

Université de Montréal

Titre du mémoire :

Étude in vivo du rôle du domaine extracellulaire de la polycystine-1

Par

Almira Kurbegovic

Programme de biologie moléculaire
Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en biologie moléculaire

Avril, 2006

© Kurbegovic Almira, 2006



Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude in vivo du rôle du domaine extracellulaire de la polycystine-1

Présenté par
Almira Kurbegovic

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

.....**Nabil Seidah**.....
président-rapporteur

.....**Marie Trudel**.....
directeur de recherche

.....**Jacques Michaud**.....
membre du jury

RÉSUMÉ

La maladie génétique rénale la plus commune, ADPKD, se caractérise par la formation de kystes tubulaires rénaux et mène à l'insuffisance rénale. Peu est connu sur le rôle du produit du gène PKD1, la polycystine-1 (PC1), une protéine transmembranaire avec un large domaine extracellulaire et un court domaine intracellulaire mutée dans 85% des cas ADPKD. Les caractéristiques structurales/fonctionnelles du domaine extracellulaire pointent toutefois vers un rôle de PC1 dans les interactions cellule-cellule/cellule-matrice extracellulaire/récepteur-ligand qui contrôleraient la prolifération, l'adhésion et la polarité cellulaire et qui sont altérées dans l'épithélium rénal ADPKD.

Dans le but d'étudier la fonction du domaine extracellulaire de PC1 *in vivo*, nous avons exprimé ce domaine chez les souris transgéniques en reproduisant simultanément une forme mutante ADPKD. Modifié par recombinaison homologue, le gène Pkd1 ne contenant que le domaine extracellulaire du gène Pkd1 murin a servi pour générer 4 souris transgéniques Pkd1_{extra} (2-80 copies du transgène) et mène à l'expression d'une protéine pc1 tronquée stable de ~330kDa. Les souris Pkd1_{extra} reproduisent plusieurs caractéristiques typiques d'ADPKD: diminution sévère d'osmolalité, protéinurie, développement d'une polykystose rénale tardive accompagnée par hyperplasie épithéliale et de fibrose interstitielle et même d'une augmentation de l'oncogène c-myc. Curieusement, nos résultats préliminaires montrent un phénotype extrarénal splénique suggérant un rôle hématologique de PC1. Notre étude a montré que la surexpression d'une protéine tronquée pc1 correspondant à une mutation ADPKD et au domaine extracellulaire de PC1 peut causer la polykystose rénale *in vivo* soulignant l'importance de ce dernier dans l'homéostasie rénale. Le(s) mécanisme(s) d'action possible(s) de la protéine pc1 tronquée reste(nt) à être déterminé(s).

Mots clés:

ADPKD / PKD1 / recombinaison homologue / BAC / polycystine-1 tronquée / domaine extracellulaire / transgénique /

ABSTRACT

ADPKD is the most common genetic kidney disease characterized by formation of tubular renal cysts that lead to end stage renal disease. Little is known about polycystin-1 (PC1) encoded by the PKD1 gene mutated in 85% of ADPKD cases. PC1 is a transmembrane protein with a large extracellular and relatively small intracellular domain. Functional/structural analysis of PC1 extracellular domain strongly suggest implication of PC1 in cell-cell/cell-matrix/receptor-ligand interactions that control proliferation, cell adhesion and polarity all of which when altered represent typical characteristics of ADPKD epithelium.

In order to study function of the extracellular domain of PC1 *in vivo*, we generated transgenic mice that overexpress this domain, mimicking closely one mutation reported in two ADPKD patients. First, modified by homologous recombination, Pkd1 gene that lacks the intracellular and transmembrane domains was used for generation of 4 transgenic mice Pkd1_{extra} (2-80 copies of transgene). Pkd1_{extra} mice that express a stable pc1 truncated protein of ~330kDa were shown to reproduce many of the typical characteristics of ADPKD: severe decrease in osmolality, proteinuria, and development of late-onset kidney polycystic kidney disease accompanied by epithelial hyperplasia, fibrosis and even increase in expression of the c-myc oncogene. Interestingly, these mice develop an extrarenal splenic phenotype indicating a possible role of PC1 in hematopoiesis.

In this study, we showed that expression of a truncated form of PC1 corresponding to one ADPKD mutation and the entire extracellular domain of PC1 can lead to polycystic kidney disease underlining its importance in kidney structural/functional integrity. It remains to be determined the exact mechanism employed by pc1_{extra} protein in development of Pkd1_{extra} phenotype.

Key words:

ADPKD / PKD1 / homologous recombination / BAC / truncated polycystin-1 / extracellular domain / transgenic /

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	i
ABSTRACT	ii
TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xiii
REMERCIEMENTS	xvi

CHAPITRE 1.0

INTRODUCTION	1
---------------------------	----------

1.1.0 LA STRUCTURE ET LA FONCTION RÉNALE

1.1.1 Le développement rénal des mammifères

1.1.1.1 Le développement rénal <i>in utero</i>	2
1.1.1.2 La structure du rein mature.....	4

1.1.1 Les fonctions du rein

1.1.2.1 La formation et la concentration d'urine.....	5
1.1.1.2 La régulation de la pression sanguine	5
1.1.1.3 La sécrétion hormonale	6

1.2.0 LES MALADIES GÉNÉTIQUES RÉNALES POLYKYSTIQUES

1.2.1 La polykystose rénale autosomique dominante (ADPKD).....	9
1.2.2 La polykystose rénale autosomique récessive (ARPKD).....	10
1.2.3 Les néphronophthésies et la maladie kystique de la médulla rénale.....	11

1.3.0 LES GÈNES DE LA POLYKYSTOSE RÉNALE AUTOSOMIQUE DOMINANTE

1.3.1 Le gène PKD1 humain

1.3.1.1 Les caractéristiques du gène PKD1 humain.....	13
1.3.1.2 L'expression du gène PKD1 humain	14
1.3.1.3 Les mutations dans le gène PKD1 humain	
1.3.1.3.1 Le nombre et le positionnement des mutations ADPKD1	14
1.3.1.3.2 La corrélation génotype-phénotype ADPKD1.....	15
1.3.2 Le gène PKD2 humain	
1.3.2.1 Les caractéristiques du gène PKD2 humain.....	16
1.3.2.2 L'expression du gène PKD2 humain	16
1.3.2.3 Les mutations dans le gène PKD2 humain	
1.3.2.3.1 Le nombre et le positionnement des mutations ADPKD2	17
1.3.2.3.2 La corrélation génotype-phénotype ADPKD2.....	17
1.3.3 Le gène PKD3 humain ?	18
1.3.4 Les homologues des gènes ADPKD	
1.3.4.1 Mus Musculus.....	18
1.4.0 LES PROTÉINES DE L'ADPKD	
1.4.1 La polycystine-1	
1.4.1.1 Le domaine extracellulaire de la polycystine-1	
1.4.1.1.1 Le peptide signal	24
1.4.1.1.2 Le domaine LRR.....	24
1.4.1.1.3 Le domaine WSC	25
1.4.1.1.4 Le domaine lectine de type-C	25
1.4.1.1.5 Le domaine LDL-A.....	26
1.4.1.1.6 Les domaines PKD.....	26
1.4.1.1.7 Le domaine REJ	27
1.4.1.1.8 Le domaine GPS.....	27
1.4.1.2 Le domaine transmembranaire de la polycystine-1.....	28
1.4.1.3 Le domaine cytoplasmique de la polycystine-1	
1.4.1.3.1 Les boucles cytoplasmiques.....	29
1.4.1.3.2 Le domaine C-terminal cytoplasmique	

1.4.1.3.2.1 Le domaine coiled-coil	29
1.4.1.3.2.2 Les sites de phosphorylation.....	30
1.4.1.3.2.3 La séquence PEST	30
1.4.1.3.2.4 Le site d'activation des protéines G.....	31
1.4.2 La polycystine-2	31

1.5.0 L'ANALYSE MOLÉCULAIRE D'ADPKD: EXPRESSION ET PATHOLOGIE

1.5.1 L'expression des polycystines-1 et -2

1.5.1.1 L'expression normale de la polycystine-1 humaine et murine	33
1.5.1.2 L'expression normale de la polycystine-2 humaine et murine	37
1.5.1.3 L'expression des polycystines dans l'ADPKD.....	40

1.5.2 Les mécanismes de pathogenèse ADPKD

1.5.2.1 La théorie du deuxième hit ou de perte d'hétérozygotie	41
1.5.2.2 La théorie d'effet dosage/haploinsuffisance	43

1.6.0 L'ANALYSE FONCTIONNELLE DES GÈNES D'ADPKD

1.6.1 Pkd1 impliqué

1.6.1.1 L'ablation génique totale de Pkd1	44
1.6.1.2 Le gène Pkd1 hypomorphe	47
1.6.1.3 La surexpression transgénique de Pkd1	
1.6.1.3.1 La surexpression de PKD1 humain.....	47
1.6.1.3.2 La surexpression de Pkd1 murin rein-spécifique	48

1.6.2 Pkd2 impliqué

1.6.2.1 L'ablation génique totale de Pkd2	49
---	----

1.7.0 L'ANALYSE DE LA PHYSIOLOGIE CELLULAIRE D'ADPKD: PARTENAIRES ET VOIES DE SIGNALISATION DE PKD1

1.7.1 La pathologie cellulaire des patients ADPKD

1.7.1.1 La prolifération cellulaire/apoptose	50
1.7.1.2 La prolifération cellulaire/apoptose	50
1.7.1.3 La polarité cellulaire	

1.7.1.3.1 La E-cadhérine	52
1.7.1.3.2 La pompe Na ⁺ -K ⁺ -ATPase.....	52
1.7.1.3.3 Le récepteur EGFR.....	53
1.7.1.4 La matrice extracellulaire.....	53
1.7.2 Les partenaires cellulaires des polycystines	
1.7.2.1 La polycystine-1.....	54
1.7.2.2 La polycystine-2.....	57
1.7.3 Les voies de signalisation de polycystine-1	
1.7.3.1 Les protéines G	60
1.7.3.2 La voie canonique Wnt.....	61
1.7.3.3 La voie AP-1.....	61
1.7.3.4 La voie calcineurine/NFAT.....	62
1.7.3.5 Les autres voies.....	62
1.7.4 Les modèles de la kystogénèse rénale	
1.7.4.1 Les mutations spontanées, insertionnelles et chimiquement induites	63
1.7.4.2 Les ablations géniques et la transgénèse.....	65
1.8.0 LE PROJET DE MAÎTRISE	
1.8.1 Le but à long terme.....	67
1.8.1.1 N-terminal: un domaine fonctionnel de la PC1?	67
1.8.2 L'hypothèse et l'approche expérimentale.....	69
1.9.0 NOTE CONCERNANT L'APPENDICE.....	69
CHAPITRE 2.0	
ARTICLE: Late-onset of polycystic kidney disease from enhanced expression of Pkd1 extracellular region	70
ABSTRACT.....	71
INTRODUCTION	72
RESULTS.....	75

