du domaine intracellulaire de PC1. In vitro, des constructions utilisant la partie intracellulaire de PC1 perdent leurs activités dans des essais fonctionnels en absence du motif coiled-coil. Ces études corréleront avec les analyses bioinformatiques qui décrivent l'existence de seulement trois sites consensus dans la courte queue cytoplasmique de PC1, dont un seul d'interaction protéine-protéine.

### **Hypothèse et approche expérimentale**

Notre première hypothèse propose que la surexpression de la polycystine-1 est suffisante à l'induction des phénotypes humains extrarénaux PKRAD chez la souris. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons généré un modèle transgénique surexprimant la polycystine-1 murine endogène (*Pkd1*<sub>TAG</sub>).

Notre seconde hypothèse énonce que le motif coiled-coil est un élément critique à la fonction de la polycystine-1. Pour répondre à cette hypothèse, nous avons généré un second modèle murin de surexpression d'une polycystine-1

tronquée du motif coiled-coil (Pkd1<sub>ΔCoiled-coil</sub>), mimant une mutation humaine qui affecte ce domaine.

## Contribution spécifique à l'article

Nom des auteurs: Olivier Côté, Almira Kurbegovic, Marie Trudel

Journal ciblé: Journal of Clinical Investigation

État actuel de l'article: En préparation

- Nature de ma participation à l'article: conception et exécution
  - J'ai travaillé à l'élaboration des figures de l'intégrité du transgène et de SDS-PAGE dans les souris Pkd1<sub>TAG</sub>
  - J'ai fait les analyses par Southern Blot pour déterminer le nombre de copies du transgène de chaque lignée
  - J'ai effectué les analyses d'expression par Northern Blot (Pkd1) ainsi que par Q-PCR (c-myc)
  - J'ai fait la dissection et les analyses histologiques subséquentes du rein, du foie, du cœur et du cerveau, dont :
    - Les coupes histologiques et les différentes colorations (HE, Sirius red, Von Kossa, Dahl's)
    - L'élaboration du triple marquage des tubules rénaux par immunofluorescence et la quantification des tubules rénaux
    - Les analyses pour déterminer le niveau de fibrose (rein et foie)
    - L'élaboration du protocole d'IHC avec le marqueur Ki67
    - L'analyse des dépôts calciques (rein et cœur)
    - L'élaboration du protocole et l'analyse des cils primaires rénaux
    - La préparation des échantillons pour la microscopie électronique
  - J'ai effectué la prise des échantillons et les analyses urinaires
  - J'ai fait la récolte des échantillons sanguins pour l'analyse du taux d'hématocrite et du phosphate
  - J'ai effectué des échocardiographies et participé à leurs analyses
  - J'ai développé la technique de visualisation par MicroFil et analysé les résultats (cœur et cerveau)
  - J'ai fait l'analyse des valeurs de pression sanguine
  - Finalement, j'ai effectué les croisements, le sevrage et l'analyse génotypique des trois lignées Pkd1<sub>TAG</sub> pour cette étude
- Nature de ma participation à la rédaction de l'article :
  - Réalisation des figures propres aux analyses mentionnées ci-haut
  - Rédaction des matériels et méthodes, légendes ainsi que collaboration et discussion pour la rédaction des autres sections de l'article
- Nature de ma participation aux résultats non-publiés (annexes) :
  - J'ai participé à la conception et l'exécution de tous les résultats non-publiés présentés en annexe

## **Article**

### **PKD1 TRANSGENIC MICE: ADULT MODEL OF POLYCYSTIC KIDNEY DISEASE WITH EXTRARENAL AND RENAL PHENOTYPES**

Olivier Côté<sup>1</sup>, Almira Kurbegovic<sup>1</sup>, Marie Trudel<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Molecular genetics and Development, Faculté de Médecine de l'Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

**Manuscript in preparation**

Keywords: Pkd pathogenesis, Pkd1, polycystic kidney disease transgenic models, hepatic cyst, cerebral aneurysm, renal cyst, cardiovascular

**ABSTRACT**

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is the most prevalent monogenetic disease caused by PKD1 gene mutations in 85% of patients. ADPKD pathogenetic mechanism is poorly understood. Interestingly, PKD1 expression is maintained or enhanced in affected tissues. Herein, we generated a transgenic approach to evaluate PKD1 enhanced expression as a pathogenetic mechanism of ADPKD. Several transgenic lines were generated from a Pkd1-BAC modified to introduce a silent tag by homologous recombination, to target a sustained wild type genomic Pkd1 expression within the native tissue and temporal regulation. These mice specifically overexpressed the Pkd1 transgene in extrarenal and renal tissues from ~2- to 15-fold over Pkd1 endogenous levels in a copy-dependent manner. All transgenic mice reproducibly developed tubular and glomerular cysts leading to renal insufficiency. Interestingly, Pkd1<sub>TAG</sub> mice also exhibited renal fibrosis and calcium deposits in papilla reminiscent of nephrolithiasis frequently observed in ADPKD. Similar to human ADPKD, these mice consistently displayed hepatic fibrosis and ~15% intrahepatic cysts of the bile ducts affecting females preferentially. Moreover, a significant proportion of mice developed cardiac anomalies with severe left ventricular hypertrophy, marked aortic arch distention and/or valvular stenosis and calcification. Of significance, Pkd1<sub>TAG</sub> mice displayed occasional cerebral lesions with evidence of ruptured and unruptured cerebral aneurysms. This Pkd1<sub>TAG</sub> mouse model demonstrates that overexpression of wildtype Pkd1 alone is sufficient to trigger the typical adult renal and extrarenal phenotypes resembling human ADPKD. Importantly, the focal nature of these phenotypes in our study as in human ADPKD, supports a pathogenetic mechanism that combines imbalance of Pkd1 dependent gene-dosage with an additional third stochastic factor.

## INTRODUCTION

Human autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is the most prevalent monogenic disease with an incidence of 1:400 to 1:1000 individuals. It is a multisystemic disorder characterized by numerous bilateral renal epithelial cysts affecting all segments of the nephron. Eventually, progression of these multiple cysts in kidneys leads to renal insufficiency and end-stage renal disease by late mid-age. Extrarenal clinical manifestations are also common with hepatic cysts being the most frequent and predominate in women. Among the non-cystic features are the cardiac and valve anomalies and, less frequently, intracranial aneurysms (1).

The majority of patients (85-90%) with ADPKD have a mutation in the PKD1 gene. The gene spans 54kb and encodes a very large protein of 4302 amino acids, polycystin-1. Polycystin-1 is a transmembrane protein that has a large N-terminal extracellular domain with a unique combination of motifs and was reported to undergo partial autocleavage at the G-protein coupled receptor proteolytic site (GPS) (2). Polycystin-1 has been implicated in signal transduction, in mechanosensation and in cell-cell/cell-matrix interactions. Human PKD1 and polycystin-1 expression have been analyzed in normal and ADPKD tissues. PKD1 and polycystin-1 are normally expressed in a wide range of adult tissues including epithelial and non-epithelial cell types (3-8). Interestingly, PKD1 expression is developmentally regulated, particularly in the kidneys. Polycystin-1 has highest levels in fetal life and is readily detected in glomerular and tubular epithelial cells (reviewed in (9) and reference therein). In normal adult kidneys, the RNA transcript and protein levels of polycystin-1 are decreased to lower levels, most notably in the collecting and distal tubules. By contrast, Pkd1 expression levels were increased (~2-fold) in

ADPKD kidneys (3, 10) and consistently, a persistent or enhanced level of polycystin-1 was detected in the majority of renal epithelial cysts (4).

Although ADPKD is a dominant disease, the focal nature of the renal cysts in ADPKD suggests that the mutational mechanism for PKD1 could be a two-hit or a loss of heterozygosity. This mechanism is supported by detection of PKD1 clonal somatic mutations in cells from a significant proportion of cysts (11-13). Moreover, loss of heterozygosity could account for the widely varying phenotype commonly observed in individual families. This mechanism would however be at variance with the persistent or enhanced expression of PKD1 seen in the majority of human renal cysts, unless a mechanism of gain-of-function/overexpression may also be operant.

The mouse *Pkd1* gene has very close similarities to the human PKD1 and may provide important insights into PKD1 function(s). During normal development, murine *Pkd1* is expressed at high levels from the morula stage and detected in all neural crest cell derivatives including adult brain, aortic arch, cartilage, and mesenchymal condensation (14, 15). Homozygous mutant mice targeted for *Pkd1* deletion have been reported to develop renal and pancreatic cysts (16-21). These attempts to generate mouse models, unfortunately, did not produce viable animals. Nevertheless, the occurrence of renal cysts in these homozygous *Pkd1* mutant mice would be consistent with the hypothesis of a two-hit mutational mechanism in humans that involves a germline mutation and somatic inactivation of the normal allele. This mechanism is also supported by conditional ablation of *Pkd1* in mice few days after birth (22) whereas, upon later ablation, additional stimuli appear necessary (23, 24). However, evidence of a mechanism of

haploinsufficiency or gene dosage reduction for cystogenesis was provided in mice homozygous for a Pkd1 hypomorphic allele or heterozygous for a Pkd1 deleted allele (25, 26). Moreover, Pkd1 gain of function may also be an additional mechanism for ADPKD pathogenesis as determined by the SBPkd1<sub>TAG</sub> mice with renal cystogenesis (27). These findings would support a gene dosage dependent mechanism for ADPKD where loss of heterozygosity, haploinsufficiency, and overexpression could trigger a renal phenotype and thereby provide an explanation of this disease's high prevalence in the population.

To interrogate Pkd1 increase dosage as a pathogenetic mechanism, Pkd1 in the native genomic context isolated from a murine BAC was targeted to transgenic mice. We generated three transgenic lines that expressed systemically Pkd1 gain-of-function at proportionally gene dosage levels in different tissues. These mice not only develop polycystic kidneys, renal failure but also all the prevalent extrarenal manifestations observed in ADPKD patients including liver cysts, cardiac and valvular anomalies as well as the dreadful complication of ruptured intracranial aneurysms. Our study reproduces the first orthologous ADPKD mouse model with the entire spectrum of adult extrarenal and renal phenotypes.

## MATERIALS AND METHODS

### *Constructs for homologous recombination of Pkd1-BAC clone*

A Pkd1-BAC clone in the bacterial host strain DH10B (RecA<sup>-</sup>; RecBC<sup>+</sup>) was isolated from a 129/Sv mouse pBelo11BAC library (Research Genetics) and was orthologous to the human PKD1 gene as described in (27). To modify the original wild-type Pkd1-BAC by homologous recombination, two constructs were produced in the pLD53.SC-AB BAC recombination vector (28). The first construct was carried out in order to introduce a silent point mutation by substitution of a G to A nucleotide as we did for SBPkd1<sub>TAG</sub> (27). This substitution created a new EcoRI restriction site in *Pkd1* exon 10 that distinguished the transgene from the endogenous gene/transcript. The second construct consisted in a ~34.5Kb deletion of the *Tsc2* gene body from the intron 2 to the penultimate exon 42. A recombination cassette containing two homology arms, the *Tsc2* promoter-intron 2 linked directly to *Tsc2* exon 42-exon 46 *Pkd1* was introduced in the BAC recombination vector. The first homology arm was obtained by PCR amplification of a 1116 bp fragment (*Tsc2* promoter-intron 2) with the primers: 5'-TCAGATGCTGCGGCCCGGGACGCA-3' (forward *Tsc2* promoter) and 5'-GGACAGCATGCCCTATGCAGATG (reverse intron 2) followed by a restriction enzyme digest SmaI-SpHI. The second arm was also generated from a PCR product of 1.2kb with the following primers: 5'-TTCAGCACATGCTCATGCC-3' (reverse *Tsc2* intron 40) and 5'-GCTGAAAATGGGCCCATTTGTTACC-3' (forward *Pkd1* exon 46) followed by a SpHI- BamHI restriction digest that produce 0.9Kb from *Tsc2* exon42 to exon46 Pkd1. Both these arms were introduced into the pLD53.SC-AB BAC recombination vector.

### *Modification of BAC clones by homologous recombination in E. coli*

Each of the two BAC recombination vectors was used in a two-step RecA strategy for BAC modifications, as previously described. Approximately 64 co-integrates were analyzed for each recombination by Southern blot to monitor for appropriate integration event. Two proper co-integrates were chosen for the second recombination event and positive clones from the resolved BACs were further analyzed by Southern following standard and PFGE by using seven probes spanning the entire sequence of the modified BAC. The probes were designed in (14, 27): a. genomic exon 1, b. genomic exon 2-3, c. genomic exon 7-15, d. cDNA exon 15-20, e. cDNA exon 25-34, f. cDNA exon 36-45, g. genomic exon 45-46. Subsequently, modified *Pkd1* gene regions were sequenced to confirm that the intended recombined BAC clones were achieved. Following these two modifications the BAC clone was referred as Pkd1<sub>TAG</sub>-BAC.

#### *Production and analysis of Pkd1<sub>TAG</sub>-BAC transgenic mice*

The Pkd1<sub>TAG</sub>-BAC (40-50 µg of DNA) was digested with the restriction enzymes MluI and NotI. The ~75kb transgene fragment was isolated on low melt agarose by PFGE. The Pkd1<sub>TAG</sub> linearized DNA fragment was purified as in (27). The fragment preparation was verified for integrity by PFGE and was microinjected as described (29). Transgenic founder mice and progenies were identified by Southern analysis of DNA from tail biopsies digested with HindIII, EcoRI and/or KpnI and respectively hybridized with the 7 mouse *Pkd1* probes to verify integrity of the transgene. The 5' transgene integrity was verified by a polymorphism at 4.47 kb of the murine *Pkd1* gene specific for 129/sv that can be distinguished from the C57BL/6J and CBA/J inbred strains that served to produce the transgenic mice. PCR amplification of genomic DNA from the polymorphic region was carried out with the primers: (forward) 5'-

CTGCACCCATGTCAGGTGTA-3' and (reverse) 5'-GTTCTAGGCCAGCCAACTC-3' and expected fragment for 129sv, C57Bl6/J and CBA/J are 100bp, 133bp and 113bp respectively.

#### *RNA expression analysis*

Total RNA was extracted from various tissues, including kidneys, lungs, spleen, brain, heart, pancreas and liver, of 4 to 9 month old animals using guanidium thiocyanate or trizol/chloroform method (30). The integrity of all RNA preparations was monitored by electrophoresis on formaldehyde-agarose gels prior analysis (31).

$Pkd1_{TAG}$  transgene expression in all tissues was analyzed by quantitative real-time PCR. All RNA samples were reversed transcribed as previously described (10). The primers used were as follows: 5'- TCAATTGCTCCGGCCGCTG- 3' (forward *Pkd1* exon 1) and 5'-CCAGCGTCTGAAGTAGGTTGTGGG-3' (reverse *Pkd1* exon 2) that detect endogenous and transgene. The S16 ribosomal gene product served as an internal control with the following primers: 5'-AGGAGCGATTTGCTGGTGTGGA-3' (forward S16 exon 3) and 5'-GCTACCAGGCCTTTGAGATGGA-3' (reverse S16 exon 4). Each pair of primers was designed such that only spliced mRNA would produce the predicted amplification products of 101bp for *Pkd1* total (endogenous gene and transgene) and 102bp for S16. All reactions for quantitative real-time PCR analysis were performed in triplicate in a master mix (Qiagen, Mississauga, Canada) using a MX4000 Mutiplex quantitative PCR analyser.

Expression analysis of *Pkd1* (endogenous gene and transgene) was also performed by Northern blot. Total RNA from each sample (30  $\mu$ g) was electrophoresed on an agarose/ formaldehyde

gel, transferred to nylon membranes and hybridized with g probe for *Pkd1* and with glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as internal control (14). Membranes were exposed to X-ray film (Biomax MS) for 24-48 hours, scanned and quantified with the Image Quant 5.0 software.

#### *Protein expression analysis*

Total protein extracts from multiple organs, kidney, lung, brain, liver, pancreas and heart, were produced in RIPA buffer (20mM Tris pH8; 2mM EDTA; 150mM NaCl; Triton 0.5%) supplemented by cocktail of inhibitors of proteases (1X, SIGMA) and PMSF (1mM). Protein concentration was estimated by Bradford assay (BioRad). Total protein extracts (40-80µg) was reduced in NuPAGE loading dye for 7min at 65°C and loaded on 4-12% NuPage Bis-Tris gel using 1X MES SDS Invitrogen migration buffer. Urinary proteins were prepared as described (32, 33). In brief, urine was supplemented with cocktail inhibitors, centrifuged to remove cell debris and supernatant was considered total urinary fraction (T). Total fraction was then centrifuged, the new supernatant is the S1 fraction and pellet resuspended for recentrifugation resulting in the non-clustered THP (S2) and the exosomes (Exo) in the pellet. Total urinary and S1 fractions (50ug) were precipitated by trichloroacetic acid and resuspended in loading dye. Exosomes were directly resuspended in loading dye with half the volume analyzed under the native form and the other following deglycosylation with 750U of PNGase (New England Biolabs). Proteins were transferred on PVDF membranes that were hybridized with mouse monoclonal antibodies, 7e12 against N-terminal of polycystin-1 (34) and secondary goat anti-mouse IgG (SIGMA) coupled to horseradish peroxidase or with mouse monoclonal antibody

gapdh from Abcam (Cambridge, MA) and revealed with Amersham ECL Advance Plus (GE HealthCare) on X-Omat films.

#### *Renal and Cardiac physiological function analysis*

The renal function was evaluated by analysis of mouse serum, obtained from centrifuged capillaries (2-3) of tail blood. Serum blood urea nitrogen (BUN) and creatinine were measured with a CX9 Beckmann apparatus. Urine samples were collected in metabolic cages for 24 hours with non-restricted water supply. Urine BUN, creatinine and ion concentrations were measured with a CX9 Beckmann apparatus whereas urine osmolality was determined with a radiometer. Aliquots of urine containing 25 µg of total protein were qualitatively analyzed on a 10 % SDS-PAGE and stained with Coomassie blue as described (35).

Cardiac dimension was monitored by echographic measurements in the M-mode using Vevo 660, (Visualsonics) and functional analysis carried out in the B-mode as in (36). Both analysis were performed with a probe transducer of 35MHz. Preheated ultrasound transmission gel (Aquasonic 100) was placed on heart region to provide acoustic coupling between the probe and the mice. Several parameters were measured from transgenic and control mice.

#### *Histologic, cellular and morphologic analysis*

Different tissues including kidneys, heart, pancreas, lung, liver, brain, spleen were analyzed from adult transgenic mice aged between 1 to 20 months. Four-µm-thick paraffin sections of paraformaldehyde or formalin-fixed tissues were deparaffinized and stained with hematoxylin

and eosin. Detection of calcium deposits were carried out with specific stains by Alizarin red or Von Kossa and fibrosis by Sirius red.

Cysts from renal tissue were immunostained to identify the origin of the nephron segment affected. Sections (4- $\mu$ m) were incubated with three primary antibodies  $\alpha$ -calbindin (Sigma) for collecting ducts, lycopersicon esculentum lectin (Vector Lab) for distal convoluted tubules and lotus tetragonolobus lectin linked to fluorescein (Vector Lab) for proximal tubules and then with secondary antibodies a goat  $\alpha$ -mouse IgG Alexa 255 (Invitrogen) and AMCA-streptavidin (Vector Lab). Slides were visualized with Axiovert S100TV microscope. Characterization of primary cilia in renal tissues was performed with  $\alpha$ -acetylated tubulin (Sigma) as primary antibody and goat  $\alpha$ -mouse IgG Alexa 255 (Invitrogen) as secondary antibody and slides were mounted with vectashield and DAPI.

Analysis of cellular c-myc expression and proliferation using Ki67 marker was performed by immunohistochemistry as in (37). Kidney and liver adult mice fixed tissues from transgenic and non-transgenic mice were incubated with rabbit c-myc (Upstate) or rabbit Ki67 (Novocastra) O/N at 4<sup>0</sup>C, then biotinylated secondary anti-rabbit antibody added and signal detected using Vectastain ABC kit (Vector laboratories, Inc) and diaminobenzinide. Proliferation rate was evaluated as the number of renal tubular cysts with 0, 1, 2, 3, 4 or more nuclei positive for Ki67 on multiple non-overlapping images ( $\geq 5$ ) using Axiophot (Zeiss) microscope.

Vasculature analysis was performed from anesthetized animals perfused intracardiac with paraformaldehyde and Microfil media (Flow Tech Inc, Mass). Fixation was carried out overnight; tissues collected were cleared with methyl salicylate and photograph with Nikon SMZ-U using Q-capture software.

#### *Statistical analysis*

Values were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. A 2-tailed unpaired Student's t-test was used for statistical analysis;  $p < 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

### *Production of Pkd1<sub>TAG</sub>-BAC by homologous recombination*

To investigate the role of *Pkd1* gain-of-function in renal and extrarenal tissues, we have used a genomic clone containing the entire *Pkd1* gene in a BAC vector 129/Sv library that we previously isolated (27). This BAC contains a ~121kb insert with ~37kb of upstream and ~39kb of downstream sequences of the *Pkd1* gene including the entire adjacent *Tsc2* gene. This Pkd1-BAC was modified by two successive homologous recombination events. First, the *Pkd1* gene was tagged in exon 10 by substituting a nucleotide (G to A) to create a novel EcoRI site at position 2355 on the cDNA map. This silent point mutation was produced to readily distinguish the *Pkd1* gene and transcript of the BAC from that of endogenous origin. Second, we have deleted the *Tsc2* gene of the Pkd1-BAC by ~34.5Kb to prevent introducing the *Tsc2* gene exogenously and to reduce BAC size (Figure 1S). This new Pkd1<sub>TAG</sub>-BAC was digested with MluI, a unique site located at ~24.8kb upstream of the *Pkd1* translation initiation site, and NotI site in the BAC polylinker sequences to remove the prokaryotic BAC vector sequences (Figure 1S). This ~75kb MluI-NotI fragment was isolated, purified and quantified for oocytes microinjection (29).

### *Production and analysis of Pkd1<sub>TAG</sub> transgenic mice*

Three transgenic founders carrying several copies (2 to 15) of the Pkd1<sub>TAG</sub> transgene as determined by Southern analysis, served to derive three transgenic lines. Characterization of the transgene chromosomal integrity in these lines was performed with 5', internal, and 3' probes (a to g) used for BAC analysis in Supplemental Figure 1. Transgene 5' UTR was monitored for presence of a specific polymorphism in the 129/Sv by a band at 100bp compared to the 113bp

and/or 133bp typical of the inbred strains used to produce these transgenic mice (Figure 1). To verify the transgene 3' end, a probe consisting of the *Pkd1* gene exon 45-46 was used to detect the endogenous 7.0kb *Pkd1* band as well as the transgene 5.0kb (Figure 1). These Pkd1<sub>TAG</sub> mice contained complete copies of the *Pkd1* transgene based on the genomic overlapping structure analysis.

#### *Pkd1* expression in adult Pkd1<sub>TAG</sub> transgenic mice

Analysis of Pkd1<sub>TAG</sub> transgene and *Pkd1* endogenous gene expression was carried out in several tissues. To first quantify the transcript levels from the transgene comparatively to the endogenous gene, Northern blots were performed on kidneys (n=4) of each transgenic line (Figure 2A). The transgene transcript size was identical to the endogenous transcript of 14.2kb. All Pkd1<sub>TAG</sub> transgenic mice showed systematically increased transcript *Pkd1* levels in kidneys relative to controls. In fact, Pkd1<sub>TAG</sub> transgene renal expression increased with the number of Pkd1<sub>TAG</sub> copies in each line compared to controls: line 6, 18, 26 displayed  $\sim 1.9 \pm 0.8$ ,  $6.0 \pm 0.9$  and  $17.9 \pm 1.9$  fold increase respectively.

Quantification of transgene expression levels was carried out by real-time PCR in the three transgenic lines at adult age, by using primers in the exon 1 and 2 of *Pkd1* (Figure 2B). The Pkd1<sub>TAG</sub> expression in transgenic mice was compared to S16 ribosomal protein gene product as internal standard. Analysis of *Pkd1* renal expression showed similar fold increase for transgenic kidneys as those obtained by Northern blot. Since endogenous *Pkd1* expression levels are modulated in various tissues, we quantified Pkd1<sub>TAG</sub> expression levels to determine whether the transgene followed the endogenous gene expression pattern. Transgene expression by real-time

PCR consistently and specifically showed highest expression in the brain of all transgenic lines relative to other organs (Figure 2B). The heart, lung, and brain displayed higher *Pkd1* levels than in the kidneys whereas the other organs including spleen, liver, and pancreas levels were lower. Interestingly, the three transgenic lines demonstrated within all tissues analyzed, a similar ratio of transgene to endogenous expression levels indicating that the *Pkd1*<sub>TAG</sub> transgene contained all the appropriate regulatory elements for tissue expression.

To monitor whether gene expression correlated with the levels of *Pkd1* protein or polycystin-1 (Pc-1), Western blot was performed on various tissues of the *Pkd1*<sub>TAG26</sub> line using the 7e12 Pc-1 monoclonal antibody and Gapdh as control. The *Pkd1*<sub>TAG26</sub> showed similar fold increase of Pc-1 for all extrarenal and renal tissues relative to non-transgenic control mice (Figure 2C). Subsequently, phenotype caused by transgene expression was characterized in the *Pkd1*<sub>TAG</sub> mice by gross and histology analysis of tissues frequently affected in human ADPKD.

#### *Renal anomalies in Pkd1*<sub>TAG</sub> mice

*Pkd1*<sub>TAG</sub> transgenic adult kidneys of all three lines were generally pale and exhibited bilateral cysts studding the cortical surface (not shown). Histologically, transgenic mice developed multiple microscopic and macroscopic cysts affecting cortex and medulla as well as glomerular cysts (Figure 3A-D). Cystic and even non-cystic tubules frequently displayed epithelial hyperplasia and hypertrophy and occasional presence of polyps with variable severity between mice. Hemorrhagic cysts consistent with some hematuria, proteinaceous casts in tubular cysts as well as interstitial fibrosis were commonly observed (Figure 3B). To evaluate levels of fibrosis, we quantified the density of Sirius red staining in *Pkd1*<sub>TAG</sub> kidneys (n=6) at 9.6±4.6% that was

significantly elevated compared to controls (n=5) at  $1.2 \pm 1.0\%$ . Further, partial and total sclerosis of glomeruli was detected in all three transgenic lines. To define more precisely the origin of the renal cysts, we used specific segment nephron markers of the proximal, distal, and collecting tubules. As shown in Figure 3C and D, cysts originated from all segments of the nephron with highest and similar proportion in proximal and collecting tubules ( $\sim 30\text{-}35\%$ ). A significant proportion of cysts ( $\sim 20\%$ ) were unstained, some of which with presence of mesangial tuft could be identified as glomerular of origin whereas others could be from undifferentiated tubular epithelial cells. Since we observed the presence of renal epithelial hyperplasia and polyps, we monitored cell proliferation with the nuclear antigen Ki67 marker by immunostaining (Figure 3 E, F). Proliferation was calculated as a percentage of tubules with 0, 1 or  $\geq 2$  Ki67-positive cells in the kidneys. In control animals,  $>92\%$  of tubules (n=941) had no Ki67-positive cells and 5.4% or 2.1% of tubules displayed 1 or  $\geq 2$  positive cells respectively. By contrast, the Pkd1<sub>TAG</sub> 26 line displayed 22.6% and 27.5% of cystic tubules with 1 or  $\geq 2$  Ki67 positive cells, a significant increase of 4 to 10-fold relative to controls ( $p < 0.01$ ). To determine whether c-myc expression correlated with the Pkd1<sub>TAG</sub> renal phenotype, c-myc level was analyzed by real-time PCR and immunohistochemistry. Expression of c-myc was increased by  $\sim 4.8$ -fold in the Pkd1<sub>TAG</sub> 26 mice (n=4) relative to controls (n=4) ( $\leq 0.02$ ). Consistently, renal sections of Pkd1<sub>TAG</sub> 26 mice also revealed diffusely elevated levels of c-myc relative to controls and frequently more pronounced nuclear staining in cystic epithelium (Figure 3 G, H).

Several Pkd1<sub>TAG</sub> mice (7/18) with highly invasive renal cysts also displayed calcium deposits that were mainly localized to the papilla, reminiscent of the renal calculi described frequently in ADPKD (38-40) (Figure 3J versus I). Since cilia anomalies have been associated with cyst

formation, cilia of renal epithelial cells were monitored by  $\alpha$ -acetylated tubulin staining in Pkd1<sub>TAG</sub> 26 line and control mice at few weeks of age prior to overt cystogenesis or dilatation (Figure 3K, L). Most strikingly, the cilia size distribution in all Pkd1<sub>TAG</sub> mice showed significantly longer cilia length relative to controls (Figure 3L). Indeed, most cilia of the Pkd1<sub>TAG</sub> mice (n=346) (Figure 3L) were >5 $\mu$ m whereas cilia in controls (n=266) (Figure 3K) were mainly 2-3 $\mu$ m in length. Cilia from Pkd1<sub>TAG</sub> renal epithelium were often of kinky structure and occasionally displayed 2 or multicilia by EM. These mice consistently developed PKD features pointing to the induced expression from the transgene as specifically responsible for the pathogenesis.

#### *Altered renal physiology in Pkd1<sub>TAG</sub> mice*

Renal function was monitored in the high expressor Pkd1<sub>TAG</sub> 26 transgenic line. Animals were monitored for urinary levels of blood urea nitrogen (BUN), creatinine, protein, and urine osmolality and volume (Table 1). In comparison to negative controls of same genetic background, the high expressors exhibited significant increase in urine volume with mild concentrating defects similar to the positive PKD controls SBM (29). Accordingly, urinary BUN, creatinine, and protein were significantly decreased. Mice from the Pkd1<sub>TAG</sub> 26 line were also monitored for hematocrit levels since patients with progressive renal insufficiency commonly develop anemia. Consistently, Pkd1<sub>TAG</sub> mice at 5 to 7 months of age displayed significantly reduced hematocrit levels (Table 1). Mice from the three transgenic Pkd1<sub>TAG</sub> lines were also analyzed qualitatively for proteinuria from urine samples on SDS-PAGE (Figure 4 A). Despite the reduced levels of protein in urine, Pkd1<sub>TAG</sub> animals appeared to display non-selective proteinuria that was most pronounced in the high transgene expressor. To determine whether Pc-

1 in  $Pkd1_{TAG}$  transgenic mice were present in urine, we prepared total crude protein from urine (T), urine devoided of exosome or uromodulin aggregates (supernatant 1, S1), the resuspended pellet was separated in two additional fractions the supernatant containing uromodulin (supernatant 2, S2) and urinary exosome following the protocol of (32, 33). Western analysis of total crude urinary protein with the LRR Pc-1 antibody (7e12) showed a similar pattern to that of total kidney extracts from native untreated (N) and deglycosylated (DG) samples (Figure 4B). While samples in the native form displayed two protein bands estimated by migration at ~360-380kDa and slightly above ~420kDa, in the deglycosylated form a unique product was detected corresponding to the lower band. Pc-1 was detected in three urine fractions (T, S1 and exosomes) whereas it appears absent in the supernatant (S2) for both control and transgenic mice. In exosomal pellet fraction, Pc-1 was present mainly in the glycosylated form, as observed in human ADPKD urinary exosomes (32). Interestingly, significant proportion of Pc-1 was also found in the S1 supernatant in both  $Pkd1_{TAG}$  transgenic mice and controls in both glycosylated and unglycosylated forms, suggesting that Pc-1 is likely excreted in the urine. Importantly, similar fold enrichment in Pc-1 was observed in  $Pkd1_{TAG}$  transgenic mice relative to controls in all three Pc-1 containing fractions, indicating that the Pc-1 from the transgene follow a normal physiological process.

#### *Hepatic anomalies in $Pkd1_{TAG}$ mice similar to PKD*

Since human ADPKD frequently developed biliary dysgenesis, we investigated whether enhanced  $Pkd1_{TAG}$  gene expression could induce hepatic abnormalities in mice. All three transgenic lines were analyzed histologically. Hepatic parenchyma appeared largely normal, however, some anomalies were detected in periportal region and in bile ducts. For both

transgenic 6 and 26 lines (low and high *Pkd1* expressors), presence of a broad band of fibrosis along the intrahepatic ducts was systematically observed and in some mice, fibrosis was widespread (Figure 5E, F). Quantification of fibrosis over the liver sections showed ~4- to 5-fold increased respectively for the *Pkd1*<sub>TAG</sub> 6 ( $9.8\pm 9.3\%$ ;  $n=10$ ;  $p\leq 0.02$ ) and 26 lines ( $11.1\pm 7.9\%$ ;  $n=12$ ;  $p<0.002$ ) compared to controls ( $1.9\pm 0.8\%$ ;  $n=10$ ). Noticeably from macroscopic liver examination, hepatic cysts could be detected in 5 of 34 *Pkd1*<sub>TAG</sub> transgenic mice from line 26 and in 1 of 32 from line 6 (Figure 5 A, B). Histologic analysis showed liver cysts likely cholangiocyte origin that ranged from mild to very severe (Figure 5C, D). Interestingly, these characteristic cystic features affected mainly female mice (4 out of 5) as in human ADPKD. To evaluate whether proliferation could be implicated in these hepatic cysts, liver sections were stained with Ki67. The epithelial linings of cysts were uniformly delineated by enhanced Ki67 staining and/or by strong nuclear staining (Figure 5G, H). These *Pkd1*<sub>TAG</sub> livers also displayed elevated c-myc expression in the cystic areas with more intense signal in cell lining the cysts (Figure 5I, J). In parallel to this increased proliferation and myc expression, presence of marked fibrosis was also noted in the region of liver cysts (not shown). Since the *Pkd1*<sub>TAG</sub> transgenic mice develop typical hepatic ADPKD characteristics, it is likely that *Pkd1* overexpression in the liver may be a pathogenetic mechanism.

