

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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

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

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

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

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

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

Université de Montréal

Rôles physiologiques des gènes *Adamts1* et *Adamts4* chez la souris

Par

Jean-François Lafond

Département de pathologie et microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la
Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade
Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences vétérinaires
option pathologie

Août 2008

© Jean-François Lafond, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé

**RÔLES PHYSIOLOGIQUE DES GÈNES *ADAMTS1* ET *ADAMTS4*
CHEZ LA SOURIS**

présenté par

JEAN-FRANÇOIS LAFOND

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Monique Doré, présidente-rapporteuse

Richard Drolet, directeur de recherche

Derek Boerboom, codirecteur

Bruce Murphy, membre du jury



Résumé

Les rôles d'*Adamts4*, un membre de la sous-famille de gènes *Adamts* (**a** **d**isintegrin **a**nd **m**etalloproteinase with **t**hrombos**p**ondin motifs) appelés aggrécanases sont largement méconnus et les souris porteuses d'une mutation nulle pour le gène *Adamts4* semblent normales. Nous formulons l'hypothèse qu'*Adamts1*, dont le patron d'expression et la spécificité de substrat sont très semblables à ceux d'*Adamts4*, pourrait avoir une redondance fonctionnelle avec *Adamts4* et serait capable de compenser sa perte. Afin de vérifier cette hypothèse, des souris porteuses de mutations nulles à la fois pour *Adamts1* et *Adamts4* ont été générées. Ces souris étaient affectées par un phénotype de mortalité périnatale associé à un défaut de développement important du pelvis et de la médulla des reins qui se révéla être la seule anomalie détectable après examen histologique complet de ces animaux. Ces lésions n'ont pas été observées dans les reins de souris *Adamts1*^{-/-}; *Adamts4*^{-/-} embryonnaires, ne devenant apparentes qu'autour de la naissance, lorsque les reins deviennent fonctionnels. Les rares (<1%) souris *Adamts1*^{-/-}; *Adamts4*^{-/-} ayant survécu jusqu'à l'âge adulte étaient affectées par le même phénotype rénal observé chez les nouveau-nés et ne présentaient aucune autre lésion. Le RTPCR en temps réel a montré qu'*Adamts1* et *Adamts4* partagent un patron d'expression similaire, tous deux étant fortement exprimés durant la période néonatale. Cette même technique a également démontré que la versicane, une molécule connue pour être métabolisée par *Adamts1* et *Adamts4*, est exprimée dans le rein murin néonatal alors que l'aggrécane, une autre molécule métabolisée par *Adamts1* et *Adamts4*, ne l'est pas. Ceci suggère que la versicane pourrait être le substrat d'*Adamts1* et *Adamts4* dans le rein en développement. Cette étude est la première à démontrer un rôle pour *Adamts4* dans le développement rénal et à

démontrer qu'*Adamts1* et *Adamts4* jouent des rôles essentiels et redondants dans le développement rénal périnatal.

Mots clés : *Adamts1*; *Adamts4*; rein; souris; mutation nulle; organogenèse; dilatation du pelvis rénal; dysgénésie rénale

Abstract

The roles of *Adamts4*, a member of the aggrecanase subfamily of *Adamts* (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) genes are still mostly unknown and *Adamts4* knockout mice appear phenotypically normal. We hypothesized that *Adamts1*, whose pattern of expression and substrate specificity overlap that of *Adamts4*, may be functionally redundant with *Adamts4* and be able to compensate for its loss. To test this, *Adamts1^{-/-}; Adamts4^{-/-}* double knockout mice were generated. *Adamts1^{-/-}; Adamts4^{-/-}* mice are affected by a phenotype of perinatal mortality associated with an important developmental defect of the renal pelvis and medulla, which was the only morphological abnormality seen after thorough histological examination of the animals. The renal lesion was not observed in embryonic *Adamts1^{-/-}; Adamts4^{-/-}* kidneys but became apparent around birth, once the kidneys start to function. The few (<1%) *Adamts1^{-/-}; Adamts4^{-/-}* animals to reach adulthood were affected by the same renal phenotype seen in newborns of the same genotype and did not display any other abnormality. Real-time RTPCR showed that *Adamts1* and *Adamts4* share a similar pattern of expression, both being strongly expressed during the perinatal period. Real-time RTPCR also showed that versican, a molecule known to be metabolized by *Adamts1* and *Adamts4*, was expressed in the neonatal murine kidney while aggrecan, another molecule known to be metabolized by *Adamts1* and *Adamts4*, was not. This suggested that versican could be the substrate for *Adamts1* and *Adamts4* in the developing kidney. This study is the first to demonstrate a role for *Adamts4* in renal development and to demonstrate that *Adamts1* and *Adamts4* play redundant and essential roles in perinatal kidney development.

Key words: *Adamts1*; *Adamts4*; kidney; knockout mice; organogenesis; pelvis dilation; renal dysgenesis

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	v
Liste des figures	x
Remerciements	xi
Introduction	1
Recension de littérature	3
1. Les gènes <i>Adamts</i>	3
1.1 Phylogénie et regroupements fonctionnels	3
1.1.1 Les agrécanases	4
1.1.2 Autres regroupements	5
1.2 Structure et fonction	6
1.2.1 Domaines fonctionnels	7
1.2.1.1 Le domaine métalloprotéinase	8
1.2.1.2 Le domaine désintégrine	8
1.2.1.3 Les motifs thrombospondines	8
1.2.1.4 Les clivages de l'extrémité C-terminale	9
1.3 Rôles physiologiques	9
1.3.1 ADAMTS1	9

1.3.2 ADAMTS4	10
1.3.3 Autres ADAMTS	11
2. Le développement rénal chez la souris	12
2.1 Les origines embryonnaires du rein	12
2.1.1 Le mésenchyme métanéphrique et le néphron	15
2.1.2 Le bourgeon urétérique et les tubules collecteurs	17
2.2 La morphogenèse par embranchement	17
2.3 Les médiateurs moléculaires du développement rénal	18
2.3.1 Voies de signalisation	19
2.3.2 Le rôle des protéoglycans sulfatés	20

Article : *Adamts1* and *Adamts4* play redundant roles in perinatal kidney

<u>development</u>	21
Abstract	22
Key words	23
Introduction	24
Materials and methods	27
Results	29
Discussion	32
Acknowledgements	36
References	37
Figure legends	41
Figures	42
<u>Discussion</u>	45

Conclusion	48
-------------------	-----------

Sources documentaires	49
------------------------------	-----------

Liste des figures

Recension de littérature:

Figure 1. Arbre phylogénique de la famille de gènes <i>Adamts</i>	4
Figure 2. Structure des protéines ADAMTS.....	7
Figure 3. Représentation schématique des trois phases du développement rénal montrant le pronéphros, le mésonéphros et le métanéphros ensemble, bien que le pronéphros soit déjà dégénéré quand le bourgeon urétérique se forme.	14
Figure 4. L'invasion du mésenchyme métanéphrique par le bourgeon urétérique et la morphogenèse par embranchement chez l'humain.	15
Figure 5. Représentation schématique des différents stades de formation des néphrons.	16

Article :

Figure 1. Renal medulla abnormality in newborn <i>Adamts1^{-/-}; Adamts4^{-/-}</i> mice.....	42
Figure 2. Perinatal onset of kidney phenotype in <i>Adamts1^{-/-}; Adamts4^{-/-}</i> mice.....	43
Figure 3. <i>Adamts1</i> , <i>Adamts4</i> and versican expression in the perinatal kidney.	44

Remerciements

Je tiens à remercier:

Dr Richard Drolet, directeur de recherche, et Dr Derek Boerboom, codirecteur, pour m'avoir confié ce projet et soutenu dans sa réalisation.

Dr Alexandre Boyer, Jacinthe Cardin, Céline Forget, Marie-Noëlle Laguë et Évelyne Lapointe pour leur aide au laboratoire et leur soutien technique.

Introduction

Les gènes *Adamts1* et *Adamts4* sont des membres de la famille *Adamts* (**a** **d**isintegrin **and** **m**etalloproteinase with **t**hrombospondin motifs), un groupe de protéases sécrétées contenant présentement 19 membres chez l'humain. De manière plus précise, *Adamts1* et *Adamts4* font partie d'une sous-famille de gènes *Adamts* appelés agrécanases. *Adamts5*, *Adamts8*, *Adamts9* et *Adamts15* sont également classés dans ce groupe. Ces gènes sont appelés agrécanases en raison de leur capacité de cliver des lecticanes riches en protéoglycanes comme l'aggrécane, la versicane, la brévicane et la neurocane. La protéine ADAMTS1 est capable de cliver l'aggrécane et la versicane et peut également inhiber, dans certaines conditions, l'angiogenèse induite par le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) et le FGF-2 (*Fibroblast Growth Factor 2*). Des souris porteuses de mutations nulles pour *Adamts1* ont été décrites, démontrant les nombreux rôles physiologiques de ce gène. Les souris *Adamts1*^{-/-} présentent des troubles de la croissance, du développement rénal, de l'ovulation et de la fertilité. L'enzyme ADAMTS4 est capable de cliver l'aggrécane, la versicane et la brévicane. *Adamts4* participe au métabolisme du cartilage articulaire et à la pathogénie de l'ostéoarthrite par son effet sur l'aggrécane. De plus, après stimulation de tissus articulaires par des cytokines inflammatoires, l'expression d'*Adamts4* augmente. Des souris *Adamts4*^{-/-} ont aussi été décrites, mais malgré l'expression étendue de ce gène et ses rôles physiologiques connus, ces animaux semblent parfaitement normaux. Le gène *Adamts4* ne serait donc pas essentiel au développement normal, à la croissance et aux fonctions physiologiques de la souris. Chez la souris comme chez tous les mammifères, les reins se développent en trois phases successives : le pronéphros, le mésonéphros et le métanéphros. Seul le métanéphros persiste et se différencie pour devenir la forme adulte et fonctionnelle du rein. Chez la

souris, le rein métanéphrique apparaît à 10,5 jours après la conception. À ce moment, son développement est possible grâce à deux structures transitoires, le bourgeon urétérique et le mésenchyme métanéphrique. À 11,5 jours après la conception, le bourgeon urétérique envahit le mésenchyme métanéphrique ce qui initie une phase d'induction réciproque des deux structures ainsi que la morphogénèse par embranchement. Le bourgeon urétérique se différencie en branches épithéliales qui deviendront les tubules collecteurs et qui envahissent le mésenchyme métanéphrique. À l'extrémité de ces branches, des cellules du mésenchyme métanéphrique forment des amas qui éventuellement se différencieront en cellules épithéliales et deviendront les glomérules et les tubules contournés des néphrons. Pendant la morphogénèse par embranchement, le bourgeon urétérique se divise un très grand nombre de fois pour former les tubules collecteurs du rein, qui croît selon un patron centrifuge. La biologie moléculaire de la morphogénèse rénale par embranchement est un sujet de recherche très dynamique et plusieurs médiateurs moléculaires ont été identifiés. Le sulfate d'héparane et le sulfate de chondroïtine font partie de ces molécules pour lesquelles des preuves biochimiques et génétiques démontrent une implication dans les mécanismes d'embranchement du bourgeon urétérique. La versicane est un protéoglycane riche en sulfate de chondroïtine qui fait partie de la matrice extracellulaire des tubules rénaux. Puisqu'*Adamts1* peut cliver la versicane, il est possible que la perte de cette activité protéolytique dans les souris *Adamts1*^{-/-} participe aux lésions rénales notées chez ces animaux. On ignore pour l'instant si d'autres agrécánases et leur activité protéolytique sont essentielles au développement rénal. L'objectif de cette étude était de déterminer les rôles d'*Adamts4*. Puisqu'*Adamts1* et *Adamts4* partagent plusieurs caractéristiques structurelles et fonctionnelles, nous formulons une hypothèse selon laquelle ces deux gènes auraient des rôles semblables et/ou complémentaires chez la souris.

Recension de littérature

1. Les gènes *Adamts*

Les gènes *Adamts* (**a** **d**isintegrin **and** **m**etalloproteinase with **t**hrombospondin motifs) forment un groupe de protéases sécrétées qui compte présentement 19 membres chez l'humain. Ce groupe de gènes constitue une branche de la sous-famille d'endopeptidase M12B *Adam* (**a** **d**isintegrin **and** **m**etalloproteinase-like ou **adam**alysine). À leur tour, les adamalysines forment l'un des sous-groupes des metzincines, avec les matrixines (MMP : métalloprotéinases matricielles), les astacines et les serralysines. Les metzincines tirent leur nom de l'ion zinc qu'elles contiennent ainsi que d'un résidu méthionine situé en aval de leur site catalytique (38). Les protéines codées par les gènes *Adamts* sont fortement apparentées aux protéinases ADAM. Par contre, alors que les ADAM sont des protéines transmembranaires (à l'exception de ADAM12 et 28), les ADAMTS sont des protéines sécrétées, plusieurs d'entre elles ayant la capacité de se lier à la matrice extracellulaire (38, 52).