Production of Pkd1 _{extra} -BAC and transgenic mice.....	75
Expression analysis of the Pkd1 _{extra} transgene.....	80
Altered renal physiologic function in Pkd1 _{extra} transgenic mice.....	84
Histopathologic anomalies in Pkd1 _{extra} mice.....	88
Identification of Pkd1 _{extra} renal molecular targets in Pkd1 _{extra} mice.....	92
DISCUSSION.....	94
ACKNOWLEDGMENTS.....	98
MATERIALS AND METHODS.....	99
DNA constructs and homologous recombination in Pkd1 _{extra} -BAC.....	99
Production and genotyping of transgenic mice.....	101
Renal function analysis.....	102
Histopathological analysis.....	103
RNA expression analysis.....	103
Protein expression analysis.....	106
REFERENCES.....	107
CHAPITRE 3.0	
DISCUSSION.....	111

3.1 Le transgène Pkd1_{extra} et son expression chez la souris transgénique Pkd1_{extra}.....	113
3.1.1 La spécification de la construction du gène modifié Pkd1 _{extra}	113
3.1.2 Les éléments régulateurs du transgène Pkd1 _{extra}	114
3.1.3 L'expression du gène Pkd1 chez les souris Pkd1 _{extra}	115
3.1.3.1 L'expression du messenger Pkd1 _{extra} chez les souris Pkd1 _{extra}	115
3.1.3.2 L'expression du messenger Pkd1 _{endo} chez la souris Pkd1 _{extra}	115
3.1.3.3 La protéine pc1 _{extra}	
3.1.3.3.1 L'expression de la protéine pc1 _{extra} chez les souris Pkd1 _{extra}	116
3.1.3.3.2 L'effet de la pc1 _{extra} sur la polycystine-1 endogène.....	116
3.1.3.3.2.1 L'interférence avec la capacité de dimérisation ?.....	117
3.1.3.3.2.2 L'interférence avec la glycosylation protéique/localisation cellulaire.....	118
3.1.3.3.2.3 L'interférence avec la conformation structurale du domaine PLAT?.....	119
3.1.3.3.3 La localisation de la protéine pc1 _{extra}	120

3.1.3.3.4 La comparaison du mécanisme d'action potentiel du domaine extracellulaire de pc1 avec celui de certains récepteurs clivés	121
---	-----

3.2 La tubulogenèse rénale normale chez les souris Pkd1_{extra} 123

3.2.1 L'implication possible de Pkd1 dans le développement rénal	123
--	-----

3.2.2 L'effet du transgène Pkd1 _{extra} sur la tubulogenèse rénale	123
---	-----

3.3 La polykystose rénale des souris Pkd1_{extra} 125

3.3.1 Les caractéristiques du phénotype rénal Pkd1 _{extra}	125
---	-----

3.3.2 Le mode d'action de pc1_{extra} dans la polykystose rénale tardive

3.3.2.1 L'hypothèse du dominant négatif de pc1 _{extra}	126
---	-----

3.3.2.2 L'implication de gènes modificateurs dans le phénotype Pkd1 _{extra}	126
--	-----

3.4 La manifestation extrarénale des souris Pkd1_{extra} 127

3.4.1 L'absence du phénotype extrarénal typique ADPKD chez les souris Pkd1 _{extra}	127
---	-----

3.4.2 L'implication de pc1 _{extra} dans la splénomégalie chez les souris Pkd1 _{extra}	127
---	-----

3.5 Les effecteurs potentiels de pc1_{extra} 128

3.5.1 La dérégulation de l'expression de c-myc chez les souris Pkd1 _{extra}	128
--	-----

3.5.2 L'influence de l'expression de pc1 _{extra} sur l'expression de pc2.....	129
--	-----

3.5.2.1 La stabilisation réciproque de PC1 et PC2 rapportée dans d'autres études .	129
--	-----

3.5.2.2 La nature et mécanisme potentiel de stabilisation de pc2 par Pkd1 _{extra}	130
--	-----

3.5.2.3 L'effet possible de la stabilisation de pc2 par Pkd1 _{extra}	130
---	-----

3.6 La conclusion 131

BIBLIOGRAPHIE..... 133

APPENDICES

APPENDICE I à V: Les résultats supplémentaires des souris Pkd1_{extra}

APPENDICE I: La vérification de l'intégrité du Pkd1 _{extra} -BAC	xx
--	----

APPENDICE II: La vérification de l'intégrité du transgène Pkd1 _{extra}	xxii
--	------

APPENDICE III: La représentation schématique de la pc1 _{extra}	xxiii
--	-------

APPENDICE IV: Le phénotype rénal particulier chez une souris de la lignée Pkd1 _{extra} I	xxiv
--	------

APPENDICE V: L'expression de lipocaline-2 chez les souris Pkd1 _{extra}	xxv
--	-----

APPENDICE VI: Les souris transgéniques SBPkd1 _{extra/TAG}	xxvii
---	-------

APPENDICE VII: La séquence et motifs protéiques de la polycystine-1 murine	xxxiv
---	-------

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1.0

Tableau 1- I: Maladies génétiques de la polykystose rénale	8
Tableau 1- II: Manifestations rénales et extrarénales d'ADPKD	10
Tableau 1- III-I: Répartition des mutations dans le gène PKD1	15
Tableau 1- III-II: Répartition des mutations dans le gène PKD2	17
Tableau 1- IV: Famille des polycystines	21
Tableau 1- V: Relation structure-fonction du domaine extracellulaire de la PC1	23
Tableau 1- VI: Expression intracellulaire de la PC1	36
Tableau 1- VII: Expression intracellulaire de la PC2	39
Tableau 1- VIII: Expression des polycystines -1 et -2 dans l'ADPKD	41
Tableau 1- IX: Mutagenèse des gènes murins de l'ADPKD: Pkd1 et Pkd2	46
Tableau 1- X: Partenaires protéiques de la polycystine-1	56
Tableau 1-XI: Partenaires protéiques de la polycystine-2.....	59
Tableau 1-XII: Modèles de la polykystose rénale:	
Mutations spontanées, insertionnelles et chimiquement induites	64
Tableau 1-XIII: Modèles de la kystogenèse rénale :	
Ablations géniques et transgénèse	66

CHAPITRE 2.0

Tableau 2- I: Evidence of altered renal physiology in Pkd1 _{extra} transgenic mice.....	85
Tableau 2- II: Chronic renal insufficiency in Pkd1 _{extra} transgenic mice	86

LISTE DES TABLEAUX (la suite...)

CHAPITRE 3.0

Tableau 3- I: Alignement de séquences de la région GPS chez différentes protéines-récepteur dont le clivage a été démontré *in vitro* 120

APPENDICES

APPENDICES I à V: Les souris transgéniques Pkd1_{extra}

Tableau A- I: Expression rénale de lipocaline-2 chez les souris Pkd1_{extra}XXV

APPENDICES VI: Les souris transgéniques SBPkd1_{extra/TAG}

Tableau A- II: Analyse physiologique de souris transgéniques SBPkd1_{extra/TAG}
HématocriteXXX

Tableau A- III: Analyse physiologique de souris transgéniques SBPkd1_{extra/TAG}
UrineXXXi

Tableau A- IV: Analyse physiologique de souris transgéniques SBPkd1_{extra/TAG}
SérumXXXi

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1.0

Figure 1- 1: Développement rénal <i>in utéro</i> et les facteurs impliqués.....	3
Figure 1- 2: Structure du rein mature	4
Figure 1- 3: Maladies génétiques de la polykystose rénale	7
Figure 1- 4: Structure protéique de la polycystine-1	23
Figure 1- 5: Structure du domaine LRR	25
Figure 1- 6: Structure protéique de la polycystine-2	32
Figure 1- 7: Théorie du deuxième hit	42
Figure 1- 8: Voies de signalisation régulées par la polycystine-1	60

CHAPITRE 2.0

Figure 2- 1: Production of Pkd1 _{extra} -BAC construct.....	76-77
Figure 2- 2: Genomic analysis of Pkd1 _{extra} transgenic mice.....	79
Figure 2- 3: Expression analysis of Pkd1 _{extra} transgene	82-83
Figure 2- 4: Proteinuria in Pkd1 _{extra} transgenic mice.....	87
Figure 2- 5: Cystogenesis in Pkd1 _{extra} transgenic mice.....	90
Figure 2- 6: Expression analysis of c-myc in Pkd1 _{extra} transgenic mice.....	92
Figure 2- 7: Expression analysis of Pkd2 and polycystin-2 in Pkd1 _{extra} mice	93

CHAPITRE 3.0

Figure 3- 1: Représentation schématique des sites d'interaction possible de pcl _{endo} et pcl _{extra}	132
--	-----

LISTE DES FIGURES (la suite....)**APPENDICES****APPENDICES I à V: Les souris transgéniques Pkd1_{extra}**

- Figure A- 1:** Séquençage de la jonction exon25-46 dans le Pkd1_{extra}-BACxx
- Figure A- 2:** Analyse de l'intégrité du Pkd1_{extra}-BAC par Southern blotxxi
- Figure A- 3:** Analyse de l'intégrité du transgène Pkd1_{extra}xxii
- Figure A- 4:** Analyse comparative structurelle de pc1 et pc1_{extra} xxiii
- Figure A- 5:** Phénotype rénal particulier chez une souris Pkd1_{extra} 11xxiv

APPENDICE VI: Les souris transgéniques SBPkd1_{extra/TAG}

- Figure A- 6:** Analyse de l'intégrité du SBPkd1_{extra/TAG}-BAC par Southern blot .. xxviii
- Figure A- 7:** Analyse de l'intégrité du transgène SBPkd1_{extra}.....xxix
- Figure A- 8:** Analyse de l'expression du transgène SBPkd1_{extra/TAG} par Q-PCR.....xxx
- Figure A- 9:** Phénotype rénal sévère chez les souris KO-SBPkd1_{extra/TAG}xxxii

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

aa: acide aminé

BAC: bacterial artificial chromosome

bp ou pb: paire de base

E: jour embryonnaire

ESRD: end stage renal disease

et al.,: et collègues

IRC: insuffisance rénale chronique

kb: kilobase (1000nt)

kDa: kiloDalton

nt: nucléotide

PKD1: gène PKD1 humain

Pkd1: gène Pkd1 murin

PC1: polycystine-1 humaine

pc1: polycystine-1 murine

pc1_{endo}: polycystine-1 murine endogène chez les souris transgéniques Pkd1_{extra}

pc1_{extra}: polycystine-1 tronquée produite par le transgène Pkd1_{extra}

RE ou ER: réticulum endoplasmique

UB ou BU: bourgeon urétérique

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier à Dre. Marie Trudel de m'avoir accueillie dans son labo et de m'avoir permise de réaliser ce projet. Sa patience, son amour pour la science, sa persévérance et son ouverture d'esprit m'ont motivée à progresser et à apprécier encore plus la recherche.