#### *Cardiac anomalies in Pkd1<sub>TAG</sub> mice*

Because a proportion of ADPKD patients develop cardiac anomalies, we performed physiologic studies using non-invasive ultrasound imaging in *Pkd1*<sub>TAG</sub> relative to control mice (Figure 6A, B). The M-mode dimensions showed significantly increased left ventricular posterior wall at diastole and at systole indicating left ventricular hypertrophy (Table 2). The interventricular

septa were also increased. Further, the aortic root diameter and area were significantly increased in the *Pkd1*<sub>TAG</sub> mice showing important dilatation as described in ADPKD patients. At necropsies, gross heart anatomy of the *Pkd1*<sub>TAG</sub> mice showed consistent and extensive volume enlargement relative to that of negative control littermates (Figure 6C, D), providing evidence of cardiac hypertrophy. Hearts of *Pkd1*<sub>TAG</sub> relative to controls analyzed by Microfil casting that filled the entire body vasculature reproduce the organ shape, also showed significant alteration in the cardiac structure and morphology (Figure 6E, F). Substantial thinning of ventricular wall was readily detectable under different angles, confirming hypertrophy (Figure 6F vs E).

Functional analysis by echographic measurement consistently showed a marked increase in stroke volume as well as in the cardiac output by almost 2-fold in *Pkd1*<sub>TAG</sub> mice (Table 2). While the heart rates of *Pkd1*<sub>TAG</sub> and control mice were similar, cardiac valves displayed some anomalies in the *Pkd1*<sub>TAG</sub> mice (Table 2) (Figure 6 A, B). As shown in Table 2, the significant increase in mean and peak velocity downstream of the aortic valve suggested stenosis. This increased velocity measurement was consistent with the abnormal aortic valve leaflets detected by ultrasound imaging as opaque in some *Pkd1*<sub>TAG</sub> mice rather than delicate and translucent (Figure 6B). Upon heart sectioning, large areas within the ventricular lining exhibited change in pigmentation, indicative of ventricular lining calcification (Figure 6 G, H). To determine whether the valves opacity and ventricular lining anomalies resulted from calcium deposits, cardiac histologic sections were stained individually with Alizarin and VonKossa. Analysis revealed presence of calcification in 6 of the 15 aortic valves and 4 of which also had staining in ventricular lining (Figure 6 I, J). Furthermore, 3 of these 6 *Pkd1*<sub>TAG</sub> mice exhibited staining in cardiac muscles as well. Since observations of valvular, vascular, and muscle calcification in

individuals with chronic kidney disease has been associated with higher serum phosphate (41), we determined the levels of phosphate in serum of Pkd1<sub>TAG</sub> mice. Analogously to human, the Pkd1<sub>TAG</sub> mice (1.9±0.3 mmol/L; n=8) had significantly increased serum phosphate relative to controls (1.4±0.2 mmol/L; n=4), supporting the hypothesis that elevation in serum phosphate concentration may contribute to calcification risk and cardiovascular events.

#### *Vascular anomalies in Pkd1<sub>TAG</sub> mice*

To investigate whether adult Pkd1<sub>TAG</sub> mice exhibited altered cardiovascular response, we measured blood pressure in Pkd1<sub>TAG</sub> 26 and control mice of 6-7 months of age using the cuff method. Two groups of Pkd1<sub>TAG</sub> 26 mice were readily distinguishable. The first group (n=5) exhibited systolic blood pressure at 113.5±11.0 comparable to control mice (n=4) with a systolic blood pressure of 116.2± 3.1. The second group of Pkd1<sub>TAG</sub> 26 mice (n=3) had significantly increased blood pressure at 161.1±5.1 (p<0.001), indicating that these mice can progress to severe hypertension as in human ADPKD.

Upon signs of distress in three mice of Pkd1<sub>TAG</sub> 26 line, we macroscopically observed severe hemorrhage and likely intracranial edema. These mice at dissection did not show closure of the cranial bone at the sutura sagittalis but did have evidence of compressed adjacent structures of the cortex and cerebellum (Figure 7A and B). No control mice exhibited this phenotype. In the Pkd1<sub>TAG</sub> 26 mice, subdural hematomas were observed in different areas of the brain and were so severe in some cases that a significant portion of the brain was completely destroyed/obliterated. Further, the cerebellum of these Pkd1<sub>TAG</sub> 26 mice at histologic examination was reduced in size or constricted, providing evidence of prior compression of this region (Figure 7C, D). To

visualize and analyze the vasculature, we used Microfil casting to fill up and remodel the entire vasculature of Pkd1<sub>TAG</sub> 26 and control mice (Figure 7E, F). As illustrated in Figure 7F, Pkd1<sub>TAG</sub> displayed an unruptured cerebral aneurysm, the most dreadful complication of ADPKD.

#### *Lifespan in Pkd1<sub>TAG</sub> mice*

Lifespan of mice from the three transgenic Pkd1<sub>TAG</sub> lines was also quantified. Animals died at  $5.5 \pm 2.8$  months (n=18) for the high expressing Pkd1<sub>TAG</sub> 26 line presumably due at least in part to renal failure and at older age of  $16.7 \pm 5.5$  (n=9) and  $16.6 \pm 1.8$  months (n=12) for the lower expressors Pkd1<sub>TAG</sub> 18 and 6 lines respectively.

## DISCUSSION

This study reports generation and characterization of the first *Pkd1* mouse model of ADPKD that develops the typical renal and extrarenal pathologic spectrum. This model was produced by targeting a “wild type” full length *Pkd1* gene isolated from a BAC that produces a functional polycystin-1 (Pc-1) protein. Since this mouse model reproduces both the entire phenotypic spectrum and the similar frequency occurrence as in ADPKD, a systemic *Pkd1* gain-of-function is most likely a pathogenetic mechanism.

The three transgenic mouse *Pkd1*<sub>TAG</sub> lines generated showed a copy-number dependent expression of the full-length *Pkd1* transgene in all tissues. Further, the similar regulatory pattern of expression as the endogenous gene indicated that the transgene likely includes all the necessary transcriptional regulatory regions of the *Pkd1* gene. Consistently, the Pc-1 protein is also similarly overexpressed in these mice. Of importance, gene dosage or expression correlated with the progression of phenotypic severity.

The *Pkd1*<sub>TAG</sub> mice are the first model of dysregulated or mutated *Pkd1* gene that develop the typical multicystic “bosselated” cortical surface with tubular and glomerular cysts as in ADPKD. Renal insufficiency was detected by 5-6 months of age with altered renal osmolality and markedly decreased hematocrit. Severe cystogenesis with loss of renal function and increase kidney fibrosis by 8-fold are hallmarks of ADPKD renal pathology. In addition to frequent hemorrhagic cysts and hematuria, an incidence of 39% of *Pkd1*<sub>TAG</sub> mice with pronounced cystic disease displayed parenchymal calcium deposits in the papilla collecting system. This finding is highly reminiscent of the nephrolithiasis observed in 20-36% of patients with ADPKD (39, 40).

While the mechanism responsible for this association is unknown, the urinary concentration defect should in theory have a protective effect against nephrolithiasis but urinary stasis within the distorted anatomy and compressed tubules may predispose to calcium precipitation.

Of particular interest was the significantly longer primary cilia of renal epithelial cells in  $Pkd1_{TAG}$  prior to cyst appearances. This indicated that increased expression of normal functional Pc-1 protein might promote ciliogenesis. Since Pc-1 was localized to the cilia (42), this finding suggests that it can occur via a direct effect of Pc-1 overexpression as well as through indirect Pc-1 cellular effectors modulating proteins of the cilia and axoneme assembly. Since cilia anomalies preceded cystogenesis, it raises the question whether it is a prerequisite for cyst formation in  $Pkd1_{TAG}$  mice. In addition, the increased cilia length distribution also persisted during cystogenesis and this, in spite of significantly elevated renal epithelial proliferation ( $p < 0.01$ ). While defect in the primary cilia have been observed in other cystic diseases, most of cilia anomalies have been attributed to shorter or absence cilia (42-45) except for the *Nek8* and *p75/Cux-1* genes (46, 47).

The consistent increase in Pc-1 in equivalent proportion from crude urine to subfractionated exosomes of the  $Pkd1_{TAG}$  over control mice argues that Pc-1 in transgenic kidneys undergo the normal in vivo physiologic protein processing. The shed Pc-1 protein both glycosylated and unglycosylated in crude urine corresponded approximately in size to a N-terminal cleaved form of Pc-1 at the G protein-coupled receptor proteolytic site (GPS at aa 3041). Strikingly, similar size Pc-1 glycosylated and unglycosylated forms were free in urine itself whereas only the glycosylated form was detected in the exosome fraction. This finding is consistent with the

cleaved form of PC-1 present in human urinary exosomes (32, 48). While the role of Pc-1 in exosomes remains to be elucidated, we speculate that the increased frequency of interaction between free Pc-1, exosome and cilia in flow of Pkd1<sub>TAG</sub> mice could influence intercellular and intracellular signaling. Alternatively, exosomes if in close proximity of cilia as shown in vitro (32) could interact, fuse and consequently, induce longer cilia with profound impact on mechanosignaling and tubular integrity.

The spectrum of extrarenal phenotypes in the Pkd1<sub>TAG</sub> mice closely recapitulates that of human ADPKD.

Indeed, the high frequency of hepatic cysts in Pkd1<sub>TAG</sub> mice affecting mainly females is reminiscent of ADPKD. Cysts affecting intrahepatic bile ducts are consistent with the pattern of *Pkd1* expression (14, 16) and likely due to enhanced transgene expression in Pkd1<sub>TAG</sub> mice. The systematic increased fibrosis surrounding the biliary ducts in Pkd1<sub>TAG</sub> mice indicated that fibrosis precedes cyst formation. Furthermore, it also suggests that *Pkd1* overexpression interferes with the extracellular environment and results in active remodeling of the extracellular matrix. Such association of liver fibrosis and cyst development has also been observed when *Pkd1* gene dosage expression is reduced in a hypomorph (49). Regions of hepatic cysts and fibrosis were associated with elevated proliferation.

The concomitant features of fibrosis and cyst formation in the liver and in kidneys of Pkd1<sub>TAG</sub> mice correlated with substantial stimulation of proliferation. Such phenotypic similarities to the SBM transgenic mice produced by targeted c-myc expression prompted analysis of c-myc expression in liver and kidneys of Pkd1<sub>TAG</sub> mice. This study demonstrates that *Pkd1* overexpression activates c-myc in both tissues and with a higher signal in cysts. Hence, it is

likely a critical component of this signaling event. While the molecular mediators immediately downstream of *Pkd1* protein are not yet delineated, c-myc appears to play an important role in the signaling pathway cascade triggered by *Pkd1*.

Cardiovascular anomalies are the most prevalent non-cystic extrarenal manifestation of ADPKD and of *Pkd1*<sub>TAG</sub> mice. *Pkd1*<sub>TAG</sub> mice structural cardiac defects are consistent with the high transgene *Pkd1* expression level. We and others have shown high *Pkd1* expression in the aortic arch, valve leaflets, atrioventricular cushion, and low in myocardium (8, 14-16, 50). Accordingly, the generalized cardiac anomalies included frequent left ventricular hypertrophy, thinning of the myocardial wall associated with significantly increased aortic root dilatation in *Pkd1*<sub>TAG</sub>. In addition, the cardiac aortic and mitral valve anomalies, particularly stenosis and calcification revealed severe functional impact. In fact, signs of aortic valve regurgitation are suggested based on a compensatory mechanism of heart dilatation/cardiomegaly and increased cardiac output with similar heart rate. In parallel to these anomalies, systemic hypertension in *Pkd1*<sub>TAG</sub> mice could be responsible for the marked aortic insufficiency. However, the strong *Pkd1* expression in the aortic valve and root is likely to have a direct contributory role. Together, these cardiac and aortic anomalies with important complications are analogous to those of ADPKD patients (51, 52).

Probably the most devastating extrarenal manifestation in ADPKD is intracranial aneurysm. Given that *Pkd1* is expressed in endothelial cells and vascular smooth muscle (8, 53), the presence of cerebral aneurysms in *Pkd1*<sub>TAG</sub> was consistent with a primary defect in vascular structure. Similarly this Pc-1 expression may also be the cause of hypertension independently of

renal cystogenesis. Development of cerebral aneurysms in *Pkd1*<sub>TAG</sub> mice as in humans is asymptomatic and could be exacerbated by systemic hypertension. However, rupture of aneurysms was detected in few *Pkd1*<sub>TAG</sub> mice at one month of age upon very brief exposure, if any, of hypertension. Rupture of cerebral aneurysms was evident by presence of subarachnoid hemorrhage, focal brain ischemia and compression of adjacent structures as well as by morbidity.

Systemic gain-of-function of *Pkd1*<sub>TAG</sub> mice leads to abnormalities in various organs/tissues as well as in kidneys. Anomalies in a particular organ of *Pkd1*<sub>TAG</sub> mice likely result from direct expression of *Pkd1* in this organ per se. Evidence for this direct effect instead of a secondary consequence of renal defects, is provided by the renal-targeted *Pkd1* mice, SB*Pkd1*<sub>TAG</sub>, that essentially displays a restricted PKD renal disorder.

The mutational mechanism of ADPKD was initially proposed as a two-hit model for cyst formation and thereby could explain the focal nature of cyst and the disease variable severity. However, this mechanism is at variance with the continuing expression of *PKDI/PC-1* in the majority of ADPKD renal cysts (3-5, 10, 54-56), hepatic cysts (6, 34, 50), and cerebral aneurysms (53). A more inclusive model would be that *PKDI/PC-1* imbalance would be sufficient to elicit a cystic phenotype. This model is supported by the increase in disease severity correlating with the increase *Pkd1* gene dosage in *Pkd1*<sub>TAG</sub> and SB*Pkd1*<sub>TAG</sub> mice (27, 57) and reciprocally with the progressive decrease in expression from haploinsufficiency to hypomorphic *Pkd1* allele in mice (23, 25, 49, 58). In fact, both human ADPKD and murine *Pkd1* studies have provided evidence for, although opposite, gain-of-function as well as loss-of-function and

haploinsufficiency/dosage effect as pathogenetic mechanisms. Hence, an imbalance model mechanism would be compatible with a dominantly inherited mutation as seen in humans and could also explain the high prevalence of ADPKD in the population. Because of cysts focal nature in ADPKD, it suggests that expression imbalance would require additional mutational steps or stochastic factors/threshold levels to determine whether a cell will enter a cystic cascade and develop cystogenesis.

This study demonstrates that “wild type” full-length *Pkd1* gain-of-function in the mouse is sufficient to reproduce the ADPKD systemic clinical manifestations. Enhanced *Pkd1* gene expression recapitulates a physiologic bona fide murine ADPKD disorder with renal and extrarenal phenotypes. Thus, these transgenic mice may be instrumental for numerous studies including the design of novel therapeutic strategies to modulate in vivo progression of ADPKD.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank Dr. V. Gattone and the Indiana University School of Medicine EM center and to the generous support of that facility by the Polycystic Kidney Disease Foundation.

This work was funded by the Canadian Institute Health Research (CIHR) grant (MT) and the CIHR studentship (AK).

## REFERENCES

1. Chapman, A.B., Rubinstein, M.D., Hughes, R., Stears, J.C., Earnest, M.P., Johnson, A.M., Gabow, P.A., and Kaehny, W.D. 1992. Intracranial aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J of Med* 327:916-920.
2. Wei, W., Hackmann, K., Xu, H., Germino, G., and Qian, F. 2007. Characterization of cis-autoproteolysis of polycystin-1, the product of human polycystic kidney disease 1 gene. *J Biol Chem* 282:21729-21737.
3. Ward, C.J., Turley, H., Ong, A.C.M., Comley, M., Biddolph, S., Chetty, R., Ratcliffe, P.J., Gatter, 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 USA* 93:1524-1528.
4. Ong, A.C.M., Ward, C.J., Butler, R.J., Biddolph, S., Bowker, C., Torra, R., Pei, Y., and Harris, P.C. 1999. 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.
5. Geng, L., Segal, Y., Peissel, B., Deng, N., Pei, Y., Carone, F., Rennke, H.G., Glücksmann-Kuis, A.M., Schneider, M.C., Ericsson, M., et al. 1996. Identification and localization of polycystin, the PKD1 gene product. *J. Clin. Invest.* 98:2674-2682.
6. 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., et al. 1997. Polycystin: In vitro synthesis, in vivo tissue expression, and subcellular

- localization identifies a large membrane-associated protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:6397-6402.
7. Chauvet, V., Qian, F., Boute, N., Cai, Y., Phakdeekitacharoen, B., Onuchic, L.F., Attie-Bitach, T., Guicharnaud, L., Devuyst, O., Germino, G.G., et al. 2002. Expression of *PKD1* and *PKD2* Transcripts and Proteins in Human Embryo and during Normal Kidney Development. *Am J Pathol* 160:973-983.
  8. Peters, D.J.M., Van De Wal, 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.
  9. Trudel, M., and Guillaume, R. 2000. Molecular biology of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Pediatr Pathol Mol Med* 18:483-499.
  10. 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.
  11. 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.
  12. 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.
  13. 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.
14. 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.
  15. Guillaume, R., and Trudel, M. 2000. Distinct and common developmental expression patterns of the murine PKD2 and PKD1 genes. *Mech Dev* 93:179-183.
  16. 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 USA* 98:12174-12179.
  17. 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 USA* 97:1731-1736.
  18. 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.
  19. Lu, W., Shen, X., Pavlova, A., Lakkis, M., Watrd, 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.
  20. Muto, S., Aiba, A., Saito, Y., Nakao, K., Nakamura, K., Tomita, K., Kitamura, T., Kurabayashi, M., Nagai, R., Higashihara, E., et al. 2002. Pioglitazone improves

- the phenotype and molecular defects of a targeted *Pkd1* mutant. *Hum Mol Genet* 11:1731-1742.
21. Wu, G., Tian, X., Nishimura, S., Markowitz, G.S., D'Agati, V., Park, J.H., Yao, L., Li, L., Geng, L., Zhao, H., et al. 2002. *Trans*-heterozygous *Pkd1* and *Pkd2* mutations modify expression of polycystin kidney disease. *Hum Mol Genet* 11:1845-1854.
  22. Starremans, P.G., Li, X., Finnerty, P.E., Guo, L., Takakura, A., Neilson, E.G., and Zhou, J. 2008. A mouse model for polycystic kidney disease through a somatic in-frame deletion in the 5' end of *Pkd1*. *Kidney Int* 73:1394-1405.
  23. Lantinga-van Leeuwen, I.S., Leonhard, W.N., van der Wal, A., Breuning, M.H., de Heer, E., and Peters, D.J.M. 2007. Kidney-specific inactivation of the *Pkd1* gene induces rapid cyst formation in developing kidneys and a slow onset of disease in adult mice. *Hum Mol Genet* 16:3188-3196.
  24. Takakura, A., Contrino, L., Beck, A.W., and Zhou, J. 2008. *Pkd1* inactivation induced in adulthood produces focal cystic disease. *J Am Soc Nephrol* 19:2351-2363.
  25. Lantinga-van Leeuwen, I.S., Dauwerse, J.G., Baelde, H.J., Leonhard, W.N., van der Wal, A., Ward, C.J., Verbeek, S., Deruiter, M.C., Breuning, M.H., de Heer, E., et al. 2004. Lowering of *Pkd1* expression is sufficient to cause polycystic kidney disease. *Hum Mol Genet* 13:3069-3077.
  26. 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.

27. Thivierge, C., Kurbegovic, A., Couillard, M., Guillaume, R., Cote, O., and Trudel, M. 2006. Overexpression of PKD1 Causes Polycystic Kidney Disease. *Mol Cell Biol* 26:1538-1548.
28. 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 R6K $\gamma$  Origin of Replication. *Genome Res* 12:1992-1998.
29. 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.
30. Couillard, M., Guillaume, R., Tanji, N., D'Agati, V., and Trudel, M. 2002. c-myc-induced Apoptosis in Polycystic Kidney Disease is Independent of FasL/Fas Interaction. *Cancer Res* 62:2210-2214.
31. 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.
32. Hogan, M.C., Manganelli, L., Woollard, J.R., Masyuk, A.I., Masyuk, T.V., Tammachote, R., Huang, B.Q., Leontovich, A.A., Beito, T.G., Madden, B.J., et al. 2009. Characterization of PKD protein-positive exosome-like vesicles. *J Am Soc Nephrol* 20:278-288.
33. Gonzales, P.A., Pisitkun, T., Hoffert, J.D., Tchapyjnikov, D., Star, R.A., Kleta, R., Wang, N.S., and Knepper, M.A. 2009. Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes. *J Am Soc Nephrol* 20:363-379.
34. Ong, A.C.M., Harris, P.C., Davies, D.R., Pritchard, L., Rossetti, S., Biddolph, S., Vaux, D.J.T., Migone, N., and Ward, C.J. 1999. Polycystin-1 expression in

- PKD1, early onset PKD1 and TSC2/PKD1 cystic tissue: implications for understanding cystogenesis. *Kidney Int* 56:1324-1333.
35. De Paepe, M.E., and Trudel, M. 1994. The transgenic SAD mouse: A model of human sickle cell glomerulopathy. *Kidney Int* 46:1337-1345.
  36. Stoyanova, E., Trudel, M., Felfly, H., Garcia, D., and Cloutier, G. 2007. Characterization of circulatory disorders in beta-thalassemic mice by noninvasive ultrasound biomicroscopy. *Physiol Genomics* 29:84-90.
  37. Couillard, M., and Trudel, M. 2009. C-myc as a modulator of renal stem/progenitor cell population. *Dev Dyn* 238:405-414.
  38. Torres, V.E., Erickson, S.B., Smith, L.H., Wilson, D.M., Hattery, R.R., and Segura, J.W. 1988. The association of nephrolithiasis and autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 11:318-325.
  39. Torres, V.E., Wilson, D.M., Hattery, R.R., and Segura, J.W. 1993. Renal stone disease in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 22:513-519.
  40. Levine, E., and Grantham, J.J. 1992. Calcified renal stones and cyst calcifications in autosomal dominant polycystic kidney disease: clinical and CT study in 84 patients. *AJR Am J Roentgenol* 159:77-81.
  41. Adeney, K.L., Siscovick, D.S., Ix, J.H., Seliger, S.L., Shlipak, M.G., Jenny, N.S., and Kestenbaum, B.R. 2009. Association of serum phosphate with vascular and valvular calcification in moderate CKD. *J Am Soc Nephrol* 20:381-387.

42. 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.
43. 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.
44. Lin, F., Hiesberger, T., Cordes, K., Sinclair, A.M., Goldstein, L.S.B., 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 USA* 100:5286-5291.
45. Masyuk, T.V., Huang, B.Q., Ward, C.J., Masyuk, A.I., Yuan, D., Splinter, P.L., Punyashthiti, R., Ritman, E.L., Torres, V.E., Harris, P.C., et al. 2003. Defects in cholangiocyte fibrocystin expression and ciliary structure in the PCK rat. *Gastroenterology* 125:1303-1310.
46. Smith, L.A., Bukanov, N.O., Husson, H., Russo, R.J., Barry, T.C., Taylor, A.L., Beier, D.R., and Ibraghimov-Beskrovnaya, O. 2006. Development of polycystic kidney disease in juvenile cystic kidney mice: insights into pathogenesis, ciliary abnormalities, and common features with human disease. *J Am Soc Nephrol* 17:2821-2831.
47. Cadieux, C., Harada, R., Paquet, M., Cote, O., Trudel, M., Nepveu, A., and Bouchard, M. 2008. Polycystic kidneys caused by sustained expression of Cux1 isoform p75. *J Biol Chem* 283:13817-13824.

48. Pisitkun, T., Shen, R.F., and Knepper, M.A. 2004. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:13368-13373.
49. Jiang, S.-T., Chiou, Y.-Y., Wang, E., Lin, H.-K., Lin, Y.-T., Chi, Y.-C., Wang, C.-K.L., Tang, M.-J., and Li, H. 2006. Defining a Link with Autosomal-Dominant Polycystic Kidney Disease in Mice with Congenitally Low Expression of Pkd1. *Am J Pathol* 168:205-220.
50. Griffin, M.D., Torres, V.E., Grande, J.P., and Kumar, R. 1996. Immunolocalization of polycystin in human tissues and cultured cells. *Proc Assoc Am Physicians* 108.
51. Leier, C.V., Baker, P.B., Kilman, J.W., and Wooley, C.F. 1984. Cardiovascular abnormalities associated with adult polycystic kidney disease. *Ann Intern Med* 100:683-688.
52. 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. *The New England Journal of Medicine* 319:907-912.
53. Griffin, M.D., Torres, V.E., Grande, J.P., and Kumar, R. 1997. Vascular Expression of Polycystin. *J Am Soc Nephrol* 8:616-626.
54. Peters, D.J.M., Spruit, L., Klingel, R., Prins, F., Baelde, H.J.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.

55. Weston, B.S., Jeffery, S., Jeffrey, I., Sharaf, S.F.A., Carter, N., Saggari-Malik, A., and Price, R.G. 1997. Polycystin expression during embryonic development of human kidney in adult tissues and ADPKD tissue. *Histochem J* 29:847-856.
56. Palson, R., Sharma, C.P., Kim, K., McLaughlin, M., Brown, D., and Arnaout, M.A. 1996. Characterization and cell distribution of polycystin, the product of autosomal dominant polycystic kidney disease gene 1. *Molecular Medicine* 2:702-711.
57. 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., et al. 2000. A human *PKDI* transgene generates functional polycystin-1 in mice and is associated with a cystic phenotype. *Hum Mol Genet* 9:2617-2627.
58. Ahrabi, A.K., Terryn, S., Valenti, G., Caron, N., Serradeil-Le Gal, C., Raufaste, D., Nielsen, S., Horie, S., Verbavatz, J.M., and Devuyst, O. 2007. PKD1 haploinsufficiency causes a syndrome of inappropriate antidiuresis in mice. *J Am Soc Nephrol* 18:1740-1753.

## LEGENDS

### Supplemental Figure 1 Analysis of the genomic integrity of Pkd1<sub>TAG</sub>-BAC

The original Pkd1<sub>TAG</sub>-BAC contains the *mPkd1* (black) and *mTsc2* (grey) genes represented in their tail to tail orientation. Southern blot analysis of two independent clones Pkd1<sub>TAG</sub>-BAC I and II deleted of *mTsc2* gene was carried out in comparison to control Pkd1<sub>TAG</sub>Tsc2-BAC to verify integrity and appropriate modification by using four restriction enzymes (BamHI, EcoRI, HindIII, and KpnI) and seven probes from a to g from *Pkd1* exon 1 to 46, as indicated on schematic map and over individual blots. The integrity of Pkd1<sub>TAG</sub> gene in Pkd1<sub>TAG</sub>-BAC I and II was thoroughly conserved and deletion of *mTsc2* was appropriate based on EcoRI and KpnI digests and probes f and g respectively with shorter bands. M: 1kb ladder, B: BamHI, E: EcoRI, H: HindIII, K: KpnI, E\*: EcoRI tag silent point mutation.

### Figure 1 Genomic analysis of Pkd1<sub>TAG</sub> transgenic mice

Representative analysis of the 5' regulatory region of Pkd1<sub>TAG</sub> transgenic mice was carried out based on a polymorphism at ~ 4.5 kb upstream of the translation initiation codon of the murine *Pkd1* gene. Since Pkd1<sub>TAG</sub> transgenic mice were produced on a mixed C57Bl6/J and CBA/J inbred background, the BAC of 129sv origin could be detected by 100bp amplification band whereas the C57Bl6/J and CBA/J displayed a 133 and 113bp, respectively. Analysis of the 3' Pkd1<sub>TAG</sub> region was verified on Southern using a KpnI digestion with the *Pkd1* g probe (exon 45-46). Bands are expected at 7Kb for the endogenous *Pkd1* gene and at 5Kb for the Pkd1<sub>TAG</sub> transgene (5 kb). The 5' and the 3' ends of the transgene were intact for the three transgenic mouse lines. M: 100 bp marker; C: negative control; C57: C57Bl/6J mice; CBA: CBA/J mice;

129:129<sup>sv</sup> mice; Ma: lambda HindIII marker; WT: wild type control mice; Tg: Pkd1<sub>TAG</sub> transgene; Endo: endogenous *Pkd1* gene; E: EcoRI; K: KpnI; E\* = tag silent point mutation.

**Figure 2** Expression analysis of Pkd1<sub>TAG</sub> transgenic mice

(A) Renal expression analysis of total *Pkd1* (endogenous and transgene: ~14.2kb) transcript of Pkd1<sub>TAG</sub> transgenic mice assessed by Northern blotting using *Pkd1* probe f (exon 36-45) and GAPDH (1.2 kb). One representative kidney sample from each transgenic line 6, 18 and 26 is compared to endogenous *Pkd1* transcript of control (C) genetic background and age-matched mice. Quantification of renal transcripts from transgenic Pkd1<sub>TAG</sub> mouse lines were increased compared to endogenous *Pkd1* transcript as indicated below the blot (control refers to 1).

(B) Quantitative real-time PCR of *Pkd1* expression from renal and extrarenal tissues was carried out using primers in exons 1 and 2. Transgenic mice (n=3; \* n= 2) from each of the 3 different lines and non-transgenic age-matched control mice were analyzed in triplicate for *Pkd1* and S16 that served as an internal control. Quantification of renal expression in these transgenic mice ranged from 1.3 to 15.5-fold relative to endogenous levels of control mice arbitrarily set at 1. Extrarenal tissue expression levels were established in function of *Pkd1* levels in control kidneys. Number in parentheses refers to the ratio of transgene expression levels to the organ control. Similar gene expression ratio or fold-increase was detected for each transgenic line across the tissues analyzed.

(C) Renal and extrarenal polycystin-1 protein expression analysis in Pkd1<sub>TAG</sub> mice (line 26) by Western blot using the N-terminal Pc-1 7e12 antibody. In Pkd1<sub>TAG</sub> organs, Pc-1 expression was intact and at higher expression levels than controls. Of the organs tested, highest Pc-1 signal was detected in lungs, heart and kidney and lower signal in the brain, liver and pancreas. Quantities

of protein loaded (ug prot) are indicated below the blot. C: non-transgenic control mice; Tg: Pkd1<sub>TAG</sub> transgenic mice, line 26. GAPDH was used as an internal loading control.

**Figure 3** Renal phenotype in Pkd1<sub>TAG</sub> mice

**(A, B)** Overview of renal cortical sections from adult 6 month-old control and Pkd1<sub>TAG</sub> mice, respectively. While control exhibited normal glomeruli and tubule, Pkd1<sub>TAG</sub> mice showed presence of numerous glomerular and tubular cysts associated with frequent proteinaceous casts and of tubulointerstitial fibrosis (H&E). Original magnification, x10.

**(C, D)** Assessment of nephron segment origin in control and Pkd1<sub>TAG</sub> mice respectively was determined by immunofluorescence using specific markers of proximal (Lotus tetragonolobus, green), distal (Esculentum Lipersicon, blue) and collecting ducts ( $\alpha$ -Calbindin D28K, red). Transgenic mice displayed cysts from all nephron segments and in higher proportion in proximal and collecting tubules. Noticeably, epithelial hyperplasia and hypertrophy were frequently observed in dilated collecting ducts. Original magnification, x20.

**(E, F)** Proliferation was assessed from control and Pkd1<sub>TAG</sub> renal section respectively with the Ki67 nuclear proliferation marker. Epithelial cells from normal and dilated tubules displayed higher rate of proliferation in Pkd1<sub>TAG</sub> mice compared to control. Original magnification, x40.

**(G, H)** Detection of c-myc in renal tissues of control and Pkd1<sub>TAG</sub> respectively correlated with higher proliferation rate. Increased nuclear and even cytoplasmic staining in cystic and non-cystic regions in Pkd1<sub>TAG</sub> relative to control. Original magnification, x40.

**(I, J)** Analysis of calcium deposits from renal section of control and Pkd1<sub>TAG</sub> respectively was evaluated by Alizarin red staining. Intense extracellular calcium deposits were detected in the

renal papilla of Pkd1<sub>TAG</sub> mice (inset) but absence of signal in cysts or in kidneys of non-transgenic mice. Original magnification, x10.

(K, L) Primary cilia of renal epithelial cells from control and Pkd1<sub>TAG</sub> mice respectively were assessed. Triplet figure consists of staining by  $\alpha$ -acetylated tubulin marker for cilia, dapi for nucleus and merge. In control mice, the average length of cilia was estimated to 2-3  $\mu\text{m}$  whereas in Pkd1<sub>TAG</sub> mice a significant shift in cilia length distribution to longer cilia of  $\geq 5 \mu\text{m}$  was measured. Original magnification, x100.

**Figure 4** Analysis of urinary proteins in Pkd1<sub>TAG</sub> mice

(A) Protein urine samples from all Pkd1<sub>TAG</sub> mice lines were compared to non-transgenic age-matched control (C) and SBM transgenic mice (positive control that develop PKD) in addition to serum protein sample (S) from non-transgenic mice on SDS-PAGE stained by Coomassie blue. Albumin normally present in serum was detected at abnormally high levels in Pkd1<sub>TAG</sub> urine comparable to SBM urine. Pkd1<sub>TAG</sub> mice like SBM mice exhibit non-selective proteinuria. Mice also displayed normal excretion of the major urinary proteins (MUPs). M: molecular mass markers of 31 to 200 kDa.