1.1 Phylogénie et regroupements fonctionnels

Les ADAMTS ont été divisés en quatre sous-groupes soit les aggrécanases, les N-protéinases du procollagène, les vWFCP (*von Willebrand factor-cleaving protease*) et les GON-ADAMTS (Fig. 1). Cependant, plusieurs ADAMTS ne sont classés dans aucun de ces sous-groupes, leurs substrats et leur activité demeurant inconnus (38).

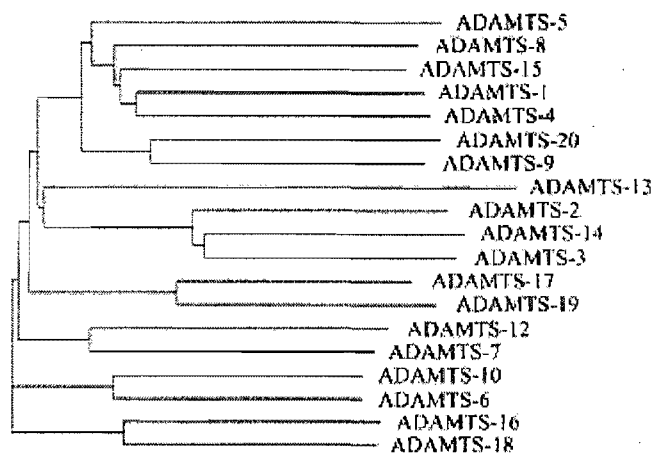


Fig. 1 Arbre phylogénique de la famille de gènes *Adamts* (tiré de Collins-Racie L.A. et al. (2004) ADAMTS8 exhibits aggrecanase activity and is expressed in human articular cartilage. *Matrix Biology* **23**, 219-230).

1.1.1 Les aggrecanases

Le sous-groupe des aggrecanases, le plus important des sous-groupes d'ADAMTS, est constitué d'ADAMTS1, 4, 5, 8, 9 et 15. Ces ADAMTS font partie de ce sous-groupe en raison de leur pouvoir de clivage de l'aggrecane, une lecticane principalement abondante dans le cartilage (17, 22, 38, 41, 50, 51). Les lecticanes sont un groupe de protéoglycans riches en sulfate de chondroïtine qui comporte, en plus de l'aggrecane, la versicane, la brévicane et la neurocane (35). La versicane a une distribution tissulaire plutôt étendue, alors que la brévicane et la neurocane se retrouvent quasi exclusivement dans le tissu nerveux (43). L'aggrecane, le protéoglycane principal du cartilage, est responsable de la résistance à la compression caractéristique de ce tissu et prévient la dégradation du collagène du cartilage (15, 22, 51). La forme humaine de la protéine contient 2316 acides aminés. Elle comporte trois domaines globulaires (G1, G2 et G3) ainsi qu'un domaine interglobulaire (entre G1 et G2) et une vaste région riche en sulfate de kératane et en sulfate

de chondroïtine (entre G2 et G3). Le domaine G1 permet à l'aggrécane d'interagir avec l'acide hyaluronique et de former des agrégats protéiques denses dans la matrice collagénique du cartilage (15, 22, 32, 50, 51). Deux sites de clivage principaux ont été identifiés dans le domaine interglobulaire de l'aggrécane. Ces sites de clivage sont les plus importants puisqu'un clivage dans le domaine interglobulaire cause la perte du domaine G1. L'un de ces sites de clivage est situé au niveau Asn³⁴¹-Phe³⁴² et correspond au site d'action de toutes les MMPs présentes dans le cartilage. L'autre site, situé à Glu³⁷³-Ala³⁷⁴, est un site de clivage pour les aggrécanasés. Quatre autres sites de clivage pour les aggrécanasés sont présents dans la région riche en sulfate de chondroïtine, mais leur importance physiologique semble beaucoup moindre (15, 22, 32, 50, 51). Les ADAMTS4 et 5 sont les aggrécanasés les mieux connus présentement. Toutes deux ont la capacité de cliver l'aggrécane au site Glu³⁷³-Ala³⁷⁴ ainsi qu'aux quatre autres sites mentionnés plus haut (32, 49, 50). ADAMTS4 et ADAMTS5 ont également la capacité de cliver la brévicane et la versicane (35, 38, 43). L'ADAMTS1 est également une aggrécanasé, capable de cliver l'aggrécane et la versicane, quoique de manière moins efficace que ne le fait l'ADAMTS4 (38, 43). L'ADAMTS9 possède aussi une activité aggrécanasé et versicanase alors que l'ADAMTS15 clive seulement l'aggrécane (38). L'ADAMTS8 a également la capacité de cliver l'aggrécane, mais cette activité aggrécanasé est faible (environ 3000 fois plus faible que l'activité aggrécanasé d'ADAMTS4) (38).

1.1.2 Autres regroupements

Comme mentionné précédemment, il existe trois autres sous-groupes d'ADAMTS. Le premier est le groupe des N-protéinases du procollagène, formé d'ADAMTS2, 3 et 14. Ces protéases participent à la maturation des molécules de procollagène en collagène de par leur

capacité à cliver les propeptides N-terminaux des différents types de procollagène. Ainsi, ADAMTS2 agit sur les procollagènes I, II et III, ADAMTS3 agit sur le procollagène II et ADAMTS14 agit sur le procollagène I (38). Ensuite, la subdivision vWFPC (*von Willebrand factor-cleaving protease*) ne compte qu'un seul membre, l'ADAMTS13. Comme son nom l'indique, son substrat est le facteur von Willebrand, une grosse glycoprotéine multimérique présente dans le plasma, les plaquettes et les cellules endothéliales dont les principaux rôles physiologiques sont de favoriser l'agrégation plaquettaire et de transporter le facteur VIII de la coagulation. De tous les membres de la famille ADAMTS, ADAMTS13 est celui qui démontre le moins d'homologie (38). Un dernier regroupement d'ADAMTS est celui des GON-ADAMTS dans lequel se retrouvent ADAMTS9 et 20. La séquence d'ADAMTS9 partage une forte homologie avec le gène *gon-1*, essentiel au développement des gonades chez *Caenorhabditis elegans*. ADAMTS20 possède une structure modulaire similaire à celui d'ADAMTS9, ce qui explique leur regroupement. L'importance de ces gènes pour le développement des gonades chez les mammifères demeure inconnue (38).

1.2 Structure et fonction

Les protéines ADAMTS sont toutes synthétisées initialement sous forme de pré-proenzymes inactives. En partant de l'extrémité N-terminale, elles comprennent toutes : un peptide signal, un pro-domaine, un domaine catalytique de type métalloprotéinase, un domaine désintégrine, une quantité variable répétée de domaines thrombospondines (TS), un domaine riche en cystéine possédant une forte homologie entre les différents ADAMTS, une région espaçante de longueur variable et un nombre variable de répétitions TS (allant

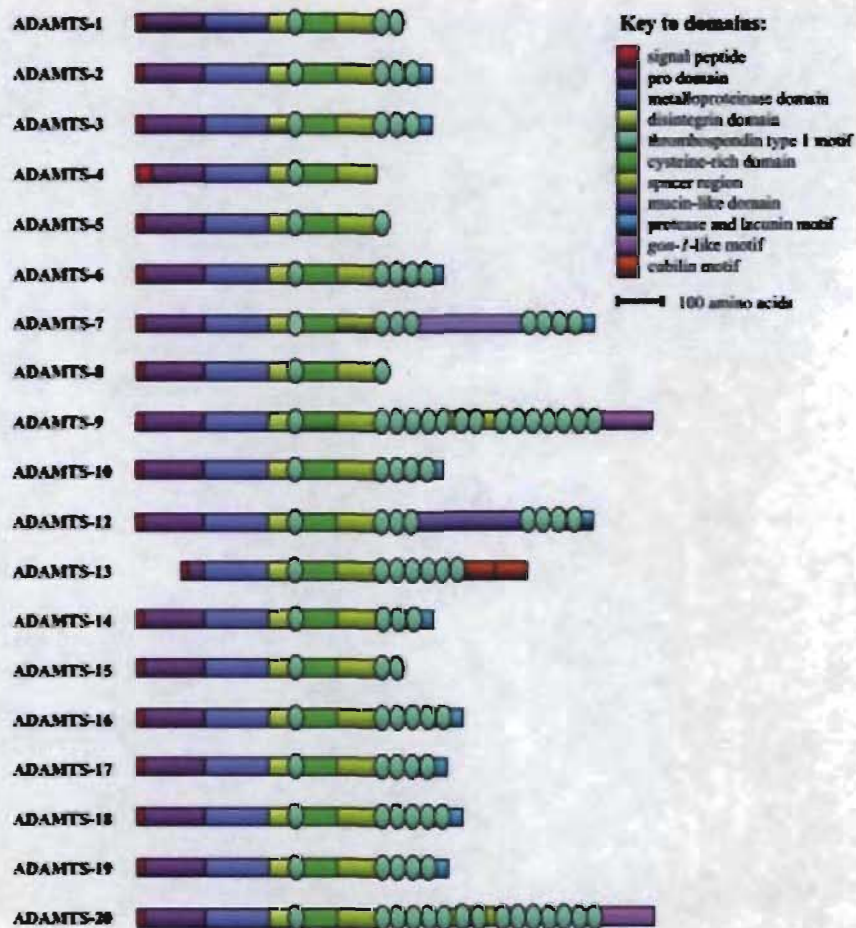


Fig. 2 Structure des protéines ADAMTS (tiré de Porter S. et al. (2005) The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem. J.* **386**, 15-27).

1.2.1 Domaines fonctionnels

Les parties les plus importantes pour la structure et la fonction des protéines ADAMTS sont les domaines métalloprotéinase, désintégrine et thrombospondine, ainsi que l'extrémité C-terminale qui peut subir différentes modifications.

1.2.1.1 Le domaine métalloprotéinase

Le domaine métalloprotéinase est un domaine catalytique possédant un motif de type reprotéinase ayant la capacité de se lier au zinc. Ce domaine métalloprotéinase possède une séquence HEXXHXXG/N/SXXHD (dans laquelle « X » représente n'importe quel acide aminé) comportant un résidu acide aspartique (D, à la fin de la séquence) conservé parmi tous les membres de la famille ADAMTS et qui les distingue des ADAMS et de toutes les autres métalloprotéinases. Ce domaine catalytique contient également un résidu méthionine à l'intérieur de la séquence V/IMA/S en aval du troisième résidu histidine liant le zinc (38, 52).

1.2.1.2 Le domaine désintégrine

Le domaine désintégrine des protéines ADAMTS partage certaines similarités de séquence avec les désintégrines de venin de serpent, une famille de polypeptides dont certains membres possèdent une séquence de reconnaissance des intégrines (arginine/glycine/acide aspartique). Cependant, aucun membre de la famille ADAMTS ne possède ce tripeptide dans son domaine désintégrine et aucune association entre les ADAMTS et les intégrines n'a été rapportée (38, 52).

1.2.1.3 Les motifs thrombospondines

Les motifs thrombospondines des protéines ADAMTS sont centraux, sont répétés en nombre variable et sont semblables à ceux décrits dans les protéines TSP1 et TSP2

(thrombospondines 1 et 2) (38, 50). Le motif TSP1 a la capacité de se lier aux glycosaminoglycans de l'aggrécane et la présence de ce motif est essentielle au clivage enzymatique de l'aggrécane par ADAMTS4 (50, 51).

1.2.1.4 Les clivages de l'extrémité C-terminale

Les modifications de l'extrémité C-terminale sont très importantes pour la spécificité de substrat et la localisation des enzymes ADAMTS. De telles modifications ont été décrites pour ADAMTS1, 4, 8, 9, et 12 (38). Dans le cas d'ADAMTS4, l'exemple le mieux décrit, l'extrémité C-terminale de la forme active complète de 75 kDa est clivée pour produire 2 isoformes de 60 et 50 kDa. Suite à ce clivage, l'enzyme quitte la matrice extracellulaire, probablement via une perte de sa capacité à se lier à la fibronectine. De plus, ce clivage entraîne des changements dans la fonction de l'enzyme, l'enzyme entière et ses isoformes ne clivant pas l'aggrécane au même endroit (17, 38).

1.3 Rôles physiologiques

1.3.1 ADAMTS1

L'enzyme ADAMTS1 est reconnue pour deux grandes fonctions. Comme mentionné plus tôt, ADAMTS1 est une aggrécanease capable de cliver l'aggrécane et la versicane, mais cette enzyme possède également une activité anti-angiogénèse, ayant la faculté d'inhiber dans certaines conditions l'angiogénèse induite par le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) et le FGF-2 (*Fibroblast Growth Factor 2*) (38). Cette activité anti-angiogénique serait due aux motifs thrombospondines, possiblement via une interaction avec la molécule

CD36, un récepteur membranaire glycoprotéique des cellules endothéliales (38). Ces motifs thrombospondines peuvent également se lier (de façon réversible) au VEGF, le séquestrant et bloquant la phosphorylation de son récepteur (30). De manière intéressante, la moitié C-terminale d'ADAMTS1 (comprenant les motifs thrombospondines) a causé une diminution de la tumorigénicité et du potentiel métastatique dans certaines études récentes réalisées avec des cellules de tumeurs ovariennes de hamster chinois chez la souris et *in vitro* (21). ADAMTS1 est donc une cible thérapeutique intéressante dans le traitement du cancer. La création de souris porteuses d'une mutation nulle (souris knockout) pour le gène ADAMTS1 ainsi que d'autres recherches ont démontré que ce gène joue un rôle physiologique important dans le développement rénal, les reins de ces animaux développant avec l'âge une perte importante de tissu médullaire. L'origine de cette lésion demeure incertaine, mais plusieurs hypothèses ont été avancées, entre autres la dysgénésie rénale ainsi que la dilatation du pelvis rénal suite à une obstruction de la jonction urétéro-pelvienne par de la fibrose (33, 34, 46, 53). En plus de cette importante lésion rénale, ces souris présentent des troubles de l'ovulation (4, 34, 42, 47), un retard de croissance important (46) et une fertilité très diminuée (34, 46).