Merci à tous les membres du labo spécialement à Caroline Thivierge, Martin Couillard, Hugues Beauchemin, Olivier Côté et Hady Felfly sans oublier l'aide bien appréciée des techniciens et des stagiaires d'été.

J'aimerais également remercier à Ekatherina Stoyanova pour les études échographiques, Annie Vallée pour le service d'histologie et Mylène Cawthorn en santé animale.

Finalement, un gros merci à ma famille ici et en Bosnie. Vous me manquez beaucoup...

Sincèrement,

Almira

"Les os peuvent se fracturer, les muscles s'atrophier, les glandes se dérégler. Le cerveau, quant à lui, peut s'endormir sans menacer immédiatement la survie. Par contre, si les reins viennent à manquer...ni les os, ni les muscles, ni les glandes, ni le cerveau peuvent continuer à fonctionner."

Tiré de "Fish to Philosopher" écrit par Dr Homer Smith

CHAPITRE 1.0
INTRODUCTION

Chapitre 1

1.1.0 La structure et la fonction rénale

1.1.1 Le développement rénal des mammifères

Le rein des vertébrés supérieurs origine du mésoderme intermédiaire et passe par deux structures non-fonctionnelles, le pronéphros (E8) et le mésonéphros (E10.5-11), afin de donner lieu au métanéphros différencié, une structure mature fonctionnelle et permanente.

1.1.1.1 Le développement rénal *in utéro*

La formation de l'unité fonctionnelle rénale, le néphron, se fait en deux étapes : l'induction et la conversion ou l'épithélisation (**Fig.1-1**).

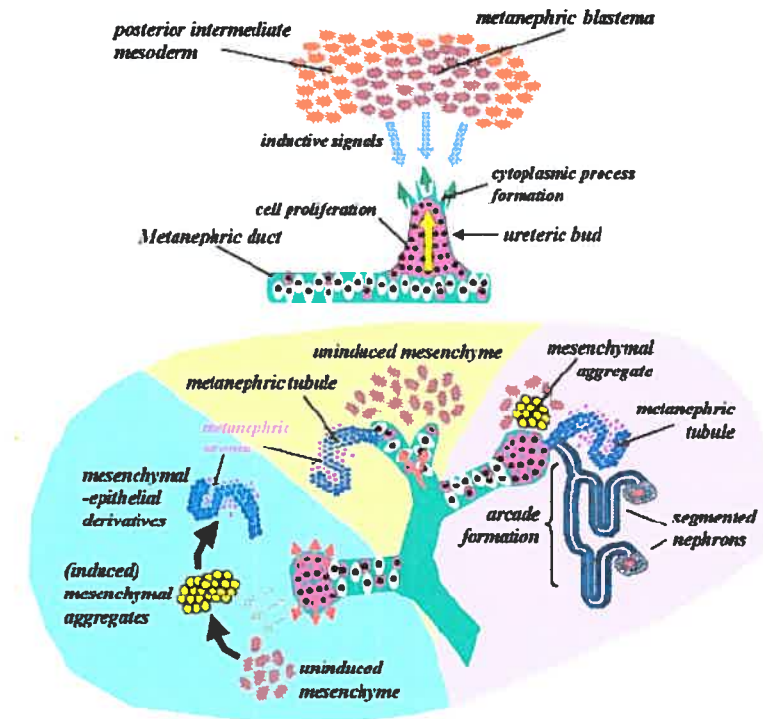
La première étape implique la formation d'une structure épithéliale appelée le bourgeon urétérique à partir du canal métanéphritique et induite par le mésenchyme métanéphritique, un groupe de cellules dérivées du mésoderme intermédiaire (**Fig.1- 1A**). Ceci est suivi par une série d'interactions séquentielles et réciproques entre le bourgeon urétérique et le mésenchyme via une combinaison des molécules de signalisation cellulaire strictement régulées, dont les facteurs de croissance (Bmp4; Bmp7; Fgf7; Gdnf α s; Wnt4), les récepteurs (Gfra1; Notch2; c-Ret), les facteurs de transcription (Emx2; Eya1; Foxc; Pax2; Wt1, RAR α et β 2), les composantes de la matrice extracellulaire et ces régulateurs (Intégrines α 8, α 6, α 3; Hs2st; Gpc3) (**Fig.1- 1B**). Le bourgeon urétérique cause une condensation du mésenchyme, tandis que le mésenchyme provoque le branchement du bourgeon, un phénomène d'induction réciproque unique aux reins, les glandes salivaires, les glandes mammaires et les poumons.

La deuxième étape implique une conversion du mésenchyme en épithélium tubulaire, une étape qui demande l'activation d'un programme moléculaire spécial. Les cellules mésenchymateuses condensent près du bourgeon urétérique formant en premier des

structures sous forme de corps en virgule, puis de corps en S. Ces derniers qui constituent les cellules épithéliales du glomérule, des tubules proximaux et des tubules distaux, se lient éventuellement sur le bourgeon en branchement qui lui donnera lieu aux tubules collecteurs afin que le tout forme un néphron mature.

Figure 1-1: Le développement rénal *in utero* et les facteurs impliqués

A.



B.

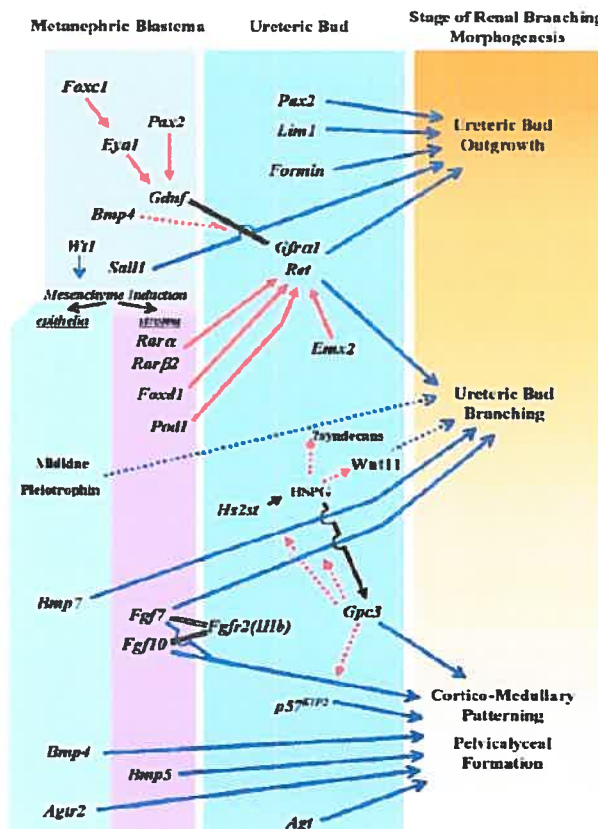
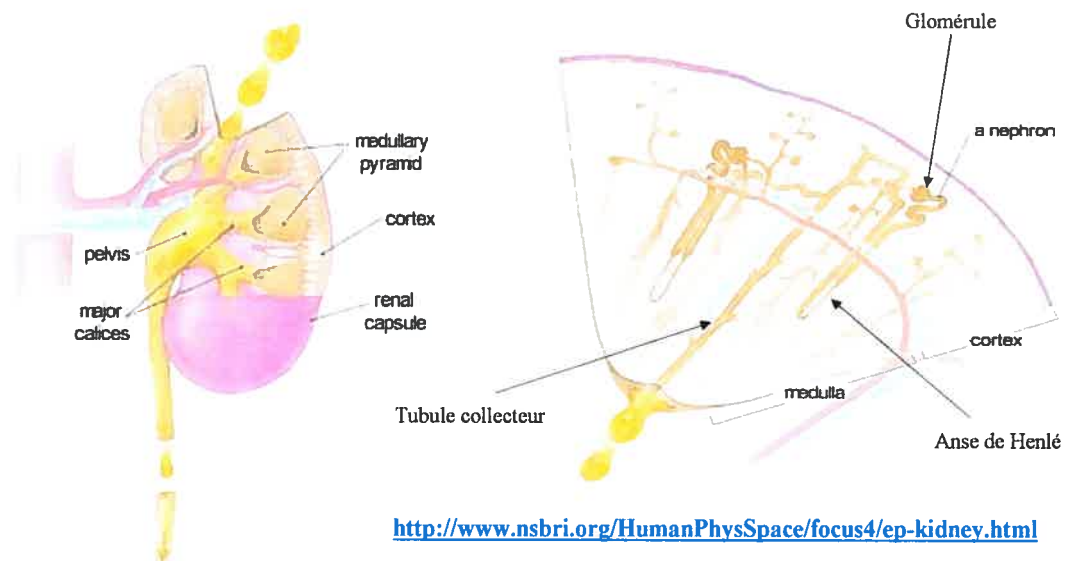


Figure modifiée de Piscione *et al.*, 2002
Le développement rénal se fait par les communications réciproques entre le mésenchyme et le bourgeon urétérique (A) via différents facteurs moléculaires (B).

1.1.1.2 La structure du rein mature

Le rein humain est séparé en deux régions distinctes, le cortex et la médulla (Fig.1-2). À l'intérieur de ces deux régions est compacté environ 1 million de néphrons. Le néphron est l'unité fonctionnelle du rein et consiste en un corpuscule rénal (le glomérule) et un tubule rénal (tubule proximal, tubule distal, anse de Henlé, tubule collecteur) entouré de vaisseaux sanguins (Fig.1-2).

Figure 1-2: La structure du rein mature



1.1.2 Les fonctions du rein

Le rein a plusieurs fonctions essentielles. En premier, c'est l'organe qui purifie et équilibre la composition du sang via les processus de filtration, de réabsorption et de sécrétion. Ces fonctions sont médiées par les différentes parties du néphron et résultent en production d'urine. Le rein élimine alors les déchets formés par le fonctionnement de notre organisme et maintient l'équilibre chimique dans notre sang.

1.1.2.1 La formation et la concentration d'urine

La filtration non-sélective des petites molécules tels que l'eau, les petits solutés, les électrolytes et les déchets azotés se fait au niveau du glomérule. Les molécules de haut poids moléculaire dont les globules rouges et les protéines ne traversent pas la barrière glomérulaire et restent dans le sang tandis que les électrolytes (Na^+ , K^+ , Cl^-), le NaCl, l'eau, glucose, les déchets toxiques dont les déchets azotés (BUN) et la créatinine passent cette barrière et sont soit sécrétés soit réabsorbés tout au long du néphron afin de former une urine concentrée.