(B) Pc-1 was analyzed in fractioned urinary samples by Western blot using the N-terminal 7e12 Pc-1 antibody. Two bands (slightly above  $\sim 420\text{kDa}$  and  $\sim 360\text{-}380\text{kDa}$ ) were typically detected in native (N, without treatment) samples whether from total kidney protein extracts of Pkd1<sub>TAG</sub>, from total urinary proteins (T) or exosome-free fraction (S1) of Pkd1<sub>TAG</sub> and of control mice. A unique Pc-1 band slightly above  $\sim 420\text{kDa}$  was observed in exosome (Exo) fractions from Pkd1<sub>TAG</sub> and control urine whereas the THP-positive (S2) fraction appears devoided of Pc-1. Noticeably, Pkd1<sub>TAG</sub> transgenic mice in comparison to age-matched control mice consistently

showed more intense Pc-1 bands and likely higher Pc-1 excretion. Upon deglycosylation (DG) of protein extracts with PNGase, a unique band is detected at the size of the lowest native band (~360-380kDa), showing strong glycosylation of Pc-1 and indicating that the band above ~420kDa is likely the cleaved form of Pc-1 (theoretical mass of 448kDa and 328kDa in glycosylated and deglycosylated respectively).

**Figure 5** Pkd1<sub>TAG</sub> mice hepatic phenotypes

**(A, B)** Macroscopic view of livers from adult control and Pkd1<sub>TAG</sub> mice, respectively. In comparison to normal liver of control mice, liver of Pkd1<sub>TAG</sub> mice appeared abnormal with clusters of cysts. Original magnification, x3.2.

**(C, D)** Overview of liver histologic sections from adult control and Pkd1<sub>TAG</sub> mice, respectively. Notably, a Pkd1<sub>TAG</sub> mouse shows presence of numerous cysts lined by cuboid epithelium, suggesting tubular cholangiocyte origin. Cluster of cysts are formed focally around the periportal region tubular structures (H&E). Original magnification, x10.

**(E, F)** Liver sections from adult control and Pkd1<sub>TAG</sub> mice, respectively. Liver of Pkd1<sub>TAG</sub> mice displayed severe periportal fibrosis with various levels of increased interstitial fibrosis (Sirius red). Original magnification, x10.

**(G, H)** Proliferation was assessed from renal sections of control and Pkd1<sub>TAG</sub> respectively with the Ki67 nuclear proliferation marker. Cystic epithelium of the liver was associated with higher rate of proliferation compared to non-cystic control. Original magnification, x40.

**(I, J)** Analysis of c-myc in hepatic tissues of control and Pkd1<sub>TAG</sub> respectively correlated with higher proliferation rate. Increased nuclear and even cytoplasmic staining is observed in cystic regions in Pkd1<sub>TAG</sub> relative to control. Original magnification, x40.

**Figure 6** Cardiac phenotypes in Pkd1<sub>TAG</sub> mice

(A, B) Non-invasive ultrasound of cardiac function of adult control mice and Pkd1<sub>TAG</sub> mice, respectively. Echocardiography of Pkd1<sub>TAG</sub> mice detected presence of aortic valve of white color, indicating calcification and probably stenosis. Attached video imaging shows the inability of the aortic valves to fully open.

(C, D) Anatomy of hearts from adult control mice and Pkd1<sub>TAG</sub> mice, respectively. The heart size of Pkd1<sub>TAG</sub> mice is readily larger than non-transgenic control. Original magnification, x2.5.

(E, F) Heart vasculature from adult control mice and Pkd1<sub>TAG</sub> mice respectively, filled with Microfil latex. Pkd1<sub>TAG</sub> mouse left ventricle hypertrophy was clearly visible under 3D angles by different segmentation and the substantial thinning of ventricular wall.

(G, H) Longitudinal sectioned heart from adult control and Pkd1<sub>TAG</sub> mice, respectively. View of sectioned heart of Pkd1<sub>TAG</sub> mouse displays changes in color pigmentation of the left ventricle wall most likely due to calcium deposits. Original magnification, x5.

(I, J) Higher-power view of aortic valves from adult control and Pkd1<sub>TAG</sub> mice, respectively. Pkd1<sub>TAG</sub> mouse exhibited severe calcified valves consistent with echocardiography (Alizarin red). Original magnification, x20.

**Figure 7** Pkd1<sub>TAG</sub> mice vascular defect: intracranial aneurysm.

(A, B) Macroscopic view of scalped head from adult control and Pkd1<sub>TAG</sub> mice (1 month), respectively. Evidence of enlarged skull associated with abnormal brain morphology, sagittal suture, intracranial hemorrhages and edema in Pkd1<sub>TAG</sub> mice. Opening of cranial cavity of Pkd1<sub>TAG</sub> mice caused a major release of fluid revealing compressed adjacent structures of the cortex and cerebellum.

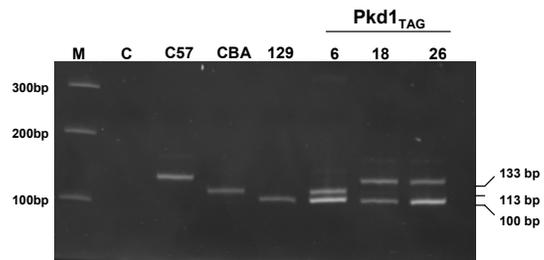
**(C, D)** Overview of brain sections from adult control and Pkd1<sub>TAG</sub> mice, respectively. Evidence of Pkd1<sub>TAG</sub> cortex thinning is shown with a major cavity associated with elongated and compressed cerebellum due to hemorrhage and excessive fluid (H&E). Original magnification, x1.25.

**(E, F)** Brain vasculature from adult control mice and Pkd1<sub>TAG</sub> mice, respectively filled with Microfil latex. Evidence of unruptured cerebral aneurysm was observed in a Pkd1<sub>TAG</sub> mouse whereas not detected in vasculature of control mice. Original magnification, x5.

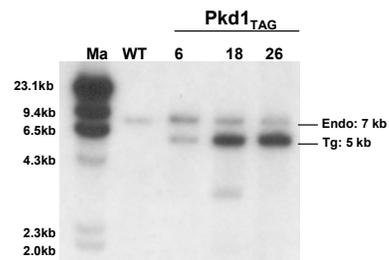
Figure 1



5' analysis: Polymorphism

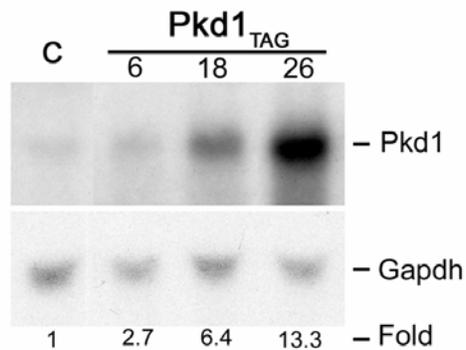


3' analysis: Pkd1 Probe/KpnI digest



## Figure 2

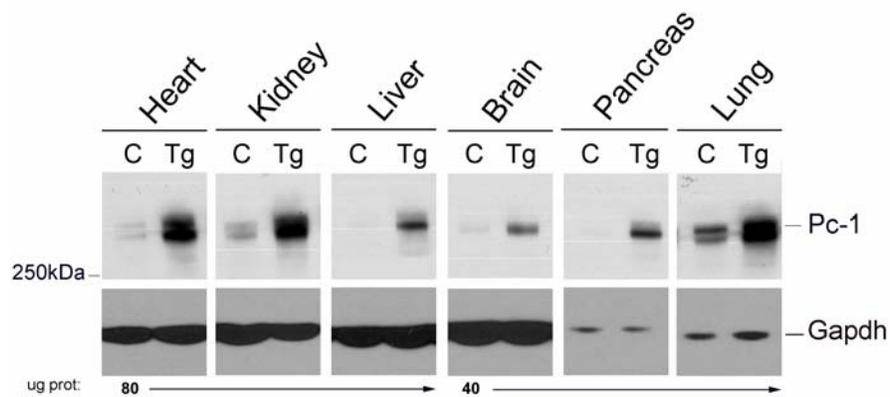
A

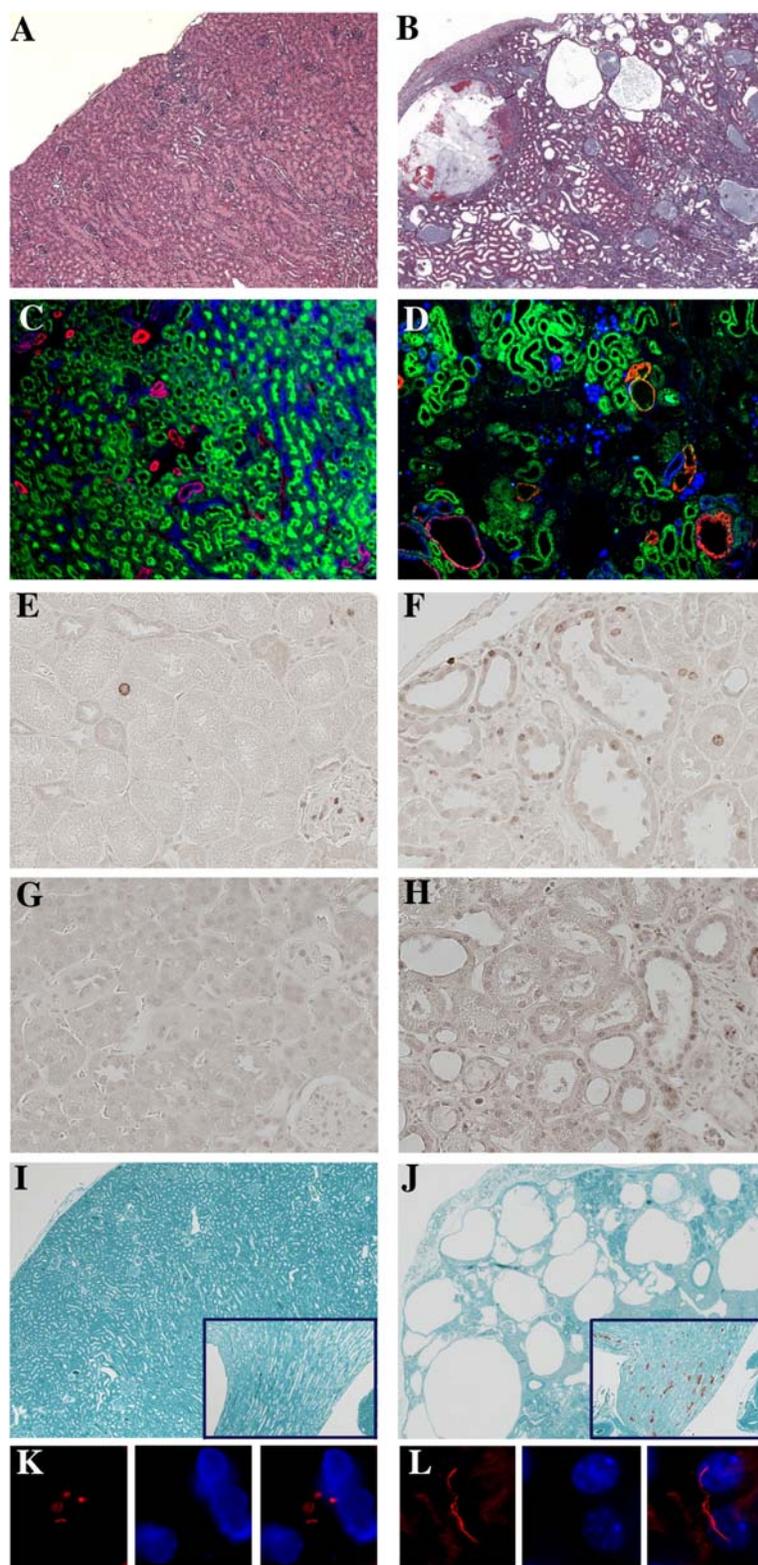


B

Mice	n	Pkd1 expression relative to control kidneys (relative to organ control)						
		Kidneys	Brain	Heart	Lungs	Spleen	Liver	Pancreas
Control	3	1.0	3.5 (1.0)	1.5 (1.0)	2.9 (1.0)	0.5 (1.0)	0.6 (1.0)	0.8 (1.0)
Pkd1 <sub>TAG</sub> 6	3	1.3	5.6 (1.6)	2.3 (1.5)	3.1 (1.1)	0.7 (1.4)	0.8 (1.2)	1.0 (1.2)
Pkd1 <sub>TAG</sub> 18	3	8.0	24.7 (7.1)	13.6 (8.8)	13.9 (4.9)	3.5 (6.6)	3.2 (5.3)	3.0 (3.6)
Pkd1 <sub>TAG</sub> 26	3	15.5	37.7 (10.8)	20.6 (13.3)	22.6 (7.9)	5.8 (11.0)	5.3 (8.7)	10.9 (13.2) *

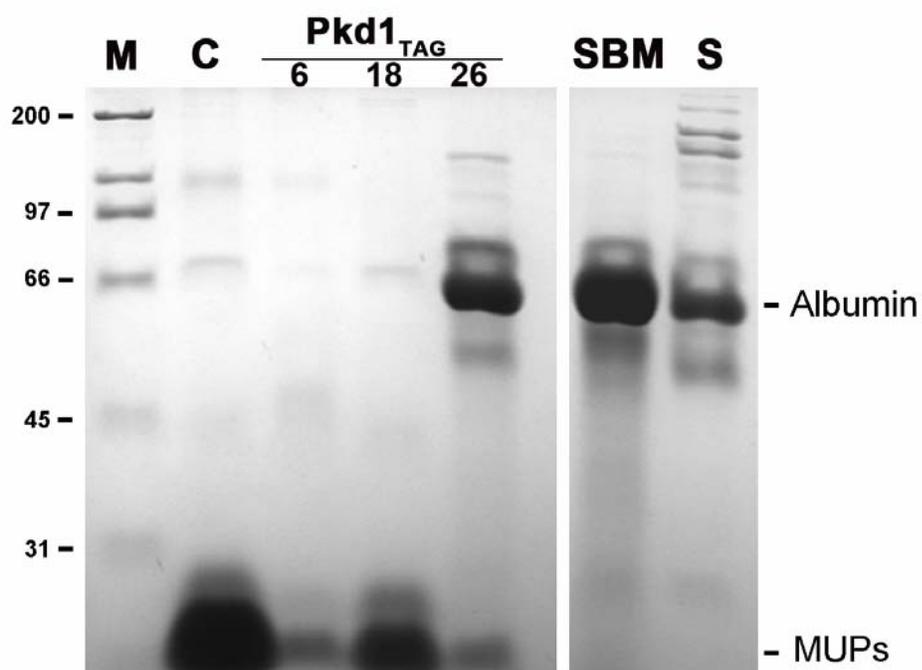
C



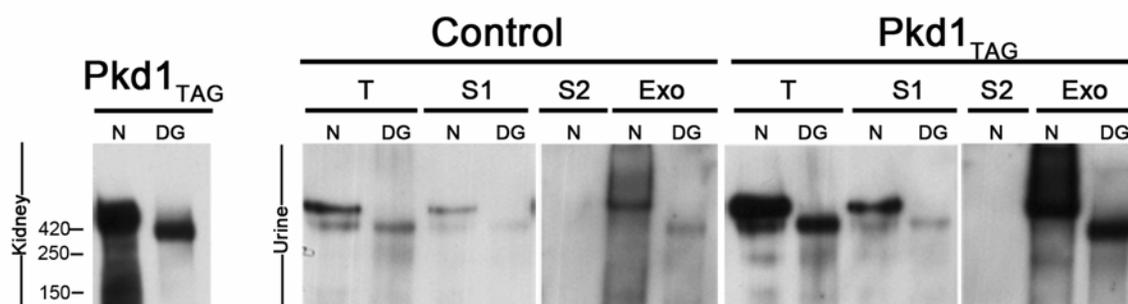
**Figure 3**

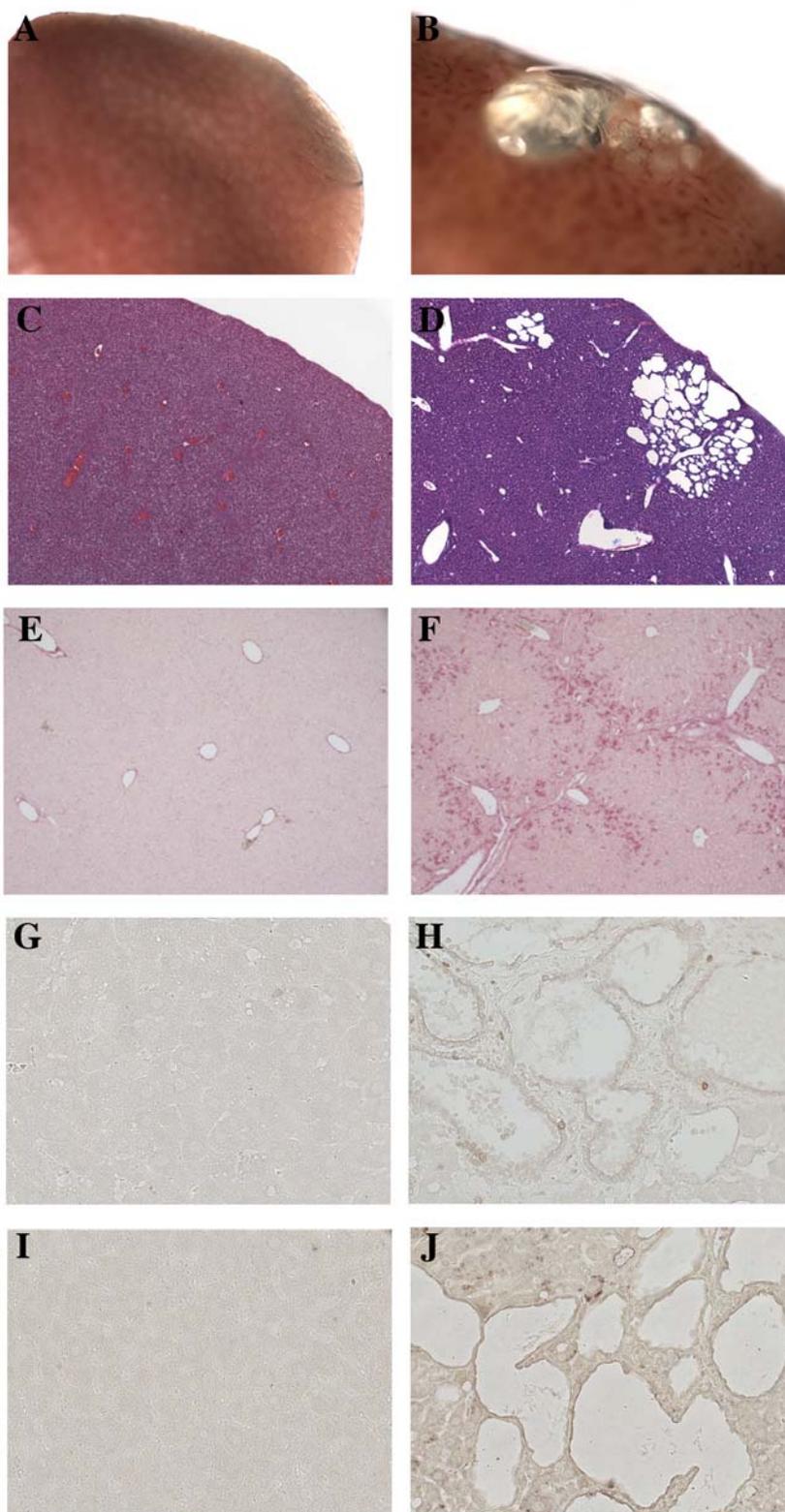
## Figure 4

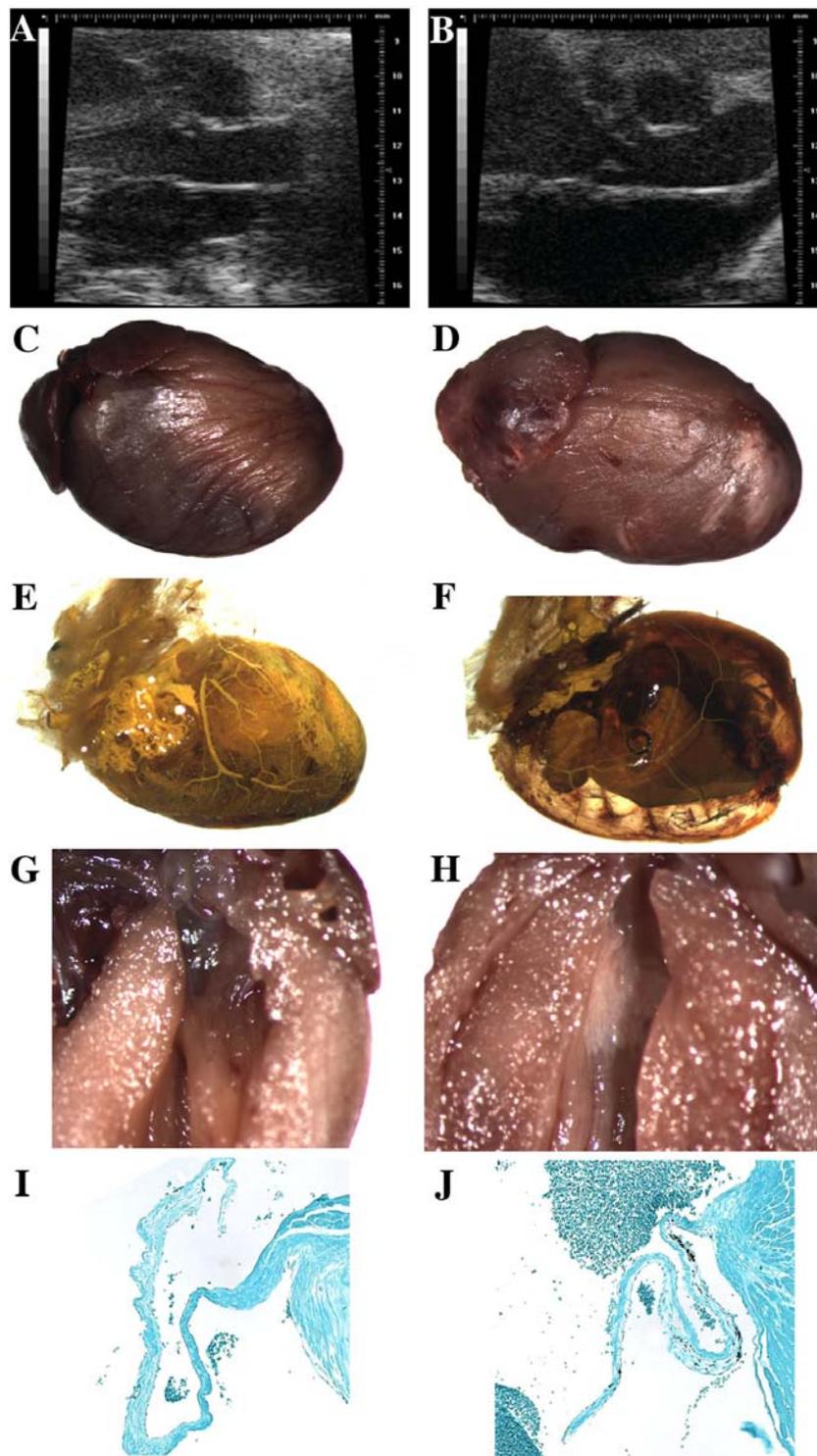
A



B



**Figure 5**

**Figure 6**

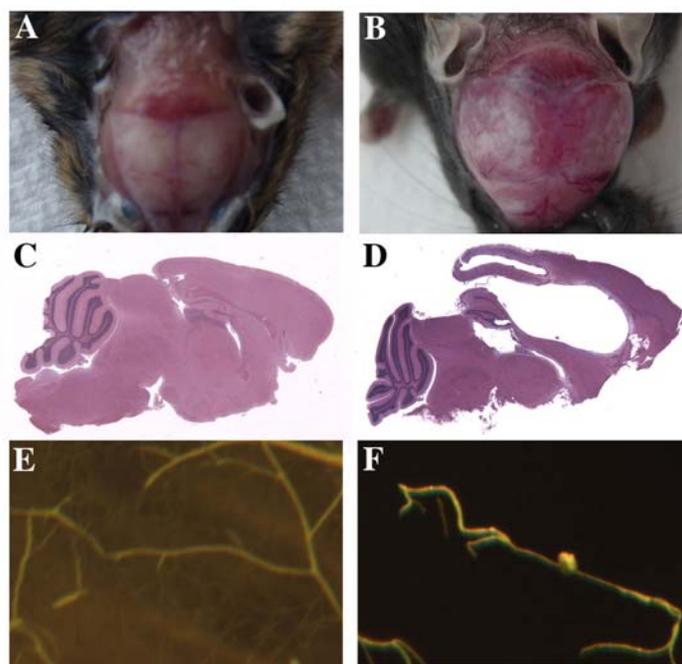
**Figure 7**

Figure S1

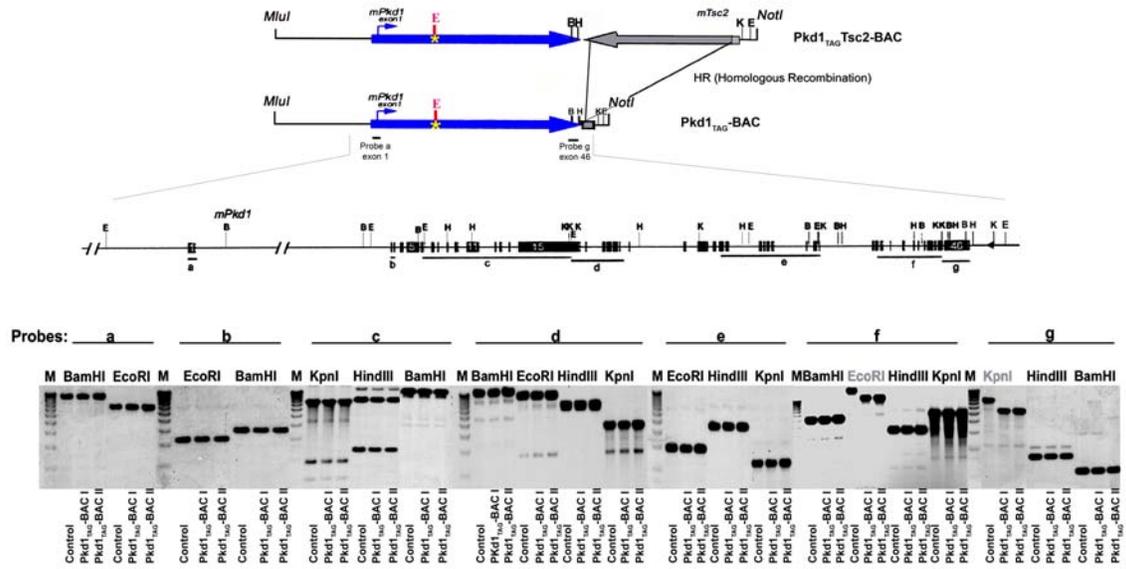


Table 1

Mice	Age (mo)	n	Volume (mL)	n	BUN (mmol/L)	n	Creatinine (mmol/L)	n	Protein (g/L)	n	Osmolality (mosm/kg)	Age (mo)	n	Hematocrit (%)
Control	4-9	12	0.7 ± 0.4	12	809 ± 320	15	3.9 ± 1.8	11	6.9 ± 5.5	11	1426 ± 547	6	5	54 ± 3
SBM	4-10	10	2.7 ± 1.3 <sup>b</sup>	7	328 ± 76 <sup>c</sup>	8	1.3 ± 0.6 <sup>c</sup>	5	3.4 ± 1.4	4	843 ± 265 <sup>a</sup>	6-8	6	33 ± 5 <sup>d</sup>
Pkd1 <sub>TAG</sub> 26	5-7	7	2.4 ± 1.5 <sup>b</sup>	8	461 ± 267 <sup>a</sup>	10	1.6 ± 1.3 <sup>b</sup>	8	1.1 ± 0.7 <sup>b</sup>	6	985 ± 566	6	7	35 ± 6 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> P ≤ 0.02; <sup>b</sup> P ≤ 0.01; <sup>c</sup> P ≤ 0.001; <sup>d</sup> P ≤ 0.0001

Table 2

Mice	Left ventricle PW		Interventricular septum		Aortic root		Left ventricle volume		Stroke vol. aorta	Cardiac output	Heart rate	Aortic valve				Mitral valve								
	Velocity		Velocity		Velocity		Velocity					Upstream		Downstream		Upstream		Downstream						
	d	s	d	s	diam.	area	d	s				mean	peak	mean	peak	mean	peak	mean	peak					
	10 <sup>-2</sup> mm/wt	10 <sup>-2</sup> mm/wt	10 <sup>-2</sup> mm/wt	10 <sup>-2</sup> mm/wt	10 <sup>-2</sup> mm/wt	10 <sup>-2</sup> μL/wt	10 <sup>-2</sup> mL/wt	mL/min/wt	bpm	mm/s	mm/s	mm/s	mm/s	mm/s	mm/s	mm/s	mm/s	mm/s	mm/s					
n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n					
Control	6	2.0 ±0.3	2.8 ±0.6	2.1 ±0.4	3.0 ±0.5	3.5 ±0.2	4.1 ±0.3	2.21 ±0.23	1.01 ±0.24	0.27 ±0.03	1.29 ±0.16	474 ±16	4	554 ±56	899 ±105	6	1152 ±134	1901 ±247	4	557 ±79	977 ±140	6	743 ±77	1247 ±133
Pkd1 <sub>TAG</sub>	4	3.3 <sup>e</sup> ±0.4	4.6 <sup>d</sup> ±0.6	3.2 <sup>a</sup> ±0.6	4.0 ±1.3	5.0 <sup>f</sup> ±0.2	5.7 <sup>f</sup> ±0.2	3.11 ±1.06	1.51 ±0.97	0.53 <sup>b</sup> ±0.13	2.59 <sup>c</sup> ±0.46	487 ±43	4	581 ±251	965 ±431	4	1705 <sup>a</sup> ±344	2772 <sup>a</sup> ±562	4	454 ±103	817 ±156	4	714 ±109	1233 ±205

<sup>a</sup> P ≤ 0.05; <sup>b</sup> P ≤ 0.03; <sup>c</sup> P ≤ 0.01; <sup>d</sup> P ≤ 0.003; <sup>e</sup> P ≤ 0.002; <sup>f</sup> P ≤ 0.0002  
d = diastolic; s = systolic; bpm = beats per minute

## Discussion

Vingt années se sont écoulées depuis la découverte des gènes *PKD1* et *PKD2* responsables de la polykystose rénale autosomique dominante. Le clonage et la caractérisation de leurs gènes orthologues murins ont permis la génération de modèles animaux nécessaires à l'étude de la PKRAD. La plupart des modèles actuels, générés par une approche d'ablation génique conventionnelle ou conditionnelle, entraînent des phénotypes précoces souvent létaux, suggérant un rôle crucial des protéines PKRAD tôt dans le développement. Toutefois, la létalité embryonnaire associée aux modèles d'ablation génique représente une barrière importante à l'élucidation des mécanismes de développement et de progression des kystes. Elle retarde la mise en place d'une stratégie thérapeutique PKRAD, d'autant plus que les phénotypes de ces souris ne corrèlent pas avec la diversité des symptômes cliniques observés chez les patients.

Les analyses effectuées sur les tissus humains démontrent que la polycystine-1 est toujours exprimée dans les kystes, parfois même à des niveaux supérieurs à la normale, suggérant que la surexpression serait un mécanisme pathogénique. Au laboratoire, nous avons effectivement démontré que la surexpression de *Pkd1* de manière spécifique aux reins était suffisante pour induire la kystogenèse rénale (Thivierge *et al*, 2006). Pour poursuivre les études de surexpression de *Pkd1*, nous avons généré un nouveau modèle murin où l'expression de *Pkd1* est régulée par son promoteur endogène. Ce modèle, nommé PKD1<sub>TAG</sub> nous a permis d'évaluer le rôle de *Pkd1* dans le développement des symptômes rénaux et extrarénaux de la polykystose rénale.

Notre étude adresse aussi les voies de signalisation et les partenaires de la polycystine-1 qui sont impliqués dans la formation des kystes. La polycystine-1 est une protéine transmembranaire possédant potentiellement plusieurs partenaires. Les études bioinformatiques ont démontré la présence d'un seul motif conservé d'interaction protéine-protéine, nommé le motif coiled-coil, situé dans la courte région intracellulaire de la polycystine-1. Nous avons établi des souris transgéniques exprimant une protéine tronquée du motif coiled-coil pour évaluer sa

fonction in-vivo. Ce modèle a produit des informations importantes sur les partenaires et les effecteurs de la polycystine-1.

## **Les souris transgéniques Pkd1<sub>TAG</sub>**

Précédemment, notre laboratoire a rapporté l'isolement et la caractérisation d'un chromosome artificiel de bactérie (BAC) contenant la séquence murine entière du gène *Pkd1* (Thivierge *et al*, 2006). Maintenant, nous réutilisons ce *Pkd1*-BAC afin de générer un nouveau modèle murin de surexpression de *Pkd1*. Pour ce faire, nous avons apporté deux modifications dans la séquence *Pkd1* par recombinaison homologue dans les BACs. Dans un premier temps, nous avons introduit une mutation silencieuse dans l'exon 10 pour créer un site de digestion EcoRI et faciliter l'analyse génotypique des souris. L'utilisation d'une mutation silencieuse plutôt que l'ajout d'un épitope spécifique (TAG) permet de conserver une structure native qui n'interfère pas avec la fonction de la protéine. Dans un second temps, nous avons retiré le gène *Tsc2* situé en position queue à queue du gène *Pkd1* pour évaluer uniquement l'effet de la surexpression de *Pkd1*. Rappelons que le gène *Tsc2* est associé à des anomalies rénales et par conséquent, est indésirable dans notre étude. Le BAC contenant la séquence modifiée de *Pkd1* a été nommé Pkd1<sub>TAG</sub>-BAC.