1.3.2 ADAMTS4

Tout comme ADAMTS1, ADAMTS4 est une aggrécanease, possédant la capacité de cliver l'aggrécane et la versicane de même que la brévicane. Encore une fois comme pour ADAMTS1, des souris porteuses d'une mutation nulle pour le gène ADAMTS4 ont été générées afin de déterminer les rôles physiologiques de ces gènes. Après une évaluation histologique poussée, ces souris privées d'ADAMTS4 se sont révélées complètement normales. L'activité enzymatique de la protéine ADAMTS4 ne serait donc pas essentielle à

la croissance, au développement et au fonctionnement normal de l'organisme (18).

Cependant, lorsque la mutation nulle pour ADAMTS4 est combinée à une mutation nulle pour ADAMTS5 (souris double knockout), on note une diminution de la dégradation de l'aggrécane dans le cartilage articulaire ostéoarthritique ainsi qu'une diminution de la sévérité de lésions ostéoarthritiques (31, 32). En effet, la caractéristique pathologique principale de l'ostéarthrose est une perte du cartilage articulaire associée à une perte d'aggrécane de la matrice cartilagineuse (32). De plus, après stimulation de tissus articulaires à l'aide de cytokines inflammatoires, il y a une augmentation de l'expression d'ADAMTS4 (18). Cette enzyme est donc une cible thérapeutique intéressante dans le traitement de l'ostéarthrose.

1.3.3 Autres ADAMTS

ADAMTS2 est essentiel pour la maturation du collagène de type 1 dans la peau et des mutations dans ce gène sont responsables de la dermatosparaxie chez le mouton et le bovin, ainsi que du syndrome Ehlers-Danlos VIIC chez l'humain. Ces maladies, de même que la mutation nulle pour ADAMTS2 chez la souris, entraînent une fragilité cutanée sévère (38).

Tel que mentionné plus haut, ADAMTS3 et 14 sont également impliqués dans la maturation des différents types de collagène. L'importance physiologique de ces dernières demeure néanmoins à déterminer. ADAMTS5 est l'aggrécanease principale du cartilage de souris et, avec ou sans la présence d'ADAMTS4, son absence est un facteur de protection contre la dégradation du cartilage articulaire dans des modèles d'ostéarthrose (14).

ADAMTS6 (de même qu'ADAMTS4, 14 et 20) est surexprimé de manière significative et consistante dans le carcinome mammaire humain (39). ADAMTS7 et ADAMTS12 sont surexprimés dans le cartilage et la synovie lors d'arthrite rhumatoïde (28, 29). ADAMTS8

possède une activité anti-angiogénique semblable à celle d'ADAMTS1 (38) et son expression est significativement diminuée dans plusieurs tumeurs cérébrales (13). Des mutations dans le gène *Adamts10* ont été trouvées dans plusieurs cas humains de syndrome de Weill-Marchesani, une maladie caractérisée par une courte taille, une brachydactylie, une raideur articulaire et des anomalies oculaires. Ces observations ont permis de démontrer que ce gène joue un rôle majeur dans la croissance et le développement de plusieurs organes chez l'humain (8). ADAMTS13 est aussi connu sous le vocable vWFCP (*von Willebrand factor-cleaving protease*). Il est essentiel à l'équilibre hémostatique et sa déficience cause le purpura thrombocytopénique thrombotique (38). ADAMTS16 est une protéase active des follicules ovariens et jouerait un rôle physiologique dans la phase pré-ovulatoire (16). *Adamts18* est un gène suppresseur de tumeurs qui est inactivé dans plusieurs carcinomes (20).

2. Le développement rénal chez la souris

Le développement rénal est un sujet de recherche complexe et dynamique. Il est utile de mentionner ici que chez l'espèce humaine, 10% des individus sont atteints par une anomalie du développement rénal ayant des conséquences cliniques (9).

2.1 Les origines embryonnaires du rein

Chez les mammifères comme chez les oiseaux, le rein se développe en trois phases : le pronéphros, le mésonéphros et le métanéphros (25, 36, fig. 3). Ce dernier est le seul à se différencier complètement, devenant le rein métanéphrique, la forme adulte et permanente du rein chez ces espèces. Le pronéphros n'atteint une fonction excrétrice que dans les

stades larvaires de poissons et d'amphibiens alors que le mésonéphros constitue la forme fonctionnelle du rein chez les adultes de ces mêmes espèces (25). L'étude du développement embryonnaire du rein permet donc dans une certaine mesure d'observer à vitesse accélérée l'évolution de cet organe à travers plusieurs millions d'années, des vertébrés inférieurs aux vertébrés supérieurs. Chez la souris, le pronéphros est une structure transitoire et rudimentaire qui n'est présente que pendant un très court moment, soit autour du jour 8 suivant la conception (jours post-conception : j.p.c.) (25, 27). Par la suite, le mésonéphros se développe à partir d'une région du mésoderme appelée zone AGM (aorte-gonade-mésonéphros) (25). Les tubules mésonéphriques sont des structures de filtration transitoires qui se développent entre les j.p.c. 8 et 10 (27) et qui dégèrent en même temps que le rein métanéphrique se forme (10), à partir du j.p.c. 10,5 (1). À ce moment, un groupe de quelques milliers de cellules, le mésenchyme métanéphrique, forme un blastème bilatéralement dans la partie caudale du mésoderme intermédiaire ce qui induit l'apparition du bourgeon urétérique (j.p.c. 11), une excroissance épithéliale du canal de Wolff adjacent. Ce bourgeon envahit ensuite le mésenchyme métanéphrique (j.p.c. 11,5) ce qui en initie l'induction réciproque et débute la morphogenèse par embranchement (1, 10). De façon simplifiée, le bourgeon urétérique forme des branches épithéliales, les futurs tubules collecteurs, qui pénètrent dans le mésenchyme métanéphrique (fig. 4). Au bout de ces branches se forment des amas de cellules provenant du mésenchyme métanéphrique. Certaines de ces cellules mésenchymateuses vont se convertir en cellules épithéliales et former les néphrons, alors que d'autres garderont leur nature mésenchymateuse afin de constituer le stroma interstitiel du rein (10).

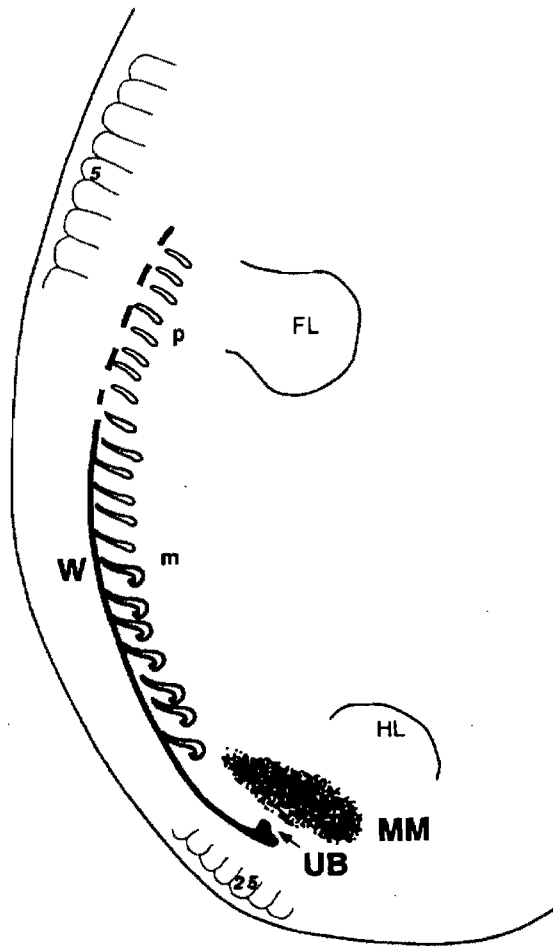


Fig. 3 Représentation schématique des trois phases du développement rénal montrant le pronéphros (p), le mésonéphros (m) et le métanéphros ensemble bien que le pronéphros soit déjà dégénéré quand le bourgeon urétérique (UB) se forme. Le mésenchyme métanéphrique (MM) n'est pas à l'échelle. FL : bourgeon du membre antérieur. HL : bourgeon du membre postérieur. W : canal de Wolff. (tiré de Lechner M.S. et Dressler G.R. (1997) The molecular basis of embryonic kidney development. *Mechanisms of development* 62, 105-120).

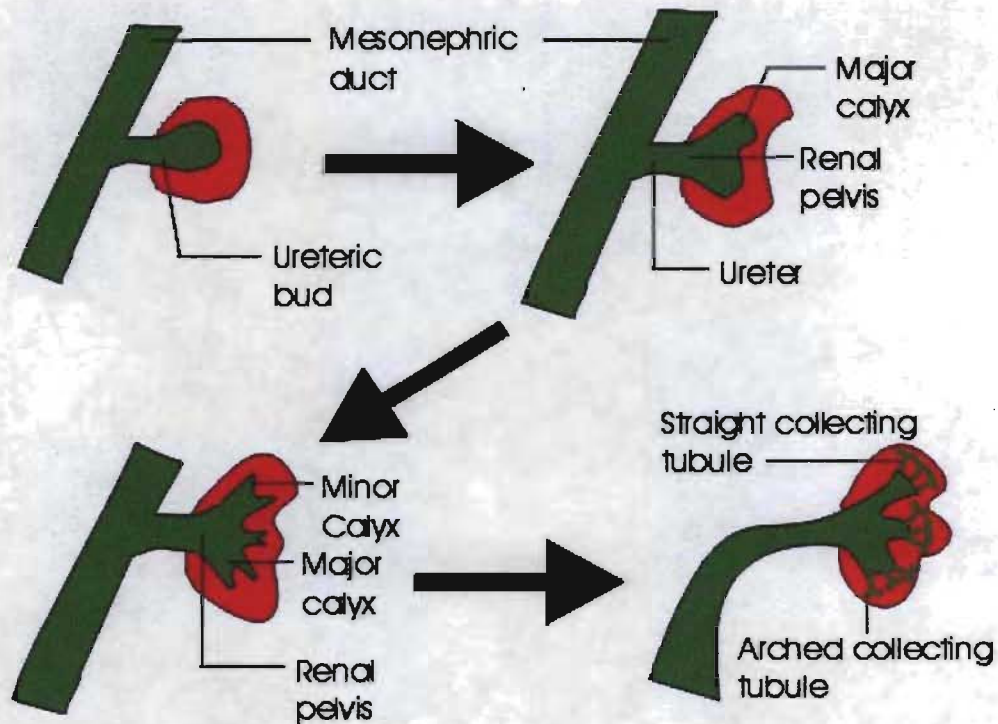


Fig. 4 L'invasion du mésenchyme métanéphrique par le bourgeon urétérique et la morphogénèse par embranchement chez l'humain. Le bourgeon urétérique et ses dérivés sont en vert alors que le mésenchyme métanéphrique et ses dérivés sont en rouge.

(http://sprojects.mmi.mcgill.ca/embryology/ug/Kidney_Stuff/Normal_Development/Kidney_home.html).

2.1.1 Le mésenchyme métanéphrique et le néphron

Les amas mésenchymateux induits par le bourgeon urétérique formeront la majorité du tissu épithélial des néphrons. Pour ce faire, les cellules mésenchymateuses induites doivent subir plusieurs transformations. Leurs propriétés adhésives et leur forme changent et éventuellement ces cellules acquièrent une polarité ainsi qu'une membrane basale. Elles forment d'abord une vésicule rénale polarisée qui demeure en contact avec l'épithélium du

bourgeon urétérique et qui s'invagine pour former une structure connue sous le nom de corps en forme de virgule (« *comma-shaped body* »), puis une structure en forme de « S » (« *S-shaped body* »). L'extrémité proximale de cette structure sera ensuite envahie par des cellules endothéliales, donnant ainsi naissance à la touffe glomérulaire (Fig. 5). Des interactions entre ces cellules endothéliales et les cellules épithéliales de la touffe glomérulaire (dérivées du mésenchyme métanéphrique) mèneront à la formation de la matrice spécialisée de la membrane basale glomérulaire. Ce processus commence à ralentir autour du j.p.c. 15,5. Cependant, de nombreux nouveaux néphrons continuent d'être formés jusqu'à 5 jours après la naissance (10, 11, 25).



a) induction of a condensate



b) pretubular cells aggregate and start to epithelialise



c) Comma-shape body



d) S-shape body



e) migration of endothelial cells



f) glomerulogenesis

Fig. 5 Représentation schématique des différents stades de formation des néphrons (tiré de Kuure S. et al. (2000) *Kidney morphogenesis: cellular and molecular regulation*.