1.1.2.2 La régulation de la pression sanguine

Le rein est directement impliqué dans la régulation de la pression sanguine. C'est un organe endocrinien capable de synthétiser et sécréter différentes hormones.

Libérée exclusivement par l'appareil juxtaglomérulaire rénal dans le sang, **la rénine**, une enzyme protéolytique, est libérée suite à une diminution de pression sanguine. La rénine est sécrétée dans le sang où elle active l'angiotensinogène qui, sous sa forme active, l'angiotensine II, fait élever la pression artérielle sanguine.

En plus de sécréter les substances qui agissent sur la pression sanguine, les tubules distaux subissent l'action d'une hormone de la glande surrénale appelée **l'aldostérone**. Suite à une diminution de pression sanguine, cette dernière augmente la réabsorption de Na^+ au niveau des tubules distaux et par conséquent mène à une augmentation du volume et de la pression sanguine.

Une autre hormone qui agit au niveau des tubules distaux et collecteurs, c'est **l'hormone antidiurétique ou ADH (vasopressine)**, un peptide de 9 acides aminés sécrété par la neurohypophyse. Suite à une augmentation de l'osmolarité sanguine, l'ADH est relâchée dans le sang et acheminé vers son site d'action. En se liant à ses récepteurs dans les tubules collecteurs, l'ADH augmente la perméabilité de l'eau en stimulant la

transcription mais également la localisation membranaire apicale des canaux exclusivement à eau (les aquaporines).

1.1.2.3 La sécrétion hormonale

À part la rénine, le rein sécrète deux autres hormones. Il s'agit de l'érythropoïétine et du calcitriol (1,25[OH]₂ Vitamine D₃).

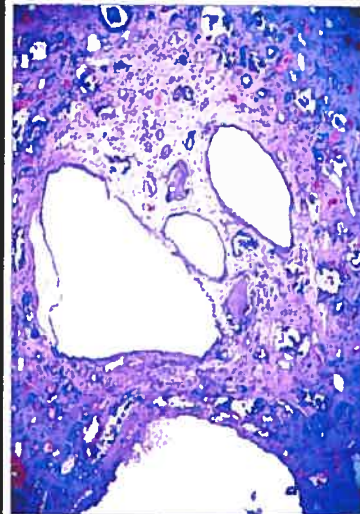
L'érythropoïétine, une glycoprotéine sécrétée par les fibroblastes péri-tubulaires interstitiels, agit sur la moelle osseuse et stimule la différenciation, la prolifération et la maturation des érythrocytes.

Quant au calcitriol, une forme de la vitamine D rendue active dans le rein à l'aide de l'enzyme 1- α -hydrolase des tubules proximaux, il régule le métabolisme minéral en agissant sur les cellules de l'intestin et les os via réabsorption sanguine de calcium. Le rein contribue alors à la formation de l'os en régularisant les niveaux de minéraux dont le calcium et le phosphate.

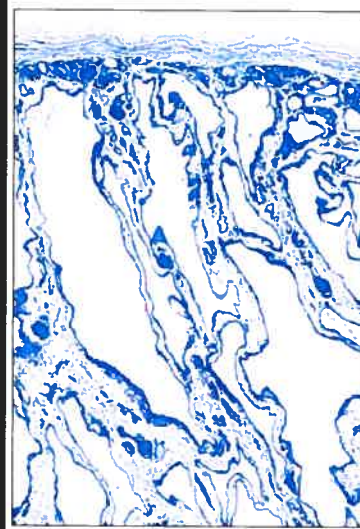
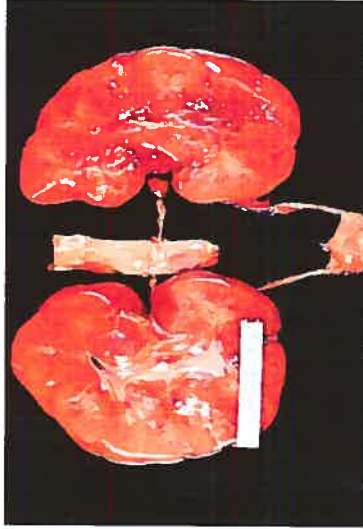
Enfin, il reste à mentionner le système kinine-kallikréine rénal qui intervient dans l'excrétion du sodium et des prostaglandines rénales, PGI₂ et PGE₂, qui interviennent en cas d'hypovolémie.

1.2.0 Les maladies génétiques rénales polykystiques (Tab.1-I, Fig.1-3)

Figure 1-3: Les maladies génétiques de la polykystose rénale



ADPKD



ARPKD



NPH/MCD

Images prises de Brenner & Rector's *The Kidney* 7th Edition; ADPKD: polykystose rénale autosomique dominante; ARPKD: polykystose rénale autosomique récessive; NPH: néphronophthisie; MCD: maladie kystique de la médulla rénale

Tableau1- I: Les maladies génétiques de la polykystose rénale

Maladie	Trait	Chr.	Gène (Génomique/cDNA en kb)	Protéine (PM en kDa)	IRC (ans)	Manifestations extrarénales
ADPKD	ADPKD1	AD	16p13.3 PKD1 (52//4.5)	Polycystine-1 (460)	53	Kystes hépatiques, pancréatiques, anévrismes cérébraux
	ADPKD2	AD	4q21-23 PKD2 (68.5.6)	Polycystine-2 (110)	69	
	ARPKD	AR	16p21-23 PKHD1 (472//6.2)	Fibrocystine /polyductine (447)	≤15 (20-45%)	
COMPLEXE NPH/MCD						
Nephronophthisis (NPH)						
	<i>Juvenile (NPH1)</i>	AR	2q12-13 NPHP1 (4.5)	Nephrocystine-1 (83)	13	
	<i>Infantile(NPH2)</i>	AR	1p36 NPHP4 (4.5: 8.0)	Nephrocystine-4 /nephroréline (134)	11-34	Dysplasie/dégénération de la rétine, fibrose hépatique, anomalies squelettiques et du cerveau
	<i>Adolescente(NPH3)</i>	AR	9q22-31 NPHP2 (5.0)	Inversine (98)	1	
		AR	3q21-22 NPHP3 (6.5: 8.0)	Nephrocystine-3 (143)	19	
Maladie kystique rénale médullaire (MCKD)						
	<i>MCKD1</i>	AD	1q21 UMOD1	?	62	Hyperuricémie, rhumatisme
	<i>MCKD2</i>	AD	16p12 UMOD2 (~2.2)	Uromoduline /Tam-Horsfall (68)	32	

AD: autosomique dominant; AR: autosomique récessif; NPH: néphronophthisis; MCKD: maladie kystique rénale médullaire; Chr.: localisation chromosomique; PM: poids moléculaire; IRC: âge moyen de l'insuffisance rénale chronique.

1.2.1 La polykystose rénale autosomique dominante (ADPKD)

L'ADPKD la maladie génétique héréditaire rénale de loin la plus commune. Elle touche 1/1000 personnes (0.1% de la population générale) (Dalgaard, 1957). ADPKD se manifeste par la formation de kystes rénaux bilatéraux d'origine épithéliale tubulaire. Les kystes peuvent se développer *in utero* (Michaud *et al.*, 1994) dans toutes les parties du néphron (Faraggiana *et al.*, 1985), ou encore apparaissent après la naissance, grossissent graduellement en nombre et en taille au cours de la vie adulte et causent une insuffisance rénale chronique (IRC) dans 50% des cas ADPKD avant 60 ans (Gallagher *et al.*, 2001). Les kystes provoquent des anomalies structurales et fonctionnelles rénales dont les défauts dans la concentration d'urine et élimination des déchets toxiques du sang, la protéinurie et les défauts endocriniens de rénine et d'érythropoïétine. Les patients ADPKD représentent 6-10% des insuffisances rénales chroniques nécessitant un traitement de suppléance de dialyse ou de transplantation.

La plus grande complication rénale d'ADPKD est l'insuffisance rénale. Cependant, l'ADPKD est une maladie systémique souvent accompagnée par les manifestations extrarénales kystiques et non-kystiques (Tab.1-II). Une des caractéristiques de ce type de polykystose rénale est une variabilité phénotypique considérable au niveau de la progression de la maladie. Environ 25% des patients ADPKD ont une fonction rénale adéquate à l'âge de 70 ans (Gabow *et al.*, 1992). Tous les patients ADPKD ne développent pas une IRC ce qui souligne l'importance des gènes modificateurs, de l'environnement, de la diète et du style de vie (cigarettes) sur la maladie. L'ADPKD est souvent référée comme une polykystose rénale adulte puisqu'elle est pratiquement asymptomatique chez les jeunes adultes et cause une IRC dans la cinquième décennie de la vie.

Tableau 1-II. Les manifestations rénales et extrarénales d'ADPKD

Type de complication	Manifestations (pourcentage de patients ADPKD affectés)
Rénal	-kystes rénaux -hypertrophie rénale -hypertension (60%) -maux du dos -hématurie (50%) -protéinurie (30%) -pierres rénales (20-30%) -infection de la voie urinaire -insuffisance rénale (50%)
Cardiovasculaire	-prolapse de la valve mitrale (26%) -anévrisme cérébral** (5-10%) ¹
Gastrointestinal	-kystes hépatiques*** (70%) ² -diverticula du colon
Autre	-kystes pancréatiques* ³ -kystes spléniques* -kystes aux ovaires*

*Très souvent asymptomatique; **Manifestation extrarénale la plus sérieuse;
***Manifestation extrarénale la plus fréquente: ¹: Huston *et al.*, 1993; Ruggieri *et al.*, 1994; ²:
Everson, 1993; ³: Torra *et al.*, 1997.

Quant à la génétique de l'ADPKD, il s'agit d'une maladie hétérogène. Deux gènes majeurs sont impliqués: PKD1 et PKD2. Les mutations dans le gène PKD1 sont responsables de 85% des cas ADPKD (Torra *et al.*, 1996) et mènent à une insuffisance rénale chronique à ~53 ans (Hateboer *et al.*, 1999b). Le gène PKD2 est muté chez ~15% des cas d'ADPKD causant une détérioration rénale clinique plus lente que PKD1 et par conséquent une IRC plus tardive vers ~69 ans (Hateboer *et al.*, 1999b). Ces gènes seront décrits plus en détail dans la section 1.3.0.

1.2.2 La polykystose rénale autosomique récessive (ARPKD)

L'ARPKD est une maladie polykystique rénale infantile à transmission récessive avec une incidence de 1/20 000 personnes (Zerres *et al.*, 1998). Elle se présente dès le stage néo-natal où les reins deviennent très gros dû principalement à des dilatations des tubules collecteurs.