Un fragment d'environ 75 kb du Pkd1<sub>TAG</sub>-BAC a été purifié et utilisé pour la microinjection. Ce fragment ne possède plus d'ADN bactérien puisqu'il a été généré grâce à des sites de restriction uniques retrouvés dans la séquence d'ADN murine. Il contient toutefois la totalité du gène *Pkd1* précédé de 25 kb de promoteur endogène. Suite à la microinjection, l'intégrité du transgène a été évaluée à l'aide de 7 sondes *Pkd1* recouvrant la séquence totale du transgène. Les analyses ont été effectuées à l'aide de plusieurs enzymes de digestion pour s'assurer d'obtenir des fragments qui se recoupent entre eux.

Trois lignées de souris Pkd1<sub>TAG</sub> possédant de 2 à 15 copies du transgène ont été produites. L'ensemble des lignées expriment le transgène de manière tissu-spécifique dans les organes et tissus analysés (reins, rate, cœur, poumons, cerveau, foie, pancréas, moelle osseuse). Le niveau d'expression du transgène corrèle avec le nombre de copie intégré. De manière importante, le transgène produit une protéine stable.

Les souris Pkd1<sub>TAG</sub> de trois lignées reproduisent la PKRAD démontrant que le phénotype observé ne résulte pas d'un effet de position du transgène lors de son intégration au génome. La sévérité du phénotype augmente en fonction du nombre croissant de copies du transgène, suggérant un mécanisme de dosage. De manière intéressante, les souris Pkd1<sub>TAG</sub> développent plusieurs phénotypes PKRAD extrarénaux à des fréquences similaires à l'humain, suggérant que la surexpression de Pkd1 est un mécanisme pathogénétique de la PKRAD.

### **Analyse d'expression et de localisation du transgène**

L'expression du transgène Pkd1<sub>TAG</sub> a été analysée par PCR quantitatif dans 7 organes (reins, rate, cœur, poumons, cerveau, foie et pancréas) de souris adultes de chaque lignée. Le niveau d'expression corrèle avec le nombre de copies du transgène dans tous les organes. De plus, l'expression tissu spécifique du transgène est conservée. Les lignées Pkd1<sub>TAG</sub> 6, 18 et 26 expriment des niveaux de *Pkd1* 2, 6 et 15 fois supérieurs au niveau endogène observé chez les souris non-transgéniques. Ces résultats suggèrent que le transgène Pkd1<sub>TAG</sub> possède tous les éléments régulateurs nécessaires à son expression.

La stabilité de la protéine encodée par le transgène Pkd1<sub>TAG</sub> a été évaluée par immunobuvardage. La polycystine-1 est exprimée et stable dans les sept organes mentionnés ci-haut. Le dosage de la polycystine-1 corrèle avec la sévérité du phénotype.

Plusieurs essais de localisation sous-cellulaire de la polycystine-1 transgénique ont été tentés par immunofluorescence. Malheureusement, l'absence d'anticorps efficace et de séquence TAG sur notre protéine transgénique n'a pas permis d'étudier son patron de localisation. Pour remédier à ce problème, notre laboratoire travaille actuellement à l'élaboration d'un nouveau transgène, construit à partir du Pkd1<sub>TAG</sub>-BAC, comprenant un épitope V5 dans son domaine extracellulaire. Le TAG V5 possède plusieurs avantages tels que sa petite taille et la disponibilité d'anticorps commerciaux spécifiques fonctionnels. Ce nouvel outil nous fournira des informations pertinentes sur la fonction et la localisation des formes endogènes et clivées de la polycystine-1.

### **Analyse de la fonction rénale**

La fonction rénale des souris Pkd1<sub>TAG</sub> a été évaluée à l'aide d'analyses urinaires et hématologiques. Les analyses urinaires démontrent une polyurie, une diminution significative du taux de protéines urinaires, de créatinine, de déchets azotés (BUN) ainsi que des ions chlorure. L'osmolalité urinaire diminue de façon non significative, ce qui peut être expliqué en partie par le nombre de souris analysées, leur âge ainsi que la variation de la sévérité du phénotype rénal. En effet, l'analyse des valeurs individuelles suggère deux populations de souris dont une serait plus affectée. De manière similaire, les données sur les patients PKRAD démontrent que le développement de l'insuffisance rénale survient chez environ 50% des patients âgés d'environ 40 à 60 ans, soit sur une période de 20 ans (Grantham, 2008). Malgré cette variation, la valeur moyenne est comparable aux niveaux observés dans les autres modèles PKRAD comme SBPkd1<sub>TAG</sub> et SBM. Les anomalies de concentration de l'urine observées dans les souris Pkd1<sub>TAG</sub> sont aussi fréquentes chez les patients PKRAD (Martinez-Maldonado *et al*, 1972).

La fonction glomérulaire des souris Pkd1<sub>TAG</sub> a été évaluée à l'aide d'analyses urinaires complémentaires par SDS-PAGE. Ces analyses ont démontré la

présence inhabituelle d'albumine dans les protéines urinaires. Ces protéines de haut poids moléculaire ne traversent normalement pas la barrière glomérulaire, suggérant une altération de sa fonction. Puisque le nombre de glomérule par unité de surface du rein ne varie pas entre les souris contrôles et  $Pkd1_{TAG}$ , la perte de fonction glomérulaire ne serait pas attribuable à une diminution du nombre d'unité de filtration (Tableau 10.2). Indirectement, ces résultats suggèrent aussi que le développement du rein n'est pas affecté par la surexpression de  $Pkd1$ . Enfin, quelques souris  $Pkd1_{TAG}$  démontraient du sang dans leur urine. Ces observations suggèrent que la fragilité vasculaire associée à une augmentation de la pression exercée par les kystes provoquerait la rupture de capillaires sanguins et les hématuries, de façon similaire à l'humain.

D'autre part, les analyses hématologiques ont permis de noter la diminution significative du nombre de globule rouge dans les souris  $Pkd1_{TAG}$  comparativement aux souris non-transgéniques. Rappelons que l'anémie est fréquente chez les patients PKRAD en conséquence à une production anormale d'érythropoïétine (Eschbach and Adamson, 1988).

### **Le phénotype rénal**

L'ensemble des souris  $Pkd1_{TAG}$  développe des kystes rénaux. La sévérité du phénotype varie considérablement entre les souris, dépendamment du niveau d'expression de  $Pkd1$  et de l'âge des souris. Cette variation est aussi observée chez les humains, suggérant que le fond génétique influence significativement la formation et la progression des kystes. Dans le but de diminuer l'influence du fond génétique sur le phénotype, nous effectuons maintenant des croisements en retour pour établir les lignées  $Pkd1_{TAG}$  sur un fond génétique C57Bl6/J pur. Les souris  $Pkd1_{TAG}$  utilisées pour nos expériences étaient jusqu'à maintenant maintenues sur un fond génétique mixte CBA/J X C57Bl6/J.

Règle générale, les reins  $Pkd1_{TAG}$  sont pâles. La majorité des souris démontrent des reins bosselés qui correspondent avec les reins hypertrophiés observés chez les patients PKRAD. Toutefois, le poids des reins normalisé en fonction du poids total pour l'ensemble des souris analysées est comparable à celui des souris contrôles. De manière intéressante, ceci corrèle avec plusieurs modèles murins PKRAD qui démontrent une hypoplasie rénale plutôt qu'une hypertrophie, dont les modèles  $SBPkd1_{TAG}$  et  $Bcl-2^{-/-}$ . Il est suggéré dans ces études que l'hypoplasie est consécutive à une élévation des niveaux d'apoptose. Des études immunohistochimiques complémentaires pourront valider cette hypothèse dans le modèle  $Pkd1_{TAG}$ . D'autre part, il est possible que l'orthologue murin de *PKD1* puisse interagir avec des voies de signalisation ou des partenaires protéiques différents de la polycystine-1 humaine et conséquemment induire certaines différences phénotypiques.

Les coupes histologiques rénales démontrent des kystes glomérulaires et tubulaires (parfois hémorragiques), des dépôts protéiques, de la fibrose interstitielle, des infiltrations lymphocytaires et des dépôts de calcium. Tous les segments du néphron développent des kystes. Des études d'immunofluorescence rapportent que les tubules proximaux et collecteurs sont les plus affectés. De plus, une portion significative de tubules collecteurs ont une hyperplasie épithéliale et démontrent des polypes. De manière intéressante, des dépôts de calcium se forment exclusivement dans la papille rénale où se situent majoritairement ces tubules collecteurs. Bien que les polyuries des souris  $Pkd1_{TAG}$  devraient fournir un effet protecteur contre la formation de dépôts calciques, la stase de l'urine dans les tubules déformés pourrait en partie expliquer la formation des pierres. Les lithiases calciques rénales représentent une complication courante chez les patients PKRAD. Comme les patients, les niveaux de calcium et le pH urinaire sont normaux chez les souris affectées.

La structure du cil primaire a été caractérisée par immunofluorescence dans les cellules épithéliales rénales. Plus de 40% des cils Pkd1<sub>TAG</sub> analysés avait une longueur supérieure aux valeurs normales évaluées dans les souris non-transgéniques. La présence de cils plus longs a été confirmée par microscopie électronique. Ce résultat suggère que le niveau d'expression de *Pkd1* influence la longueur du cil primaire. En effet, l'élévation ou l'ablation de *Pkd1* entraîne respectivement l'allongement ou le rétrécissement du cil, et, dans les deux cas, la formation de kystes. Un lien intéressant semble donc exister entre la polycystine-1, la longueur du cil primaire et la formation de kystes, bien qu'il n'est toujours pas connu. De plus, nous avons observé des anomalies de la structure du cil dans les souris Pkd1<sub>TAG</sub>, comme l'élargissement du cil, des bourgeonnements de sa membrane ainsi que des cellules avec plusieurs cils. Une technique d'immunolocalisation utilisant des anticorps anti-polycystine-1 liés à de petites particules d'or a révélé la présence de structures extracellulaires non-identifiées situées dans le lumen des tubules. Cette observation supporte une hypothèse récente selon laquelle la polycystine-1 serait sécrétée via des vésicules formées à la base du cil primaire (Hogan *et al*, 2009).

### **Les mécanismes moléculaires de kystogenèse rénal**

Les voies moléculaires impliquées dans le développement des kystes rénaux ont été étudiées par PCR quantitatif chez les souris Pkd1<sub>TAG</sub>. L'influence de la surexpression de Pkd1 sur l'expression des gènes *Pkd2*, *m-TOR*, *c-Jun*, *c-Myc* et *Nek8* a été évaluée puisque la littérature suggère leur importance dans la kystogenèse rénale in-vitro.

Premièrement, *Pkd1* n'affecte pas l'expression rénale de *Pkd2* dans les souris Pkd1<sub>TAG</sub>, tout comme les modèles murins SBPkd1<sub>TAG</sub> et Pkd1<sup>-/-</sup> (Annexe 4). Toutefois, puisqu'il est suggéré que la polycystine-1 interagit et stabilise la polycystine-2 in-vitro (Newby *et al*, 2002), nous avons quantifié le niveau d'expression de la polycystine-2 par immunobuvardage dans les reins Pkd1<sub>TAG</sub>.

Des résultats préliminaires suggèrent une diminution des niveaux de polycystine-2 proportionnelle à l'augmentation de *Pkd1* dans les souris *Pkd1*<sub>TAG</sub> kystiques et non-kystiques comparativement aux souris contrôles (Annexe 9). De plus, nous avons observé une bande d'environ 130 kilodaltons spécifiques aux tissus kystiques. Des analyses supplémentaires à l'aide d'un second contrôle interne devront être entreprises pour confirmer ces observations.

Deuxièmement, nous avons évalué le niveau d'expression de *m-TOR*. Le rôle de *m-TOR* dans le développement rénal est peu connu; son inactivation entraîne la léthalité embryonnaire vers 12.5 jours chez la souris, soit avant la formation des reins (Murakami *et al*, 2004). De plus, il n'existe pas de modèle de surexpression ou d'inactivation conditionnelle de *m-TOR* utilisant un promoteur rein spécifique. Toutefois, plusieurs évidences suggèrent le rôle de la voie *m-TOR* dans les maladies polykystiques des reins. Primo, le gène *TSC2* qui régule la voie *m-TOR* est associé à la formation de kystes rénaux chez l'humain (Curatolo *et al*, 2008). Secundo, il est démontré que l'utilisation de rapamycine, un inhibiteur de *m-TOR*, ralentit la progression des kystes dans les modèles murins PKD (Edelstein, 2008). Nous avons démontré que l'expression de *m-TOR* augmente significativement dans le modèle d'ablation génique *Pkd1*<sup>-/-</sup> comparativement aux modèles de surexpression *Pkd1*<sub>TAG</sub> et SB*Pkd1*<sub>TAG</sub> (Annexe 6). Les deux modèles de surexpression démontrent toutefois une tendance à la hausse qui pourrait être confirmé par l'étude d'un plus grand nombre de souris et la création de groupe en fonction de la sévérité du phénotype (Peu, moyennement et beaucoup de kystes). En effet, les souris *Pkd1*<sup>-/-</sup> développent systématiquement des reins kystiques permettant la reproductibilité des résultats et des statistiques. D'autre part, nous nous sommes intéressé à l'étude de la régulation post-traductionnelle de la voie *m-TOR*, importante dans le mécanisme de prolifération. Notre collaboration avec le Dr. Chen (Université de l'Alberta, Edmonton) démontre une élévation du niveau de phosphorylation de *m-TOR* dans les souris *Pkd1*<sub>TAG</sub>, ce qui corrèle avec la

diminution du phénotype kystique des modèles PKD par l'utilisation de rapamycine. Notre nouveau modèle pourra servir à établir si la rapamycine réduit la formation de kystes induites spécifiquement par la voie Pkd1 dans la PKRAD.

Troisièmement, l'expression de *c-Jun* diminue dans le modèle Pkd1<sub>TAG</sub> (Annexe 7). Cette observation corrèle avec la diminution de la protéine dans les tissus kystiques humains (Le *et al*, 2005). Cette protéine est aussi régulée de façon post-traductionnelle ; la phosphorylation de *c-Jun* augmente à la position S73 chez les patients. Il sera intéressant de rechercher la présence de ce site sur l'orthologue murin de *c-Jun* et d'analyser son état de phosphorylation dans les souris Pkd1<sub>TAG</sub>.

Quatrièmement, les reins kystiques Pkd1<sub>TAG</sub> expriment de 4 à 5 fois plus de transcrit et de protéine *c-myc* (Annexe 5). Des analyses immunohistochimiques supportent cette observation dans les tissus rénaux et hépatiques affectés et suggèrent une voie de signalisation commune à plusieurs organes. De plus, l'expression de *c-myc* dans les kystes rénaux et hépatiques corrèle avec les régions positives pour le marqueur de prolifération Ki67. De manière intéressante, *c-myc* reproduit aussi un phénotype PKRAD dans les souris transgéniques (Trudel *et al*, 1991) et est augmenté dans les tissus PKRAD humains (Lanoix *et al*, 1996). L'induction de la kystogenèse pourrait être une conséquence directe de l'élévation de *c-myc* ou indirecte puisque nos résultats démontrent aussi que la surexpression de *myc* active la transcription de *Pkd1* dans les souris SBM (Annexe 23). Cette activation "en retour" rappelle les mécanismes de prolifération autocrine générés dans l'épithélium kystique, tel que EGF/EGFr. De manière importante, l'activation de *c-myc* est observée autant dans les modèles d'ablation génique (Pkd1<sup>-/-</sup>) ou de surexpression de *Pkd1* (SBPkd1<sub>TAG</sub> ; Pkd1<sub>TAG</sub>) expliquant la formation de kystes en présence ou en absence de Pkd1, soit selon un mécanisme de dosage.

Pour adresser le rôle de *c-myc* dans la voie *Pkd1*, nous avons entrepris l'étude d'un modèle d'ablation génique conditionnel de *c-myc* en utilisant une

recombinase exprimée de façon rein-spécifique ( $Ksp_{cre}$ ) sur un fond génétique  $Pkd1^{-/-}$  ( $Ksp_{cre}$  ;  $Myc^{Flox}$  ;  $Pkd1^{-/-}$ ). Les résultats préliminaires suggèrent que l'ablation de *c-myc* dans les reins  $Pkd1^{-/-}$  améliore d'environ 20 % la surface kystique, ce qui corrèle avec le niveau de recombinaison de 25 % engendré par la  $Ksp_{cre}$  (Annexe 24). De manière plus spécifique, nous avons aussi débuté un croisement  $Ksp_{cre}$  ;  $Myc^{Flox}$  ;  $Pkd1^{Flox}$  qui permettra d'évaluer le rôle de *c-myc* dans le type cellulaire précis où  $Pkd1$  est inactivé.

Le mécanisme par lequel l'inactivation ou la surexpression de *Pkd1* entraîne l'activation de *c-myc* est inconnu. Un mécanisme potentiel d'induction de *c-myc* correspond à la liaison et la stabilisation intracellulaire de la  $\beta$ -caténine par la polycystine-1 (Lal et al., 2008). Dans le futur, nous pourrions évaluer le rôle de la  $\beta$ -caténine en générant le modèle  $Ksp_{cre}$  ;  $\beta$ -caténine<sup>Flox</sup> ;  $Pkd1^{Flox}$  et comparer ces résultats avec ceux obtenus dans le modèle  $Ksp_{cre}$  ;  $Myc^{Flox}$  ;  $Pkd1^{Flox}$ .

Enfin, le gène *Nek8* est exprimé à des niveaux ~5 fois supérieurs chez les souris  $Pkd1_{TAG}$ ,  $SBPkd1_{TAG}$  et dans le modèle  $Pkd1^{-/-}$  comparativement aux contrôles non transgéniques (Annexe 8). La littérature suggère que la mutations de *Nek8* dans le modèle *jck* augmente l'expression de *Pkd1* et inversement, que les reins  $Pkd1^{-/-}$  démontrent de haut niveau de *Nek8* (Natoli et al, 2008). Pour notre part, nous démontrons pour la première fois que la surexpression de *Pkd1* est aussi associée à la surexpression de *Nek8* et à la présence de cils plus longs.

## Les phénotypes extrarénaux

Les souris  $Pkd1_{TAG}$  reproduisent plusieurs phénotypes extra-rénaux caractéristiques des patients atteints de la PKRAD.

Premièrement, elles développent des kystes hépatiques dans 15% des cas. Les femelles sont majoritairement affectées (4/5 souris kystiques), suggérant un effet particulier des hormones comme chez l'humain. Les kystes hépatiques proviennent de l'épithélium des conduits biliaires intrahépatiques de manière

consistante avec le patron d'expression endogène de *Pkd1* (Guillaume *et al*, 1999; Guillaume *et al*, 2000; Boulter *et al*, 2001). Il semble que les kystes soient une conséquence directe d'un effet de dosage de *Pkd1* puisque que ce phénotype hépatique soit aussi observé dans un modèle murin hypomorphe (Jiang *et al*, 2006). De façon importante, ce phénotype n'a cependant pas été observé dans notre modèle transgénique SBPkd1<sub>TAG</sub> qui dirige l'expression de *Pkd1* de manière spécifique aux reins (Thivierge *et al*, 2006). De plus, nous avons déterminé que l'expression de l'oncogène c-myc est plus élevée dans l'épithélium kystique du foie et corrèle avec l'expression du marqueur de prolifération Ki67. Les cellules affectées se développent en groupe, corrélant avec un mécanisme d'expansion clonale.

Deuxièmement, les souris Pkd1<sub>TAG</sub> développent des anomalies cardiaques et vasculaires, soit les plus fréquentes manifestations extra-rénales de la PKRAD, comme l'hypertrophie ventriculaire, l'épaississement de la paroi ventriculaire postérieure, l'augmentation du diamètre et de la surface aortique ainsi que la calcification de la paroi ventriculaire et de la valve aortique. Le patron d'expression de *Pkd1* dans l'arche aortique, les différentes valves cardiaques, la paroi atrioventriculaire et le myocarde corrèle avec les anomalies observées et suggère un effet direct de la surexpression de *Pkd1* dans leur formation (Peters *et al*, 1999; Guillaume *et al*, 1999; Guillaume *et al*, 2000; Boulter *et al*, 2001). De plus, des niveaux anormalement élevés de phosphate sanguin ont été mesuré dans le sérum, un phénomène courant associé à la calcification des valves chez les humains (Adeney *et al*, 2009). Les analyses de fonction cardiaque démontrent une augmentation du volume d'éjection aortique et du ventricule gauche suggérant la présence de reflux (Annexe 2). De manière intéressante, plusieurs animaux démontraient de l'hypertension bien que la corrélation directe entre la présence d'anomalies cardiaques et d'hypertension n'a pas été évaluée.

Troisièmement, nous avons observé une plus grande incidence du développement d'anomalies cérébrales dans les souris  $Pkd1_{TAG}$  comparativement aux souris non transgéniques. Trois jeunes souris adultes (~1 mois) ont été euthanasiées suite à des signes de détresse. Les autopsies ont démontré la présence d'œdème, d'hémorragies et d'anomalies de la structure osseuse crânienne. Une perte de l'organisation du cortex et du cervelet a été observée dû à une compression engendrée par l'accumulation de liquide sous le cortex. La présence de sang suggérait une rupture d'anévrisme, une complication majeure d'ADPKD. Les anévrismes pourraient être une cause primaire de la surexpression de *Pkd1* qui localise dans les cellules endothéliales et le muscle vasculaire lisse (Peters *et al*, 1999). Des anévrismes cérébraux asymptomatiques (non-rompu) ont aussi été observés dans la région postérieure du cortex d'une souris adulte. La présence d'hypertension pourrait aussi contribuer à la rupture des anévrismes puisqu'elle a été détectée dans les jeunes souris de 1 mois.

Ces résultats démontrent que la surexpression de *Pkd1* chez la souris représente un mécanisme pathogénique pour induire la formation d'un large spectre de phénotypes rénaux et extrarénaux humains de la PKRAD.

### **Les études de complémentations géniques**

La fonctionnalité du transgène a été évaluée à l'aide de croisements des souris  $Pkd1_{TAG}$  et  $Pkd1^{-/-}$ . Les souris  $Pkd1_{TAG6} ; Pkd1^{-/-}$  (bas nombre de copies) et  $Pkd1_{TAG26} ; Pkd1^{-/-}$  (haut nombre de copies) survivent à la naissance, démontrant que le transgène est fonctionnel et qu'il sauvegarde la létalité embryonnaire causée par l'ablation génique de *Pkd1*. Les souris adultes analysées jusqu'à 14 mois vivent normalement bien que quelques souris de la lignée 26 démontrent toujours des anomalies rénales. Ces résultats sont consistants avec la présence d'un mécanisme de dosage.

## Le mécanisme pathogénétique PKRAD

Il a été proposé que la formation de kystes dans la PKRAD était causée par l'addition d'une mutation spontanée à une mutation germinale transmise par l'un des parents, soit par un mécanisme de "two-hit". Cette hypothèse expliquait la nature focale des kystes et la présence d'une grande variation phénotypique, même observée chez les jumeaux. Toutefois, ce mécanisme pathogénétique ne corrèle pas avec les différentes études démontrant la présence de Pkd1 ou de la polycystine-1 dans les kystes rénaux (Ward *et al*, 1996; Ong *et al*, 1999b; Peters *et al*, 1999), hépatiques (Ibraghimov-Beskrovnaya *et al*, 1997) et les autres tissus PKRAD affectés (Griffin *et al*, 1997). Les études de surexpression de Pkd1 dans les modèles SBPkd1<sub>TAG</sub> (Thivierge *et al*, 1996) et Pkd1<sub>TAG</sub> ainsi que la diminution progressive de l'expression de *Pkd1* dans les modèles hypomorphes (Jiang *et al*, 2006; ) ou d'haploinsuffisance (Lantinga-van Leeuwen *et al*, 2007) supportent un modèle dans lequel tout débalancement de l'expression pourrait enclencher la kystogénèse. Ce modèle n'exclut pas le mécanisme de transmission dominant de la PKRAD et pourrait expliquer pourquoi la PKRAD se présente avec une prévalence si élevée. De manière importante, les études dans le modèle Pkd1<sub>TAG</sub> suggèrent aussi qu'un événement supplémentaire (une mutation ou une insulte physiologique) au mécanisme de dosage de Pkd1 serait nécessaire pour induire la kystogénèse, expliquant la nature focale des kystes. Une autre étude supporte ce mécanisme de "third-hit" dans le développement de la PKRAD (Takakura *et al*, 2009).

## Les souris transgéniques Pkd1<sub>ΔCoiled-coil</sub>

La construction Pkd1<sub>ΔCoiled-coil</sub> a été générée à partir du BAC-Pkd1<sub>TAG</sub> auquel nous avons supprimé 75 nucléotides de l'exon 46 correspondant au motif coiled-coil (acides aminés 4212-4236) de la polycystine-1 par recombinaison homologue.

Cette modification ne produit aucun changement au cadre de lecture et n'affecte pas la séquence située en 3' de la délétion. Comme pour les souris  $Pkd1_{TAG}$ , un fragment d'environ 75 kb a été extrait du BAC- $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$ , purifié et utilisé comme transgène lors de la microinjection.

La purification du transgène  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$  et la vérification de son intégrité à l'aide des sept sondes *Pkd1* ont été effectuées dans des conditions identiques à ceux décrites pour le transgène  $Pkd1_{TAG}$  (Voir matériel et méthodes ainsi que Annexe 10). Quatre lignées de souris possédant 2 ou 15 copies du transgène ont été générés. L'ensemble des lignées démontre une expression tissu spécifique du transgène. Le niveau d'expression corrèle avec le nombre de copie du transgène (Annexe 11). De manière surprenante, les souris  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$  d'âge comparable aux souris  $Pkd1_{TAG}$  ne développent pas de phénotype PKRAD, et ce, indépendamment du niveau d'expression. Les coupes histologiques rénales de souris adultes âgées jusqu'à 15 mois ne présentent aucune anomalie (Annexe 12). La survie des souris  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$  est comparable à celle des souris non-transgéniques. Ces résultats suggèrent que l'expression d'une protéine *Pc1* tronquée du motif coiled-coil n'a pas d'effet et n'interfère pas avec la fonction normale de la protéine endogène.

### **Analyse de la fonction rénale**

La fonction rénale évaluée via les paramètres urinaires ne varie pas de façon significative entre les souris non transgéniques et  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$  (Annexe 13), de manière consistante avec l'histologie rénale. Les paramètres tels que l'osmolalité, le taux de créatinine, les déchets azotés (BUNs) et les protéines urinaires sont comparables, confirmant que la fonction rénale est normale.

## Le phénotype rénal

Nous avons caractérisé le cil primaire de jeunes souris adultes  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$  par immunofluorescence. De manière surprenante, la longueur des cils  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$  est semblable à celle des souris non transgéniques (Annexe 15). Ce résultat est intéressant puisqu'il associe l'absence de kystes à la longueur normale des cils primaires. De plus, il démontre qu'à des niveaux équivalents d'expression, le transgène  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$  n'influence pas la longueur du cil en comparaison au transgène  $Pkd1_{TAG}$ . Ceci suggère que le motif coiled-coil est important dans le mécanisme d'induction des anomalies ciliaires dans un contexte de surexpression de *Pkd1*.

Il est intéressant de noter que le nombre de glomérule par unité de surface diminue dans les transgéniques  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$  comparativement aux souris contrôles, malgré leur fonction rénale normale (Annexe 14). De manière similaire, le nombre de glomérule varie significativement dans le rein humain adulte sans influencer la fonction rénale (Nyengaard and Bendsten, 1992). Toutefois, il est démontré que la diminution du nombre de glomérule s'accompagne d'une hypertrophie compensatoire pour que le volume glomérulaire filtré reste constant (Hoy *et al*, 2006). Cette hypertrophie est associée au développement de sclérose glomérulaire du à la demande plus grande du petit nombre de néphrons présents (Olson *et al*, 1985) et facilite le développement de maladies rénales. De manière importante, quelques souris âgées de plus de 15 mois ont démontré des anomalies rénales et extrarénales de la PKRAD. De nouvelles souris âgées de plus de 15 mois devront être analysées pour évaluer la présence d'hypertrophie glomérulaire, d'hypertension, de sclérose glomérulaire pour ainsi établir la fréquence de ces phénotypes rénaux. Pour le moment, on ne peut pas exclure une seconde hypothèse stipulant que la polycystine-1 pourrait avoir un rôle directe sur

la formation des glomérules puisqu'il est rapporté in-vitro qu'elle induit la formation de tubule dans les cellules MDCK (Boletta *et al*, 2000).

### Les études d'expression

Les analyses d'expression par PCR quantitatif démontrent que le taux d'expression rénal des gènes *Pkd2*, *c-myc*, *c-Jun* et *m-TOR* ne varie pas dans les souris  $Pkd1_{\Delta\text{Coiled-coil}}$  comparativement aux souris contrôles (Annexe 4 à 8). Cette observation suggère que la fonction de la polycystine-1 endogène, qui est toujours exprimée, ne soit pas affectée par la présence de la protéine tronquée, expliquant aussi la fonction rénale normale. De manière intéressante, les souris  $Pkd1_{\Delta\text{Coiled-coil}}$  qui ont des cils primaires de longueur normale expriment *Nek8* au même niveau que les souris non transgéniques, comparativement aux  $Pkd1_{\text{TAG}}$  qui surexpriment *Nek8* et développent des anomalies ciliaires.

### Le croisement $Pkd1_{\Delta\text{Coiled-coil}}$ ; $Pkd1^{-/-}$

Les souris transgéniques  $Pkd1_{\Delta\text{Coiled-coil}}$  ont été croisées avec les souris  $Pkd1^{-/-}$  afin de déterminer le rôle du motif coiled-coil en absence de polycystine-1 endogène. À cette fin, nous avons utilisé la lignée  $Pkd1_{\Delta\text{Coiled-coil}}$  49 qui possède 2 copies du transgène permettant de générer une approche expérimentale semblable au "Knock-in". Rappelons que l'expression du transgène  $Pkd1_{\Delta\text{Coiled-coil}}$  est régulée de manière tissu spécifique et que la présence de deux copies devrait fournir un niveau d'expression comparable au niveau endogène.

Les souris  $Pkd1_{\Delta\text{Coiled-coil}}$  49 ;  $Pkd1^{+/+}$  et  $Pkd1_{\Delta\text{Coiled-coil}}$  49 ;  $Pkd1^{+/-}$  se développent normalement et génère des adultes fertiles comparables aux souris contrôles. Comparativement, toutes les souris  $Pkd1_{\Delta\text{Coiled-coil}}$  49 ;  $Pkd1^{-/-}$  développent des dilatations massives de l'abdomen visibles dès le 5<sup>e</sup> jour. À ce stade, elles démontrent un retard de croissance et une silhouette caractéristique en forme de "poire" (Annexe 16). Les autopsies ont démontré que ces

malformations étaient causées par la présence de reins kystiques pouvant, dans certains cas, représentés 1/3 du poids total des souris. Aucune souris  $Pkd1_{\Delta\text{Coiled-coil}} 49$  ;  $Pkd1^{-/-}$  n'a survécu au-delà de 17 jours. Ce phénotype est semblable à celui observé dans le modèle d'ablation génique conditionnel  $Ksp\text{-}Cre$ ;  $Pkd1^{\text{flox/flox}}$  (Shibazaki *et al*, 2008). En effet, l'ablation rein-spécifique de *Pkd1* entraîne la formation de reins polykystiques massifs qui perdent l'organisation cortex/médulla et démontrent un aspect extérieur lisse. De plus, notre résultat corrèle avec les études d'inactivation conditionnelle qui démontrent l'existence d'une fenêtre précise durant le développement rénal où *Pkd1* doit être exprimé pour éviter la formation rapide et sévère de kystes (Piontek *et al*, 2007; Lantiga-van Leeuwen *et al*, 2007).

### **Le phénotype rénal et extrarénal**

Les phénotypes rénaux et extra-rénaux des souris  $Pkd1_{\Delta\text{Coiled-coil}} 49$  ;  $Pkd1^{-/-}$  ont été caractérisés. Dans un premier temps, nous avons déterminé que la formation des kystes rénaux débute avant le jour embryonnaire 17.5 (Annexe 17), comme dans les modèles d'ablation génique de *Pkd1*. Ils se développent rapidement et leurs dimensions progressent jusqu'à la mort des souris vers ~14 jours. Les kystes rénaux sont principalement d'origine tubulaire, bien que certains glomérules soient aussi affectés. Le marquage des différents segments du néphron par immunofluorescence démontre que les tubules proximaux et distaux sont majoritairement affectés (Annexe 25). Les analyses histologiques (Hématoxyline et éosine; Rouge Sirius) démontrent la présence d'infiltration, de fibrose (Annexe 18) et de dépôts protéiques. Plusieurs glomérules rénaux semblent normaux avant le 5<sup>e</sup> jour alors que la majorité démontre des dilatations au 10<sup>e</sup> jour. Ainsi, comme chez l'humain, tous les segments du néphron semblent affectés.

De plus, les souris  $Pkd1_{\Delta\text{Coiled-coil}} 49$  ;  $Pkd1^{-/-}$  démontrent des hypertrophies épithéliales sévères du pancréas qui sont systématiquement remplis d'un liquide

verdâtre. Les analyses histologiques révèlent principalement des dilatations et des kystes des conduits pancréatiques. Les kystes sont entourés de cellules hyperplasiques suggérant des anomalies de prolifération. Des études d'immunofluorescence utilisant le marqueur de prolifération Ki67 ont démontré une augmentation du signal dans des groupes de cellules des parois kystiques (Annexe 19) comparativement aux tissus contrôles non-kystiques. Cette observation suggère une expansion clonale des cellules, comme il a été démontré dans l'épithélium kystique humain (Torres VE, 1998). L'origine cellulaire des kystes pancréatique a été évaluée à l'aide des marqueurs endocrine (glucagon) et exocrine (amylase) du pancréas. De façon intéressante, les cellules qui prolifèrent de manière anormale sont positives pour le marqueur exocrine, soit les cellules acineuses et l'épithélium tubulaire (Annexe 19).