Mechanisms of development 92, 31-45).

2.1.2 Le bourgeon urétérique et les tubules collecteurs

Lors de la morphogenèse rénale par embranchement, le bourgeon urétérique se divise de très nombreuses fois. Ces branches formeront le système des tubules collecteurs, reliant les tubules contournés distaux des néphrons à l'uretère. Ces divisions successives du bourgeon urétérique se répètent dans un rein croissant de manière centrifuge, les néphrons situés près de la médulla étant les plus vieux alors que les néphrons du cortex superficiel sont les plus jeunes (27). En plus de former les tubules collecteurs, le pelvis rénal et l'uretère, les multiples embranchements du bourgeon urétérique sont responsables de la migration cellulaire, de la prolifération locale et de la réorganisation de la matrice extracellulaire environnante (11).

2.2 La morphogenèse par embranchement

L'évagination du bourgeon urétérique à partir de la portion postérieure du canal de Wolff constitue l'évènement initial de la morphogenèse par embranchement, le processus par lequel le rein se développe (6). Ce mode de développement n'est pas propre au rein et de nombreux autres organes se forment de cette façon, comme par exemple le poumon, le foie, le pancréas, la glande mammaire, la prostate et les glandes salivaires (19, 37, 48). Il s'agit en fait d'une suite complexe de bourgeonnements d'un épithélium primordial qui se divise et subit de nombreuses étapes de remodelage dans une combinaison de prolifération cellulaire, d'apoptose et d'autres évènements cellulaires (37). Dans le rein, la morphogenèse par embranchement est définie comme étant la croissance et l'embranchement du bourgeon urétérique et des tubules collecteurs qui en proviennent pendant le développement embryonnaire du rein (45). Des études menées *in vivo* et en

culture ont démontré que le bourgeon urétérique est une structure extrêmement plastique, capable de former des bifurcations et des trifurcations terminales ainsi que des branchements latéraux. Les mécanismes exacts régissant ce processus demeurent un mystère, mais on sait que les cellules des extrémités des branches du bourgeon urétérique démontrent une activité proliférative élevée ainsi qu'une activité apoptotique faible (37).

2.3 Les médiateurs moléculaires du développement rénal

Les médiateurs moléculaires du développement rénal regroupent plus de 80 paires ligand-récepteur, responsables de la croissance et de la différenciation des différentes parties de l'organe (1). Parmi ces molécules, les facteurs de croissance revêtent une importance particulière. Plusieurs facteurs de croissance sont à l'œuvre dans le rein embryonnaire, mais les plus importants sont le *Glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF) et les *fibroblast growth factors* (FGFs). Le GDNF fait partie de la superfamille du TGF β (*Transforming Growth Factor β*) et est exprimé en premier lieu dans la région du mésenchyme métanéphrique adjacent à la partie postérieure du canal de Wolff, d'où le bourgeon urétérique émerge. Un knock-out du GDNF empêche l'émergence du bourgeon urétérique et cause ainsi une agénésie rénale (6, 37, 44). De nombreux FGFs sont exprimés dans le rein en développement, mais FGF7 et FGF10 sont les plus importants pour la morphogenèse par embranchement. Ces deux facteurs de croissance se lient au récepteur FGFR2b, un récepteur de type tyrosine kinase dont l'expression rénale est localisée surtout ou exclusivement dans l'épithélium du bourgeon urétérique (6). Des souris knock-out pour FGF7 ou pour FGF10 ont des reins plus petits que la normale avec un nombre diminué de néphrons (hypoplasie rénale). Puisque FGF7 et FGF10 partagent le même récepteur et sont

exprimés au même endroit au même moment, ils ont probablement un rôle redondant dans le développement embryonnaire rénal (2, 6).

2.3.1 Voies de signalisation

Plus de 300 gènes ont été identifiés dans les diverses voies de signalisation régulant le développement embryonnaire du rein. Le premier signal moléculaire connu à intervenir dans le développement rénal est le facteur de transcription WT1 (*Wilms' tumor suppressor gene*). En son absence, le mésenchyme métanéphrique régresse et disparaît; les reins ne se développent pas. En sa présence, le mésenchyme métanéphrique synthétise le GDNF ce qui permet l'émergence du bourgeon urétérique (1). Pax2 est un autre gène dont l'absence conduit à un défaut de formation du bourgeon urétérique et à une hypoplasie rénale (3). Après leur induction par WT1 et Pax2, les cellules blastiques, les futurs néphrons, sont influencées par des molécules de signalisation telles que IGF-1 (*insulin-like growth factor*), IGF-2, PDGF-A (*platelet-derived growth factor*), PDGF-B et l'acide rétinoïque. Ensuite, les principaux signaux impliqués dans la différenciation des glomérules et de leur réseau vasculaire sont le VEGF (*vascular endothelial growth factor*), Delta1 (et son récepteur Notch2) et PDGF-B (1). La cascade de signalisation Wnt a aussi une grande importance. Les cellules exprimant Wnt4 ont la capacité de promouvoir la formation de tubules lorsqu'elles sont mises en contact avec du tissu mésenchymateux, ce qui démontre la participation de Wnt4 dans la transformation des cellules du mésenchyme métanéphrique en cellules épithéliales (12). Wnt11 est exprimé à l'extrémité des branches du bourgeon urétérique tout au long du développement rénal embryonnaire. Les reins mutants pour Wnt11 ont des embranchements anormaux conduisant à l'hypoplasie rénale et ont un niveau d'expression de GDNF diminué (54).

2.3.2 Le rôle des protéoglycanees sulfatés

Des glycosaminoglycans sous les formes de HSPG (heparan sulfate proteoglycans) et de CSPG (chondroitin sulfate proteoglycans) participent au développement rénal normal. Le HSPG en particulier est essentiel à l'organogenèse rénale. Des mutations dans différentes étapes de la biosynthèse de cette molécule causent des phénotypes divers allant des kystes rénaux à l'agénésie rénale. L'importance des protéoglycanees sulfatés dans l'organogenèse rénale se retrouve principalement au niveau de la formation d'embranchements par le bourgeon urétérique. L'hyposulfatation du HSPG cause une réduction du nombre d'embranchements formés par le bourgeon urétérique *in vitro*. Les rôles exacts du HSPG dans la morphogenèse par embranchement ne sont pas totalement élucidés, mais cette molécule est connue pour sa capacité à stabiliser le lien entre certains facteurs de croissance et leur récepteur, prolongeant ainsi le signal généré par ces facteurs de croissance. Le HSPG pourrait également former une sorte de réservoir de facteurs de croissance qui seraient relâchés en quantité et en temps voulus suite à la dégradation de la partie protéique de la molécule par des métalloprotéinases matricielles (MMP). Finalement, mentionnons que le HSPG est requis pour le fonctionnement de la voie du GDNF (48).

Le but de ce projet est donc d'étudier les rôles physiologiques des gènes *Adamts1* et *Adamts4* chez la souris. De plus, étant donné les similarités structurelles et fonctionnelles que partagent ces deux gènes, nous formulons l'hypothèse qu'ils partagent au moins partiellement les mêmes rôles.

Article***Adamts1* and *Adamts4* play redundant roles in perinatal kidney development**

Jean-François Lafond, Richard Drolet, Derek Boerboom

From the Department of Pathology and Microbiology (Lafond, Drolet) and the Department of Veterinary Biomedicine (Boerboom), Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, 3200 Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 2M2, Canada.

Corresponding author: Jean-François Lafond, Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, 3200 Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 2M2, Canada; [\[information retrée / information withdrawn\]](#)

Abstract

The roles of *Adamts4*, a member of the aggrecanase subfamily of *Adamts* (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) genes are still mostly unknown and *Adamts4* knockout mice appear phenotypically normal. We hypothesized that *Adamts1*, whose pattern of expression and substrate specificity overlap that of *Adamts4*, may be functionally redundant with *Adamts4* and be able to compensate for its loss. To test this, *Adamts1^{-/-}; Adamts4^{-/-}* double knockout mice were generated. *Adamts1^{-/-}; Adamts4^{-/-}* mice are affected by a phenotype of perinatal mortality associated with an important developmental defect of the renal pelvis and medulla, which was the only morphological abnormality seen after thorough histological examination of the animals. The renal lesion was not observed in embryonic *Adamts1^{-/-}; Adamts4^{-/-}* kidneys but became apparent around birth, once the kidneys start to function. The few (<1%) *Adamts1^{-/-}; Adamts4^{-/-}* animals to reach adulthood were affected by the same renal phenotype seen in newborns of the same genotype and did not display any other abnormality. Real-time RTPCR showed that *Adamts1* and *Adamts4* share a similar pattern of expression, both being strongly expressed during the perinatal period. Real-time RTPCR also showed that versican, a molecule known to be metabolized by *Adamts1* and *Adamts4*, was expressed in the neonatal murine kidney while aggrecan, another molecule known to be metabolized by *Adamts1* and *Adamts4*, was not. This suggested that versican could be the substrate for *Adamts1* and *Adamts4* in the developing kidney. This study is the first to demonstrate a role for *Adamts4* in renal development and to demonstrate that *Adamts1* and *Adamts4* play redundant and essential roles in perinatal kidney development.

Key words

Adamts1; *Adamts4*; kidney; knockout mice; organogenesis; pelvis dilation; renal dysgenesis

Introduction

Adamts1 and *Adamts4* are members of the *Adamts* (**a** **d**isintegrin **a**nd **m**etalloproteinase with **t**hrombos**p**ondin motifs) family, a group of secreted proteases currently composed of 19 members in humans. More precisely, *Adamts1* and *Adamts4* are part of a subfamily of *Adamts* genes called the aggrecanases. Other members of this group are *Adamts5*, *Adamts8*, *Adamts9* and *Adamts15*. These genes are named aggrecanases because of their ability to cleave proteoglycan-rich lecticans such as aggrecan, versican, brevican and neurocan (Porter et al. 2005, Nakamura et al. 2000). *Adamts1* is able to cleave both aggrecan and versican and also has the ability to inhibit VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) and FGF-2 (Fibroblast Growth Factor 2) induced angiogenesis under certain conditions (Porter et al. 2005). *Adamts1*^{-/-} knockout mice have been described, showing multiple physiologic roles for this gene. *Adamts1*^{-/-} mice suffer from defects in growth, kidney development, ovulation and fertility (Mittaz et al. 2004). *Adamts4* is able to cleave aggrecan, versican and brevican (Gao et al. 2002). *Adamts4* plays a role in articular cartilage metabolism and in osteoarthritis through its ability to cleave aggrecan (Majumdar et al. 2007). Furthermore, after stimulation of articular tissues by inflammatory cytokines, there is an increase in *Adamts4* expression (Glasson et al. 2004). *Adamts4*^{-/-} knockout mice have also been described, but surprisingly, considering its widespread expression and known physiological roles, these animals appear completely normal, which implies that this gene is not essential to normal development, growth and physiological functions in mice (Glasson et al. 2004).

In mice as in all mammals, the kidneys develop in 3 distinct phases: pronephros, mesonephros and metanephros (Kuure et al. 2000). Only the metanephros persists and

differentiates completely to become the functional, adult kidney. In mice, the metanephric kidney first appears at dpc (day post-conception) 10.5 (Bard 2002). At that time, its development originates from two transient intermediate structures known as the metanephric mesenchyme and the ureteric bud. At dpc 11.5, the ureteric bud invades the metanephric mesenchyme, which initiates a phase of reciprocal induction of both structures and starts branching morphogenesis (Dressler 2006). The ureteric bud differentiates into epithelial branches, the soon-to-be collecting ducts, which invade the metanephric mesenchyme. At the tips of the epithelial branches, metanephric mesenchyme cells form clumps that will eventually differentiate into epithelial cells, which in turn will become the glomeruli and convoluted tubules of the nephrons (Dressler 2006). During branching morphogenesis, the ureteric bud splits itself countless times to form the collecting ducts of the kidney, which grows in a centrifugal pattern (Lechner and Dressler 1997). The molecular biology of kidney branching morphogenesis is an area of intense investigation, and a number of molecular mediators have been identified (Bard 2002). Among these are heparan sulfate and chondroitin sulfate proteoglycans, for which biochemical and genetic evidence exists that suggests their involvement in the branching of the ureteric bud (Steer et al. 2004). Versican is a chondroitin sulfate proteoglycan that is expressed in the kidney, and is notably thought to be a component of the renal extracellular matrix of renal proximal tubule epithelial cells (Selbi et al. 2006) and the distal straight tubules (Kawashima et al., 1999). As *Adamts1* can cleave versican, it is possible that a defect in proteolytic processing of versican could contribute to the kidney defects observed in *Adamts1*^{-/-} mice (Porter et al. 2005). Whether other aggrecanases and the proteolytic processing of their substrates may be required for kidney development remains unknown. The aim of this study was to determine the roles of *Adamts4*. Since *Adamts1* and *Adamts4* share many structural and

functional features, we hypothesized that those 2 genes could have similar and/or complementary roles in the mice.