Tout comme l'ADPKD, l'ARPKD présente des manifestations extrarénales importantes (**Gang et al., 1986; Lieberman et al., 1971; Cole et al., 1987**). Les manifestations les plus fréquentes qui accompagnent cette forme de kystogenèse rénale, c'est la dysgénèse biliaire qui résulte en fibrose congénitale hépatique, en comparaison aux kystes hépatiques chez l'ADPKD. Les patients ARPKD développent très souvent de l'hypertension et de l'hyperplasie pulmonaire, la cause primaire du décès.

Les mutations dans le gène PKHD1 constituent le défaut primaire d'ARPKD. Découvert par le clonage positionnel sur le chromosome 6p21-cen, le PKHD1 s'étale sur 472 kb du génome et contient 67 exons. Il encode pour la fibrocystine/polyductine, une protéine de 4072 acides aminés avec un poids moléculaire prédit de 447 kDa.

1.2.3 Les néphronophthisies (NPH) et la maladie kystique de la médulla rénale (MCD)

Ces deux maladies ont été longuement considérées comme une seule entité dû à un phénotype histologiquement identique. Dans les deux cas, les kystes se forment au niveau de la frontière cortico-médullaire du rein accompagnés par une infiltration interstitielle et une fibrose. Les reins NPH et MCD sont de taille normale en comparaison aux reins énormes ADPKD ou ARPKD.

Les différences entre NPH et MCD sont cependant observables au niveau du mode de transmission, l'âge de l'apparition de l'insuffisance rénale et des effets extrarénaux.

La néphronophthisie est une maladie autosomique récessive qui se manifeste très tôt et mène à une insuffisance rénale dans la première décennie de la vie. Il existe trois formes de NPH. Il s'agit de NPH 1 (juvénile), NPH2 (infantile) et NPH3 (adolescente), causées par des mutations dans la nephrocystine-1 et 4, l'inversine et la nephrocystine-3,

respectivement (**Tab.1-I, Fig.1-3**). La manifestation extrarénale la plus commune est la dégénération de la rétine. Les anomalies squelettiques, l'ataxie cérébelleuse et la fibrose hépatique sont également signalées chez les patients NPH.

La polykystose de la médulla rénale, quant à elle, a un trait dominant et mène à une insuffisance rénale plus tardive. C'est une maladie hétérogène causée par des mutations dans au moins deux gènes: 1) dans le gène d'uromoduline, la glycoprotéine urinaire la plus abondante, situé sur le chromosome 16p12 et 2) dans un deuxième gène pas encore identifié. Certaines familles MCD ont des manifestations d'arthrite rhumatoïdale et d'hyperuricémie.

L'étude de maladies rénales kystiques mentionnées ci-haut, les similarités et les différences de leurs caractéristiques (rénales et extrarénales), suggère que la kystogénèse puisse résulter d'une convergence commune des voies de signalisation de chacune d'elles. Dans mon projet de maîtrise, nous nous intéressons à la forme la plus commune de toutes les maladies héréditaires kystiques, l'ADPKD (**Calvet *et al.*, 2001**). Les sections qui suivent présenteront en détail la problématique d'ADPKD: les gènes, les mutations, la structure et localisation de la protéine, les fonctions potentielles et les partenaires cellulaires des gènes ADPKD.

1.3.0 Les gènes de la polykystose rénale autosomique dominante

1.3.1 Le gène PKD1 humain

1.3.1.1 Les caractéristiques du gène PKD1 humain

Le gène PKD1 humain a été localisé en 1985 sur le bras court du chromosome 16 (16q13.3) (Reeders *et al.*, 1985), 9 ans avant qu'il soit définitivement identifié en 1994 (European Consortium, 1994). Séparé par seulement 63 nucléotides, le gène PKD1 se trouve dans la direction queue-à-queue avec le gène TSC2 qui encode pour la tubérine impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire.

Le gène PKD1 a une structure compacte de 46 exons dans une région génomique de 52 kb et produit un très grand transcrit de 14 kb (International Consortium, 1995; Hughes *et al.*, 1995; American Consortium, 1995).

Deux tiers du gène humain PKD1 (~70% du gène) sont dupliqués plusieurs fois dans le voisinage immédiat sur le chromosome 16. La région dupliquée correspond à l'extrémité 5' du gène à partir de l'exon 1 jusqu'à l'intron 34. Ces régions dupliquées sont appelées les régions HG (Homologous Gene) ou des pseudogènes résultants probablement de retropositions et/ou de recombinaisons homologues. Les pseudogènes produisent des transcrits polyadénylés (The European Consortium, 1994) et ont 97% d'homologie avec le gène PKD1.

L'intron 1 de PKD1 a une longueur de plus de 15kb et pourrait contenir des éléments régulateurs transcriptionnels. Dans cet intron se trouve également une des trois régions riches en polypurine-polypyrimidine, les deux autres de trouvant dans l'intron 21 et 22 de 2.5kb et 0.5kb, respectivement. Ces régions peuvent former des triplexes intramoléculaires qui mènent à la mutagenèse et la terminaison de la réplication d'ADN (Blaszak *et al.*, 1999). Le promoteur proximal du gène PKD1 contient des séquences consensus de liaison de différents facteurs transcriptionnels incluant les sites Sp1, Ets, AP-1, AP-2 et plusieurs éléments de liaison de LEF/TCF. Le gène PKD1 encode pour la protéine polycystine-1 qui sera décrite en détail dans la section 1.4.0.

1.3.1.2 L'expression du gène PKD1 humain

Le gène humain PKD1 est exprimé au cours du développement embryonnaire et rénal. Chez un embryon humain de 5-6 semaines, l'expression du gène PKD1 est détectée dans le tissu neural, les cardiomyocytes, le mésonéphros et les dérivées endodermes. Au niveau du rein embryonnaire humain, il est exprimé dans les tubules proximaux tandis qu'au stade fœtal l'expression est surtout détectée dans les tubules distaux. Chez l'adulte, détecté par l'hybridation *in situ* (Chauvet *et al.*, 2002) et par la protection à la RNase (Ward *et al.*, 1996), le signal de PKD1 est très fort dans le cerveau, le cœur, le poumon, un peu moins fort dans les muscles squelettiques et très peu dans le rein.

1.3.1.3 Les mutations dans le gène PKD1 humain

L'identification des mutations chez les patients ADPKD1 a été un processus long et difficile en raison de la duplication (4-6 fois) et la taille énorme du gène PKD1.

1.3.1.3.1 Le nombre et le positionnement des mutations ADPKD1

Un peu plus de 250 mutations qui causent ADPKD1 ont été identifiées jusqu'à maintenant dans le gène PKD1. Ce nombre risque d'augmenter puisque chaque famille ADPKD semble posséder sa propre mutation (Ariyurek *et al.*, 2004; Peral *et al.*, 1997).

Il y a deux types de mutations ADPKD1: typique et non-typique.

Les types de mutations typiques ADPKD1 sont les mutations faux-sens, non-sens, les insertions, les petites délétions et les mutations d'épissage (Tab.1-III-I). Ces mutations sont distribuées tout au long du gène PKD1; il ne semble pas y avoir de regroupement (Peral *et al.*, 1996a; Peral *et al.*, 1997; Roelfsema *et al.*, 1997; Rossetti *et al.*, 2001; Veldhuisen *et al.*, 1997). Toutefois, il est suggéré que ces mutations dans le gène PKD1 mèneraient probablement à la production de protéines tronquées dont le rôle n'est pas connu.

Tableau 1-III-I: La répartition des mutations dans le gène PKD1

Type de mutation	Nombre des mutations (%)
Substitutions des nucléotides	
<i>Faux-sens</i>	76 (29)
<i>Non-sens</i>	64 (24)
Substitutions des nucléotides (épissage)	21 (8)
Petites délétions	63 (24)
Petites insertions	20 (8)
Grosses délétions	16 (6)
Grosses insertions & duplications	2 (-1)
Réarrangements complexes (inversions)	3 (-1)
TOTAL	265 (~100%)

Données de Human Gene Mutation Database (HGMD)
<http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd/search.html>

Des larges délétions du chromosome 16 représentent des mutations non-typiques d'ADPKD1 et mènent, contrairement aux mutations typiques ADPKD, à une forme plus sévère et plus précoce d'ADPKD. Ces délétions particulières touchent partiellement ou complètement les gènes PKD1 et TSC2 et donnent lieu à un syndrome contigu (**Brook-Carter et al., 1994; Sampson et al., 1997**). Des larges délétions dans le gène PKD1 seul, sans délétion de TSC2, sont cependant très rares (**Ariyurek et al., 2004; Tab.1-III-I**).

1.3.1.3.2 La corrélation génotype-phénotype ADPKD1

Plusieurs groupes se sont intéressés à faire une corrélation entre les mutations et le développement, la progression et les manifestations rénales et extrarénales de la maladie ADPKD.

Une étude a démontré que les mutations en 5' du gène PKD1 semblent plus sévères que celles en 3' (**Rossetti et al., 2002b**). De plus, ces mutations en 5' N-terminal sont très souvent associées à un phénotype vasculaire (**Rossetti et al., 2003**). Les manifestations extrarénales tel que l'anévrisme cérébral ont également tendance à se regrouper chez certaines familles (**Ruggieri et al., 1994; Huston et al., 1993**). Malgré ces associations, une variabilité importante inter- et même intrafamiliale du phénotype est souvent

rapportée chez les patients ADPKD (**Fick *et al.*, 1994a; Milutinovic *et al.*, 1992; Geberth *et al.*, 1995; Hateboer *et al.*, 1999a**). Une même mutation peut donner lieu à un phénotype différent (**Milutinovic *et al.*, 1992; Rossetti *et al.*, 2002b**). Le meilleur exemple de cette variabilité intrafamiliale, c'est le cas des jumeaux dizygotiques qui ont tous les deux une même mutation non-sens mais étonnement une sévérité du phénotype très différente (**Peral *et al.*, 1996b**). Cette variabilité suggère une implication de gènes modificateurs et de facteurs environnementaux dans la maladie. De plus, la maladie semble moins agressive chez les femmes que chez les hommes (**Gabow *et al.*, 1992; Dalgaard, 1957; Gretz *et al.*, 1989**). Le développement d'IRC survient ~5 ans plus tôt chez l'homme que chez la femme (**Gretz *et al.*, 1989; Choukroun *et al.*, 1995**) suggérant un rôle hormonal dans ADPKD. Les femmes ADPKD enceintes ont plus de risque de faire de l'hypertension, une autre indication du rôle des hormones dans ADPKD.

1.3.2 Le gène PKD2 humain

1.3.2.1. Les caractéristiques du gène PKD2 humain

Le gène humain PKD2 a été localisé sur le chromosome 4q21-23 en 1993 (**Peters *et al.*, 1993; Kimberling *et al.*, 1993**) et puis identifié en 1996 (**Mochizuki *et al.*, 1996**). Étalaé sur une région d'ADN génomique de 68 kb, le gène PKD2 a un transcrit de 5.4 kb (**Mochizuki *et al.*, 1996**), un transcrit beaucoup plus petit que celui du gène PKD1, et ne comporte que 15 exons. Contrairement au gène PKD1, le gène PKD2 n'est pas dupliqué. Il encode la protéine polycystine-2 qui sera décrite en détail dans la section 1.4.0.