Comme les modèles d'ablation génique *Pkd1*, les souris  $Pkd1_{\Delta\text{Coiled-coil}}$  49 ;  $Pkd1^{-/-}$  ne présentent aucune anomalie hépatique. L'absence de fibrose hépatique supporte un phénotype de polykystose rénale dominant plutôt que récessif. En effet, la forme récessive humaine est associée à une fibrose hépatique sévère très tôt, ce qui n'est pas observé chez les patients PKRAD. Il est intéressant de noter cette particularité malgré le développement des kystes rénaux en bas âge.

La PKRAD est associée à des anomalies de formation osseuse, corrélant avec le haut niveau d'expression de *Pkd1* dans le cartilage (Turco *et al*, 1993). Chez la souris, l'ablation génique de *Pkd1* entraîne un délai sévère de formation du cartilage et de l'os débutant au jour embryonnaire 13.5 (Boulter *et al*, 2001). De manière intéressante, les souris  $Pkd1_{\Delta\text{Coiled-coil}}$  49 ;  $Pkd1^{-/-}$  sont plus petites que les contrôles. Des analyses histologiques préliminaires suggèrent aussi une diminution du nombre et de la grosseur des chondrocytes dans les os longs (Annexe 21). De façon importante, le rapport de la longueur des os (Fémur, péroné, radius, cubitus et tibia) sur la longueur totale des souris ne varie pas chez le nouveau-né (Annexe

20). Puisque le retard de croissance s'observe vers le 5<sup>e</sup> jour, ces études devront être complétées chez les souris plus âgées.

Des anomalies cérébrales ont été observées lors de la dissection des souriceaux de 10 jours. La présence de sang à l'intérieur de la boîte crânienne suggérait des hémorragies aussi dénotées dans les modèles d'ablation génique (Annexe 22). Rappelons que les souris  $Pkd1^{-/-}$  démontrent de l'œdème et des hémorragies massive qui les rendent facilement identifiable dès le jour embryonnaire e17.5. Étonnamment, les nouveaux-nés  $Pkd1_{\Delta\text{Coiled-coil}} 49 ; Pkd1^{-/-}$  ne démontrent pas d'hémorragies ou d'œdème. Cette observation expose le seul phénotype majeur des souris  $Pkd1^{-/-}$  qui n'est pas observé à la naissance des  $Pkd1_{\Delta\text{Coiled-coil}} 49 ; Pkd1^{-/-}$ , suggérant une cause de léthalité embryonnaire des souris  $Pkd1^{-/-}$ . De manière intéressante, la polycystine-1 comporte un large domaine extracellulaire formé de plusieurs motifs d'adhésion cellulaire. Elle est exprimée dans dans l'aorte abdominale et thoracique, dans les artères rénaux, cérébrale, mésentérique et vertébral ainsi que plusieurs autres vaisseaux sanguins, corrélant avec la présence d'anomalies vasculaires et d'hémorragies dans les modèles d'ablation génique de  $Pkd1$ . Puisque les souris  $Pkd1_{\Delta\text{Coiled-coil}} 49 ; Pkd1^{-/-}$  expriment une forme de la polycystine-1 qui comprend toujours son domaine extracellulaire, il est possible que la protéine conserve une fonction d'adhérence et stabilise la paroi vasculaire, expliquant la survie des souriceaux  $Pkd1_{\Delta\text{Coiled-coil}} 49 ; Pkd1^{-/-}$ . Afin de déterminer l'importance de  $Pkd1$  dans les vaisseaux sanguins, nous avons établi une approche conditionnelle d'ablation dans la souris. Pour ce faire, nous avons croisé le modèle  $Pkd1^{\text{Flox}}$  (Piontek *et al*, 2004) avec des souris qui expriment une cre recombinase sous le contrôle du promoteur Tie2 (Kisakuni *et al*, 2001). Bientôt, ce nouveau modèle nous permettra d'établir le rôle de  $Pkd1$  dans l'endothélium vasculaire.

## Le mécanisme pathogénétique

Il a été proposé que la polycystine-1 joue un rôle crucial dans l'initiation de la formation des jonctions cellules-cellules (Streets *et al*, 2009). Dans cet article, les auteurs suggèrent que la polycystine-1 s'associe avec la E-cadhérin de manière coiled-coil indépendante pour réguler la formation des complexes de jonction cellulaire et proposent que la formation de kyste dans les modèles d'ablation génique de *Pkd1* serait consécutive à l'absence de ce complexe. De manière intéressante, les souris *Pkd1* $_{\Delta\text{Coiled-coil}}$  49 ; *Pkd1*<sup>-/-</sup> qui possèdent le site potentiel d'interaction polycystine-1/E-cadhérin forment toujours des kystes rénaux. Ces observations suggèrent que la kystogenèse rénale serait indépendante de la liaison de l'E-cadhérin à la polycystine-1 et suggère plutôt qu'un partenaire liant le motif coiled-coil serait lié au développement de kystes. Il est à noter que l'absence de la liaison d'une protéine adaptatrice ou la modification de la structure intracellulaire de la polycystine-1 pourrait aussi être responsable du phénotype kystique. Des analyses supplémentaires devront être réalisées pour exclure ces possibilités.

Enfin, nous avons démontré que la délétion du motif coiled-coil entraîne un phénotype similaire à l'ablation totale de *Pkd1* dans le rein, suggérant un rôle critique du motif coiled-coil à la fonction de la polycystine-1. Nos résultats suggèrent aussi que le motif coiled-coil possède des rôles distincts dans les différents tissus où il est exprimé puisqu'il sauvegarde la léthalité embryonnaire des souris *Pkd1*<sup>-/-</sup> mais conserve certains phénotypes tel que les kystes rénaux et pancréatiques.

## Les souris transgéniques CUX-1

Notre laboratoire a collaboré avec le groupe du Dr. Bouchard pour déterminer le rôle d'un isoforme de la protéine Cux-1 dans le développement de la polykystose rénale. Rappelons que la protéine Cux-1 est surexprimée dans les tissus kystiques mais que sa surexpression n'est pas suffisante pour induire un phénotype rénal. Ensemble, nous avons démontré qu'un isoforme créé à partir d'un promoteur situé dans l'exon 20 de *Cux-1*, nommé p75-Cux1, est aussi surexprimé dans les tissus kystiques des souris *Pkd1<sup>-/-</sup>* et que, comparativement à *Cux-1*, il peut induire la kystogenèse rénale dans un modèle de surexpression (Cadieux *et al*, 2008).

## Conclusion

En conclusion, nous avons démontré que la surexpression de *Pkd1* est suffisante pour induire la PKRAD in-vivo. Comparativement aux modèles murins d'ablation génique, la surexpression reproduit les phénotypes rénaux et extrarénaux caractéristiques des patients, dont les anomalies hépatiques, pancréatiques, cardiaques et cérébrales. Notre étude supporte un mécanisme de dosage pour induire la kystogenèse rénale. De plus, nous avons observé l'augmentation de l'expression du gène *c-myc* dans les kystes rénaux et hépatiques. Cette redondance d'expression dans différents organes affectés suggère *c-myc* comme un membre important de la voie *Pkd1* et une cible thérapeutique potentielle pour inhiber la croissance des kystes.

D'autre part, nous avons démontré l'importance de l'intégrité du motif coiled-coil de la polycystine-1 à sa fonction. Dans une approche transgénique, la protéine tronquée du motif coiled-coil n'interfère pas et n'entraîne pas les phénotypes observés par la surexpression d'une protéine endogène ( $Pkd1_{TAG}$ ). Inversement, dans un fond génétique  $Pkd1^{-/-}$ , l'expression d'une protéine tronquée reproduit des phénotypes rénaux et pancréatiques sévères, comme dans les modèles d'ablation génique de *Pkd1*.

Enfin, ces deux modèles transgéniques de polykystose rénale autosomique dominante représentent des outils importants pour définir les voies de signalisation impliquées dans les mécanismes de kystogenèse induit par *Pkd1* et évaluer des stratégies thérapeutiques.

## Bibliographie

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

Adeney KL, Siscovick DS, Ix JH, Seliger SL, Shlipak MG, Jenny NS, Kestenbaum BR (2009) Association of serum phosphate with vascular and valvular calcification in moderate CKD. *J Am Soc Nephrol* **20**: 381-387.

Afzelius BA (2004) Cilia-related diseases. *J Pathol* **204**: 470-477.

Aguiari G, Trimi V, Bogo M, Mangolini A, Szabadkai G, Pinton P, Witzgall R, Harris PC, Borea PA, Rizzuto R, del Senno L (2008) Novel role for polycystin-1 in modulating cell proliferation through calcium oscillations in kidney cells. *Cell Prolif* **41**: 554-573.

Alcalay NI, Sharma M, Vassmer D, Chapman B, Paul B, Zhou J, Brantley JG, Wallace DP, Maser RL, Vanden Heuvel GB (2008) Acceleration of polycystic kidney disease progression in cpk mice carrying a deletion in the homeodomain protein Cux1. *Am J Physiol Renal Physiol* **295**: F1725-1734.

Alehan FK, Gurakan B, Agildere M (2002) Familial arachnoid cysts in association with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Pediatrics* **110**: e13.

Allen A, Wiegmann TB, MacDougall ML (1986) Arachnoid cyst in a patient with autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* **8**: 128-130.

Amann K, Tornig J, Nichols C, Zeier M, Mall G, Ritz E (1995) Effect of ACE inhibitors, calcium channel blockers and their combination on renal and extrarenal structures in renal failure. *Nephrol Dial Transplant* **10 Suppl 9**: 33-38.

Asari S, Ohmoto T (1993) Natural history and risk factors of unruptured cerebral aneurysms. *Clin Neurol Neurosurg* **95**: 205-214.

Avner ED, Piesco NP, Sweeney WE, Jr., Studnicki FM, Fetterman GH, Ellis D (1984) Hydrocortisone-induced cystic metanephric maldevelopment in serum-free organ culture. *Lab Invest* **50**: 208-218.

Babich V, Zeng WZ, Yeh BI, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Cai Y, Somlo S, Huang CL (2004) The N-terminal extracellular domain is required for polycystin-1-dependent channel activity. *J Biol Chem* **279**: 25582-25589.

Bachner L, Vinet MC, Lacave R, Babron MC, Rondeau E, Sraer JD, Chevet D, Kaplan JC (1990) Linkage study of a large family with autosomal dominant polycystic kidney disease with reduced expression. Absence of linkage to the PKD 1 locus. *Hum Genet* **85**: 221-227.

Badenas C, Torra R, Perez-Oller L, Mallolas J, Talbot-Wright R, Torregrosa V, Darnell A (2000) Loss of heterozygosity in renal and hepatic epithelial cystic cells from ADPKD1 patients. *Eur J Hum Genet* **8**: 487-492.

Baena-Lopez LA, Baonza A, Garcia-Bellido A (2005) The orientation of cell divisions determines the shape of Drosophila organs. *Curr Biol* **15**: 1640-1644.

Bahceci F, Sari R, Sarikaya M, Atik E, Karıncaoglu Y, Sevinc A (2004) Renal failure in a patient with autosomal dominant polycystic kidney disease and coexisting dermatomyositis: first report in the literature. *J Natl Med Assoc* **96**: 844-846.

Bajwa ZH, Sial KA, Malik AB, Steinman TI (2004) Pain patterns in patients with polycystic kidney disease. *Kidney Int* **66**: 1561-1569.

Banerjee AK, Rana PV (1976) Cerebral AV malformation and aneurysm with polycystic kidney. *Neurol India* **24**: 160-161.

Bardaji A, Martinez-Vea A, Valero A, Gutierrez C, Garcia C, Ridao C, Oliver JA, Richart C (2001) Cardiac involvement in autosomal-dominant polycystic kidney disease: a hypertensive heart disease. *Clin Nephrol* **56**: 211-220.

Basar O, Ibis M, Ucar E, Ertugrul I, Yolcu OF, Koklu S, Parlak E, Ulker A (2006) Recurrent pancreatitis in a patient with autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Pancreatology* **6**: 160-162.

Bergmann C, Senderek J, Sedlacek B, Pegiazoglou I, Puglia P, Eggermann T, Rudnik-Schoneborn S, Furu L, Onuchic LF, De Baca M, Germino GG, Guay-Woodford L, Somlo S, Moser M, Buttner R, Zerres K (2003) Spectrum of mutations in the gene for autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD/PKHD1). *J Am Soc Nephrol* **14**: 76-89.

Bernstein J (1987) Hepatic involvement in hereditary renal syndromes. *Birth Defects Orig Artic Ser* **23**: 115-130.

Bhunja AK, Piontek K, Boletta A, Liu L, Qian F, Xu PN, Germino FJ, Germino GG (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.

Birnbaumer L, Zhu X, Jiang M, Boulay G, Peyton M, Vannier B, Brown D, Platano D, Sadeghi H, Stefani E, Birnbaumer M (1996) On the molecular basis and regulation of cellular capacitative calcium entry: roles for Trp proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 15195-15202.

Bisgrove BW, Yost HJ (2006) The roles of cilia in developmental disorders and disease. *Development* **133**: 4131-4143.

Blaszak RT, Potaman V, Sinden RR, Bissler JJ (1999) DNA structural transitions within the PKD1 gene. *Nucleic Acids Res* **27**: 2610-2617.

Bogdanova N, Dworniczak B, Dragova D, Todorov V, Dimitrakov D, Kalinov K, Hallmayer J, Horst J, Kalaydjieva L (1995) Genetic heterogeneity of polycystic kidney disease in Bulgaria. *Hum Genet* **95**: 645-650.

Bogdanova N, Markoff A, Gerke V, McCluskey M, Horst J, 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 LF, Bhunia AK, Phakdeekitcharoen B, Hanaoka K, Guggino W, Monaco L, Germino GG (2000) Polycystin-1, the gene product of PKD1, induces resistance to apoptosis and spontaneous tubulogenesis in MDCK cells. *Mol Cell* **6**: 1267-1273.

Bouba I, Koptides M, Mean R, Costi CE, Demetriou K, Georgiou I, Pierides A, Siamopoulos K, Deltas CC (2001) Novel PKD1 deletions and missense variants in a cohort of Hellenic polycystic kidney disease families. *Eur J Hum Genet* **9**: 677-684.

Boulter C, Mulroy S, Webb S, Fleming S, Brindle K, 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 CA, Aguzzi A, Evans MJ, Affara N (1992) A chimaeric mouse model for autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Contrib Nephrol* **97**: 60-70.

Brasier JL, Henske EP (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.

Burtey S, Riera M, Ribe E, Pennekamp P, Passage E, Rance R, Dworniczak B, Fontes M (2008) Overexpression of PKD2 in the mouse is associated with renal tubulopathy. *Nephrol Dial Transplant* **23**: 1157-1165.

Butler WE, Barker FG, 2nd, Crowell RM (1996) Patients with polycystic kidney disease would benefit from routine magnetic resonance angiographic screening for intracerebral aneurysms: a decision analysis. *Neurosurgery* **38**: 506-515; discussion 515-506.

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

Cadieux C, Harada R, Paquet M, Cote O, Trudel M, Nepveu A, Bouchard M (2008) Polycystic kidneys caused by sustained expression of Cux1 isoform p75. *J Biol Chem* **283**: 13817-13824.

Cano DA, Sekine S, Hebrok M (2006) Primary cilia deletion in pancreatic epithelial cells results in cyst formation and pancreatitis. *Gastroenterology* **131**: 1856-1869.

Chapman AB, Guay-Woodford LM, Grantham JJ, Torres VE, Bae KT, Baumgarten DA, Kenney PJ, King BF, Jr., Glockner JF, Wetzel LH, Brummer ME, O'Neill WC, Robbin

ML, Bennett WM, Klahr S, Hirschman GH, Kimmel PL, Thompson PA, Miller JP (2003) Renal structure in early autosomal-dominant polycystic kidney disease (ADPKD): The Consortium for Radiologic Imaging Studies of Polycystic Kidney Disease (CRISP) cohort. *Kidney Int* **64**: 1035-1045.

Chapman AB, Gabow PA (1997) Hypertension in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int Suppl* **61**: S71-73.

Chapman AB, Gabow PA, Schrier RW (1991) Reversible renal failure associated with angiotensin-converting enzyme inhibitors in polycystic kidney disease. *Ann Intern Med* **115**: 769-773.

Chapman AB, Johnson A, Gabow PA, Schrier RW (1990) The renin-angiotensin-aldosterone system and autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* **323**: 1091-1096.

Chapman AB, Johnson AM, Gabow PA, Schrier RW (1994) Overt proteinuria and microalbuminuria in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* **5**: 1349-1354.

Chapman AB, Rubinstein D, Hughes R, Stears JC, Earnest MP, Johnson AM, Gabow PA, Kaehny WD (1992) Intracranial aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* **327**: 916-920.

Chapman JR, Hilson AJ (1980) Polycystic kidneys and abdominal aortic aneurysms. *Lancet* **1**: 646-647.

Chauveau D, Pirson Y, Verellen-Dumoulin C, Macnicol A, Gonzalo A, Grunfeld JP (1994) Intracranial aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* **45**: 1140-1146.

Chen XZ, Segal Y, Basora N, Guo L, Peng JB, Babakhanlou H, Vassilev PM, Brown EM, Hediger MA, Zhou J (2001) Transport function of the naturally occurring pathogenic polycystin-2 mutant, R742X. *Biochem Biophys Res Commun* **282**: 1251-1256.

Chernova MN, Vandorpe DH, Clark JS, Alper SL (2005) Expression of the polycystin-1 C-terminal cytoplasmic tail increases Cl channel activity in *Xenopus* oocytes. *Kidney Int* **68**: 632-641.

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

Cobben JM, Breuning MH, Schoots C, ten Kate LP, Zerres K (1990) Congenital hepatic fibrosis in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* **38**: 880-885.

Cogswell C, Price SJ, Hou X, Guay-Woodford LM, Flaherty L, Bryda EC (2003) Positional cloning of *jcpk/bpk* locus of the mouse. *Mamm Genome* **14**: 242-249.

Cole DG, Diener DR, Himelblau AL, Beech PL, Fuster JC, Rosenbaum JL (1998) *Chlamydomonas* kinesin-II-dependent intraflagellar transport (IFT): IFT particles contain proteins required for ciliary assembly in *Caenorhabditis elegans* sensory neurons. *J Cell Biol* **141**: 993-1008.

Coqueret O, Berube G, Nepveu A (1998) The mammalian Cut homeodomain protein functions as a cell-cycle-dependent transcriptional repressor which downmodulates p21WAF1/CIP1/SDI1 in S phase. *Embo J* **17**: 4680-4694.

Curatolo P, Bombardieri R, Jozwiak S (2008) Tuberous sclerosis. *Lancet* **372**: 657-668.

D'Agata ID, Jonas MM, Perez-Atayde AR, Guay-Woodford LM (1994) Combined cystic disease of the liver and kidney. *Semin Liver Dis* **14**: 215-228.

Dalgaard OZ (1957) Bilateral polycystic disease of the kidneys; a follow-up of 284 patients and their families. *Dan Med Bull* **4**: 128-133.

Daoust MC, Reynolds DM, Bichet DG, Somlo S (1995) Evidence for a third genetic locus for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Genomics* **25**: 733-736.

Davies PF (1995) Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev* **75**: 519-560.

de Almeida S, de Almeida E, Peters D, Pinto JR, Tavora I, Lavinha J, Breuning M, Prata MM (1995) Autosomal dominant polycystic kidney disease: evidence for the existence of a third locus in a Portuguese family. *Hum Genet* **96**: 83-88.

de Mattos AM, Olyaei AJ, Prather JC, Golconda MS, Barry JM, Norman DJ (2005) Autosomal-dominant polycystic kidney disease as a risk factor for diabetes mellitus following renal transplantation. *Kidney Int* **67**: 714-720.

Delmas P (2005) Polycystins: polymodal receptor/ion-channel cellular sensors. *Pflugers Arch* **451**: 264-276.

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

Devriendt K, Doooms L, Proesmans W, de Zegher F, Desmet V, Eggermont E (1996) Paucity of intrahepatic bile ducts, solitary kidney and atrophic pancreas with diabetes mellitus: atypical Alagille syndrome? *Eur J Pediatr* **155**: 87-90.

Dressler GR, Wilkinson JE, Rothenpieler UW, Patterson LT, Williams-Simons L, Westphal H (1993) Deregulation of Pax-2 expression in transgenic mice generates severe kidney abnormalities. *Nature* **362**: 65-67.

Du J, Wilson PD (1995) Abnormal polarization of EGF receptors and autocrine stimulation of cyst epithelial growth in human ADPKD. *Am J Physiol* **269**: C487-495.

Ducloux D, Motte G, Vautrin P, Bresson-Vautrin C, Rebibou JM, Chalopin JM (1999) Polycystic kidney disease as a risk factor for post-transplant diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant* **14**: 1244-1246.

Eccer T, Schrier RW (2001) Hypertension in autosomal-dominant polycystic kidney disease: early occurrence and unique aspects. *J Am Soc Nephrol* **12**: 194-200.

Edelstein CL (2008) Mammalian target of rapamycin and caspase inhibitors in polycystic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* **3**: 1219-1226.

Errasti P, Manrique J, Lavilla J, Rossich E, Hernandez A, Pujante D, Ndarabu A, Garcia N, Purroy A (2003) Autosomal-dominant polycystic kidney disease: high prevalence of graft

loss for death-related malignancies and cardiovascular risk factors. *Transplant Proc* **35**: 1717-1719.

Eschbach JW, Adamson JW (1988) Modern aspects of the pathophysiology of renal anemia. *Contrib Nephrol* **66**: 63-70.

Ettinger A, Kahn PC, Wise HM, Jr. (1969) The importance of selective renal angiography in the diagnosis of polycystic disease. *J Urol* **102**: 156-161.

Evan AP, Gardner KD, Jr. (1976) Comparison of human polycystic and medullary cystic kidney disease with diphenylamine-induced cystic disease. *Lab Invest* **35**: 93-101.

Everson GT (1990) Hepatic cysts in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Mayo Clin Proc* **65**: 1020-1025.

Everson GT, Scherzinger A, Berger-Leff N, Reichen J, Lezotte D, Manco-Johnson M, Gabow P (1988) Polycystic liver disease: quantitation of parenchymal and cyst volumes from computed tomography images and clinical correlates of hepatic cysts. *Hepatology* **8**: 1627-1634.

Faber M, Kupin W (1987) Renal cell carcinoma and acquired cystic kidney disease after renal transplantation. *Lancet* **1**: 1030-1031.

Fick GM, Johnson AM, Hammond WS, Gabow PA (1995) Causes of death in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* **5**: 2048-2056.

Fischer E, Legue E, Doyen A, Nato F, Nicolas JF, Torres V, Yaniv M, Pontoglio M (2006) Defective planar cell polarity in polycystic kidney disease. *Nat Genet* **38**: 21-23

Fliser D, Pacini G, Engelleiter R, Kautzky-Willer A, Prager R, Franek E, Ritz E (1998) Insulin resistance and hyperinsulinemia are already present in patients with incipient renal disease. *Kidney Int* **53**: 1343-1347.

Foggensteiner L, Bevan AP, Thomas R, Coleman N, Boulter C, Bradley J, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Klinger K, 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 M, Atanasoski S, Sancho S, Magyar JP, Rulicke T, Schwab ME, Suter U (2000) Progressive segregation of unmyelinated axons in peripheral nerves, myelin alterations in the CNS, and cyst formation in the kidneys of myelin and lymphocyte protein-overexpressing mice. *J Neurochem* **75**: 1927-1939.

Gabow PA, Duley I, Johnson AM (1992) Clinical profiles of gross hematuria in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* **20**: 140-143.

Gabow PA, Ikle DW, Holmes JH (1984) Polycystic kidney disease: prospective analysis of nonazotemic patients and family members. *Ann Intern Med* **101**: 238-247.

Gabow PA, Johnson AM, Kaehny WD, Manco-Johnson ML, Duley IT, Everson GT (1990) Risk factors for the development of hepatic cysts in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hepatology* **11**: 1033-1037.

Gabow PA, Schrier RW (1989) Pathophysiology of adult polycystic kidney disease. *Adv Nephrol Necker Hosp* **18**: 19-32.

Garcia-Otin AL, Guillou F (2006) Mammalian genome targeting using site-specific recombinases. *Front Biosci* **11**: 1108-1136.

Geng L, Okuhara D, Yu Z, Tian X, Cai Y, Shibasaki S, Somlo S (2006) Polycystin-2 traffics to cilia independently of polycystin-1 by using an N-terminal RVxP motif. *J Cell Sci* **119**: 1383-1395.

Geng L, Segal Y, Peissel B, Deng N, Pei Y, Carone F, Rennke HG, Glucksmann-Kuis AM, Schneider MC, Ericsson M, Reeders ST, Zhou J (1996) Identification and localization of polycystin, the PKD1 gene product. *J Clin Invest* **98**: 2674-2682.

George JC (1992) Congestive heart failure in a patient with autosomal dominant polycystic kidney disease. *AJR Am J Roentgenol* **159**: 1348-1349.

Germino GG, Somlo S (1992) A positional cloning approach to inherited renal disease. *Semin Nephrol* **12**: 541-553.

Giamarchi A, Padilla F, Crest M, Honore E, Delmas P (2006) TRPP2: Ca<sup>2+</sup>-permeable cation channel and more. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **52**: 105-114.

Gibbs GF, Huston J, 3rd, Qian Q, Kubly V, Harris PC, Brown RD, Jr., Torres VE (2004) Follow-up of intracranial aneurysms in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* **65**: 1621-1627.

Gieteling EW, Rinkel GJ (2003) Characteristics of intracranial aneurysms and subarachnoid haemorrhage in patients with polycystic kidney disease. *J Neurol* **250**: 418-423.

Gillmor SA, Villasenor A, Fletterick R, Sigal E, Browner MF (1997) The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity. *Nat Struct Biol* **4**: 1003-1009.

Goilav B, Satlin LM, Wilson PD (2008) Pathways of apoptosis in human autosomal recessive and autosomal dominant polycystic kidney diseases. *Pediatr Nephrol* **23**: 1473-1482.

Gong Y, Ma Z, Patel V, Fischer E, Hiesberger T, Pontoglio M, Igarashi P (2009) HNF-1beta regulates transcription of the PKD modifier gene Kif12. *J Am Soc Nephrol* **20**: 41-47.

Gong Y, Mo C, Fraser SE (2004) Planar cell polarity signalling controls cell division orientation during zebrafish gastrulation. *Nature* **430**: 689-693.

Gonzalez-Perrett S, Kim K, Ibarra C, Damiano AE, Zotta E, Batelli M, Harris PC, Reisin IL, Arnaout MA, Cantiello HF (2001) Polycystin-2, the protein mutated in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), is a Ca<sup>2+</sup>-permeable nonselective cation channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 1182-1187.

Gorivodsky M, Mukhopadhyay M, Wilsch-Braeuninger M, Phillips M, Teufel A, Kim C, Malik N, Huttner W, Westphal H (2009) Intraflagellar transport protein 172 is essential for primary cilia formation and plays a vital role in patterning the mammalian brain. *Dev Biol* **325**: 24-32.

Grantham JJ (1983) Polycystic kidney disease: a predominance of giant nephrons. *Am J Physiol* **244**: F3-10.

Grantham JJ (1988) Polycystic kidney disease--an old problem in a new context. *N Engl J Med* **319**: 944-946.

Grantham JJ (2008) Clinical practice. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* **359**: 1477-1485.

Grantham JJ, Geiser JL, Evan AP (1987) Cyst formation and growth in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* **31**: 1145-1152.

Griffin MD, Torres VE, Kumar R (1997) Cystic kidney diseases. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **6**: 276-283.

Grunfeld JP, Albouze G, Jungers P, Landais P, Dana A, Droz D, Moynot A, Lafforgue B, Boursztyn E, Franco D (1985) Liver changes and complications in adult polycystic kidney disease. *Adv Nephrol Necker Hosp* **14**: 1-20.

Guay-Woodford LM, Wright CJ, Walz G, Churchill GA (2000) Quantitative trait loci modulate renal cystic disease severity in the mouse bpk model. *J Am Soc Nephrol* **11**: 1253-1260.

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

Gunaratne HJ, Moy GW, Kinukawa M, Miyata S, Mah SA, Vacquier VD (2007) The 10 sea urchin receptor for egg jelly proteins (SpREJ) are members of the polycystic kidney disease-1 (PKD1) family. *BMC Genomics* **8**: 235.

Hanaoka K, Qian F, Boletta A, Bhunia AK, Piontek K, Tsiokas L, Sukhatme VP, Guggino WB, Germino GG (2000) Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents. *Nature* **408**: 990-994.

Handa SP (2006) Cardiovascular manifestations of autosomal dominant polycystic kidney disease in young adults. *Clin Invest Med* **29**: 339-346.

Harris PC, Bae KT, Rossetti S, Torres VE, Grantham JJ, Chapman AB, Guay-Woodford LM, King BF, Wetzel LH, Baumgarten DA, Kenney PJ, Consugar M, Klahr S, Bennett WM, Meyers CM, Zhang QJ, Thompson PA, Zhu F, Miller JP (2006) Cyst number but not the rate of cystic growth is associated with the mutated gene in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* **17**: 3013-3019.

Harris PC, Torres VE (2008) Polycystic Kidney Disease. *Annu Rev Med*.

Harris PC, Ward CJ, Peral B, Hughes J (1995a) Autosomal dominant polycystic kidney disease: molecular analysis. *Hum Mol Genet* **4 Spec No**: 1745-1749.

Harris PC, Ward CJ, Peral B, Hughes J (1995b) Polycystic kidney disease. 1: Identification and analysis of the primary defect. *J Am Soc Nephrol* **6**: 1125-1133.

Hartz PA, Wilson PD (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.

Hayashi T, Mochizuki T, Reynolds DM, Wu G, Cai Y, Somlo S (1997) Characterization of the exon structure of the polycystic kidney disease 2 gene (PKD2). *Genomics* **44**: 131-136.

Herrera GA (1991) C-erb B-2 amplification in cystic renal disease. *Kidney Int* **40**: 509-513.

Hiesberger T, Shao X, Gourley E, Reimann A, Pontoglio M, Igarashi P (2005) Role of the hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta) C-terminal domain in Pkhd1 (ARPKD) gene transcription and renal cystogenesis. *J Biol Chem* **280**: 10578-10586.

Hildebrandt F, Otto E, Rensing C, Nothwang HG, Vollmer M, Adolphs J, Hanusch H, Brandis M (1997) A novel gene encoding an SH3 domain protein is mutated in nephronophthisis type 1. *Nat Genet* **17**: 149-153.

Hildebrandt F, Zhou W (2007) Nephronophthisis-associated ciliopathies. *J Am Soc Nephrol* **18**: 1855-1871.

Hjelmsaeth J, Hartmann A (1999) Insulin resistance in patients with adult polycystic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* **14**: 2521-2522.

Hoche B, Thone-Reineke C, Rohmeiss P, Schmager F, Slowinski T, Burst V, Siegmund F, Quertermous T, Bauer C, Neumayer HH, Schleuning WD, Theuring F (1997) Endothelin-1 transgenic mice develop glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, and renal cysts but not hypertension. *J Clin Invest* **99**: 1380-1389.

Hogan MC, Manganelli L, Woollard JR, Masyuk AI, Masyuk TV, Tammachote R, Huang BQ, Leontovich AA, Beito TG, Madden BJ, Charlesworth MC, Torres VE, LaRusso NF,

Harris PC, Ward CJ (2009) Characterization of PKD protein-positive exosome-like vesicles. *J Am Soc Nephrol* **20**: 278-288.

Hossack KF, Leddy CL, Johnson AM, Schrier RW, Gabow PA (1988) Echocardiographic findings in autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* **319**: 907-912.

Hou X, Mrug M, Yoder BK, Lefkowitz EJ, Kremmidiotis G, D'Eustachio P, Beier DR, Guay-Woodford LM (2002) Cystin, a novel cilia-associated protein, is disrupted in the cpk mouse model of polycystic kidney disease. *J Clin Invest* **109**: 533-540.

Hoy WE, Samuel T, Hughson MD (2006) Reduce nephron number and glomerulomegaly in Australian Aborigines: a group at high risk for renal disease and hypertension. *Kidney Int* **70**: 104-110.

Hu MC, Piscione TD, Rosenblum ND (2003) Elevated SMAD1/beta-catenin molecular complexes and renal medullary cystic dysplasia in ALK3 transgenic mice. *Development* **130**: 2753-2766.

Huan Y, 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 CJ, Aspinwall R, Butler R, Harris PC (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 CJ, Peral B, Aspinwall R, Clark K, San Millan JL, Gamble V, Harris PC (1995) The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nat Genet* **10**: 151-160.

Huston J, 3rd, Torres VE, Sullivan PP, Offord KP, Wiebers DO (1993) Value of magnetic resonance angiography for the detection of intracranial aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* **3**: 1871-1877.

Huston J, 3rd, Torres VE, Wiebers DO, Schievink WI (1996) Follow-up of intracranial aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease by magnetic resonance angiography. *J Am Soc Nephrol* **7**: 2135-2141.

Iakoubova OA, Dushkin H, Beier DR (1995) Localization of a murine recessive polycystic kidney disease mutation and modifying loci that affect disease severity. *Genomics* **26**: 107-114.

Ibels LS, Alfrey AC, Huffer WE, Craswell PW, Anderson JT, Weil R, 3rd (1979) Arterial calcification and pathology in uremic patients undergoing dialysis. *Am J Med* **66**: 790-796.

Ibraghimov-Beskrovnaya O, Dackowski WR, Foggensteiner L, Coleman N, Thiru S, Petry LR, Burn TC, Connors TD, Van Raay T, Bradley J, Qian F, Onuchic LF, Watnick TJ, Piontek K, Hakim RM, Landes GM, Germino GG, Sandford R, Klinger KW (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.