Materials and methods

Animals. *Adamts1*^{-/-} and *Adamts4*^{-/-} knock-out mice were obtained from the laboratory of Dr. JoAnne S. Richards at the Baylor College of Medicine, Houston, Texas. *Adamts1*^{-/-}; *Adamts4*^{-/-} double knockout mice were generated in our laboratory by selective breeding. Genotyping analyses were performed by PCR on DNA obtained from tail biopsies as directed by the animal provider.

Histology. Six entire newborn mice from each of 4 different genotypes (wild type (WT), *Adamts1*^{-/-}, *Adamts4*^{-/-} and *Adamts1*^{-/-}; *Adamts4*^{-/-}) and kidneys from embryonic and adult mice were fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin, cut at a thickness of 3 μm at 50 μm intervals and stained with hematoxylin-eosin-phloxin-saffron (HEPS).

Real-time RTPCR. Total kidney RNA was isolated from WT (wild type) mice using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada). Reverse transcription-PCR (RT-PCR) was done using the SuperScript™ III Platinum® Two-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). For each reaction, 2 μg of RNA were used and the manufacturer's instructions were followed. The sequences primers used for amplification are as follows: *Adamts1*: GTGAAGCCAAAGGCATTGGCTACT (sense) and TGGCTCCAGCAGGAATTGTGACA (antisense); *Adamts4*: TGGCTGTGACCGGATCATTGGCT (sense) and CCCCAGGAAGAACCACATCTGT (antisense); Aggrecan: CACTGGGAAGAGCCTCGAATCACCT (sense) and CTTCTTTAATGGATTCCTTATATGACA (antisense); Versican: GAAACGGGAGATGGGCAATGCCT (sense) and

CTGAAATGATGAGTGAAGCACATGT (antisense). Amplification was performed on Rotor-Gene 6™ (Corbett Research, Mortlake, New South Wales, Australia). The mixture was preheated at 95°C for 10 min and then the PCR was cycled 40 times at 95°C for 10 s, 60°C for 15 s, and 72°C for 20 s. The amplification cycles were followed by melting cycle from 85°C to 95°C at a rate of 1°C per 5 s to confirm specificity of the amplification and rule out the presence of primer dimers. We used the expression of the housekeeping gene RPL-19 as the control to normalize *Adamts1*, *Adamts4*, versican and aggrecan expression.

Statistical methods. Real-time RTPCR results were analyzed by unpaired, two-tailed T-test in order to evaluate potential effects of developmental stage on *Adamts1*, *Adamts4*, versican and aggrecan mRNA levels. *P* values lower than 0.05 were considered statistically significant. Analyses were performed using Prism 4.0a software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

Results

To determine the physiological roles of *Adamts4*, we obtained *Adamts4*^{-/-} mice and performed a thorough histological examination of all their organs and tissues, which revealed no morphological abnormalities. To verify our hypothesis that *Adamts1* and *Adamts4* play complementary roles, *Adamts1*^{+/-} and *Adamts4*^{-/-} mice were crossed in order to generate *Adamts1*^{-/-}; *Adamts4*^{-/-} double knockout mice. Unexpectedly, the majority of these mice (>99%) showed a perinatal mortality phenotype, while *Adamts1*^{-/-} and *Adamts4*^{-/-} newborn controls seemed normal. Thorough histological examination of all organs were then conducted on newborn *Adamts1*^{-/-}, *Adamts4*^{-/-}, *Adamts1*^{-/-}; *Adamts4*^{-/-} and WT mice in an attempt to identify the precise effects of the double gene knockout and explain the perinatal mortality noted in the *Adamts1*^{-/-}; *Adamts4*^{-/-} animals. *Adamts1*^{-/-}; *Adamts4*^{-/-} newborn pups consistently showed an important morphological abnormality affecting the kidneys. In every individual examined, the renal pelvis was dilated and the renal medulla was irregularly thinned (Fig. 1). Conversely, the renal cortex seemed to be unaffected and retained its normal histological appearance with normal glomeruli and tubules. In contrast to what was observed in the *Adamts1*^{-/-}; *Adamts4*^{-/-} newborn pups, all individuals of the 3 other genotypes examined, *Adamts1*^{-/-}, *Adamts4*^{-/-} and WT, had morphologically normal kidneys (Fig. 1). Aside from the kidneys, all organs and tissues from every individual of all 4 genotypes examined showed no morphological abnormalities.

In order to determine more precisely the onset of the renal phenotype observed in *Adamts1*^{-/-}; *Adamts4*^{-/-} newborn mice, the kidneys of 15.5 dpc (days post-conception) and 17.5 dpc *Adamts1*^{-/-}; *Adamts4*^{-/-} and WT mice embryos were examined microscopically (Fig. 2 A-D). Surprisingly, we could not discern any sign of the renal lesions described above in the

Adamts1^{-/-}; *Adamts4*^{-/-} embryonic kidneys. All the embryonic kidneys examined had the same histological appearance, regardless of the genotype, indicating that the onset of the *Adamts1*^{-/-}; *Adamts4*^{-/-} kidney defect occurs near the time of birth. A very limited number of *Adamts1*^{-/-}; *Adamts4*^{-/-} animals survived to reach adulthood (<1%). All organs and tissues from those rare individuals were collected and examined microscopically in the hope of finding more information concerning the roles of *Adamts4* and the cause of perinatal death of *Adamts1*^{-/-}; *Adamts4*^{-/-} pups, but no extra-renal anomalies could be identified. The kidneys of adult *Adamts1*^{-/-}; *Adamts4*^{-/-} individuals showed the same pelvic/medullary defects described above for the newborns (Fig. 2 E-F).

Renal medullary thinness and pelvis dilation are known to occur in cases of hydronephrosis; the medullary atrophy resulting from the increased intrapelvic pressure induced by an urinary obstruction. To verify if urinary obstruction could explain the renal phenotype observed in *Adamts1*^{-/-}; *Adamts4*^{-/-} mice, careful histological examination of the lower urinary tract of newborn mice was performed. All the structures examined, including ureters, urinary bladders and urethras were found to be patent and indistinguishable from those collected from WT animals. This suggested that the renal abnormality found in *Adamts1*^{-/-}; *Adamts4*^{-/-} mice is not the consequence of a mechanical obstruction of the urinary tract.

To study the perinatal expression of *Adamts1* and *Adamts4* and its potential substrates in the murine kidney, we conducted a real-time RTPCR timecourse analysis of *Adamts1*, *Adamts4*, versican and aggrecan expression in WT kidneys collected in 15.5 and 17.5 dpc embryos as well as in newborn and 7 days old animals (Fig. 3 A-B). *Adamts1* and *Adamts4* mRNA were detected at high and statistically unvarying ($P > 0.05$) abundance at all stages

examined. Versican mRNA was detected at highest levels at d15.5, and decreased gradually thereafter, although statistically significant differences in mRNA levels were not identified between groups ($P > 0.05$). We were not able to detect aggrecan expression in the kidney at any developmental timepoint.

Discussion

The *Adamts* genes code for secreted proteases, many of which are able to bind elements of the extracellular matrix (Porter et al. 2005). *Adamts1* and *Adamts4* are part of a subfamily of *Adamts* genes called the aggrecanases because of their ability to cleave lecticans often found in proteoglycans-rich elements of the extracellular matrix, including aggrecan, versican, brevican and neurocan (Nakamura et al. 2000). *Adamts1*^{-/-} mice have been previously well described and have allowed the identification of a number of roles for this gene in the normal development of many organs and tissues including the kidneys (Shindo et al. 2000, Mittaz et al. 2004). Prior to this report, *Adamts4* had never been implicated in renal development, and *Adamts4*^{-/-} mice have been reported to be completely normal (Glasson et al. 2004). The results of the present study show that while mice can live more or less normally without either *Adamts1* or *Adamts4*, the loss of both genes together is largely lethal. The absence of any morphological abnormalities aside from the renal lesions suggests that these are likely to be responsible for the perinatal mortality suffered by *Adamts1*^{-/-}; *Adamts4*^{-/-} mice, presumably due to severe impairment of renal function. It is demonstrated here that in the absence of *Adamts1*, *Adamts4* becomes essential for normal renal development and thus has important functions in the kidney. It is also demonstrated that *Adamts1* and *Adamts4* show a functional redundancy in kidney development since the absence of either one is partly or completely compensated by the presence of the other, while the absence of both causes the appearance of a severe phenotype.

The precise pathogenesis of the renal lesions observed in *Adamts1*^{-/-}; *Adamts4*^{-/-} mice remains elusive. The developing kidney grows via a process known as branching morphogenesis. This mechanism consists of a complex series of budding and proliferation of a primordial epithelium, the ureteric bud, which grows into the metanephric

mesenchyme and gives birth to the network of collecting ducts (Saxen, 1987). Essentially, the ureteric bud becomes the medulla, while the metanephric mesenchyme differentiates into the glomeruli and tubules of the cortex. Since *Adamts1* and *Adamts4* are aggrecanases, it is likely that their role in normal perinatal kidney development involves the metabolism of lecticans and proteoglycans, which are structural molecules of the extracellular matrix. In all likelihood, there is remodelling of the kidney's extracellular matrix around birth associated with the elongation and branching of medullary tubules (Cha et al. 2001), and this could be dependent on *Adamts* processing of versican and/or similar molecules. The renal phenotype observed in *Adamts1*^{-/-}; *Adamts4*^{-/-} mice might therefore be the consequence of an extracellular matrix defect that prevents the expansion of the renal medulla during postnatal kidney development, ultimately leading to a medullary dysgenesis. A similar mechanism has previously been proposed for *Adamts1*^{-/-} mice, which are characterized by renal defects similar to what we describe for *Adamts1*^{-/-}; *Adamts4*^{-/-} animals, but much less severe, generally non-lethal and with a later onset (Mittaz et al. 2004). In the present case, the relatively severe phenotype observed in *Adamts1*^{-/-}; *Adamts4*^{-/-} animals might be explained by the complete loss of all aggrecanase activity in the renal medulla.

Another possibility is that the renal phenotype observed represents hydronephrosis. Hydronephrosis is the term used to describe dilation of the renal pelvis and calyces associated with progressive atrophy of the kidney parenchyma due to obstruction of the outflow of urine (Cotran et al. 1999). The renal lesions occurring in our *Adamts1*^{-/-}; *Adamts4*^{-/-} animals are very similar to what would be observed in cases of hydronephrosis. In these cases, a mechanical obstruction of the outflow of urine can originate anywhere from the ureteropelvic junction to the urethra. *Adamts1*^{-/-} mice have been reported to be

affected by a partial fibrous obstruction of the ureteropelvic junction (Shindo et al. 2000). We carefully examined all structures of the lower urinary tract in embryonic and newborn *Adamts1*^{-/-}; *Adamts4*^{-/-} mice and found them to be normal, thus eliminating the possibility of mechanical urinary obstruction leading to hydronephrosis. Similarly, the study of Mittaz et al. (2004) conducted on *Adamts1*^{-/-} mice did not reveal any evidence of ureteropelvic fibrous obstruction. The normal outflow of urine from the kidneys to the urinary bladder is dependent on pyeloureteric peristalsis (Lang et al., 2008), and a defect in this process can create a functional obstruction that can also lead to hydronephrosis. Theoretically, the lack or a decrease of the pelvis peristaltic movements would create lesions similar to those observed in our affected mice. While we consider this to be an unlikely scenario, we cannot exclude that such a functional urinary obstruction may contribute to the *Adamts1*^{-/-}; *Adamts4*^{-/-} renal phenotype.

The substrates for *Adamts1* and *Adamts4* are the lecticans. These include aggrecan, versican, brevican and neurocan. Brevican and neurocan are known to be almost exclusively expressed in the nervous system (Sandy et al. 2001), which leaves aggrecan and versican as potential substrates in the neonatal kidney. Our results demonstrate that versican is indeed expressed in the embryonic and neonatal murine kidney while aggrecan does not seem to be. For this reason, it is highly probable that the main substrate for *Adamts1* and *Adamts4* in the neonatal kidney is versican.

Further research will be needed to confirm and clarify the complementary roles of *Adamts1* and *Adamts4* in the neonatal kidney. Immunohistochemistry or *in situ* hybridization could be used to determine whether or not there is overlapping localization of *Adamts1* and *Adamts4* in the developing kidney. Demonstrating that versican is indeed a substrate for

Adamts1 and *Adamts4* in the developing kidney would also be very important to confirm our hypotheses. This could be achieved with Western blots comparing the levels of *Adamts1/Adamts4*-cleaved versican in protein extracts from *Adamts1*^{-/-}, *Adamts4*^{-/-}, *Adamts1*^{-/-}; *Adamts4*^{-/-} and WT kidneys.

In summary, this study describes for the first time *Adamts1*^{-/-}; *Adamts4*^{-/-} double knockout mice and provides evidence that versican is the substrate of these enzymes in the developing murine kidney. A role for *Adamts4* in renal development is described for the first time. Finally, we demonstrate that *Adamts1* and *Adamts4* play redundant and essential roles in perinatal development of the kidney.