1.3.2.2 L'expression du gène PKD2 humain

L'expression du PKD2 humain est semblable, sans être identique, à celle de PKD1; elle est plus diffuse et commence plus tôt (**Chauvet *et al.*, 2002**). Le gène PKD2 est exprimé dans la plupart des tissus fœtaux et adultes (**Chauvet *et al.*, 2002; Mochizuki *et al.*, 1996**). Au stade fœtal, l'expression est très forte dans le poumon et les tubules

collecteurs et distaux du rein. Au stade adulte, l'expression demeure forte dans le rein, le cœur et le pancréas.

1.3.2.3 Les mutations dans le gène PKD2 humain

1.3.2.3.1 Le nombre et le positionnement des mutations ADPKD2

Environ 70 mutations ont été identifiées jusqu'à maintenant dans le gène PKD2 qui causent ADPKD2 (**Tab.1-III-II**). Il s'agit des mutations faux-sens, non-sens, des mutations de changement de cadre de lecture, des délétions et des mutations d'épissage. Ces mutations mènent probablement à la production de protéines tronquées et à l'inactivation du gène PKD2. Tout comme dans le cas de PKD1, il n'y a pas d'évidence de regroupement des mutations PKD2 (**Veldhuisen *et al.*, 1997**). Contrairement au gène PKD1, le gène PKD2 ne subirait pas de larges délétions génomiques telles que trouvées dans le syndrome contigu (se référer à la section 1.3.1.3.1.).

Tableau 1-III-II: La répartition des mutations dans le gène PKD2

Type de mutation	Nombre des mutations (%)
Substitutions des nucléotides	
<i>Faux-sens</i>	6 (8)
<i>Non-sens</i>	21 (30)
Substitutions des nucléotides (épissage)	9 (13)
Petites délétions	23 (32)
Petites insertions	8 (11)
Grosses délétions	1 (~1)
Grosses insertions & duplications	2 (~2)
Réarrangements complexes (inversions)	1 (~1)
TOTAL	71 (~100%)

Données de Human Gene Mutation Database (HGMD)
<http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd/search.html>

1.3.2.3.2 La corrélation génotype-phénotype ADPKD2

La maladie ADPKD2 est moins sévère mais phénotypiquement identique à l'ADPKD1 jugé par l'apparition de l'insuffisance rénale plus tardive chez les patients ADPKD2 versus ADPKD1. Tout comme pour le gène PKD1, la localisation d'une mutation dans le gène PKD2 semble être associée à la sévérité de la maladie (**Hateboer *et al.*, 2000**).

Il est important de mentionner l'existence de patients ADPKD ayant des mutations dans les deux gènes d'ADPKD, PKD1 et PKD2 (Pei *et al.*, 2001). Ces mutations trans-hétérozygotes sont associées avec un phénotype ADPKD plus sévère que les mutations dans le gène PKD1 ou PKD2 seul.

1.3.3 Le gène PKD3 humain?

Certaines études ont rapporté la présence de patients ADPKD qui ne semblent pas posséder de mutations dans les gènes PKD1 ou PKD2 (Turco *et al.*, 1996; Ariza *et al.*, 1997; Bogdanova *et al.*, 1995; DeAlmeida *et al.*, 1995; Pei *et al.*, 1998; Daoust *et al.*, 1995). Ces observations suggèrent l'existence d'un troisième locus ADPKD. Le gène PKD3 reste cependant à être identifié. Les mutations dans ce troisième gène ADPKD seraient plutôt une cause rare de la maladie ADPKD.

1.3.4 Les homologues des gènes de la polykystose rénale autosomique dominante

1.3.4.1 *Mus musculus*

La souris possède les orthologues de la polykystose rénale autosomique dominante humaine. Il s'agit de Pkd1 (Löhning *et al.*, 1997) et de Pkd2, correspondant au PKD1 et PKD2 humain, respectivement. Le Pkd1 se trouve sur le chromosome murin 17 (Olsson *et al.*, 1996), tandis que le gène Pkd2 est situé sur le chromosome 5 (Wu *et al.*, 1997; Pennekamp *et al.*, 1998). Contrairement au PKD1 humain, le Pkd1 murin n'est pas dupliqué (Olsson *et al.*, 1996) et ne contient pas de répétitions de séquence polypurine-polypyrimidine (Piontek *et al.*, 1999). Toutefois, la région entre les sites de polyadénylation Pkd1 et Tsc2 est très conservée et possède donc probablement un rôle chez l'humain et la souris. Malgré quelques différences, les gènes ADPKD humains et murins sont très homologues. Il existe ~80% d'identité entre les gènes PKD1 (Löhning *et al.*, 1997) et ~95% d'homologie entre les gènes PKD2 humain et murin (Pennekamp *et al.*, 1998).

Ces orthologues ne se ressemblent pas exclusivement au niveau de leurs séquences mais ont également des similarités étroites de l'expression. Lors du développement, l'expression de Pkd1 est forte dans toutes les cellules dérivées de la crête neurale, le tube neural, le système nerveux central, le tissu préchondrogénique, les glandes salivaires, le métanéphros et les vaisseaux et moins forte dans les autres tissus (**Guillaume et al., 1999**). L'expression rénale est maximale juste avant la naissance (E16-E19) et diminue peu après la naissance (**Guillaume et al., 1999; Geng et al., 1997**).

Quant à l'expression du gène Pkd2, elle ressemble beaucoup à celle de Pkd1 (**Guillaume et al., 1999; Guillaume et al., 2000; Markowitz et al., 1999**). Cependant, contrairement au gène Pkd1, les dérivées de la crête neurale expriment peu le gène Pkd2. À part le rein, le gène Pkd2 est exprimé également dans les muscles et les cellules érythroïdes.

À part la souris, les séquences du gène PKD1 ont également été caractérisées chez le rat, le poisson, le chien, l'oursin de mer et le nématode (**Moy et al. 1996; Barr et Sternberg, 1999**).

1.4.0 Les protéines de la polykystose rénale autosomique dominante

Les protéines d'ADPKD, la polycystine-1 et -2, font partie d'une nouvelle famille de protéines: la famille des polycystines. Cette famille est divisée en deux sous-groupes de protéines compte tenu de leurs séquences et des homologies structurales avec soit la polycystine-1 (famille "PC1-like" composée de 5 membres) soit la polycystine-2 (famille "PC2-like" composée de 3 membres) (**Tab.1-IV**). Les polycystines ADPKD, la polycystine-1 et -2, seront présentées en détail dans cette section.

Tableau 1- IV: La famille des polycystines

Gène	Espèce	Expression tissulaire	Fonction potentielle	Ref.
Polycystine-1 like				
PKD1	humain/souris	<u>rein</u> , cerveau, poumon, cœur (expression ubiquitaire, forte dans le tissu fœtal)	récepteur, régulateur de canal	1,2
PKDREJ	humain	testicules exclusivement	récepteur	3, 22
PKD1L1	humain	testicules, cœur, jéjunum, cerveau, placenta, pas d'expression dans le rein	récepteur	4
PKD1L2	humain/souris	cœur, cerveau, <u>rein</u> , foie, testicules, muscle squelettique, placenta, poumon, pancréas	récepteur, canal	5,6
PKD1L3	humain/souris	foie, testicules, placenta, <u>rein</u> (expression faible)	récepteur, canal	5,6
Orthologues				
<i>lov-1</i> (orthologue de PKD1)	<i>C. elegans</i>	neurones sensoriels mâles	récepteur, régulateur de canal	7
REJ1 (orthologue de PKD1?)	oursin de mer	sperme, membrane plasmique acrosomale	récepteur	8
REJ2 (orthologue de PKD1?)	oursin de mer	sperme, membrane plasmique acrosomale	?	9
REJ3 (orthologue de PKD1?)	oursin de mer	sperme, membrane plasmique acrosomale	récepteur	10
Polycystine-2 like				
PKD2	humain/souris	<u>rein</u> , cerveau, poumon, cœur (expression ubiquitaire, forte dans le tissu fœtal et adulte)	canal (calcium)	11,12
PKD2L1 (PKDL)	humain	muscle cardiaque, muscle squelettique, cerveau, rate, testicules, rétine, <u>rein</u> (expression forte chez adulte)	canal (calcium)	13-15
PKD2L2	humain/souris	testicules	canal (calcium)	16,17
Orthologues				
PKD2 (orthologue de PKD2)	oursin de mer	sperme, membrane plasmique acrosomale	canal (calcium)	18
<i>pkd-2</i> (orthologue de PKD2)	<i>C. elegans</i>	neurones sensoriels mâles	canal (calcium)	19,20
<i>amo</i> (orthologue de PKD2)	<i>Drosophila</i>	flagella, sperme	canal (calcium)	21

lov-1 : location of *vulva*, orthologue de PKD1 chez *C. elegans*; *amo* : *almost there*, orthologue de PKD2 humain chez la drosophile; ? : pas encore connu

Ref: Références; 1: Hughes *et al.*, 1995; 2: International Consortium, 1995; 3: Hughes *et al.*, 1999; 4: Yuasa *et al.*, 2002; 5: Li *et al.*, 2003; 6: Yuasa *et al.*, 2004; 7: Barr *et al.*, 1999; 8: Moy *et al.*, 1996; 9: Galindo *et al.*, 2004; 10: Mengerink *et al.*, 2002; 11: Schneider *et al.*, 1996; 12: Mochizuki *et al.*, 1996; 13: Wu *et al.*, 1998b; 14: Nomura *et al.*, 1998; 15: Chen *et al.*, 1999; Murakami *et al.*, 2005; 16: Veldhuisen *et al.*, 1999; 17: Guo *et al.*, 2000; 18: Neill *et al.*, 2004; 19: Barr *et al.*, 1999; 20: Mochizuki *et al.*, 1996; 21: Wainick *et al.*, 2003; 22: Butscheid *et al.*, 2006.

1.4.1 La polycystine-1

La polycystine-1 est une molécule originale sans équivalent qui fait partie de familles de protéines “PC1-like”, aussi appelée “receptor-like family” (**Fig.1-4**). Elle a une masse moléculaire calculée de 460 kDa (**Hughes *et al.*, 1995**) mais d’environ 520 kDa compte tenu des multiples sites de glycosylation (~60 sites de glycosylation) (**Boletta *et al.*, 2001**). C’est une protéine très large de 4302 acides aminés. La PC1 a une longue portion N-terminale extracellulaire, 11 domaines transmembranaires prédits et un court domaine C-terminal cytoplasmique. Elle contient plusieurs motifs protéiques distincts qui pourraient être responsables de sa fonction cellulaire (**Tab.1-V**). Sa fonction ni son ligand ne sont pas connus.