Ibrahim S (2007) Increased apoptosis and proliferative capacity are early events in cyst formation in autosomal-dominant, polycystic kidney disease. *ScientificWorldJournal* **7**: 1757-1767.

Iglesias CG, Torres VE, Offord KP, Holley KE, Beard CM, Kurland LT (1983) Epidemiology of adult polycystic kidney disease, Olmsted County, Minnesota: 1935-1980. *Am J Kidney Dis* **2**: 630-639.

Ishibashi A (1981) Renal imagings in the diagnosis of polycystic kidney disease. *Nippon Jinzo Gakkai Shi* **23**: 1003-1013.

Jiang ST, Chiou YY, Wang E, Lin HK, Lin YT, Chi YC, Wang CK, Tang MJ, Li H (2006) Defining a link with autosomal-dominant polycystic kidney disease in mice with congenitally low expression of Pkd1. *Am J Pathol* **168**: 205-220.

Juvela S, Porras M, Heiskanen O (1993) Natural history of unruptured intracranial aneurysms: a long-term follow-up study. *J Neurosurg* **79**: 174-182.

Kaehny WD, Everson GT (1991) Extrarenal manifestations of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Semin Nephrol* **11**: 661-670.

Kay BK, Williamson MP, Sudol M (2000) The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *Faseb J* **14**: 231-241.

Kelleher CL, McFann KK, Johnson AM, Schrier RW (2004) Characteristics of hypertension in young adults with autosomal dominant polycystic kidney disease compared with the general U.S. population. *Am J Hypertens* **17**: 1029-1034.

Keller R (2002) Shaping the vertebrate body plan by polarized embryonic cell movements. *Science* **298**: 1950-1954.

Kelley KA, Agarwal N, Reeders S, 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 VP, Walz G (1999a) Interaction between RGS7 and polycystin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 6371-6376.

Kim E, Arnould T, Sellin LK, Benzing T, Fan MJ, Gruning W, Sokol SY, Drummond I, Walz G (1999b) The polycystic kidney disease 1 gene product modulates Wnt signaling. *J Biol Chem* **274**: 4947-4953.

Kim H, Bae Y, Jeong W, Ahn C, Kang S (2004) Depletion of PKD1 by an antisense oligodeoxynucleotide induces premature G1/S-phase transition. *Eur J Hum Genet* **12**: 433-440.

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

Kimberling WJ, Kumar S, Gabow PA, Kenyon JB, Connolly CJ, Somlo S (1993) Autosomal dominant polycystic kidney disease: localization of the second gene to chromosome 4q13-q23. *Genomics* **18**: 467-472.

Kissane JM (1990) Renal cysts in pediatric patients. A classification and overview. *Pediatr Nephrol* **4**: 69-77.

Klingel R, Ramadori G, Schuppan D, Knittel T, Meyer zum Buschenfelde KH, Kohler H (1993) Coexpression of extracellular matrix glycoproteins undulin and tenascin in human autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nephron* **65**: 111-118.

Kobayashi H, Munemoto S, Hayashi M, Yamamoto S (1984) Association of persistent hypoglossal artery, multiple intracranial aneurysms, and polycystic disease. *Surg Neurol* **21**: 258-260.

Kobe B, Deisenhofer J (1994) The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem Sci* **19**: 415-421.

Kokot F, Grzeszczak W, Zukowska-Szzechowska E, Wiecek A (1990) Endocrine alterations in kidney transplant patients. *Blood Purif* **8**: 76-86.

Kolb RJ, Nauli SM (2008) Ciliary dysfunction in polycystic kidney disease: an emerging model with polarizing potential. *Front Biosci* **13**: 4451-4466.

Kolpakova-Hart E, McBratney-Owen B, Hou B, Fukai N, Nicolae C, Zhou J, Olsen BR (2008) Growth of cranial synchondroses and sutures requires polycystin-1. *Dev Biol* **321**: 407-419.

Kottgen M (2007) TRPP2 and autosomal dominant polycystic kidney disease. *Biochim Biophys Acta* **1772**: 836-850.

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

Kozlowski P, Bissler J, Pei Y, Kwiatkowski DJ (2008) Analysis of PKD1 for genomic deletion by multiplex ligation-dependent probe assay: absence of hot spots. *Genomics* **91**: 203-208.

Kulla L, Deymeer F, Smith TW, Weiner M, Mullins TF, 3rd (1982) Intracranial dissecting and saccular aneurysms in polycystic kidney disease. *Arch Neurol* **39**: 776-778.

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

Lal M, Song X, Pluznick JL, Di Giovanni V, Merrick DM, Rosenblum ND, Chauvet V, Gottardi CJ, Pei Y, Caplan MJ (2008) Polycystin-1 C-terminal tail associates with beta-catenin and inhibits canonical Wnt signaling. *Hum Mol Genet* **17**: 3105-3117.

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

Lantinga-van Leeuwen IS, Dauwerse JG, Baelde HJ, Leonhard WN, van de Wal A, Ward CJ, Verbeek S, Deruiter MC, Breuning MH, de Heer E, Peters DJ (2004) Lowering of Pkd1 expression is sufficient to cause polycystic kidney disease. *Hum Mol Genet* **13**: 3069-3077.

Lantinga-van Leeuwen IS, Leonhard WN, van der Wal A, Breuning MH, de Heer E, Peters DJ (2007) Kidney-specific inactivation of the Pkd1 gene induces rapid cyst formation in developing kidneys and a slow onset of disease in adult mice. *Hum Mol Genet* **16**: 3188-3196.

Latta H, Maunsbach AB, Madden SC (1961) Cilia in different segments of the rat nephron. *J Biophys Biochem Cytol* **11**: 248-252.

Le NH, van der Wal A, van der Bent P, Lantinga-van Leeuwen IS, Breuning MH, van Dam H, de Heer E, Peters DJ (2005) Increased activity of activator protein-1 transcription factor components ATF2, c-Jun, and c-Fos in human and mouse autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* **16**: 2724-2731.

Ledford AW, Brantley JG, Kemeny G, Foreman TL, Quaggin SE, Igarashi P, Oberhaus SM, Rodova M, Calvet JP, Vanden Heuvel GB (2002) Deregulated expression of the homeobox gene Cux-1 in transgenic mice results in downregulation of p27(kip1) expression during nephrogenesis, glomerular abnormalities, and multiorgan hyperplasia. *Dev Biol* **245**: 157-171.

Leier CV, Baker PB, Kilman JW, Wooley CF (1984) Cardiovascular abnormalities associated with adult polycystic kidney disease. *Ann Intern Med* **100**: 683-688.

Levey AS, Pauker SG, Kassirer JP (1983) Occult intracranial aneurysms in polycystic kidney disease. When is cerebral arteriography indicated? *N Engl J Med* **308**: 986-994.

Levine E, Grantham JJ (1992) Calcified renal stones and cyst calcifications in autosomal dominant polycystic kidney disease: clinical and CT study in 84 patients. *AJR Am J Roentgenol* **159**: 77-81.

Li HP, Geng L, Burrow CR, Wilson PD (1999) Identification of phosphorylation sites in the PKD1-encoded protein C-terminal domain. *Biochem Biophys Res Commun* **259**: 356-363.

Li KJ, Shiau AL, Chiou YY, Yo YT, Wu CL (2005a) Transgenic overexpression of prothymosin alpha induces development of polycystic kidney disease. *Kidney Int* **67**: 1710-1722.

Li X, Luo Y, Starremans PG, McNamara CA, Pei Y, Zhou J (2005b) Polycystin-1 and polycystin-2 regulate the cell cycle through the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Nat Cell Biol* **7**: 1202-1212.

Lin F, Hiesberger T, Cordes K, Sinclair AM, Goldstein LS, Somlo S, 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.

Loghman-Adham M, Nauli SM, Soto CE, Kariuki B, Zhou J (2003) Immortalized epithelial cells from human autosomal dominant polycystic kidney cysts. *Am J Physiol Renal Physiol* **285**: F397-412.

Lohning C, Nowicka U, Frischauf AM (1997) The mouse homolog of PKD1: sequence analysis and alternative splicing. *Mamm Genome* **8**: 307-311.

Longa L, Brusco A, Carbonara C, Polidoro S, Scolari F, Valzorio B, Riegler P, Tardanico R, Migone N (1997) A tuberous sclerosis patient with a large TSC2 and PKD1 gene deletion shows extrarenal signs of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Contrib Nephrol* **122**: 91-95.

Lowden DA, Lindemann GW, Merlino G, Barash BD, Calvet JP, Gattone VH, 2nd (1994) Renal cysts in transgenic mice expressing transforming growth factor-alpha. *J Lab Clin Med* **124**: 386-394.

Lu W, Peissel B, Babakhanlou H, Pavlova A, Geng L, Fan X, Larson C, Brent G, 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 CJ, Pritchard L, Harris PC, Genest DR, Perez-Atayde AR, 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.

Lumiaho A, Pihlajamaki J, Hartikainen J, Ikaheimo R, Miettinen R, Niemitukia L, Lampainen E, Laakso M (2003) Insulin resistance is related to left ventricular hypertrophy in patients with polycystic kidney disease type 1. *Am J Kidney Dis* **41**: 1219-1224.

Luo Y, Vassilev PM, Li X, Kawanabe Y, Zhou J (2003) Native polycystin 2 functions as a plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-permeable cation channel in renal epithelia. *Mol Cell Biol* **23**: 2600-2607.

MacKay K, Striker LJ, Pinkert CA, Brinster RL, Striker GE (1987) Glomerulosclerosis and renal cysts in mice transgenic for the early region of SV40. *Kidney Int* **32**: 827-837.

Magistroni R, He N, Wang K, Andrew R, Johnson A, Gabow P, Dicks E, Parfrey P, Torra R, San-Millan JL, Coto E, Van Dijk M, Breuning M, Peters D, Bogdanova N, Ligabue G, Albertazzi A, Hateboer N, Demetriou K, Pierides A, Deltas C, St George-Hyslop P, Ravine D, Pei Y (2003) Genotype-renal function correlation in type 2 autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* **14**: 1164-1174.

Malhas AN, Abuknesha RA, Price RG (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.

Malka D, Hammel P, Vilgrain V, Flejou JF, Belghiti J, Bernades P (1998) Chronic obstructive pancreatitis due to a pancreatic cyst in a patient with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Gut* **42**: 131-134.

Markoff A, Bogdanova N, Knop M, Ruffer C, Kenis H, Lux P, Reutelingsperger C, Todorov V, Dworniczak B, Horst J, Gerke V (2007) Annexin A5 interacts with polycystin-1 and interferes with the polycystin-1 stimulated recruitment of E-cadherin into adherens junctions. *J Mol Biol* **369**: 954-966.

Markowitz GS, Cai Y, Li L, Wu G, Ward LC, Somlo S, D'Agati VD (1999) Polycystin-2 expression is developmentally regulated. *Am J Physiol* **277**: F17-25.

Martignoni G, Bonetti F, Pea M, Tardanico R, Brunelli M, Eble JN (2002) Renal disease in adults with TSC2/PKD1 contiguous gene syndrome. *Am J Surg Pathol* **26**: 198-205.

Martin GM, Ogburn CE, Colgin LM, Gown AM, Edland SD, Monnat RJ, Jr. (1996) Somatic mutations are frequent and increase with age in human kidney epithelial cells. *Hum Mol Genet* **5**: 215-221.

Martinez-Maldonado M (1974) Letter: Polycystic kidney disease and hyperuricemia. *Ann Intern Med* **80**: 116.

Martinez-Maldonado M, Yium JJ, Eknayan G, Suki WN (1972) Adult polycystic kidney disease: studies of the defect in urine concentration. *Kidney Int* **2**: 107-113.

Martinez-Vea A, Bardaj A, Gutierrez C, Garca C, Peralta C, Marcas L, Oliver JA (2004) Exercise blood pressure, cardiac structure, and diastolic function in young normotensive

patients with polycystic kidney disease: a prehypertensive state. *Am J Kidney Dis* **44**: 216-223.

Martinez-Vea A, Bardaji A, Gutierrez C, Garcia C, Peralta C, Aguilera J, Sanchez P, Vidiella J, Angelet P, Compte T, Richart C, Oliver JA (1999) Echocardiographic evaluation in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease and end-stage renal disease. *Am J Kidney Dis* **34**: 264-272.

Martinez JR, Grantham JJ (1995) Polycystic kidney disease: etiology, pathogenesis, and treatment. *Dis Mon* **41**: 693-765.

Matsumura M, Wada H, Nojiri K (1985) Persistent primitive trigeminal artery, cavum septi pellucidi, and associated cerebral aneurysm in a patient with polycystic kidney disease: case report. *Neurosurgery* **16**: 395-397.

McDonald RA, Avner ED (1991) Inherited polycystic kidney disease in children. *Semin Nephrol* **11**: 632-642.

Mejias E, Navas J, Lluberes R, Martinez-Maldonado M (1989) Hyperuricemia, gout, and autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Med Sci* **297**: 145-148.

Mercola M (2003) Left-right asymmetry: nodal points. *J Cell Sci* **116**: 3251-3257.

Milutinovic J, Fialkow PJ, Agodoa LY, Phillips LA, Rudd TG, Bryant JI (1984) Autosomal dominant polycystic kidney disease: symptoms and clinical findings. *Q J Med* **53**: 511-522.

Milutinovic J, Fialkow PJ, Agodoa LY, Phillips LA, Rudd TG, Sutherland S (1990) Clinical manifestations of autosomal dominant polycystic kidney disease in patients older than 50 years. *Am J Kidney Dis* **15**: 237-243.

Milutinovic J, Fialkow PJ, Rudd TG, Agodoa LY, Phillips LA, Bryant JI (1980) Liver cysts in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Med* **68**: 741-744.

Minke B, Cook B (2002) TRP channel proteins and signal transduction. *Physiol Rev* **82**: 429-472.

Mochizuki T, Wu G, Hayashi T, Xenophontos SL, Veldhuisen B, Saris JJ, Reynolds DM, Cai Y, Gabow PA, Pierides A, Kimberling WJ, Breuning MH, Deltas CC, Peters DJ, 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, Saunier S (2002) The gene mutated in juvenile nephronophthisis type 4 encodes a novel protein that interacts with nephrocystin. *Nat Genet* **32**: 300-305.

Montoliu J, Torras A, Revert L (1980) Polycystic kidneys and abdominal aortic aneurysms. *Lancet* **1**: 1133-1134.

Moyer JH, Lee-Tischler MJ, Kwon HY, Schrick JJ, Avner ED, Sweeney WE, Godfrey VL, Cacheiro NL, Wilkinson JE, Woychik RP (1994) Candidate gene associated with a mutation causing recessive polycystic kidney disease in mice. *Science* **264**: 1329-1333.

Murakami M, Ichisaka T, Maeda M, Oshiro N, Hara K, Edenhofer F, Kiyama H, Yonezawa K, Yamanaka S (2004) mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* **24**: 6710-6718.

Murcia NS, Richards WG, Yoder BK, Mucenski ML, Dunlap JR, Woychik RP (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 PC, Katsuki M, 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 KE, Wheeler DE, Silva FG (1995) Proliferative activity of cyst epithelium in human renal cystic diseases. *J Am Soc Nephrol* **5**: 1462-1468.

Naitoh H, Shoji H, Ishikawa I, Watanabe R, Furuta Y, Tomozawa S, Igarashi H, Shinozaki S, Katsura H, Onozato R, Kudoh M (2005) Intraductal papillary mucinous tumor of the pancreas associated with autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Gastrointest Surg* **9**: 843-845.

Nakajima F, Shibahara N, Arai M, Gohji K, Ueda H, Katsuoka Y (2000) Intracranial aneurysms and autosomal dominant polycystic kidney disease: followup study by magnetic resonance angiography. *J Urol* **164**: 311-313.

Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Ebihara I, Shimada N, Koide H (2000) Elevation of serum levels of metalloproteinase-1, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and type IV

collagen, and plasma levels of metalloproteinase-9 in polycystic kidney disease. *Am J Nephrol* **20**: 32-36.

Natoli TA, Gareski TC, Dackowski WR, Smith L, Bukanov NO, Russo RJ, Husson H, Matthews D, Piepenhagen P, Ibraghimov-Beskrovnaya O (2008) Pkd1 and Nek8 mutations affect cell-cell adhesion and cilia in cysts formed in kidney organ cultures. *Am J Physiol Renal Physiol* **294**: F73-83.

Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, Williams E, Vassilev P, Li X, Elia AE, Lu W, Brown EM, Quinn SJ, Ingber DE, Zhou J (2003) Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet* **33**: 129-137.

Nauli SM, Kawanabe Y, Kaminski JJ, Pearce WJ, Ingber DE, Zhou J (2008) Endothelial cilia are fluid shear sensors that regulate calcium signaling and nitric oxide production through polycystin-1. *Circulation* **117**: 1161-1171.

Nauta J, Goedbloed MA, van den Ouweland AM, Nellist M, Hoogeveen AT (2000) Immunological detection of polycystin-1 in human kidney. *Histochem Cell Biol* **113**: 303-311.

Newby LJ, Streets AJ, Zhao Y, Harris PC, Ward CJ, Ong AC (2002) Identification, characterization, and localization of a novel kidney polycystin-1-polycystin-2 complex. *J Biol Chem* **277**: 20763-20773.

Newcombe DS (1973) Letter: Gouty arthritis and polycystic kidney disease. *Ann Intern Med* **79**: 605.

Nguyen HQ, Danilenko DM, Bucay N, DeRose ML, Van GY, Thomason A, Simonet WS (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, Maser RL (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.

Niv Y, Turani C, Kahan E, Fraser GM (1997) Association between pancreatic cystadenocarcinoma, malignant liver cysts, and polycystic disease of the kidney. *Gastroenterology* **112**: 2104-2107.

Nomura H, Turco AE, Pei Y, Kalaydjieva L, Schiavello T, Weremowicz S, Ji W, Morton CC, Meisler M, Reeders ST, 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.

Nunez L, O'Connor LF, Pinto AG, Gil-Aguado M, Gutierrez M (1986) Annuloaortic ectasia and adult polycystic kidney. A frequent association. *Chest* **90**: 299-300.

Nyengaard JR, Bendsten TF (1992) Glomerular number and size in relation to age, kidney weight, and body surface in normal man. *Anat Rec* **232**: 194-201.

Obermuller N, Morente N, Kranzlin B, Gretz N, Witzgall R (2001) A possible role for metalloproteinases in renal cyst development. *Am J Physiol Renal Physiol* **280**: F540-550.

Ojeda JL, Ros MA, Garcia-Porrero JA (1986) Polycystic kidney disease induced by corticoids. A quantitative and qualitative analysis of cell populations in the tubular cysts. *Nephron* **42**: 240-248.

Okada S, Misaka T, Tanaka Y, Matsumoto I, Ishibashi K, Sasaki S, Abe K (2008) Aquaporin-11 knockout mice and polycystic kidney disease animals share a common mechanism of cyst formation. *Faseb J* **22**: 3672-3684.

Okamoto Y, Awazu A, Ono K, Nakayama K, Yamada K (1983) Surgical treatment of abdominal aneurysm in hemodialysis patient with polycystic kidney. *Nippon Geka Hokan* **52**: 718-724.

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

Olson JL, de Urdaneta AG, Heptinstall RH (1985) Glomerular hyalinosis and its relation to hyperfiltration. *Lab Invest* **52**: 387-398.

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

Ong AC, Harris PC, Davies DR, Pritchard L, Rossetti S, Biddolph S, Vaux DJ, Migone N, Ward CJ (1999a) Polycystin-1 expression in PKD1, early-onset PKD1, and TSC2/PKD1 cystic tissue. *Kidney Int* **56**: 1324-1333.

Ong AC, Ward CJ, Butler RJ, Biddolph S, Bowker C, Torra R, Pei Y, Harris PC (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 LF, 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 ED, Zerres K, Guay-Woodford LM, Somlo S, Germino GG (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 SA, Sweeney WE, Neff CD, Avner ED (1995) Epidermal growth factor receptor expression is abnormal in murine polycystic kidney. *Kidney Int* **47**: 490-499.

Otto EA, Loeys B, Khanna H, Hellemans J, Sudbrak R, Fan S, Muerb U, O'Toole JF, Helou J, Attanasio M, Utsch B, Sayer JA, Lillo C, Jimeno D, Coucke P, De Paepe A, Reinhardt R, Klages S, Tsuda M, Kawakami I, Kusakabe T, Omran H, Imm A, Tippens M, Raymond PA, Hill J, Beales P, He S, Kispert A, Margolis B, Williams DS, Swaroop A, Hildebrandt F (2005) Nephrocystin-5, a ciliary IQ domain protein, is mutated in Senior-Loken syndrome and interacts with RPGR and calmodulin. *Nat Genet* **37**: 282-288.

Otto EA, Schermer B, Obara T, O'Toole JF, Hiller KS, Mueller AM, Ruf RG, Hoefele J, Beekmann F, Landau D, Foreman JW, Goodship JA, Strachan T, Kispert A, Wolf MT, Gagnadoux MF, Nivet H, Antignac C, Walz G, Drummond IA, Benzing T, 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.

Palsson R, Sharma CP, Kim K, McLaughlin M, Brown D, Arnaout MA (1996) Characterization and cell distribution of polycystin, the product of autosomal dominant polycystic kidney disease gene 1. *Mol Med* **2**: 702-711.

Park JY, Schutzer WE, Lindsley JN, Bagby SP, Oyama TT, Anderson S, Weiss RH (2007) p21 is decreased in polycystic kidney disease and leads to increased epithelial cell cycle progression: roscovitine augments p21 levels. *BMC Nephrol* **8**: 12.

Parnell SC, Magenheimer BS, Maser RL, Calvet JP (1999) Identification of the major site of in vitro PKA phosphorylation in the polycystin-1 C-terminal cytosolic domain. *Biochem Biophys Res Commun* **259**: 539-543.

Parnell SC, Magenheimer BS, Maser RL, Rankin CA, Smine A, Okamoto T, Calvet JP (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 SC, Magenheimer BS, Maser RL, Zien CA, Frischauf AM, Calvet JP (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.

Patel V, Li L, Cobo-Stark P, Shao X, Somlo S, Lin F, Igarashi P (2008) Acute kidney injury and aberrant planar cell polarity induce cyst formation in mice lacking renal cilia. *Hum Mol Genet* **17**: 1578-1590.

Pedersen LB, Rosenbaum JL (2008) Chapter Two Intraflagellar Transport (IFT) Role in Ciliary Assembly, Resorption and Signalling. *Curr Top Dev Biol* **85**: 23-61.

Pei Y, Watnick T, He N, Wang K, Liang Y, Parfrey P, Germino G, St 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.

Pennekamp P, Karcher C, Fischer A, Schweickert A, Skryabin B, Horst J, Blum M, Dworniczak B (2002) The ion channel polycystin-2 is required for left-right axis determination in mice. *Curr Biol* **12**: 938-943.

Peral B, Gamble V, Strong C, Ong AC, Sloane-Stanley J, Zerres K, Winearls CG, Harris PC (1997) Identification of mutations in the duplicated region of the polycystic kidney disease 1 gene (PKD1) by a novel approach. *Am J Hum Genet* **60**: 1399-1410.

Peral B, San Millan JL, Ong AC, Gamble V, Ward CJ, Strong C, Harris PC (1996) Screening the 3' region of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene reveals six novel mutations. *Am J Hum Genet* **58**: 86-96.

Perez-Oller L, Torra R, Badenas C, San Millan JL, Darnell A (2000) [Heterozygosity loss and somatic mutations in type I and II dominant autosomal renal polycystic kidney disease: evidence of a recessive mechanism at a cell level in cystogenesis]. *Nefrologia* **20**: 130-138.

Peters DJ, Spruit L, Saris JJ, Ravine D, Sandkuijl LA, Fossdal R, Boersma J, van Eijk R, Norby S, Constantinou-Deltas CD, et al. (1993) Chromosome 4 localization of a second gene for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Genet* **5**: 359-362.

Peters DJ, van de Wal A, Spruit L, Saris JJ, Breuning MH, Bruijn JA, de Heer E (1999) Cellular localization and tissue distribution of polycystin-1. *J Pathol* **188**: 439-446.

Piontek K, Menezes LF, Garcia-Gonzalez MA, Huso DL, Germino GG (2007) A critical developmental switch defines the kinetics of kidney cyst formation after loss of Pkd1. *Nat Med* **13**: 1490-1495.

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

Piontek KB, Huso DL, Grinberg A, Liu L, Bedja D, Zhao H, Gabrielson K, Qian F, Mei C, Westphal H, Germino GG (2004) A functional floxed allele of Pkd1 that can be conditionally inactivated in vivo. *J Am Soc Nephrol* **15**: 3035-3043.

Pletnev V, Huether R, Habegger L, Schultz W, Duax W (2007) Rational proteomics of PKD1. I. Modeling the three dimensional structure and ligand specificity of the C\_lectin binding domain of Polycystin-1. *J Mol Model* **13**: 891-896.

Pracyk JB, Massey JM (1989) Moyamoya disease associated with polycystic kidney disease and eosinophilic granuloma. *Stroke* **20**: 1092-1094.

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

Proesmans W, Van Damme B, Casaer P, Marchal G (1982) Autosomal dominant polycystic kidney disease in the neonatal period: association with a cerebral arteriovenous malformation. *Pediatrics* **70**: 971-975.

Puri S, Magenheimer BS, Maser RL, Ryan EM, Zien CA, Walker DD, Wallace DP, Hempson SJ, Calvet JP (2004) Polycystin-1 activates the calcineurin/NFAT (nuclear factor of activated T-cells) signaling pathway. *J Biol Chem* **279**: 55455-55464.

Qian F, Boletta A, Bhunia AK, Xu H, Liu L, Ahrabi AK, Watnick TJ, Zhou F, Germino GG (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 FJ, Cai Y, Zhang X, Somlo S, Germino GG (1997a) PKD1 interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain. *Nat Genet* **16**: 179-183.

Qian F, Germino GG (1997b) "Mistakes happen": somatic mutation and disease. *Am J Hum Genet* **61**: 1000-1005.

Qian F, Watnick TJ, Onuchic LF, Germino GG (1996) The molecular basis of focal cyst formation in human autosomal dominant polycystic kidney disease type I. *Cell* **87**: 979-987.

Que F, Nagorney DM, Gross JB, Jr., Torres VE (1995) Liver resection and cyst fenestration in the treatment of severe polycystic liver disease. *Gastroenterology* **108**: 487-494.

Ravich L, Lerman PH, Drabkin J (1976) Ruptured renal cyst in polycystic disease. *Urology* **7**: 60-61.

Raychowdhury MK, McLaughlin M, Ramos AJ, Montalbetti N, Bouley R, Ausiello DA, Cantiello HF (2005) Characterization of single channel currents from primary cilia of renal epithelial cells. *J Biol Chem* **280**: 34718-34722.

Richards WG, Sweeney WE, Yoder BK, Wilkinson JE, Woychik RP, Avner ED (1998) Epidermal growth factor receptor activity mediates renal cyst formation in polycystic kidney disease. *J Clin Invest* **101**: 935-939.

Ricker JL, Gattone VH, 2nd, Calvet JP, Rankin CA (2000) Development of autosomal recessive polycystic kidney disease in BALB/c-cpk/cpk mice. *J Am Soc Nephrol* **11**: 1837-1847.

Rinkel GJ, Djibuti M, Algra A, van Gijn J (1998) Prevalence and risk of rupture of intracranial aneurysms: a systematic review. *Stroke* **29**: 251-256.

Rivera JV, Martinez Maldonado M, Ramirezdearellano GA, Ehrlich L (1965) Association of Hyperuricemia and Polycystic Kidney Disease. *Bol Asoc Med P R* **57**: 251-262.

Rodova M, Islam MR, Maser RL, Calvet JP (2002) The polycystic kidney disease-1 promoter is a target of the beta-catenin/T-cell factor pathway. *J Biol Chem* **277**: 29577-29583.

Rodriguez-Pena AB, Grande MT, Eleno N, Arevalo M, Guerrero C, Santos E, Lopez-Novoa JM (2008) Activation of Erk1/2 and Akt following unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* **74**: 196-209.

Rohatgi R (2008) Clinical manifestations of hereditary cystic kidney disease. *Front Biosci* **13**: 4175-4197.

Rossetti S, Burton S, Strmecki L, Pond GR, San Millan JL, Zerres K, Barratt TM, Ozen S, Torres VE, Bergstralh EJ, Winearls CG, Harris PC (2002) 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, Kubly V, Slezak JM, Saggar-Malik AK, Pei Y, Ong AC, Stewart F, Watson ML, Bergstralh EJ, Winearls CG, Torres VE, Harris PC (2003) Association of mutation position in polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene and development of a vascular phenotype. *Lancet* **361**: 2196-2201.

Rossetti S, Harris PC (2007) Genotype-phenotype correlations in autosomal dominant and autosomal recessive polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* **18**: 1374-1380.

Roth KE, Rieder CL, Bowser SS (1988) Flexible-substratum technique for viewing cells from the side: some in vivo properties of primary (9+0) cilia in cultured kidney epithelia. *J Cell Sci* **89 ( Pt 4)**: 457-466.

Roy S, Dillon MJ, Trompeter RS, Barratt TM (1997) Autosomal recessive polycystic kidney disease: long-term outcome of neonatal survivors. *Pediatr Nephrol* **11**: 302-306.

Ruggieri PM, Poulos N, Masaryk TJ, Ross JS, Obuchowski NA, Awad IA, Braun WE, Nally J, Lewin JS, Modic MT (1994) Occult intracranial aneurysms in polycystic kidney disease: screening with MR angiography. *Radiology* **191**: 33-39.

Saadi-Kheddouci S, Berrebi D, Romagnolo B, Cluzeaud F, Peuchmaur M, Kahn A, Vandewalle A, Perret C (2001) Early development of polycystic kidney disease in transgenic mice expressing an activated mutant of the beta-catenin gene. *Oncogene* **20**: 5972-5981.

Sampson JR, Maheshwar MM, Aspinwall R, Thompson P, Cheadle JP, Ravine D, Roy S, Haan E, Bernstein J, Harris PC (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 RK, Chisoe S, Pepin K, Bateman A, Chothia C, Hughes J, 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 DL, Barrios R, Massey C, Banez EI, Ou CN, Rajagopalan S, Aguilar-Cordova E, Lebovitz RM, Overbeek PA, Lieberman MW (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.

Scheff RT, Zuckerman G, Harter H, Delmez J, Koehler R (1980) Diverticular disease in patients with chronic renal failure due to polycystic kidney disease. *Ann Intern Med* **92**: 202-204.

Schievink WI, Huston J, 3rd, Torres VE, Marsh WR (1995) Intracranial cysts in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Neurosurg* **83**: 1004-1007.

Schievink WI, Torres VE, Piepgras DG, Wiebers DO (1992) Saccular intracranial aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* **3**: 88-95.

Schrier RW, Johnson AM, McFann K, Chapman AB (2003) The role of parental hypertension in the frequency and age of diagnosis of hypertension in offspring with autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* **64**: 1792-1799.

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

Sedman A, Bell P, Manco-Johnson M, Schrier R, Warady BA, Heard EO, Butler-Simon N, Gabow P (1987) Autosomal dominant polycystic kidney disease in childhood: a longitudinal study. *Kidney Int* **31**: 1000-1005.

Sharma M, Brantley JG, Alcalay NI, Zhou J, Heystek E, Maser RL, Vanden Heuvel GB (2005) Differential expression of Cux-1 and p21 in polycystic kidneys from Pkd1 null and cpk mice. *Kidney Int* **67**: 432-442.

Sherstha R, McKinley C, Russ P, Scherzinger A, Bronner T, Showalter R, Everson GT (1997) Postmenopausal estrogen therapy selectively stimulates hepatic enlargement in women with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hepatology* **26**: 1282-1286.

Shiba D, Takamatsu T, Yokoyama T (2005) Primary cilia of inv/inv mouse renal epithelial cells sense physiological fluid flow: bending of primary cilia and Ca<sup>2+</sup> influx. *Cell Struct Funct* **30**: 93-100.

Shibazaki S, Yu Z, Nishio S, Tian X, Thomson RB, Mitobe M, Louvi A, Velazquez H, Ishibe S, Cantley LG, Igarashi P, Somlo S (2008) Cyst formation and activation of the extracellular regulated kinase pathway after kidney specific inactivation of Pkd1. *Hum Mol Genet* **17**: 1505-1516.

Shindo T, Kurihara H, Maemura K, Kurihara Y, Ueda O, Suzuki H, Kuwaki T, Ju KH, Wang Y, Ebihara A, Nishimatsu H, Moriyama N, Fukuda M, Akimoto Y, Hirano H, Morita

H, Kumada M, Yazaki Y, Nagai R, Kimura K (2002) Renal damage and salt-dependent hypertension in aged transgenic mice overexpressing endothelin-1. *J Mol Med* **80**: 105-116.

Simons M, Mlodzik M (2008) Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease. *Annu Rev Genet* **42**: 517-540.

Smith LA, Bukanov NO, Husson H, Russo RJ, Barry TC, Taylor AL, Beier DR, Ibraghimov-Beskrovnaya O (2006) Development of polycystic kidney disease in juvenile cystic kidney mice: insights into pathogenesis, ciliary abnormalities, and common features with human disease. *J Am Soc Nephrol* **17**: 2821-2831.

Stacey M, Lin HH, Gordon S, McKnight AJ (2000) LNB-TM7, a group of seven-transmembrane proteins related to family-B G-protein-coupled receptors. *Trends Biochem Sci* **25**: 284-289.

Starremans PG, Li X, Finnerty PE, Guo L, Takakura A, Neilson EG, Zhou J (2008) A mouse model for polycystic kidney disease through a somatic in-frame deletion in the 5' end of Pkd1. *Kidney Int* **73**: 1394-1405.