Acknowledgements

The authors would like to thank A. Boyer, E. Lapointe and M.N. Lague for their valuable help in the laboratory and C. Forget for her work on mouse colony management and genotype analyses.

References

1. Bard J.B.L. (2002) Growth and death in the developing mammalian kidney: signals, receptors and conversations. *Bioessays* **24**, 72-82
2. Cha J.H., Kim Y.H., Jung J.Y., Han K.H., Madsen K.M. and Kim J. (2001) Cell proliferation in the loop of henle in the developing rat kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12**, 1410-1421
3. Cotran R.S., Kumar V. and Collins T. (1999) Urinary tract obstruction. *In: Robbins pathologic basis of disease*, 6th ed., p. 988, W.B. Saunders, Philadelphia, PA.
4. Dressler G.R. (2006) The cellular basis of kidney development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 509-529
5. Gao G., Westling J., Thompson V.P., Howell T.D., Gottschall P.E. and Sandy J.D. (2002) Activation of the proteolytic activity of ADAMTS4 (Aggrecanase-1) by C-terminal truncation. *J. Biol. Chem.* **277**, 11034-11041
6. Glasson S.S., Askew R., Sheppard B., Carito B.A., Blanchet T., Ma H., Flannery C.R., Kanki K., Wang E., Peluso D., Yang Z., Majumdar M.K. and Morris E.A. (2004) Characterization of and osteoarthritis susceptibility in ADAMTS-4-knockout mice. *Arthritis Rheum.* **50**, 2547-2558
7. Kawashima H., Li Y.F., Watanabe N., Hirose J., Hirose M. and Miyasaka M. (1999) Identification and characterization of ligands for L-selectin in the kidney. I. Versican, a large chondroitin sulfate proteoglycan, is a ligand for L-selectin. *Int. Immunol.* **11**, 393-405
8. Kuno K., Okada Y., Kawashima H., Nakamura H., Miyasaka M., Ohno H. and Matsushima K. (2000) ADAMTS-1 cleaves a cartilage proteoglycan, aggrecan. *FEBS Lett.* **478**, 241-245

9. Kuure S., Vuolteenaho R. and Vainio S. (2000) Kidney morphogenesis: cellular and molecular regulation. *Mech. Dev.* **92**, 31-45
10. Lang R.J., Tonta M.A., Zoltkowski B.Z., Meeker W.F., Wendt I. and Parkington H.C. (2006) Pyeloureteric peristalsis: role of atypical smooth muscle cells and interstitial cells of Cajal-like cells as pacemakers. *J. Physiol.* **576**, 695-705
11. Lechner M.S. and Dressler G.R. (1997) The molecular basis of embryonic kidney development. *Mech. Dev.* **62**, 105-120
12. Majumdar M.K., Askew R., Schelling S., Stedman N., Blanchet T., Hopkins B., Morris E.A. et Glasson S.S. (2007) Double-knockout of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in mice results in physiologically normal animals and prevents the progression of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **56**, 3670-3674
13. Mittaz L., Ricardo S., Martinez G., Kola I., Kelly D.J., Little M.H., Hertzog P.J. and Pritchard M. (2005) Neonatal calyceal dilation and renal fibrosis resulting from loss of ADAMTS-1 in mouse kidney is due to a developmental dysgenesis. *Nephrol. Dial. Transplant.* **20**, 419-423
14. Mittaz L., Russel D.L., Wilson T., Brasted M., Tkalcevic J., Salamonsen L.A., Hertzog P.J. and Pritchard M.A. (2004) ADAMTS-1 is essential for the development and function of the urogenital system. *Biol. Reprod.* **70**, 1096-1105
15. Nakamura H., Fujii Y., Inoki I., Sugimoto K., Tanzawa K., Matsuki H., Miura R., Yamaguchi Y. and Okada Y. (2000) Brevican is degraded by matrix metalloproteinases and aggrecanase-1 (ADAMTS-4) at different sites. *J. Biol. Chem.* **275**, 38885-38890
16. Porter S., Clark I.M., Kevorkian L. and Edwards D.R. (2005) The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem. J.* **386**, 15-27
17. Sandy J.D., Westling J., Kenagy R.D., Iruela-Arispe M. L., Verscharen C., Rodriguez-Mazaneque J.C., Zimmermann D.R., Lemire J.M., Fischer J.W., Wight T.N. and Clowes

- A.W. (2001) Versican V1 proteolysis in human aorta *in vivo* occurs at the Glu⁴⁴¹-Ala⁴⁴² bond, a site that is cleaved by recombinant ADAMTS-1 and ADAMTS-4. *J. Biol. Chem.* **276**, 13372-13378
18. Saxen L. (1987) Organogenesis of the kidney. Cambridge University Press, Cambridge.
19. Selbi W., de la Motte C.A., Hascall V.C., Day A.J., Bowen T. and Phillips A.O. (2006) Characterization of hyaluronan cable structure and function in renal proximal tubular epithelial cells. *Kidney Int.* **70**, 1287-1295
20. Shindo, T., Kurihara H., Kuno K., Yokoyama H., Wada T., Kurihara Y., Imai T., Wang Y., Ogata M., Nishimatsu H., Moriyama N., Oh-Hashi Y., Morita H., Ishikawa T., Nagai R., Yazaki Y. and Matsushima K. (2000) ADAMTS-1: a metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function. *J. Clin. Invest.* **105**, 1345-1352
21. Steer D.L., Shah M.M., Bush K.T., Stuart R.O., Sampogna R.V., Meyer T.N., Schwesinger C., Bai X., Esko J.D. and Nigam S.K. (2004) Regulation of ureteric bud branching morphogenesis by sulphated proteoglycans in the developing kidney. *Dev. Biol.* **272**, 310-327
22. Tortorella M., Pratta M., Liu R.Q., Abbaszade I., Ross H., Burn T. and Arner E. (2000) The thrombospondin motif of aggrecanase-1 (ADAMTS-4) is critical for aggrecan substrate recognition and cleavage. *J. Biol. Chem.* **275**, 25791-25797
23. Tortorella M., Pratta M., Liu R.Q., Austin J., Ross H., Abbaszade I., Burn T. and Arner E. (2000) Sites of aggrecan cleavage by recombinant human aggrecanase-1. *J. Biol. Chem.* **275**, 18566-18573
24. Yokoyama H., Wada T., Kobayashi K., Kuno K., Kurihara H., Shindo T. and Matsushima K. (2002) A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs

(ADAMTS)-1 null mutant mice develop renal lesions mimicking obstructive nephropathy.

Nephrol. Dial. Transplant. 17, 39-41

Figure legends

Fig. 1. Renal abnormality in newborn *Adamts1*^{-/-}; *Adamts4*^{-/-} mice. Kidneys of newborn WT (A), *Adamts1*^{-/-} (B), *Adamts4*^{-/-} (C) and *Adamts1*^{-/-}; *Adamts4*^{-/-} (D) mice showing a thin renal medulla and dilated pelvis in the *Adamts1*^{-/-}; *Adamts4*^{-/-} kidney. Kidneys of the other 3 genotypes are normal (HEPS, 50X).

Fig. 2. Perinatal onset of kidney phenotype in *Adamts1*^{-/-}; *Adamts4*^{-/-} mice. 15.5 dpc (A-B) and 17.5 dpc (C-D) *Adamts1*^{-/-}; *Adamts4*^{-/-} and WT kidneys. All kidneys are morphologically normal. *Adamts1*^{-/-}; *Adamts4*^{-/-} (E) and WT (F) adult kidneys showing severely thinned medulla and pelvis dilation in the *Adamts1*^{-/-}; *Adamts4*^{-/-} kidney (HEPS, A-B 200X, C-D 50X, E-F 25X).

Fig. 3. *Adamts1*, *Adamts4* and versican expression in perinatal kidney. Real-time RTPCR timecourse analysis of *Adamts1* (A), *Adamts4* (B) and versican (C) expression in 15.5 dpc, 17.5 dpc, 1d and 7d WT mice kidneys. *Adamts1* and *Adamts4* share a similar pattern of expression and are both strongly expressed around birth. Versican is also expressed in the perinatal kidney.