1.4.1.1 Le domaine extracellulaire de la polycystine-1

Le domaine extracellulaire constitue 70% de la protéine et contient plusieurs sous-domaines: le peptide signal, le domaine LRR (Leucine Rich Repeat) entouré par les domaines riches en cystéines, le domaine WSC (cell-wall integrity and stress-response component domain), les domaines PKD (Ig-like domaines), le domaine lectine de type-C, le domaine LDL, REJ et le domaine GPS (**Fig.1-4**).

Figure 1-4: La structure protéique de la polycystine-1

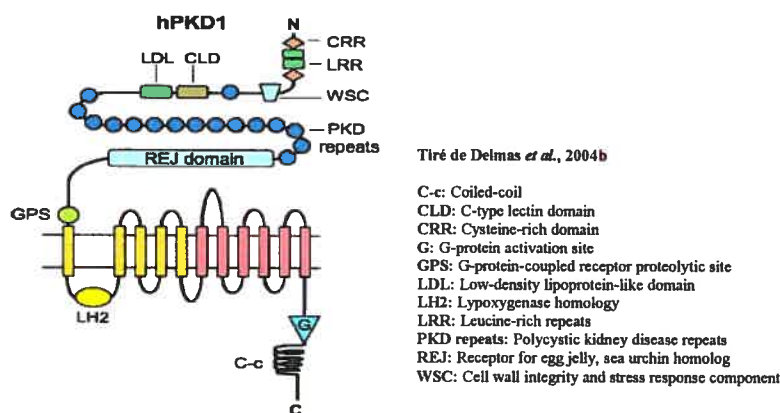


Tableau 1-V: La relation structure-fonction potentielle du domaine extracellulaire de la polycystine-1

Sous-domaine extracellulaire	Souris aa**	Humain aa** (exon)	Protéines connues qui ont ce sous-domaine	Rôle suggéré
Peptide signal	1→23	1→23 (1)	Protéines sécrétoires	Passage par la voie sécrétoire
N LRR	32→66	32→66 (1)		
LRR	68→91 92→115 116→140	92→115 (2) 116→140 (3)	Fibromuline, Toll, Slit, décorine, biglycane	Interaction avec la matrice extracellulaire
C LRR	152→177	152→177 (4)		
WSC	180→261	180→261 (5)	<i>Trichoderma harzianum</i> β-1,3 exonucléase	Liaison aux carbohydrates
Pkd1-1	277→352	277→352 (5)		
Lectine type-C*	425→531	425→532 (6-7)	Collectines, sélectines P, L, E, <i>leukocyte-endothelial cell adhesion molecule</i> , protéine de liaison HIV-gp120	Adhésion cellulaire
LDL-A*	?	?	LDLR: récepteur de lipoprotéine de faible densité (cholestérol)	Interaction avec la matrice extracellulaire
Pkd1-2 à 16	937→2141	937→2141 (11-15)	Collagénase et protéases bactériennes	
REJ ¹	2164→2688	2168→2693 (15-22)	SuREJ, PC1-like 1, 2, 3, PKDREJ	Canal de calcium
GPS ¹	3003→3052	3011→3060 (25)	Latrophiline, récepteur Ig-hepta, inhibiteur de l'angiogenèse cerveau-spécifique, PC1-like 1, 2, 3, suREJ3, CD97	Récepteur couplé au protéines G

Légende: aa: la position des acides aminés; ¹: un domaine présent chez tous les membres de la famille "PC1-like"; *: la liaison au calcium ou interaction calcium-dépendante; **: www.ensembl.org; le numéro d'identification de la séquence murine: ENSMUSG00000032855; le numéro d'identification de la séquence humaine: ENSG00000008710.

1.4.1.1.1 Le peptide signal

Le peptide signal hydrophobique de la polycystine-1 est constitué des 23 premiers acides aminés encodés par l'exon 1 dans l'extrémité N-terminale extracellulaire. La présence de ce peptide signal suggère une procession protéique via la voie sécrétoire de la cellule.

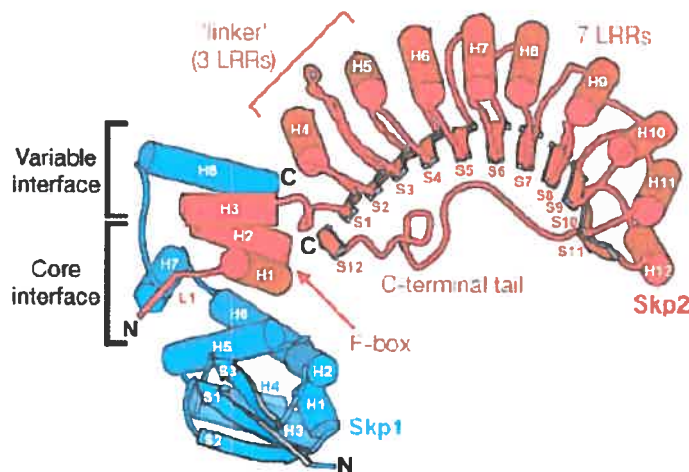
1.4.1.1.2 Le domaine LRR

Les domaines LRR sont trouvés chez les protéines des différents organismes à partir des virus jusqu'aux eucaryotes. Premièrement identifié chez la glycoprotéine- α 2 (Takahashi *et al.*, 1985), le domaine LRR a été observé par la suite chez une multitude de protéines impliquées dans la régulation d'expression génétique, la polarisation cellulaire, l'apoptose et l'adhésion cellulaire permettant ainsi des interactions protéine-protéine (Scott *et al.*, 2004; Smits *et al.*, 2003; Vassart *et al.*, 2004).

Un domaine LRR (Leucine-Rich Repeat) est constitué de 20-30 acides aminés qui forment une structure non-globulaire en arc ou "horseshoe shape" (Enkhbayar *et al.*, 2004) avec un feuillet- β du côté concave de la structure et des éléments hélicaux du côté convexe (Fig.1-5). Le feuillet- β contient un segment de 11 résidus précisément positionnés (LxxLxLxxN/CxL) et très conservés chez les protéines LRR. Les structures 3D de certains complexes protéiques LRR/ligand ont montré que la surface concave du domaine LRR est idéale pour les interactions avec les hélices- α et permettrait diverses interactions entre les protéines (Kobe *et al.*, 2001).

La polycystine-1 a deux répétitions de LRR, encodés par les exons 2 et 3, par rapport à au moins 21 répétitions chez les protéines *Toll* de Drosophile, la décorine et le biglycane (Guy *et al.*, 1991). Ces deux répétitions de LRR chez la polycystine-1 pourraient être fonctionnelles et suffisantes pour la liaison au ligand. Deux des neuf répétitions LLR chez le récepteur hGR (*human gonadotropin receptor*) sont capables par elles-mêmes de conférer une réponse fonctionnelle complète et la liaison au ligand (Vischer *et al.*, 2003). Finalement, les domaines LRR de la polycystine-1 sont entourés en N et C terminal par les régions riches en cystéines, une caractéristique typique des protéines extracellulaires.

Figure 1-5: La structure du domaine LRR



La structure du complexe protéique humain Skp1-Skp2. La protéine Skp2 est une ubiquitine ligase et une protéine F-box impliquée dans la régulation du cycle cellulaire. Elle contient 10 LRRs, sept dans son domaine N-terminal et trois dans le domaine C-terminal (Schulman *et al.*, 2000).

1.4.1.1.3 Le domaine WSC

Encodé par une partie de l'exon 5, le domaine WSC contient jusqu'à 8 résidus de cystéines très conservées qui pourraient faire des ponts disulfures. Ce domaine a été trouvé chez la β -1,3 exoglucanase de *Trichoderma harzianum* et les protéines de la réponse au stress (*cell-wall integrity and stress-response component proteins*) de *Saccharomyces cerevisiae*. La β -1,3 exoglucanase contient deux copies du domaine WSC alors que les protéines de levure n'en contiennent qu'une. L'importance du nombre de copies de ce domaine n'est pas connue.

1.4.1.1.4 Le domaine lectine de type-C

Les lectines sont classifiées par le type de leurs domaines de reconnaissance des carbohydrates (CRD). Il y a deux types de ces domaines : le type S et le type L (Drickamer, 1988; Drickamer, 1993a; Drickamer, 1993b). La polycystine-1 possède un motif lectine de type L situé après le premier des 16 domaines PKD et encodé par les

exons 6 et 7. Une des propriétés de ce type de lectine est sa dépendance au calcium pour son activité de liaison aux carbohydrates. Les sélectines, les protéines membranaires impliquées dans l'adhésion cellulaire et dans l'inflammation (**Lasky, 1992; Fakuda et al., 1999**), et les collectines sont des protéines qui possèdent ce domaine. Le domaine C-lectine de PC1 est très similaire à celui des protéoglycanes qui agissent avec les glycoprotéines de la matrice extracellulaire.

1.4.1.1.5 Le domaine LDL-A

Le domaine hydrophobe LDL-A de la polycystine-1 (**International Consortium, 1995**) se trouverait entre le premier et 15 autres domaines PKD. Il s'agit d'un module de ~40 acides aminés riche en cystéine (**Fass et al., 1997**) trouvé chez plus de 100 protéines dont le récepteur de lipoprotéine de faible densité (récepteur de cholestérol; **Sudhof et al., 1985**). Chez ce dernier, le domaine LDL-A hydrophobique médie la liaison du récepteur avec son ligand, les lipoprotéines (**Esser et al., 1988; Russell et al., 1989**), et pourrait avoir un rôle similaire chez la polycystine-1.

1.4.1.1.6 Les domaines PKD (immunoglobuline-like domains)

Chez la polycystine-1, environ 1300 acides aminés (30% de la protéine) sont regroupés pour faire des structures semblables à celles des immunoglobulines, appelées les domaines PKD ou "Ig-like".

Il s'agit de séquences d'environ 80 acides aminés formant des structures de feuillets- β . La polycystine-1 contient 16 domaines PKD. Le premier domaine encodé par l'exon 5 est séparé des 15 autres qui eux sont regroupés en tandem et sont encodés par les exons 11 à 15. Les domaines PKD ne se ressemblent pas beaucoup entre eux à part d'une portion de séquence très conservée, le motif WDFGDGS, trouvé sans exception dans tous les domaines PKD. Une autre homologie remarquable est observée dans le domaine PKD 10 et ce de l'humain jusqu'au Fugu (**Bycroft et al., 1999**). Ceci pourrait représenter un site potentiel de liaison de la polycystine-1 à un ligand.