Stillwell TJ, Gomez MR, Kelalis PP (1987) Renal lesions in tuberous sclerosis. *J Urol* **138**: 477-481.

Stocklin E, Botteri F, 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.

Streets AJ, Moon DJ, Kane ME, Obara T, Ong AC (2006) Identification of an N-terminal glycogen synthase kinase 3 phosphorylation site which regulates the functional localization of polycystin-2 in vivo and in vitro. *Hum Mol Genet* **15**: 1465-1473.

Streets AJ, Wagner BE, Harris PC, Ward CJ, Ong AC (2009) Homophilic and heterophilic polycystin-1 interactions regulate E-cadherin recruitment and junction assembly in MDCK cells. *J Cell Science* **122**: 1410-1417.

Sudol M, Chen HI, Bougeret C, Einbond A, Bork P (1995) Characterization of a novel protein-binding module--the WW domain. *FEBS Lett* **369**: 67-71.

Sulikowski T, Kaminski M, Rozanski J, Zietek Z, Domanski L, Majewski W, Sienko J, Romanowski M, Mizerski A, Myslak M, Tejchman K, Pabisiak K, Nowacki M, Ostrowski M, Ciechanowski K (2006) Laparoscopic removal of renal cysts in patients with ADPKD as an alternative method of treatment and patient preparation for kidney transplantation: preliminary results. *Transplant Proc* **38**: 23-27.

Sweeney WE, Jr., Avner ED (2006) Molecular and cellular pathophysiology of autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Cell Tissue Res* **326**: 671-685.

Sweeney WE, Jr., Hamahira K, Sweeney J, Garcia-Gatrell M, Frost P, Avner ED (2003) Combination treatment of PKD utilizing dual inhibition of EGF-receptor activity and ligand bioavailability. *Kidney Int* **64**: 1310-1319.

Takakura A, Contrino L, Beck AW, Zhou J (2008) Pkd1 inactivation induced in adulthood produces focal cystic disease. *J Am Soc Nephrol* **19**: 2351-2363.

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

Tamura H, Kato H, Hirose S, Itoyama S, Matsumura O, Nagasawa R, Mitarai T, Isoda K (1994) An adult case of polycystic kidney disease associated with congenital hepatic fibrosis. *Nippon Jinzo Gakkai Shi* **36**: 962-967.

Telenti A, Torres VE, Gross JB, Jr., Van Scoy RE, Brown ML, Hattery RR (1990) Hepatic cyst infection in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Mayo Clin Proc* **65**: 933-942.

Thivierge C, Kurbegovic A, Couillard M, Guillaume R, Cote O, Trudel M (2006) Overexpression of PKD1 causes polycystic kidney disease. *Mol Cell Biol* **26**: 1538-1548.

Thomsen HS, Thaysen JH (1988) Frequency of hepatic cysts in adult polycystic kidney disease. *Acta Med Scand* **224**: 381-384.

Tighe O, Carmody M, Croke DT (1995) Molecular genetic analysis of ADPKD in Irish families. *Contrib Nephrol* **115**: 102-104.

Timio M, Monarca C, Pede S, Gentili S, Verdura C, Lolli S (1992) The spectrum of cardiovascular abnormalities in autosomal dominant polycystic kidney disease: a 10-year follow-up in a five-generation kindred. *Clin Nephrol* **37**: 245-251.

Torra R, Badenas C, San Millan JL, Perez-Oller L, Estivill X, 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.

Torres VE (1998) New insights into polycystic kidney disease and its treatment. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **7**: 159-169.

Torres VE (1999) Extrarenal manifestations of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* **34**: xlv-xlvi.

Torres VE (2008) Vasopressin antagonists in polycystic kidney disease. *Semin Nephrol* **28**: 306-317.

Torres VE, Sweeney WE, Jr., Wang X, Qian Q, Harris PC, Frost P, Avner ED (2003) EGF receptor tyrosine kinase inhibition attenuates the development of PKD in Han:SPRD rats. *Kidney Int* **64**: 1573-1579.

Torres VE, Wilson DM, Hattery RR, Segura JW (1993) Renal stone disease in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* **22**: 513-519.

Trudel M, Barisoni L, Lanoix J, 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, Costantini F (1991) C-myc as an inducer of polycystic kidney disease in transgenic mice. *Kidney Int* **39**: 665-671.

Tsiokas L, Kim E, Arnould T, Sukhatme VP, 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.

Tulis DA, Unthank JL, Prewitt RL (1998) Flow-induced arterial remodeling in rat mesenteric vasculature. *Am J Physiol* **274**: H874-882.

Turco AE, Padovani EM, Chiaffoni GP, Peissel B, Rossetti S, Marcolongo A, Gammaro L, Maschio G, Pignatti PF (1993) Molecular genetic diagnosis of autosomal dominant polycystic kidney disease in a newborn with bilateral cystic kidneys detected prenatally and multiple skeletal malformations. *J Med Genet* **30**: 419-422.

Ul Haque A, Moatasim A (2008) Adult polycystic kidney disease: a disorder of connective tissue? *Int J Clin Exp Pathol* **1**: 84-90.

Upadhyaya P, Birkenmeier EH, Birkenmeier CS, Barker JE (2000) Mutations in a NIMA-related kinase gene, Nek1, cause pleiotropic effects including a progressive polycystic kidney disease in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 217-221.

Upadhyaya P, Churchill G, Birkenmeier EH, Barker JE, Frankel WN (1999) Genetic modifiers of polycystic kidney disease in intersubspecific KAT2J mutants. *Genomics* **58**: 129-137.

van Adelsberg J (1999) Peptides from the PKD repeats of polycystin, the PKD1 gene product, modulate pattern formation in the developing kidney. *Dev Genet* **24**: 299-308.

van Adelsberg J (2000) Polycystin-1 interacts with E-cadherin and the catenins--clues to the pathogenesis of cyst formation in ADPKD? *Nephrol Dial Transplant* **15**: 1-2.

van Dijk MA, Chang PC, Peters DJ, Breuning MH (1995) Intracranial aneurysms in polycystic kidney disease linked to chromosome 4. *J Am Soc Nephrol* **6**: 1670-1673.

Vandorpe DH, Chernova MN, Jiang L, Sellin LK, Wilhelm S, Stuart-Tilley AK, Walz G, Alper SL (2001) The cytoplasmic C-terminal fragment of polycystin-1 regulates a Ca<sup>2+</sup>-permeable cation channel. *J Biol Chem* **276**: 4093-4101.

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

Vareesangthip K, Tong P, Wilkinson R, Thomas TH (1997) Insulin resistance in adult polycystic kidney disease. *Kidney Int* **52**: 503-508.

Vassort G, Fauconnier J (2008) [Transient receptor potential, TRP channels: a new family of channels broadly expressed]. *Med Sci (Paris)* **24**: 163-168.

Wakabayashi T, Fujita S, Ohbora Y, Suyama T, Tamaki N, Matsumoto S (1983) Polycystic kidney disease and intracranial aneurysms. Early angiographic diagnosis and early operation for the unruptured aneurysm. *J Neurosurg* **58**: 488-491.

Wallace DP, Quante MT, Reif GA, Nivens E, Ahmed F, Hempson SJ, Blanco G, Yamaguchi T (2008) Periostin induces proliferation of human autosomal dominant polycystic kidney cells through alphaV-integrin receptor. *Am J Physiol Renal Physiol* **295**: F1463-1471.

Wang Q, Pan J, Snell WJ (2006) Intraflagellar transport particles participate directly in cilium-generated signaling in *Chlamydomonas*. *Cell* **125**: 549-562.

Ward CJ, Hogan MC, Rossetti S, Walker D, Sneddon T, Wang X, Kubly V, Cunningham JM, Bacallao R, Ishibashi M, Milliner DS, Torres VE, Harris PC (2002) The gene mutated

in autosomal recessive polycystic kidney disease encodes a large, receptor-like protein. *Nat Genet* **30**: 259-269.

Ward CJ, Turley H, Ong AC, Comley M, Biddolph S, Chetty R, Ratcliffe PJ, Gattner K, Harris PC (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.

Ward CJ, Yuan D, Masyuk TV, Wang X, Punyashthiti R, Whelan S, Bacallao R, Torra R, LaRusso NF, Torres VE, Harris PC (2003) Cellular and subcellular localization of the ARPKD protein; fibrocystin is expressed on primary cilia. *Hum Mol Genet* **12**: 2703-2710.

Watnick TJ, Torres VE, Gandolph MA, Qian F, Onuchic LF, Klinger KW, Landes G, Germino GG (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.

Wei W, Hackmann K, Xu H, Germino G, Qian F (2007) Characterization of cis-autoproteolysis of polycystin-1, the product of human polycystic kidney disease 1 gene. *J Biol Chem* **282**: 21729-21737.

Weston BS, Bagneris C, Price RG, Stirling JL (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.

Whitfield JF (2008) The solitary (primary) cilium--a mechanosensory toggle switch in bone and cartilage cells. *Cell Signal* **20**: 1019-1024.

Wiebers DO, Torres VE (1992) Screening for unruptured intracranial aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* **327**: 953-955.

Wilson PD (1997) Epithelial cell polarity and disease. *Am J Physiol* **272**: F434-442.

Wilson PD (2001) Polycystin: new aspects of structure, function, and regulation. *J Am Soc Nephrol* **12**: 834-845.

Wilson PD (2004) A plethora of epidermal growth factor-like proteins in polycystic kidneys. *Kidney Int* **65**: 2441-2442.

Wilson PD, Falkenstein D (1995) The pathology of human renal cystic disease. *Curr Top Pathol* **88**: 1-50.

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

Windisch JM, Marksteiner R, Schneider R (1995) Nerve growth factor binding site on TrkA mapped to a single 24-amino acid leucine-rich motif. *J Biol Chem* **270**: 28133-28138.

Winyard P, Chitty LS (2008) Dysplastic kidneys. *Semin Fetal Neonatal Med* **13**: 142-151.

Woo DD, Nguyen DK, Khatibi N, Olsen P (1997) Genetic identification of two major modifier loci of polycystic kidney disease progression in pcy mice. *J Clin Invest* **100**: 1934-1940.

Woo D, (1995) Apoptosis and loss of renal tissue in polycystic kidney diseases. *N Engl J Med* **333 (1)**: 18-25.

Woolf AS, Price KL, Scambler PJ, Winyard PJ (2004) Evolving concepts in human renal dysplasia. *J Am Soc Nephrol* **15**: 998-1007.

Wu G (2001) Current advances in molecular genetics of autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **10**: 23-31.

Wu G, D'Agati V, Cai Y, Markowitz G, Park JH, Reynolds DM, Maeda Y, Le TC, Hou H, Jr., Kucherlapati R, Edelmann W, Somlo S (1998) Somatic inactivation of Pkd2 results in polycystic kidney disease. *Cell* **93**: 177-188.

Wu G, Markowitz GS, Li L, D'Agati VD, Factor SM, Geng L, Tibara S, Tuchman J, Cai Y, Park JH, van Adelsberg J, Hou H, Jr., Kucherlapati R, Edelmann W, Somlo S (2000) Cardiac defects and renal failure in mice with targeted mutations in Pkd2. *Nat Genet* **24**: 75-78.

Wu G, Tian X, Nishimura S, Markowitz GS, D'Agati V, Park JH, Yao L, Li L, Geng L, Zhao H, Edelmann W, Somlo S (2002) Trans-heterozygous Pkd1 and Pkd2 mutations modify expression of polycystic kidney disease. *Hum Mol Genet* **11**: 1845-1854.

Xiao Z, Zhang S, Magenheimer BS, Luo J, Quarles LD (2008) Polycystin-1 regulates skeletogenesis through stimulation of the osteoblast-specific transcription factor RUNX2-II. *J Biol Chem* **283**: 12624-12634.

Xiao Z, Zhang S, Mahlios J, Zhou G, Magenheimer BS, Guo D, Dallas SL, Maser R, Calvet JP, Bonewald L, Quarles LD (2006) Cilia-like structures and polycystin-1 in osteoblasts/osteocytes and associated abnormalities in skeletogenesis and Runx2 expression. *J Biol Chem* **281**: 30884-30895.

Xu C, Rossetti S, Jiang L, Harris PC, Brown-Glaberman U, Wandinger-Ness A, Bacallao R, Alper SL (2007) Human ADPKD primary cyst epithelial cells with a novel, single codon deletion in the PKD1 gene exhibit defective ciliary polycystin localization and loss of flow-induced Ca<sup>2+</sup> signaling. *Am J Physiol Renal Physiol* **292**: F930-945.

Xu GM, Gonzalez-Perrett S, Essafi M, Timpanaro GA, Montalbetti N, Arnaout MA, Cantiello HF (2003) Polycystin-1 activates and stabilizes the polycystin-2 channel. *J Biol Chem* **278**: 1457-1462.

Yeaman C, Grindstaff KK, Nelson WJ (1999) New perspectives on mechanisms involved in generating epithelial cell polarity. *Physiol Rev* **79**: 73-98.

Yoder BK (2007) Role of primary cilia in the pathogenesis of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* **18**: 1381-1388.

Yoder BK, Hou X, Guay-Woodford LM (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.

Yu S, Hackmann K, Gao J, He X, Piontek K, Garcia-Gonzalez MA, Menezes LF, Xu H, Germino GG, Zuo J, Qian F (2007) Essential role of cleavage of Polycystin-1 at G protein-coupled receptor proteolytic site for kidney tubular structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 18688-18693.

Yuasa T, Takakura A, Denker BM, Venugopal B, Zhou J (2004) Polycystin-1L2 is a novel G-protein-binding protein. *Genomics* **84**: 126-138.

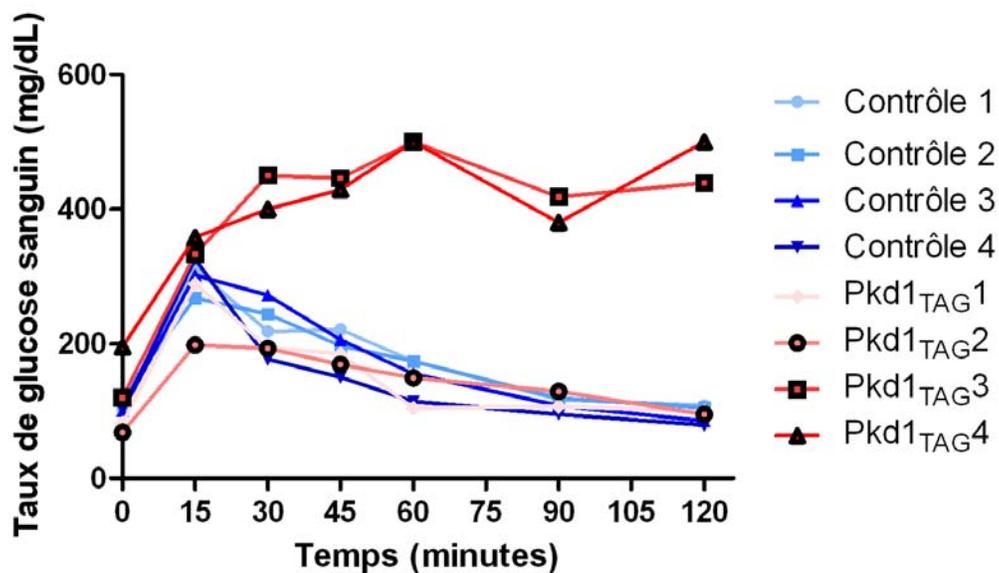
Zeier M, Geberth S, Schmidt KG, Mandelbaum A, Ritz E (1993) Elevated blood pressure profile and left ventricular mass in children and young adults with autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* **3**: 1451-1457.

Zhang Q, Taulman PD, Yoder BK (2004) Cystic kidney diseases: all roads lead to the cilium. *Physiology (Bethesda)* **19**: 225-230.

## Annexe

### Annexe 1:

#### Tolérance au glucose des souris Pkd1<sub>TAG</sub>.



**LÉGENDE :** Réponse physiologique suite à l'injection de glucose (injection intra péritonéale, 2 mg de glucose/g de souris) chez les souris contrôles et Pkd1<sub>TAG</sub>26 adultes. Étonnamment, 2 souris transgéniques sur 4 démontrent une incapacité à réduire leur taux de glucose sanguin, suggérant une déficience du niveau ou de la fonction de l'insuline.

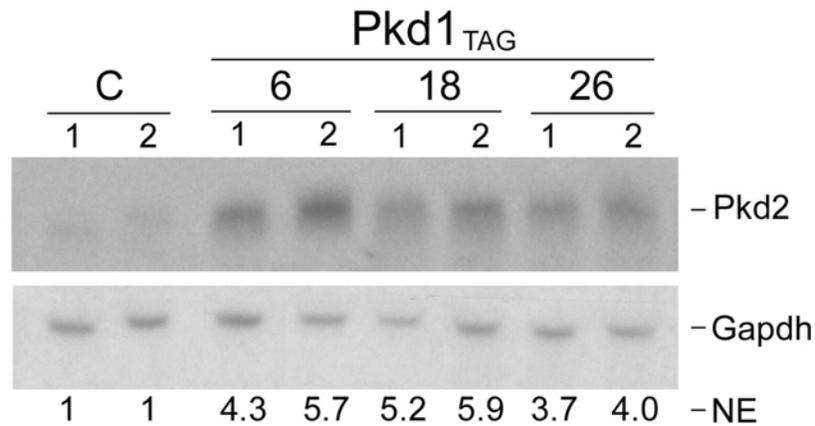
## Annexe 2 :

Paramètres échocardiographiques des souris Pkd1<sub>TAG</sub>.

Paramètres échocardiographiques		n	Contrôles	n	Pkd1 <sub>TAG</sub>	P
<b>SIV; d</b>	mm/poids	6	<b>0.021</b> ± 0.004	4	<b>0.032</b> ± 0.006	0.04
<b>SIV; s</b>	mm/poids	6	<b>0.030</b> ± 0.005	4	<b>0.040</b> ± 0.013	0.21
<b>MPVG; d</b>	mm/poids	6	<b>0.020</b> ± 0.003	4	<b>0.033</b> ± 0.004	0.00
<b>MPVG; s</b>	mm/poids	6	<b>0.028</b> ± 0.006	4	<b>0.046</b> ± 0.006	0.00
<b>DA</b>	mm/poids	6	<b>0.035</b> ± 0.002	4	<b>0.050</b> ± 0.002	0.00
<b>SA</b>	mm <sup>2</sup> /poids	6	<b>0.041</b> ± 0.003	4	<b>0.057</b> ± 0.002	0.00
<b>RC</b>	bpm	6	<b>474</b> ± 16	4	<b>487</b> ± 43	0.59
<b>Valve mitrale</b>						
<b>VMoV; amont</b>	mm/s	4	<b>557</b> ± 79	4	<b>454</b> ± 103	0.16
<b>VMaV; amont</b>	mm/s	4	<b>977</b> ± 140	4	<b>817</b> ± 156	0.18
<b>VMoV; amont</b>	mm/s	6	<b>743</b> ± 77	4	<b>714</b> ± 109	0.66
<b>VMaV; amont</b>	mm/s	6	<b>1247</b> ± 133	4	<b>1233</b> ± 205	0.91
<b>Valve aortique</b>						
<b>VMoV; amont</b>	mm/s	4	<b>554</b> ± 56	4	<b>581</b> ± 251	0.84
<b>VMaV; amont</b>	mm/s	4	<b>899</b> ± 105	4	<b>965</b> ± 431	0.78
<b>VMoV; amont</b>	mm/s	6	<b>1152</b> ± 134	4	<b>1705</b> ± 344	0.04
<b>VMaV; amont</b>	mm/s	6	<b>1901</b> ± 247	4	<b>2772</b> ± 562	0.05
<b>FE</b>	%	6	<b>54.8</b> ± 6.5	4	<b>53.6</b> ± 17.1	0.90
<b>IR</b>	%	6	<b>28.5</b> ± 4.3	4	<b>28.5</b> ± 12.2	0.99
<b>VVG; d</b>	µL/poids	6	<b>2.21</b> ± 0.23	4	<b>3.11</b> ± 1.06	0.19
<b>VVG; s</b>	µL/poids	6	<b>1.01</b> ± 0.24	4	<b>1.51</b> ± 0.97	0.38
<b>VEA</b>	ml/poids	6	<b>0.0027</b> ± 0.0003	4	<b>0.0053</b> ± 0.0013	0.02
<b>DC</b>	(mL/min)/poids	6	<b>1.29</b> ± 0.16	4	<b>2.59</b> ± 0.46	0.00

**LÉGENDE :** Paramètres échocardiographiques des souris contrôles non transgéniques et Pkd1<sub>TAG</sub>26.

**Abréviations :** **n** ; nombre de souris analysées, **SIV** ; septum intra ventriculaire, **d** ; diastole, **s** ; systole, **MPVG** ; mur postérieur du ventricule gauche, **DA** ; diamètre aortique, **SA** ; surface aortique, **RC** ; rythme cardiaque, **VMoV** ; valeur moyenne de vitesse, **VMaV** ; valeur maximale de vitesse, **FE** ; fraction éjection, **IR** ; indice de rétrécissement, **VVG** ; volume du ventricule gauche, **VEA** ; volume d'éjection aortique, **DC** ; débit cardiaque, **P** ; Valeur P du test de Student; les données sont considérées comme significativement différentes des valeurs contrôles lorsque  $P \leq 0.05$ .

**Annexe 3:****Expression rénale de *Pkd2* chez les souris *Pkd1*<sub>TAG</sub>.**

**LÉGENDE :** Analyse de l'expression rénale de *Pkd2* chez les souris *Pkd1*<sub>TAG</sub> par buvardage de type Northern. On observe de gauche à droite les niveaux d'expression de *Pkd2* (haut) et *Gapdh* (bas) de 2 souris contrôles (C), *Pkd1*<sub>TAG</sub>6, *Pkd1*<sub>TAG</sub>18 et *Pkd1*<sub>TAG</sub>26.

**Abréviations :** **C** ; souris contrôles non transgéniques, ***Pkd2*** ; Polycystic kidney disease 2, ***Gapdh*** ; Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, **NE** ; niveau d'expression relatif aux reins contrôles.

**Annexe 4:****Expression de *Pkd2* dans les reins de plusieurs modèles murins *Pkd1*.**

Lignée	Âge mois	n	Expression rénale de <i>Pkd2</i> ( <i>Pkd2</i> / <i>S16</i> )	P
Contrôle	6-8	3	1.0 ± 0.3	
<i>Pkd1</i> <sub>TAG6</sub>	4-6	3	1.3 ± 0.4	0.33
	13-19	2	2.7 ± 0.6	0.34
<i>Pkd1</i> <sub>TAG26</sub>	6-9	3	0.9 ± 0.5	0.87
<i>Pkd1</i> <sub>ΔCoiled-coil 42</sub>	4-5	3	1.2 ± 0.7	0.71
	18	3	1.4 ± 0.8	0.47
<i>Pkd1</i> <sub>ΔCoiled-coil 49</sub>	4-6	3	2.4 ± 0.9	0.10
	14-19	3	0.9 ± 0.4	0.79
<i>SBPkd1</i> <sub>TAG3</sub>	3-7	3	0.5 ± 0.2	0.10
	12-19	3	1.0 ± 0.2	0.86
<i>SBPkd1</i> <sub>TAG41</sub>	5-6	3	0.9 ± 0.4	0.83
	19-20	3	0.8 ± 0.7	0.61
<i>Pkd1</i> <sup>-/-</sup>	E17.5	3	2.0 ± 0.5	0.06

**LÉGENDE :** Expression rénale de *Pkd2* évaluée par PCR quantitatif. Les valeurs d'expression des différents modèles *Pkd1* sont relatives aux reins contrôles arbitrairement rapportés à 1. Chaque souris a été analysée en triplicata.

**Abréviations:** *Pkd2*; Polycystic kidney disease 2, *S16*; ribosomal protein S16, **P**; Valeur P du test de Student (Significatif si  $P \leq 0.05$ ).

**Annexe 5:****Expression de *c-Myc* dans les reins de plusieurs modèles murins *Pkd1*.**

Lignée	Âge mois	n	Expression rénale de <i>c-Myc</i> ( <i>c-Myc</i> / <i>S16</i> )	P
Contrôle	6-8	3	1.0 ± 0.6	
<i>Pkd1</i> <sub>TAG26</sub>	6-9	5	4.8 ± 2.4	0.02
<i>Pkd1</i> <sub>ΔCoiled-coil 42</sub>	4-5	3	2.4 ± 1.8	0.32
<i>SBPkd1</i> <sub>TAG39</sub>	4-7	3	2.8 ± 2.5	0.33
<i>SBM 14</i>	7	1	21.1	
<i>Pkd1</i> <sup>-/-</sup>	E17.5	3	2.5 ± 1.0	0.11

**LÉGENDE :** Expression rénale de *c-Myc* relative aux reins contrôles et évaluée par PCR quantitatif.

**Abréviations:** *c-Myc*; Myelocytomatosis oncogene, *S16*; ribosomal protein S16, **P**; Valeur P du test de Student (Significatif si  $P \leq 0.05$ ).

**Annexe 6:****Expression de *m-TOR* dans les reins de plusieurs modèles murins *Pkd1*.**

Lignée	Âge (mois)	n	Expression rénale de m-TOR (m-TOR/S16)	P
<b>Contrôle</b>	6-8	3	<b>1.0 ± 0.1</b>	
<b>Pkd1<sub>TAG6</sub></b>	4-6	3	<b>1.3 ± 0.5</b>	0.39
	13-19	3	<b>2.7 ± 1.8</b>	0.24
<b>Pkd1<sub>TAG26</sub></b>	6-9	3	<b>1.0 ± 0.5</b>	0.95
<b>Pkd1<sub>ΔCoiled-coil</sub> 42</b>	4-5	3	<b>1.2 ± 0.7</b>	0.70
	18	3	<b>0.93 ± 0.6</b>	0.86
<b>Pkd1<sub>ΔCoiled-coil</sub> 49</b>	4-6	3	<b>1.4 ± 1.2</b>	0.65
	14-19	3	<b>1.1 ± 0.9</b>	0.92
<b>SBPkd1<sub>TAG39</sub></b>	4-7	3	<b>2.3 ± 2.5</b>	0.47
<b>SBPkd1<sub>TAG41</sub></b>	19-20	2	<b>0.9 ± 0.5</b>	0.77
<b>Pkd1<sup>-/-</sup></b>	E17.5	3	<b>2.2 ± 0.3</b>	0.01

**LÉGENDE :** Expression rénale de *m-TOR* relative aux reins contrôles et évaluée par PCR quantitatif.

**Abréviations:** *m-TOR*; mammalian Target of Rapamycin, **S16**; ribosomal protein S16, **P**; Valeur P du test de Student (Significatif si  $P \leq 0.05$ ).

**Annexe 7:****Expression de *c-Jun* dans les reins de plusieurs modèles murins *Pkd1*.**

Lignée	Âge mois	n	Expression rénale de <i>c-Jun</i> ( <i>c-Jun</i> / <i>S16</i> )	P
Contrôle	6-8	3	1.00 ± 0.07	
<i>Pkd1</i> <sub>TAG6</sub>	4-6	3	0.41 ± 0.07	0.00
	13-19	3	0.49 ± 0.15	0.01
<i>Pkd1</i> <sub>TAG26</sub>	6-9	3	0.59 ± 0.17	0.04
<i>Pkd1</i> <sub>ΔCoiled-coil</sub> 42	4-5	3	1.00 ± 0.37	0.99
	18	3	0.83 ± 0.68	0.71
<i>Pkd1</i> <sub>ΔCoiled-coil</sub> 49	4-6	3	0.75 ± 0.37	0.36
	14-19	3	0.76 ± 0.72	0.62
SB <i>Pkd1</i> <sub>TAG3</sub>	3-7	3	0.82 ± 0.61	0.65
	12-19	3	1.43 ± 0.78	0.43
SB <i>Pkd1</i> <sub>TAG39</sub>	4-7	3	1.01 ± 0.62	0.97
SB <i>Pkd1</i> <sub>TAG41</sub>	5-6	3	0.95 ± 0.41	0.84
	19-20	3	0.70 ± 0.59	0.48
<i>Pkd1</i> <sup>-/-</sup>	E17.5	5	0.94 ± 0.68	0.86

**LÉGENDE :** Expression rénale de *c-Jun* relative aux reins contrôles et évaluée par PCR quantitatif.

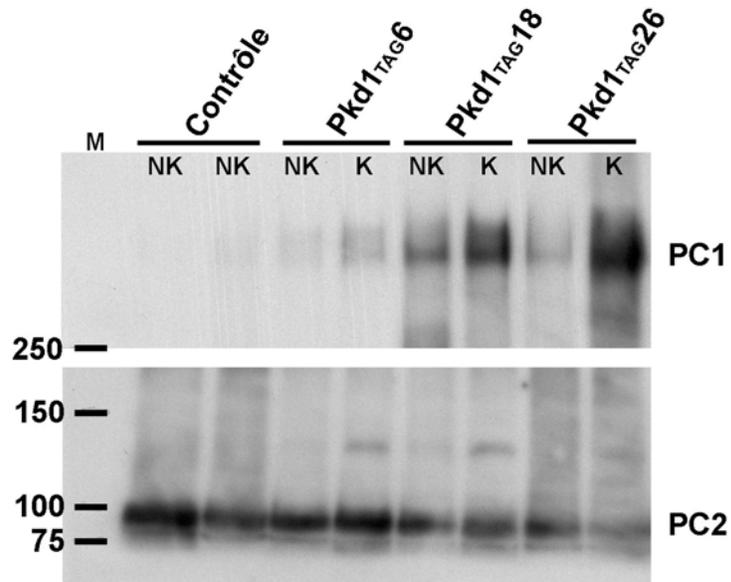
**Abréviations:** *c-Jun*; Jun oncogene, *S16*; ribosomal protein S16, **P**; Valeur P du test de Student (Significatif si  $P \leq 0.05$ ).

**Annexe 8:****Expression de *Nek8* dans les reins de plusieurs modèles murins *Pkd1*.**

Lignée	Âge (mois)	n	Expression rénale de <i>Nek8</i> ( <i>Nek8</i> / <i>S16</i> )	P
Contrôle	6-8	3	1.0 ± 0.2	
<i>Pkd1</i> <sub>TAG26</sub>	6-9	3	5.1 ± 1.4	0.04
<i>Pkd1</i> <sub>ΔCoiled-coil</sub> 42	4-5	3	1.2 ± 0.9	0.79
SB <i>Pkd1</i> <sub>TAG39</sub>	4-7	3	4.0 ± 0.7	0.01
<i>Pkd1</i> <sup>-/-</sup>	E17.5	2	4.9 ± 0.3	0.01

**LÉGENDE :** Expression rénale de *Nek8* relative aux reins contrôles et évaluée par PCR quantitatif.

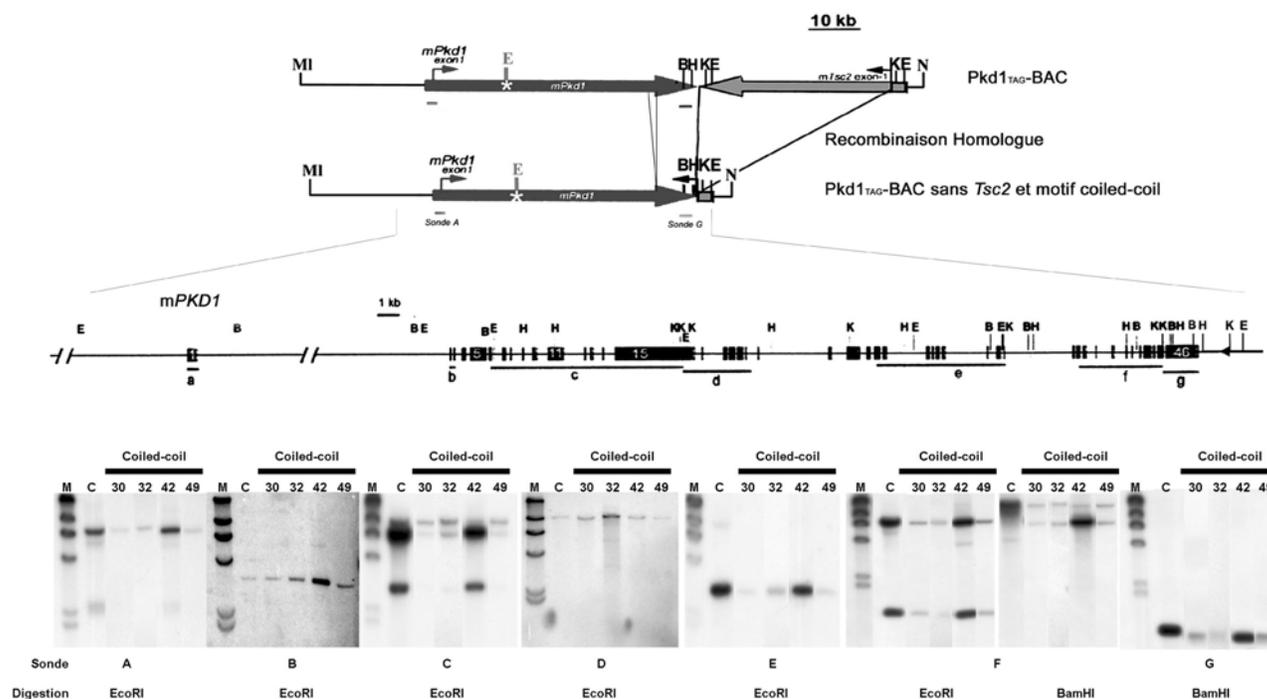
**Abréviations:** *Nek8*; Nima-related expressed kinase 8, *S16*; ribosomal protein S16, **P**; Valeur P du test de Student (Significatif si  $P \leq 0.05$ ).