Figures

Fig. 1

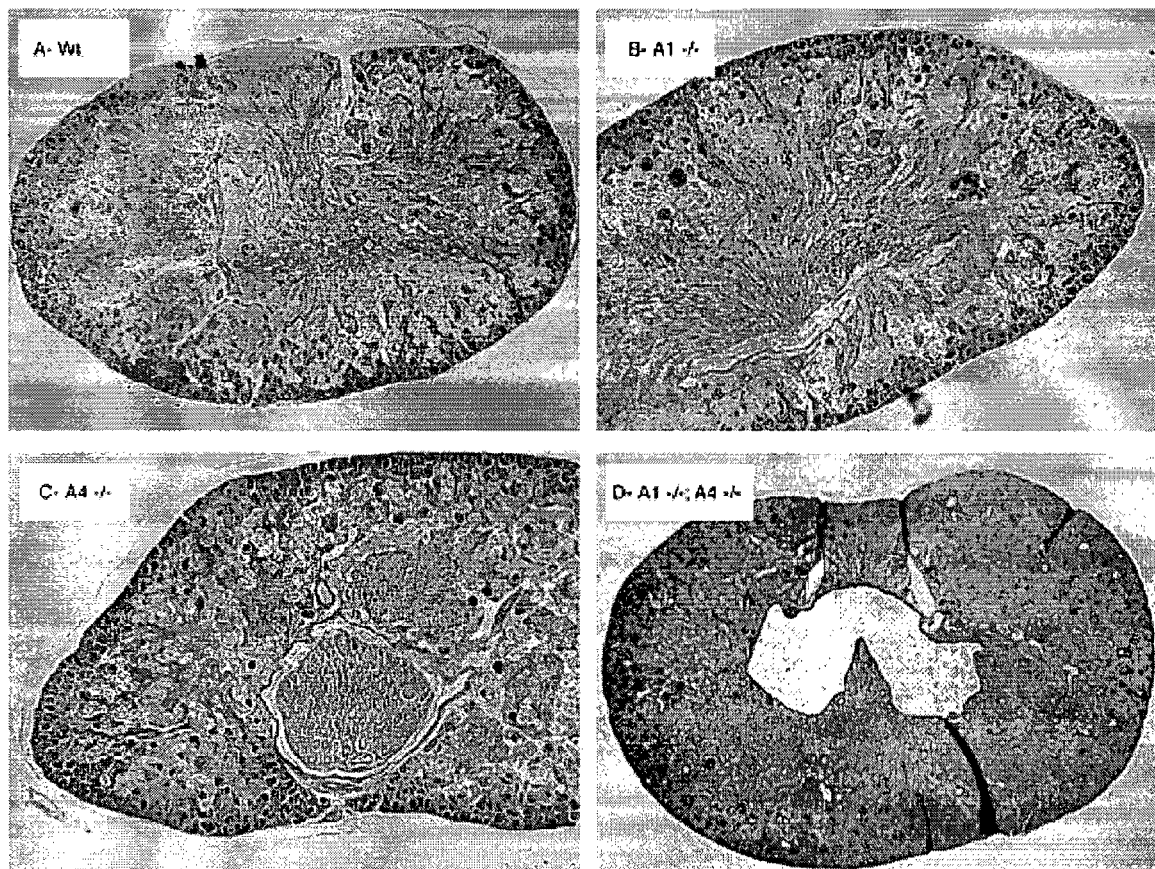


Fig. 2

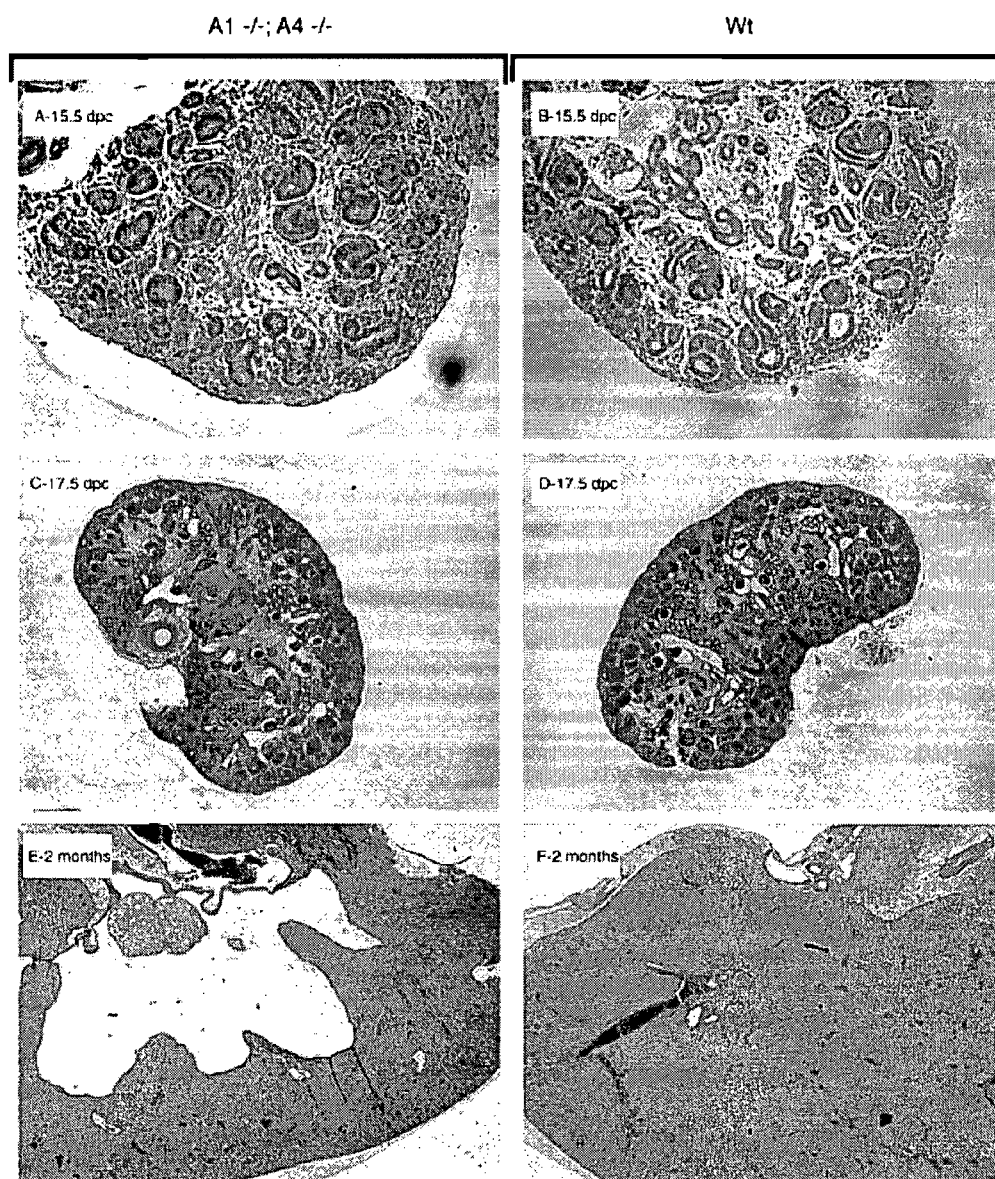
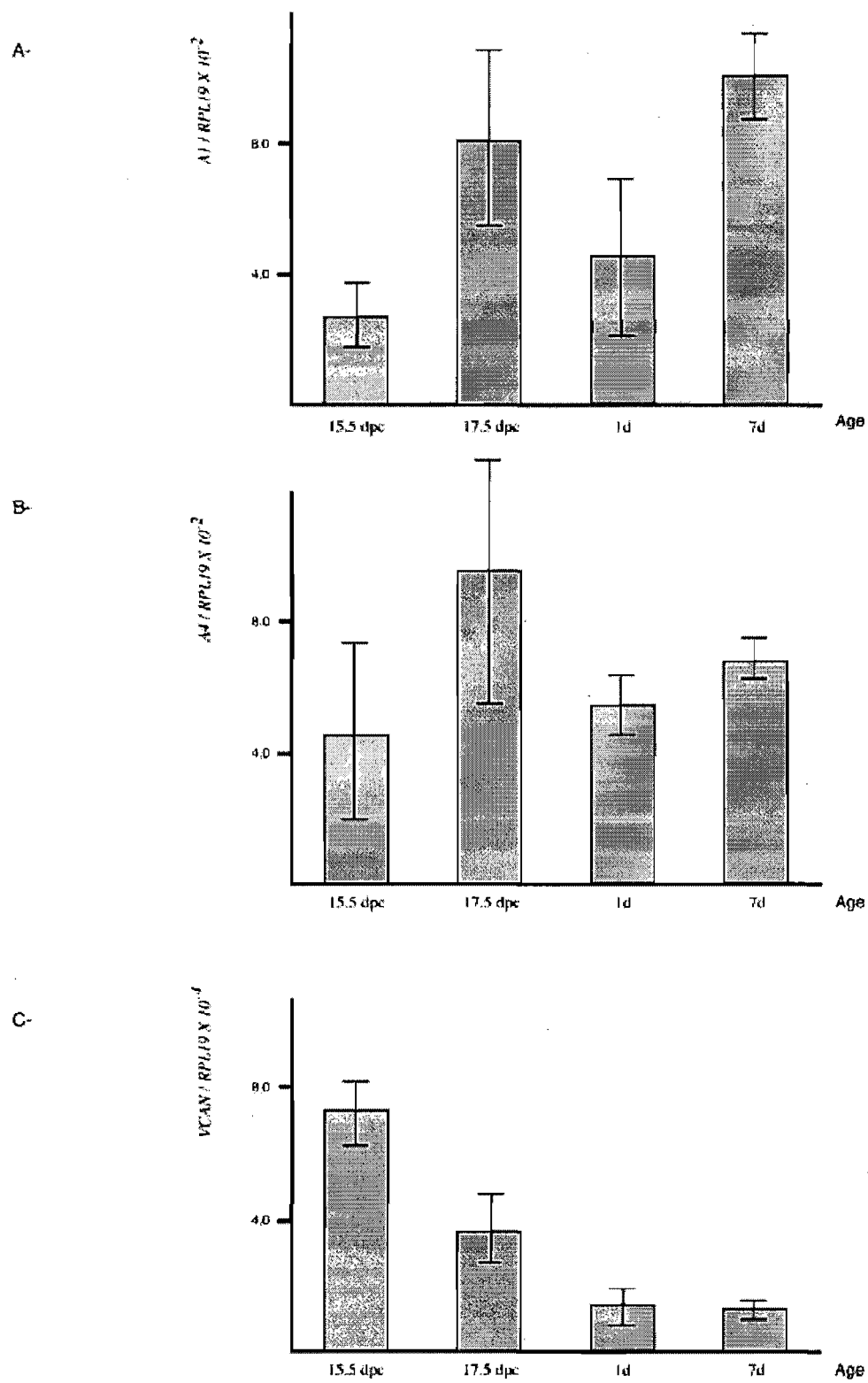


Fig. 3



Discussion

Les gènes *Adamts* codent pour des protéases sécrétées souvent capables de se lier à la matrice extracellulaire (38). *Adamts1* et *Adamts4* font partie d'une sous-famille de gènes *Adamts* appelés les aggrécanases parce que leurs protéines sont capables de cliver les lecticanes communément trouvées dans la matrice extracellulaire comme l'aggrécane, la versicane, la brévicane et la neurocane (35). Les souris porteuses d'une mutation nulle pour le gène *Adamts1* ont été décrites et ont permis l'identification de nombreux rôles physiologiques pour ce gène dans le développement de plusieurs organes et du rein en particulier (34, 46). Jusqu'à ce jour, *Adamts4* ne possédait aucune implication connue dans le développement rénal et les souris *Adamts4*^{-/-} avait été décrites comme normales (18). Les résultats de cette étude montre que bien que les souris puissent vivre plus ou moins normalement en l'absence d'*Adamts1* ou d'*Adamts4*, la perte simultanée des deux gènes est généralement fatale. L'absence de lésion morphologique autre que les lésions rénales décrites plus haut suggère que ces lésions rénales sont responsables de la forte mortalité notée chez les souriceaux *Adamts1*^{-/-}; *Adamts4*^{-/-}, possiblement suite à une perturbation sévère de la fonction rénale. À ce jour, il n'y avait aucun rôle connu d'*Adamts4* dans le rein. Cette étude démontre qu'en l'absence d'*Adamts1*, *Adamts4* devient essentiel au développement rénal normal et donc possède des fonctions importantes dans le rein. On constate également qu'*Adamts1* et *Adamts4* possèdent une redondance fonctionnelle dans le développement rénal puisque l'absence de l'un ou de l'autre est partiellement ou complètement compensée par la présence de l'autre, alors que l'absence simultanée des deux gènes cause l'apparition d'un phénotype sévère. Étant donné qu'*Adamts1* et *Adamts4* sont des aggrécanases, il est probable que leurs rôles dans le développement rénal périnatal impliquent le métabolisme des lecticanes et des protéoglycanes.

La pathogénie exacte des lésions rénales observées chez les souris *Adamts1^{-/-}*; *Adamts4^{-/-}* demeure inconnue. Le rein se développe par un processus nommé morphogénèse par embranchement. Ce mécanisme est constitué d'une suite complexe de bourgeonnements et de prolifération à partir d'un épithélium primordial, le bourgeon urétérique, qui envahit le mésenchyme métanéphrique et donne naissance au réseau des tubules collecteurs (45). En résumé, le bourgeon urétérique devient la médulla et le pelvis alors que le mésenchyme métanéphrique forme les glomérules et les tubules du cortex. D'après les fonctions connues de ces gènes, il est logique de croire que leur absence cause une perturbation de la protéolyse de leurs substrats, qui sont des molécules structurelles de la matrice extracellulaire. Autour de la naissance, il y a un remodelage de la matrice extracellulaire du rein associé à une élongation des tubules médullaires (5) qui pourrait dépendre de l'effet de gènes *Adamts* sur la versicane ou d'autres molécules semblables. Le phénotype rénal noté chez les animaux *Adamts1^{-/-}*; *Adamts4^{-/-}* pourrait donc provenir d'une modification de la matrice extracellulaire empêchant l'expansion de la médulla lors du développement périnatal et menant à une dysgénésie rénale. Un mécanisme semblable a déjà été proposé pour expliquer des lésions rénales observées chez des souris *Adamts1^{-/-}* (34). Pour ce qui est des animaux *Adamts1^{-/-}*; *Adamts4^{-/-}*, la sévérité du phénotype pourrait s'expliquer par le fait que les reins de ces animaux sont complètement privés d'activité agrécanase. Une autre explication possible pour les lésions rénales affectant les souris *Adamts1^{-/-}*; *Adamts4^{-/-}* est qu'elles correspondent à de l'hydronéphrose. L'hydronéphrose est la condition caractérisée par la dilatation du pelvis et des calices rénaux associée à l'atrophie de la médulla suite à une obstruction de l'écoulement urinaire (7). Les lésions observées dans les reins des souris *Adamts1^{-/-}*; *Adamts4^{-/-}* ressemblent beaucoup aux lésions notées dans les cas d'hydronéphrose. Dans ces cas, une obstruction mécanique de

l'écoulement d'urine peut se produire n'importe où, de la jonction urétéropelvienne à l'urètre. Une obstruction fibreuse partielle de la jonction urétéropelvienne a été rapportée chez certaines souris *Adamts1^{-/-}* (46). Nous avons examiné attentivement le système urinaire inférieur de nos animaux *Adamts1^{-/-}*; *Adamts4^{-/-}* sans trouver une telle obstruction, ce qui nous permet d'éliminer l'hypothèse d'une obstruction mécanique menant à l'hydronéphrose. De la même façon, l'étude de Mittaz (34) n'a révélé aucune obstruction fibreuse de la jonction urétéropelvienne chez les souris *Adamts1^{-/-}*. L'écoulement normal de l'urine des reins à la vessie dépend en grande partie du péristaltisme urétéropelvien (26) et une perturbation de ce processus pourrait causer une obstruction fonctionnelle pouvant également mener à l'hydronéphrose. En théorie, une perte ou une diminution des ondes péristaltiques du pelvis pourrait donc causer des lésions telles que celles observées chez les souris *Adamts1^{-/-}*; *Adamts4^{-/-}*. Bien que ce scénario soit peu probable, il est impossible d'éliminer la possibilité qu'une telle obstruction fonctionnelle soit en cause dans le cas présent.

Les substrats d'*Adamts1* et *Adamts4* sont les lecticanes dont font partie l'aggrécane, la versicane, la brévicane et la neurocane. La brévicane et la neurocane sont reconnues pour être à peu près exclusivement exprimées dans le tissu nerveux (43) ce qui ne laisse que l'aggrécane et la versicane comme substrats potentiels dans le rein néonatal. Nos résultats démontrent que la versicane est effectivement exprimée dans les reins embryonnaires et périnataux de souris alors que l'aggrécane ne semble pas l'être. Dans ces circonstances, il est fort probable que la versicane soit le substrat principal d'*Adamts1* et *Adamts4* dans les reins des souris, à tout le moins autour de la naissance.

Conclusion

D'autres recherches seront nécessaires afin de confirmer et de clarifier les rôles complémentaires d'*Adamts1* et *Adamts4* dans le rein périnatal. L'immunohistochimie ou l'hybridation *in situ* pourraient être utilisées pour déterminer si les deux gènes sont exprimés aux mêmes endroits dans le tissu rénal. Il serait également très utile de démontrer que la versicane est bel et bien le substrat d'*Adamts1* et *Adamts4* dans le rein en développement. Ceci pourrait être réalisé en mesurant les quantités de versicane clivée par l'activité protéolytique des *Adamts* dans des extraits protéiques de reins WT et *Adamts1*^{-/-}; *Adamts4*^{-/-}.

En résumé, cette étude décrit pour la première fois des souris porteuses d'une double mutation nulle *Adamts1*^{-/-}; *Adamts4*^{-/-} et suggère que la versicane est le substrat de ces deux gènes dans le rein murin en développement. L'implication d'*Adamts4* dans le développement rénal est démontrée ici pour la première fois. Finalement, nous démontrons également qu'*Adamts1* et *Adamts4* jouent des rôles redondants et essentiels dans le développement périnatal du rein.

Sources documentaires

1. Bard J.B.L. (2002) Growth and death in the developing mammalian kidney: signals, receptors and conversations. *Bioessays* **24**, 72-82
2. Bates C.M. (2007) Role of fibroblast growth factor receptor signalling in kidney development. *Pediatr. Nephrol.* **22**, 343-349
3. Bates C.M. (2000) Kidney development: regulatory molecules crucial to both mice and men. *Mol. Genet. Metab.* **71**, 391-396
4. Boerboom D., Russel D.L., Richards J.S. et Sirois J. (2003) Regulation of transcripts encoding ADAMTS-1 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin-like motifs-1) and progesterone receptor by human chorionic gonadotropin in equine preovulatory follicles. *J. Mol. Endocrinol.* **31**, 473-485
5. Cha J.H., Kim Y.H., Jung J.Y., Han K.H., Madsen K.M. and Kim J. (2001) Cell proliferation in the loop of henle in the developing rat kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12**, 1410-1421
6. Costantini F. (2006) Renal branching morphogenesis: concepts, questions and recent advances. *Differentiation* **74**, 402-421
7. Cotran R.S., Kumar V. and Collins T. (1999) Urinary tract obstruction. *In*: Robbins pathologic basis of disease, 6th ed., p. 988, W.B. Saunders, Philadelphia, PA.
8. Dagonneau N., Benoist-Lasselin C., Huber C., Faivre L., Mégarbané A., Alswaid A., Dollfus H., Alembik Y., Munnich A., Legeai-Mallet L. et Cormier-Daire V. (2004) ADAMTS-10 mutations in autosomal recessive Weill-Marchesani syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **75**, 801-806
9. Davies J. (1993) How to build a kidney. *Cell Biol.* **4**, 213-219

10. Dressler G.R. (2006) The cellular basis of kidney development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 509-529
11. Dressler G.R. (2002) Tubulogenesis in the developing mammalian kidney. *Trends Cell Biol.* **12**, 390-395
12. Dressler G.R. (1999) Kidney development branches out. *Dev. Genet.* **24**, 189-193
13. Dunn J.R., Reed J.E., du Plessis D.G., Shaw E.J., Reeves P., Gee A.L., Warnke P. et Walker C. (2006) Expression of ADAMTS-8, a secreted protease with antiangiogenic properties, is downregulated in brain tumours. *Br. J. Cancer.* **24**, 1186-1193
14. Fosang A.J., Rogerson F.M., East C.J. et Stanton H. (2008) ADAMTS-5 : the story so far. *Eur. Cell. Mater.* **5**, 11-26
15. Fushimi K., Troeberg L., Nakamura H., Lim N.H. et Nagase H. (2008) Functional differences of the catalytic domains in human ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in aggrecanolytic activity. *J. Biol. Chem.* **283**, 6706-6716
16. Gao S., De Geyter C., Kossowska K. et Zhang H. (2007) FSH stimulates the expression of the ADAMTS-16 protease in mature human ovarian follicles. *Mol. Hum. Reprod.* **13**, 465-471
17. Gao G., Westling J., Thompson V.P., Howell T.D., Gottschall P.E. et Sandy J.D. (2002) Activation of the proteolytic activity of ADAMTS4 (Aggrecanase-1) by C-terminal truncation. *J. Biol. Chem.* **277**, 11034-11041
18. Glasson S.S., Askew R., Sheppard B., Carito B.A., Blanchet T., Ma H., Flannery C.R., Kanki K., Wang E., Peluso D., Yang Z., Majumdar M.K. et Morris E.A. (2004) Characterization of and osteoarthritis susceptibility in ADAMTS-4-knockout mice. *Arthritis Rheum.* **50**, 2547-2558
19. Haas C.S., Gleason B., Lin S., Tramonti G. et Kanwar Y.S. (2004) Matrix metalloproteinases in renal development. *Connect. Tissue Res.* **45**, 73-85

20. Jin H., Wang X., Ying J., Wong A.H., Li H., Lee K.Y., Srivastava G., Chan A.T., Yeo W., Ma B.B., Putti T.C., Lung M.L., Shen Z.Y., Xu L.Y., Langford C. et Tao Q. (2007) Epigenetic identification of ADAMTS18 as a novel 16q23.1 tumor suppressor frequently silenced in esophageal, nasopharyngeal and multiple other carcinomas. *Oncogene*. **26**, 7490-7498
21. Kuno K., Bannai K., Hakozaiki M., Matsushima K. et Hirose K. (2004) The carboxyl-terminal half region of ADAMTS-1 suppresses both tumorigenicity and experimental tumor metastatic potential. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **319**, 1327-1333
22. Kuno K., Okada Y., Kawashima H., Nakamura H., Miyasaka M., Ohno H. et Matsushima K. (2000) ADAMTS-1 cleaves a cartilage proteoglycan, aggrecan. *FEBS Lett.* **478**, 241-245
23. Kuno K., Terashima Y. et Matsushima K. (1999) ADAMTS-1 is an active metalloproteinase associated with the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* **274**, 18821-18826
24. Kuno K. et Matsushima K. (1998) ADAMTS-1 protein anchors at the extracellular matrix through the thrombospondin type 1 motifs and its spacing region. *J. Biol. Chem.* **273**, 13912-13917
25. Kuure S., Vuolteenaho R. et Vainio S. (2000) Kidney morphogenesis: cellular and molecular regulation. *Mech. Dev.* **92**, 31-45
26. Lang R.J., Tonta M.A., Zoltkowski B.Z., Meeker W.F., Wendt I. and Parkington H.C. (2006) Pyeloureteric peristalsis: role of atypical smooth muscle cells and interstitial cells of Cajal-like cells as pacemakers. *J. Physiol.* **576**, 695-705
27. Lechner M.S. et Dressler G.R. (1997) The molecular basis of embryonic kidney development. *Mech. Dev.* **62**, 105-120

28. Liu C.J., Kong W., Ilalov K., Yu S., Xu K., Prazak L., Fajardo M., Sehgal B. et Di Cesare P.E. (2006) ADAMTS-7: a metalloproteinase that directly binds to and degrades cartilage oligomeric matrix protein. *FASEB J.* **20**, 988-990
29. Liu C.J., Kong W., Xu K., Luan Y., Ilalov K., Sehgal B., Yu S., Howell R.D. et Di Cesare P.E. (2006) ADAMTS-12 associates with and degrades cartilage oligomeric matrix protein. *J. Biol. Chem.* **281**, 15800-15808
30. Luque A., Carpizo D.R. et Iruela-Arispe M.L. (2003) ADAMTS-1/METH1 inhibits endothelial cell proliferation by direct binding and sequestration of VEGF₁₆₅. *J. Biol. Chem.* **278**, 23656-23665
31. Majumdar M.K., Askew R., Schelling S., Stedman N., Blanchet T., Hopkins B., Morris E.A. et Glasson S.S. (2007) Double-knockout of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in mice results in physiologically normal animals and prevents the progression of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **56**, 3670-3674
32. Malfait A., Liu R., Ijiri K., Komiya S. et Tortorella M. (2002) Inhibition of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage. *J. Biol. Chem.* **277**, 22201-22208
33. Mittaz L., Ricardo S., Martinez G., Kola I., Kelly D.J., Little M.H., Hertzog P.J. et Pritchard M. (2005) Neonatal calyceal dilation and renal fibrosis resulting from loss of ADAMTS-1 in mouse kidney is due to a developmental dysgenesis. *Nephrol. Dial. Transplant.* **20**, 419-423
34. Mittaz L., Russel D.L., Wilson T., Brasted M., Tkalcevic J., Salamonsen L.A., Hertzog P.J. et Pritchard M.A. (2004) ADAMTS-1 is essential for the development and function of the urogenital system. *Biol. Reprod.* **70**, 1096-1105

35. Nakamura H., Fujii Y., Inoki I., Sugimoto K., Tanzawa K., Matsuki H., Miura R., Yamaguchi Y. et Okada Y. (2000) Brevican is degraded by matrix metalloproteinases and aggrecanase-1 (ADAMTS-4) at different sites. *J. Biol. Chem.* **275**, 38885-38890
36. Nishinakamura R. (2003) Kidney development conserved over species: essential roles of Sall1. *Semin. Cell. Dev. Biol.* **14**, 241-247
37. Piscione T.D. et Rosenblum N.D. (2002) The molecular control of renal branching morphogenesis: current knowledge and emerging insights. *Differentiation* **70**, 227-246
38. Porter S., Clark I.M., Kevorkian L. et Edwards D.R. (2005) The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem. J.* **386**, 15-27
39. Porter S., Scott S.D., Sassoon E.M., Williams M.R., Jones J.L., Girling A.C., Ball R.Y. et Edwards D.R. (2004) Dysregulated expression of adamalysin-thrombospondin genes in human breast carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **10**, 2429-2440
40. Richards J.S., Hernandez-Gonzales I., Gonzalez-Robayna I., Teuling E., Lo Y., Boerboom D., Falender A.E., Doyle K.H., LeBaron R., Thompson V. et Sandy J.D. (2005) Regulated expression of ADAMTS family members in follicles and cumulus oocyte complexes: evidence for specific and redundant patterns during ovulation. *Biol. Reprod.* **72**, 1241-1255
41. Rodriguez-Manzaneque J. C., Westling J., Thai S., Luque A., Knauper V., Murphy G., Sandy J.D. et Iruela-Arispe M.L. (2002) ADAMTS1 cleaves aggrecan at multiple sites and is differentially inhibited by metalloproteinase inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 501-508
42. Russel D.L., Doyle K.M.H., Ochsner S.A., Sandy J.D. et Richards J.S. (2003) Processing and localization of ADAMTS-1 and proteolytic cleavage of versicane during cumulus matrix expansion and ovulation. *J. Biol. Chem.* **278**, 42330-42339

43. Sandy J.D., Westling J., Kenagy R.D., Iruela-Arispe M. L., Verscharen C., Rodriguez-Mazaneque J.C., Zimmermann D.R., Lemire J.M., Fischer J.W., Wight T.N. et Clowes A.W. (2001) Versican V1 proteolysis in human aorta *in vivo* occurs at the Glu⁴⁴¹-Ala⁴⁴² bond, a site that is cleaved by recombinant ADAMTS-1 and ADAMTS-4. *J. Biol. Chem.* **276**, 13372-13378
44. Sariola H. et Sainio K. (1998) Cell lineages in the embryonic kidney: their inductive interactions and signalling molecules. *Biochem. Cell Biol.* **76**, 1009-1016
45. Saxen L. (1987) Organogenesis of the kidney. Cambridge University Press, Cambridge.
46. Shindo, T., Kurihara H., Kuno K., Yokoyama H., Wada T., Kurihara Y., Imai T., Wang Y., Ogata M., Nishimatsu H., Moriyama N., Oh-Hashi Y., Morita H., Ishikawa T., Nagai R., Yazaki Y. et Matsushima K. (2000) ADAMTS-1: a metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function. *J. Clin. Invest.* **105**, 1345-1352
47. Shozu M., Minami N., Yokoyama H., Inoue M., Kurihara H., Matsushima K. et Kuno K. (2005) ADAMTS-1 is involved in normal follicular development, ovulatory process and organization of the medullary vascular network in the ovary. *J. Mol. Endocrinol.* **35**, 343-355
48. Steer D.L., Shah M.M., Bush K.T., Stuart R.O., Sampogna R.V., Meyer T.N., Schwesinger C., Bai X., Esko J.D. et Nigam S.K. (2004) Regulation of ureteric bud branching morphogenesis by sulphated proteoglycans in the developing kidney. *Dev. Biol.* **272**, 310-327
49. Tortorella M.D., Malfait A., Deccico C. et Arner E. (2001) The role of ADAM-TS4 (aggrecanase-1) and ADAM-TS5 (aggrecanase-2) in a model of cartilage degradation. *Osteoarthritis Cartilage.* **9**, 539-552

50. Tortorella M., Pratta M., Liu R.Q., Abbaszade I., Ross H., Burn T. et Arner E. (2000) The thrombospondin motif of aggrecanase-1 (ADAMTS-4) is critical for aggrecan substrate recognition and cleavage. *J. Biol. Chem.* **275**, 25791-25797.
51. Tortorella M., Pratta M., Liu R.Q., Austin J., Ross H., Abbaszade I., Burn T. et Arner E. (2000) Sites of aggrecan cleavage by recombinant human aggrecanase-1. *J. Biol. Chem.* **275**, 18566-18573
52. Wolfsberg T.G., Primakoff P., Myles D.G. et White J.M. (1995) ADAM, a novel family of membrane proteins containing a disintegrin and metalloprotease domain : multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. *J. Cell Biol.* **131**, 275-278
53. Yokoyama H., Wada T., Kobayashi K., Kuno K., Kurihara H., Shindo T. et Matsushima K. (2002) A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS)-1 null mutant mice develop renal lesions mimicking obstructive nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* **17**, 39-41
54. Yu J., McMahon A.P. et Valerius M.T. (2004) Recent genetic studies of mouse kidney development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **14**, 550-557