**Annexe 9:****Expression de la polycystine-2 dans les reins Pkd1<sub>TAG</sub>.**

**LÉGENDE** : Expression rénale de PC2 évaluée par immunobuvardage.

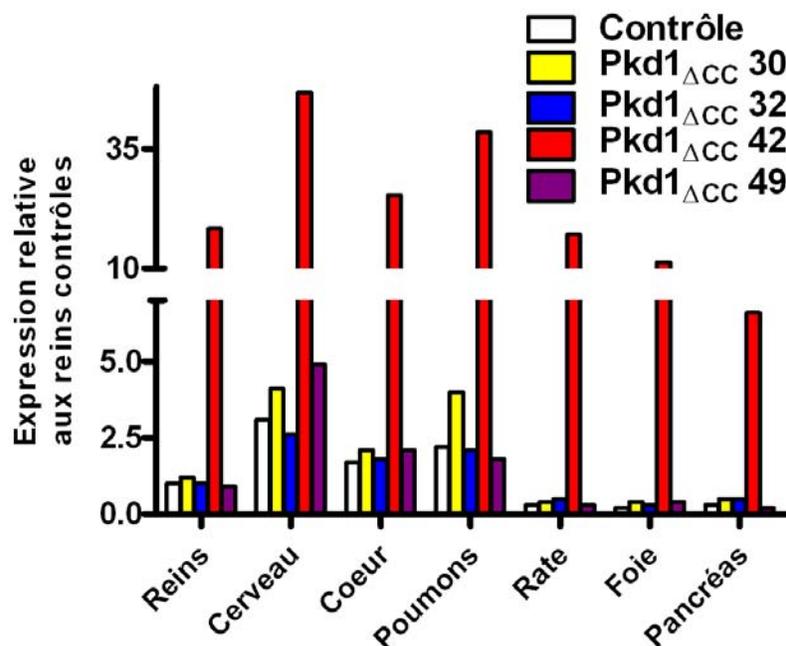
**Abréviations:** **M**; Marqueur de poids moléculaire (kilodaltons), **NK**; non-kystique, **K**; kystique, **PC1**; polycystine-1, **PC2**; Polycystine-2.

## Annexe 10:

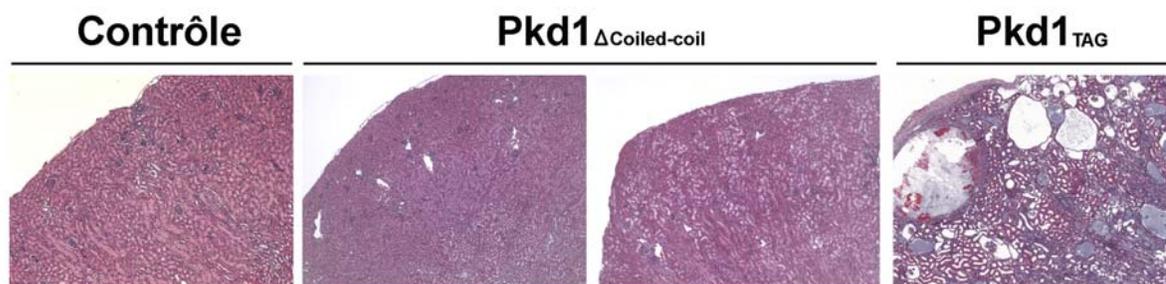
Production et analyse de l'intégrité du transgène  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$ .

**LÉGENDE :** Production et analyse de l'intégrité du transgène  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$ . La figure du haut démontre la construction  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$ -BAC générée par recombinaison homologue à partir du  $Pkd1_{TAG-BAC}$ . On note les sept sondes  $Pkd1$  utilisées pour évaluer l'intégrité du transgène sous les exons dans le schéma (sondes a à g). La figure du bas démontre les analyses de l'ADN génomique des 4 lignées de souris  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$ , nommées 30, 32, 42 et 49, par buvardage de type Southern. On observe les bandes caractéristiques de la délétion du coiled-coil sur les deux derniers panneaux à gauche (digestion BamHI ; sonde F et G).

**Abréviations:** M; Marqueur de poids moléculaire (kilodaltons), C; ADN contrôle sans délétion ( $Pkd1_{TAG}$ ).

**Annexe 11:****Expression du transgène  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$** 

**LÉGENDE :** Expression du transgène  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$  relative aux reins contrôles et évaluée par PCR quantitatif. Le niveau d'expression corrèle avec le nombre de copie du transgène suggérant, comme chez les souris  $Pkd1_{TAG}$ , la présence de tous les éléments régulateurs nécessaires à l'expression tissu-spécifique du transgène.

**Annexe 12:****Phénotype rénal des souris  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$** 

**LÉGENDE :** Sections corticales de reins adultes (Gauche à droite ; souris contrôle de 7 mois,  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$  42 de 7 mois et de 15 mois ainsi que  $Pkd1_{TAG}$  26 de 7 mois ; Hématoxyline et éosine, X5). Il est à noter que les souris transgéniques possèdent un nombre de copie équivalent de leur transgène respectif (~15 copies). Comparativement aux souris  $Pkd1_{TAG}$ , les souris  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$  ne développent pas de kystes rénaux.

**Annexe 13:****Paramètre urinaire des souris Pkd1<sub>ΔCoiled-coil</sub>**

Lignée	Âge (mois)	n	Volume (mL)	Bun (mmol/litre)	Créatinine (mmol/litre)	Protéines (g/litre)	Osmolalité (mosm/kg)
<b>Contrôle</b>	2-7	10	<b>0.8 ± 0.4</b>	<b>776 ± 151</b>	<b>3.2 ± 0.8</b>	<b>5.8 ± 5.2</b>	<b>1468 ± 339</b>
<b>Pkd1<sub>ΔCoiled-coil</sub>42</b>	2-10	4	<b>0.6 ± 0.3</b>	<b>1071 ± 577</b>	<b>4.6 ± 1.7</b>	<b>7.2 ± 5.2</b>	<b>1863 ± 434</b>
<b>Pkd1<sub>ΔCoiled-coil</sub>49</b>	2-8	3	<b>0.7 ± 0.3</b>	<b>1272 ± 433</b>	<b>5.8 ± 2.6</b>	<b>17.3 ± 13.7</b>	<b>1741 ± 375</b>

**LÉGENDE :** Paramètres urinaires des souris Pkd1<sub>ΔCoiled-coil</sub>. Le volume, les niveaux de Bun, de créatinine, de protéines urinaires et d'osmolalité ne varient pas de façon significative, suggérant une fonction rénale normale comparativement aux souris contrôles. À noter ; le n représente le nombre minimal de souris utilisé par lignée tout paramètres confondus.

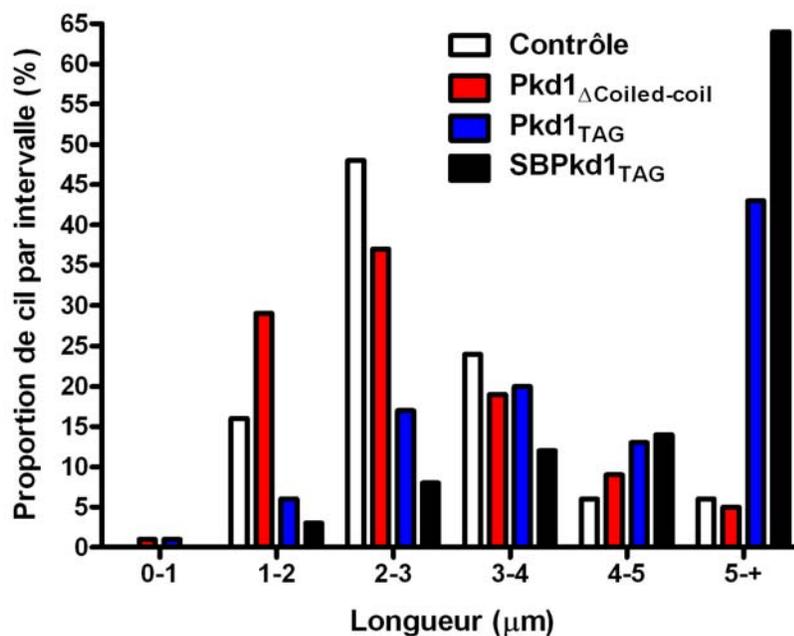
**Annexe 14:****Nombre de glomérules rénaux par unités de surface chez les souris****Pkd1<sub>ΔCoiled-coil</sub>**

Lignée	Âge (mois)	n	Glomérules (g/mm <sup>2</sup> )	P
<b>Contrôle</b>	1-6	11	<b>9.8 ± 1.0</b>	
<b>Pkd1<sub>ΔCoiled-coil</sub>30</b>	2	3	<b>6.2 ± 1.1</b>	0.015
<b>Pkd1<sub>ΔCoiled-coil</sub>32</b>	2-3	3	<b>5.5 ± 1.0</b>	0.006
<b>Pkd1<sub>ΔCoiled-coil</sub>42</b>	3-5	3	<b>5.0 ± 0.9</b>	0.002
<b>Pkd1<sub>ΔCoiled-coil</sub>49</b>	4-5	3	<b>5.5 ± 0.7</b>	0.001

**LÉGENDE :** Nombre de glomérule par unité de surface dans les reins Pkd1<sub>ΔCoiled-coil</sub>. Les souris adultes de toutes les lignées Pkd1<sub>ΔCoiled-coil</sub> démontrent une diminution significative du nombre de glomérule par unité de surface comparativement aux contrôles. **P**; Valeur P du test de Student (Significatif si P ≤ 0.05).

## Annexe 15:

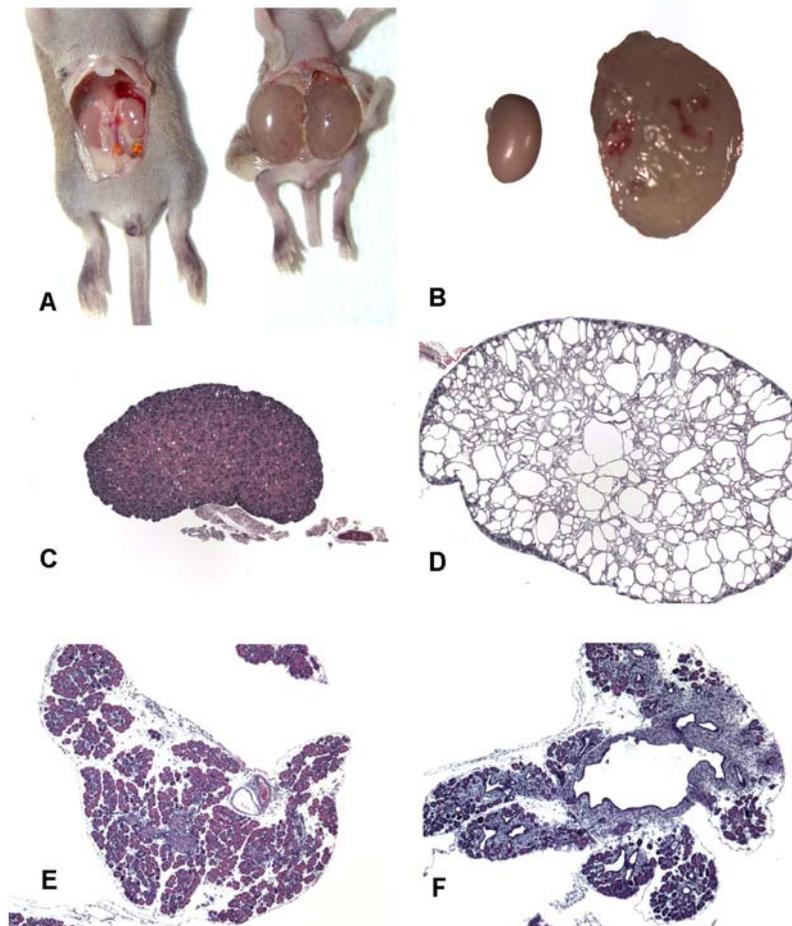
### Caractérisation du cil primaire dans les reins $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$



**LÉGENDE :** Caractérisation de la longueur du cil primaire dans les cellules épithéliales rénales  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$ . La distribution de la longueur des cils primaires des souris  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}$  (rouge) est comparable à ceux des souris non-transgéniques âgées de 2 mois. Inversement, les modèles PKRAD  $Pkd1_{TAG}$  et  $SBPkd1_{TAG}$  démontrent une plus grande proportion de cil plus grand que 5 microns.

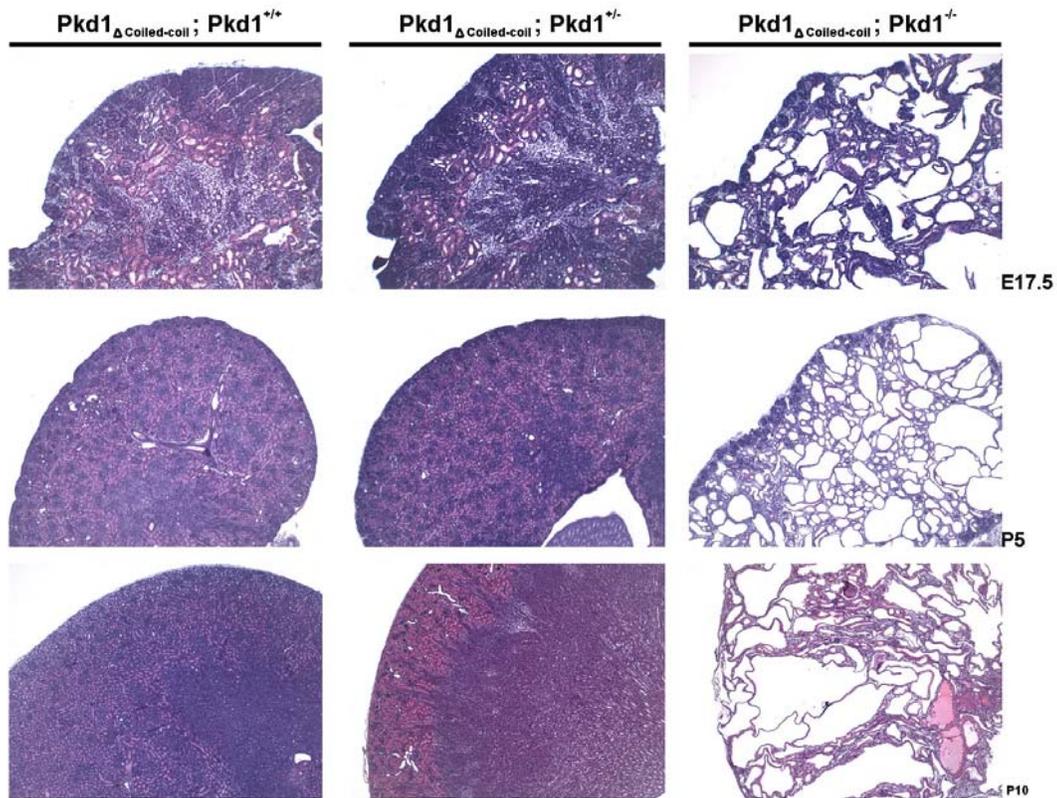
## Annexe 16:

### Phénotype rénal et pancréatique des souris $Pkd1_{\Delta Coiled-coil} 49$ ; $Pkd1^{-/-}$ .



**LÉGENDE :** Phénotype des souris  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil} 49$  ;  $Pkd1^{-/-}$ . (A) Laparotomie de souris  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil} 49$  ;  $Pkd1^{+/+}$  (à droite) et  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil} 49$  ;  $Pkd1^{-/-}$  (à gauche) âgées de 10 jours. (B) Les reins des souris mutantes homozygotes peuvent représenter 1/3 du poids total des souris mais conserve une forme extérieure d'apparence lisse. (C, D) Des coupes histologiques démontrent la présence de dilatations massives dans les reins  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil} 49$  ;  $Pkd1^{-/-}$  comparativement aux contrôles. On note la perte de la distinction entre le cortex et la médulla (Hématoxyline et éosine). (E, F) Les souris  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil} 49$  ;  $Pkd1^{-/-}$  développent aussi des dilatations et des kystes pancréatiques (à droite).

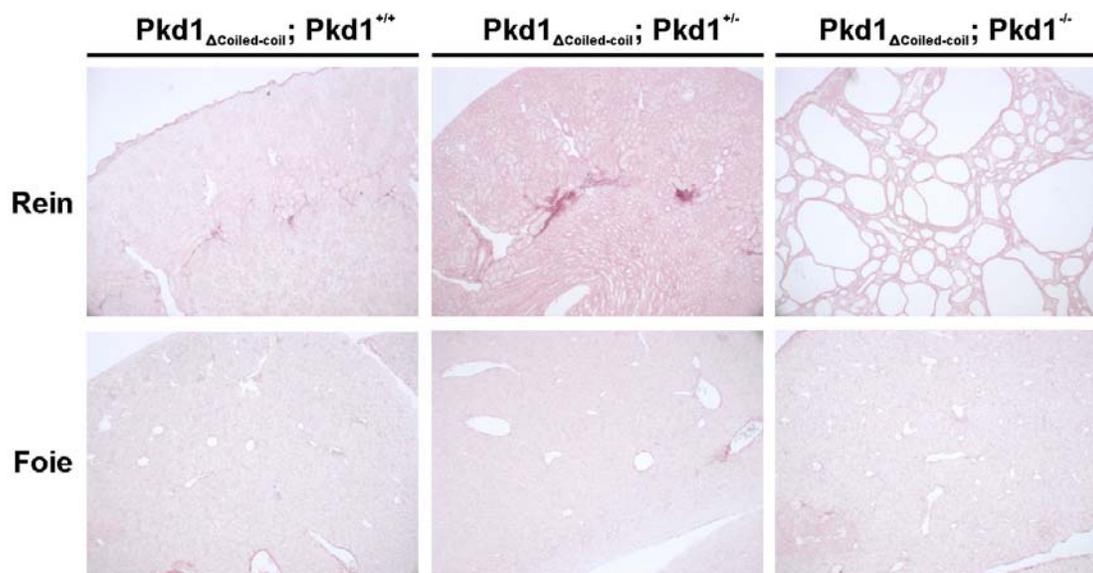
## Annexe 17:

Progression du phénotype rénal des souris  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}^{49}; Pkd1^{-/-}$ .

**LÉGENDE** : Progression des kystes rénaux chez les souris  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}^{49}; Pkd1^{-/-}$ . On observe déjà la présence de kystes au 17,5<sup>e</sup> jour embryonnaire (E17.5) ainsi qu'une progression rapide des kystes entre le jour 5 et le jour 10 (Hématoxyline et éosine, ligne du haut X5, ligne du milieu et du bas X10).

**Annexe 18:**

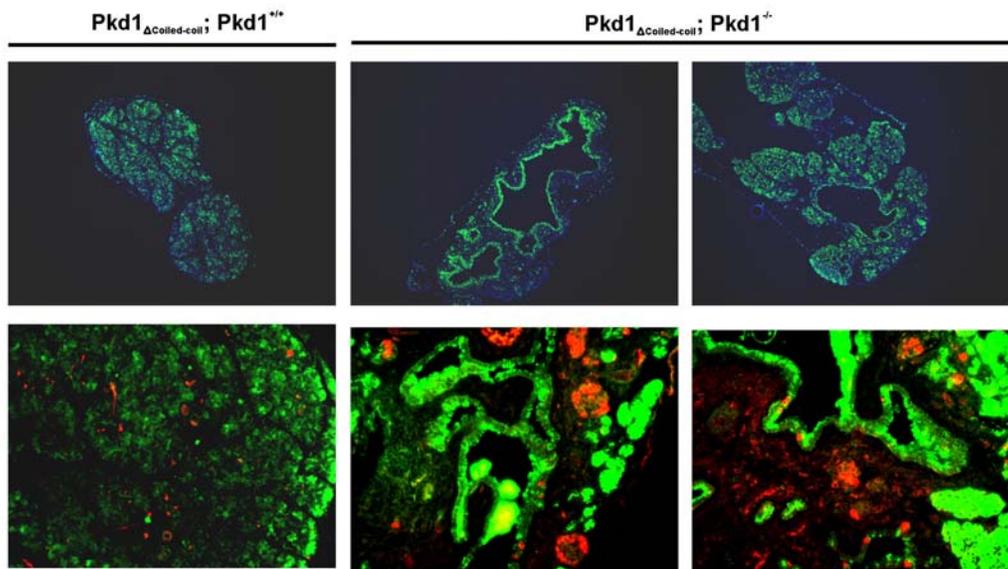
**Développement de fibrose chez les souris  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}^{49}$  ;  $Pkd1^{-/-}$ .**



**LÉGENDE :** Analyse du développement de la fibrose rénale et hépatique de souris  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}^{49}$  ;  $Pkd1^{-/-}$  âgées de 5 jours (Rouge de Sirius, X5). On observe une augmentation progressive du niveau de fibrose rénale (haut) chez les transgéniques  $+/+$ ,  $+/-$  et  $-/-$ . Le foie n'est pas affecté significativement par la formation de fibrose hépatique (bas).

## Annexe 19:

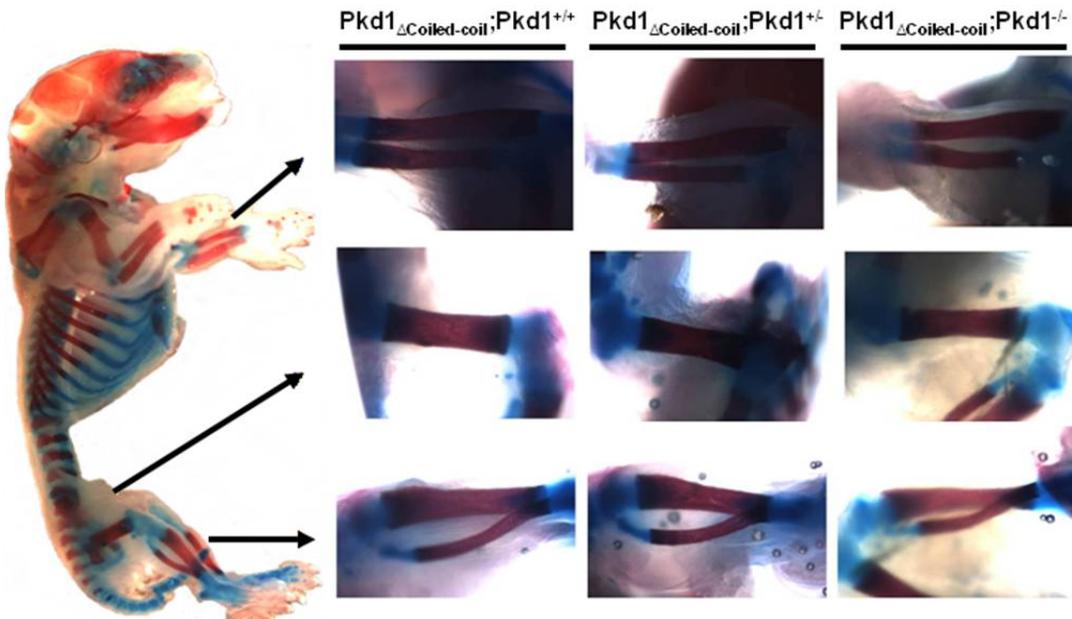
### Phénotype pancréatique des souris $Pkd1_{\Delta Coiled-coil} 49$ ; $Pkd1^{-/-}$ .



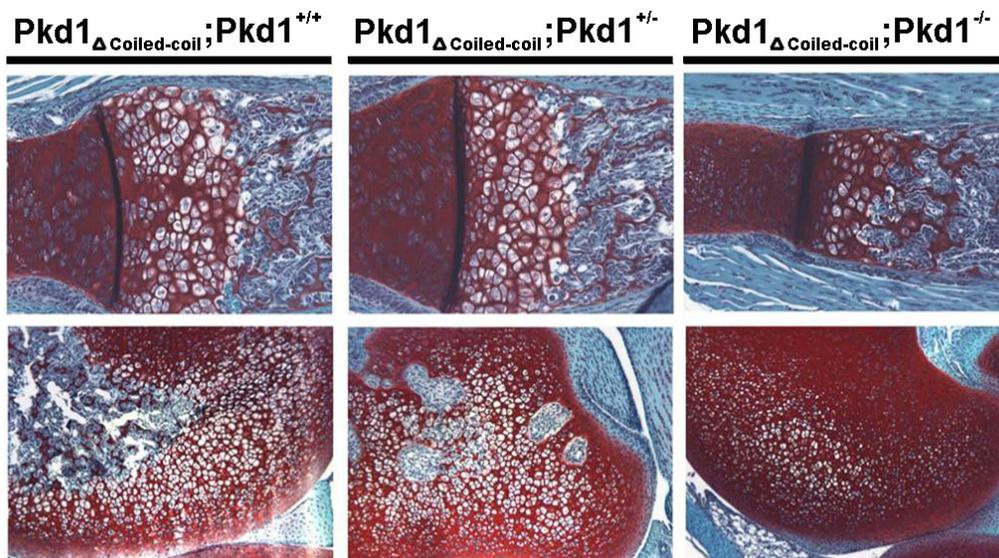
**LÉGENDE :** Phénotype pancréatique des souris  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil} 49$  ;  $Pkd1^{-/-}$ . (Haut) Analyse des niveaux de prolifération par immunofluorescence à l'aide du marqueur Ki67. On note une augmentation du signal de prolifération dans les cellules bordant les kystes pancréatiques des souris  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil} 49$  ;  $Pkd1^{-/-}$  dès le 5<sup>e</sup> jour comparativement aux contrôles  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil} 49$  ;  $Pkd1^{+/+}$  (Vert ; Ki67, X5). (Bas) Analyse de l'origine des kystes à 10 jours (vert ; amylase, rouge ; glucagon, 5X). Les kystes démontrent une coloration verte suggérant une anoalies des cellules acineuses et épithéliales des conduits pancréatiques.

**Annexe 20:**

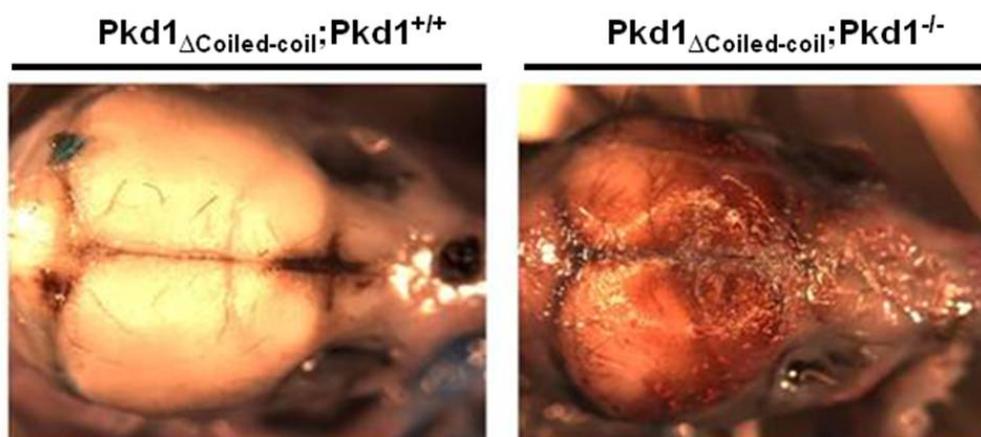
**Analyse des os longs des souris  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil} 49$  ;  $Pkd1^{-/-}$ .**



**LÉGENDE :** Analyse des os longs dans les souris  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil} 49$  ;  $Pkd1^{-/-}$  (5X). Les ratios des os longs principaux (radius, cubitus, fémur, tibia, péroné) sur la longueur totale des souris ne démontrent pas de différence significative à 10 jours.

**Annexe 21:****Analyse histologique des os de souris  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}^{49}$  ;  $Pkd1^{-/-}$ .**

**LÉGENDE :** Analyse histologique des os longs dans les souris  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}^{49}$  ;  $Pkd1^{-/-}$ . (Haut) Sections du péroné démontrant la densité du cartilage coloré en rouge (Safranine O, Fast green ; X5). Noter la diminution du nombre et de la grosseur des chondrocytes dans les plaques de croissance (10 jours). (Bas) Sections de la tête du fémur (X10).

**Annexe 22:****Anomalies cérébrales des souris  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}^{49}$  ;  $Pkd1^{-/-}$ .**

**LÉGENDE :** Anomalies cérébrales observées chez les souris  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}^{49}$  ;  $Pkd1^{-/-}$ . On dénote la présence de sang sous le crâne suggérant la présence d'hémorragies.

**Annexe 23:****Expression relative de *Pkd1* dans les reins du modèle murin SBM.**

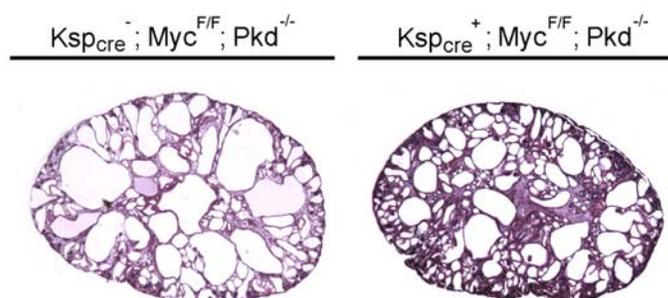
Lignée	n	Expression de Pkd1 Pkd1/S16	P
Contrôle	11	1.0 ± 0.2	
SBM 14	10	2.4 ± 0.5	<0.001
SBM 47	4	1.9 ± 0.4	0.016
SBM 81	4	1.9 ± 0.3	0.003
SBM 83	5	1.9 ± 0.9	0.080

**LÉGENDE** : Expression rénale de *Pkd1* relative aux reins contrôles dans les souris SBM.

**Abréviations** : P; Valeur P du test de Student (Significatif si  $P \leq 0.05$ ).

**Annexe 24:****Analyse du rôle de *c-Myc* dans le mécanisme de kystogénèse**

Lignée	n	Surface kystique (%)	P
$Ksp_{cre}; Pkd1^{-/-}; Myc^{+/+}$	11	61.4 ± 12.0	
$Ksp_{cre}; Pkd1^{-/-}; Myc^{Flox/+}$	3	54.7 ± 20.0	0.04
$Ksp_{cre}; Pkd1^{-/-}; Myc^{Flox/Flox}$	6	45.0 ± 17.5	0.08

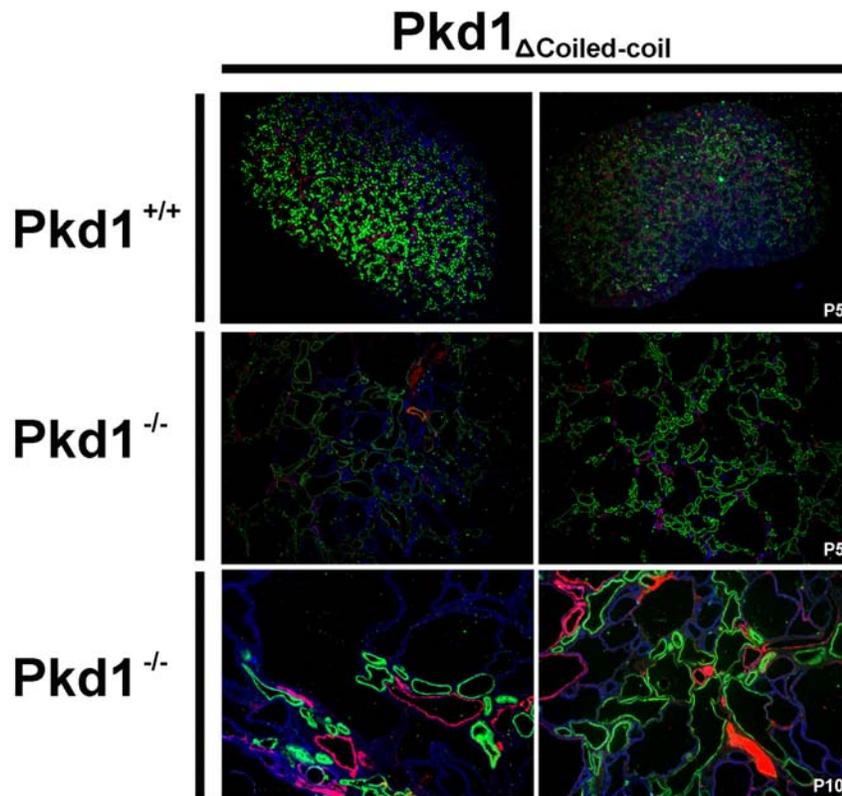


**LÉGENDE** : Évaluation de la surface kystique des reins dans un modèle d'ablation génique conditionnelle de *c-Myc* sur un fond génétique  $Pkd1^{-/-}$ . Sur le tableau du haut, on remarque que la surface kystique des reins semble diminuer de l'ordre de 20% dans les souris  $Ksp_{cre}; Pkd1^{-/-}; Myc^{Flox/Flox}$ , une valeur proportionnelle au taux de recombinaison d'environ 25 % de la cre utilisée. La figure du bas démontre le phénotype rénal observé en absence de cre recombinase (à gauche) et en présence de cre (à droite).

**Abréviations** : P; Valeur P du test de Student (Significatif si  $P \leq 0.05$ ).

**Annexe 25:**

Origine des kystes des souris  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}; Pkd1^{-/-}$ .



**LÉGENDE :** Analyse de l'origine des kystes rénaux à l'aide de marqueurs spécifiques aux différents segments du néphron. On observe les coupes rénales de souriceaux  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}; Pkd1^{+/+}$  et  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}; Pkd1^{-/-}$  de 5 et 10 jours (P5 et P10) marquées en bleu (Tubules distaux; Lypersicon Esculentum Lectin), rouge (Tubules collecteurs;  $\alpha$ -calbindin D28K) et vert (Tubules proximaux; Lotus Tetragonolobus Lectin). On remarque la dilatation massive des tubules  $Pkd1_{\Delta Coiled-coil}; Pkd1^{-/-}$  dès 5 jours et la progression jusqu'à 10 jours.