1.4.1.1.7 Le domaine REJ

Le domaine REJ est composé d'environ 600 acides aminés et encodé par les exons 15-22. Il se trouve entre le domaine GPS (**Voir la section 1.4.1.1.8**) et le dernier domaine PKD. Le domaine REJ a été très étudié dans le récepteur-canal REJ (**r**eceptor for **e**gg **j**elly) de l'oursin de mer et constitue une partie importante de la structure extracellulaire et de la fonction même de cette protéine (**Moy et al., 1996**). Chez l'oursin de mer, lors de la fertilisation le récepteur suREJ1 se lie aux glycoprotéines de l'œuf (egg jelly) et déclenche une réaction acrosomale en transformant le sperme en une cellule fusogénique (**Mengerink et al., 2002**). L'homologue de ce récepteur chez l'humain s'appelle PKDREJ et pourrait, tout comme son orthologue de l'oursin de mer, avoir un rôle central lors de la fertilisation.

1.4.1.1.8 Le domaine GPS

Le domaine de clivage protéolytique des récepteurs couplés aux protéines G, les protéines de sept domaines transmembranaires, ou GPS (**G**-protein coupled receptor **p**roteolytic **s**ite domain-**G**PCR **p**roteolytic **s**ite) est une région d'environ 50 acides aminés qui contient 2 à 4 résidus cystéines prompts à former des ponts disulfures.

Le clivage protéique dans le domaine GPS a été en premier démontré chez la latrophiline/CL-1, un récepteur neuronal couplé aux protéines G de type N. La famille des GPCR de type N ont la caractéristique d'avoir un très large et complexe domaine extracellulaire N terminal (LNB-TM7) (**Stacey et al., 2000**). Les membres de cette famille ont un domaine GPS très conservé suggérant un rôle fonctionnel du clivage. Dans le cas de la latrophiline (CL-1), le site de clivage a été localisé au niveau de la séquence HL³⁰⁴⁸↓T³⁰⁴⁹ où ↓ représente la position exacte du clivage (**Krasnoperov et al., 1997**). Ce clivage a un rôle fonctionnel puisque la CL-1 endogène doit être clivée pour l'activation du récepteur (**Stacey et al., 2000**). Toutefois, même après le clivage les deux fragments résultants restent fortement associés. En plus de la latrophiline, ce domaine est retrouvé dans plusieurs autres récepteurs membranaires (**Ponting et al., 1999**).

Cependant, il reste à déterminer lesquels de ces récepteurs subissent réellement le clivage dans le domaine GPS et quel est, s'il y en a un, le rôle fonctionnel du clivage.

Quant à la polycystine-1, elle contient un site GPS juste avant son premier domaine transmembranaire dans la partie la plus distale extracellulaire. Le groupe de Gregory G. Germino (**Qian *et al.*, 2002**) a démontré un clivage de la polycystine-1 *in vitro* au site GPS, un clivage qui serait dépendant du domaine REJ (**Voir la section 1.4.1.1.7**). Le clivage, l'identification de la protéase impliquée (la machinerie cellulaire impliquée) tout comme le rôle du clivage dans la fonction de la polycystine-1 et ce *in vivo* sont tous des sujets qu'il faudrait étudier et qui donneraient nécessairement des indices importants sur la fonction de PC1.

1.4.1.2 Le domaine transmembranaire de la polycystine-1

La polycystine-1 est une protéine de 9 à 11 domaines transmembranaires prédits par les analyses d'hydrophobicité (**International Consortium, 1995; Hughes *et al.*, 1995**). Par contre, certaines analyses informatiques suggèrent plutôt 7 domaines transmembranaires comme dans le cas des récepteurs couplés aux protéines G classiques (7TM). La cristallisation de la protéine donnera plus d'indices par rapport au nombre exact de domaines transmembranaires de la polycystine-1.

1.4.1.3 Le domaine cytoplasmique de la polycystine-1

Un domaine cytoplasmique relativement court de la polycystine-1 est constitué d'environ 200 acides aminés et contient plusieurs sites de phosphorylation et des motifs impliqués dans des interactions protéiques. Ces interactions pourraient relier la polycystine-1 avec le réseau de signalisation intracellulaire.

1.4.1.3.1 Les boucles cytoplasmiques

La première boucle cytoplasmique entre le premier et le deuxième passage transmembranaire de la polycystine-1 contient un domaine PLAT (polycystin-1, lipoxygénase and α -toxin) (Bateman *et al.*, 1999), aussi appelé le domaine LH2 (Lipoxygenase homology). Ce domaine est également trouvé chez la lipase pancréatique humaine (vanTilbeurgh *et al.*, 1993), la lipoxigénase-15 du lapin (Gillmor *et al.*, 1998) et l'alphatoxine de *Clostridium Perfringens* (Naylor *et al.*, 1998). Le domaine LH2 fait des structures de feuillet- β et serait responsable des interactions protéine-protéine et protéine-lipide. Il est également le domaine protéique le plus conservé entre le PKD1 humain et le PKD1 de Fugu (Sandford *et al.*, 1997).

La boucle entre les domaines transmembranaires 3 et 4 possède une séquence riche en proline. Les séquences riches en proline ou plutôt les sites consensus PxxP, où P=Proline et X=n'importe quel acide aminé, sont reconnues par les domaines SH3 d'une multitude des protéines (Kay *et al.*, 2000). Le domaine SH3 est retrouvé chez les protéines du cytosquelette et de la signalisation intracellulaire (Abl, cdc25, cortactine, myosine, tensine, RasGAP, sous-unité régulatrice de PI3K, PLC γ , Src tyrosine kinase, spectrine, ZO-1, Pex13p) et permettrait l'interaction protéine-protéine. L'importance de ce domaine dans la fonction de PC1 n'est pas connue.

1.4.1.3.2 Le domaine C-terminal cytoplasmique

1.4.1.3.2.1 Le domaine coiled-coil

Les domaines coiled-coil sont des motifs des hélices- α enroulés dans une superhélice, des structures idéales pour permettre les interactions entre les protéines. Ce domaine est retrouvé chez les molécules de fusion vésiculaire dont les SNAP, SNARE et synaptobrevine, impliquées dans le transport protéique membranaire. Chez l'humain, la polycystine-1 contient un domaine coiled-coil entre les acides aminés 4193 et 4248.

1.4.1.3.2.2 Les sites de phosphorylation

La phosphorylation est une modification post-traductionnelle fonctionnelle chez une panoplie de protéines ayant souvent une signification physiologique importante. La polycystine-1 contient du côté cytoplasmique plusieurs sites potentiels de phosphorylation. Il s'agit de quatre résidus tyrosine (Y4110, Y4118, Y4127, Y4237) et quatre résidus sérines (motifs SRSSR) qui pourraient être potentiellement phosphorylés. La première évidence de phosphorylation de polycystine-1 a été rapportée par le groupe de James Calvet en 1999 (**Parnell *et al.*, 1999**). En utilisant les protéines de fusion contenant la partie C-terminale murine et la phosphorylation *in vitro*, ce groupe a identifié pour la première fois la phosphorylation de sérine 4159 murine par la protéine kinase A (PKA). PKA est une kinase dépendante de l'AMPc et a entre autre un rôle critique dans la régulation des récepteurs couplés aux protéines G.

Les essais de phosphorylation *in vitro* tout comme l'utilisation des kinases commerciales ont de plus démontré que les résidus Y4237 et S4251 humains sont les cibles de c-src et de la PKA, respectivement (**Li HP *et al.*, 1999**; **Parnell *et al.*, 1999**). La phosphorylation de tyrosine 4237 pourrait représenter un site d'ancrage et de reconnaissance de protéines spécifiques pourvues de motifs SH2. Ces motifs lient les tyrosines phosphorylées spécifiquement et sont retrouvés chez une multitude de protéines: les protéines adaptatrices (grb2), les kinases (Src), les phosphatases (ship2), les protéines d'ubiquitination (c-Cbl), les protéines de la régulation du cytosquelette (tensine) et de la signalisation (PLC γ , SOCS, RasGDP).

1.4.1.3.2.3 La séquence PEST

La séquence PEST (P, Pro; E, Glu; S, Ser; T, Thr) est un motif reconnu et sensible aux protéases (la prolyl-endoréptidase et la cystéine protéase/calpaine) qui sont capables de réguler via ce domaine la stabilité et l'abondance des protéines cibles. Cette séquence est présente chez 95% des protéines ayant une demi-vie moindre de 2 heures, tel que les proto-oncogènes c-fos, c-myc et l'ornithine décarboxylase, et chez moins de 10% des

protéines plus stables. Certaines protéines dont la protéine β -amyloïde précurseur (APP) impliquée dans la neuropathologie de la maladie d'Alzheimer, contiennent quatre séquences PEST (**Siman *et al.*, 1989**).

Une séquence PEST a été identifiée dans le domaine cytoplasmique de la polycystine-1 et pourrait cibler cette dernière à la dégradation limitant/contrôlant sa demi-vie. Dans le cas où la séquence PEST serait exposée, ceci amènerait à une dégradation rapide de la PC1. La liaison de PC1 avec ces partenaires protéiques cellulaires pourrait cacher cette séquence et empêcher sa dégradation rapide. Cette hypothèse tout comme la vraie signification du domaine PEST chez la polycystine-1 reste à être vérifiées.

1.4.1.3.2.4 Le site d'activation des protéines G

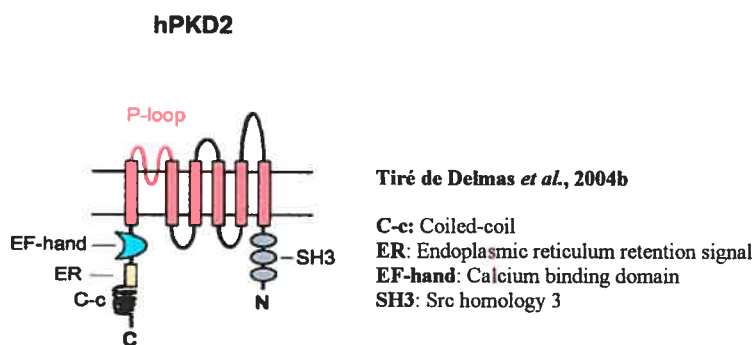
Les récepteurs couplés aux protéines G tels que la protéine amyloïde d'Alzheimer (APP) et le récepteur IGF-II/mannose 6-phosphate contiennent un motif consensus d'activation des protéines G, la séquence BB.....BBxB ou BB.....BBxxB (B=résidus basiques R, K, ou H; X=résidu non-basique) (**Nashimoto *et al.*, 1993; Okamoto *et al.*, 1990**). La polycystine-1 possède une telle séquence (**Parnell *et al.*, 1998**). Ce domaine est situé dans la partie C-terminale cytoplasmique proximale à la membrane et est très conservé chez l'humain, la souris et le poisson.

1.4.2 La polycystine-2

Contrairement à la polycystine-1, la polycystine-2 est une protéine beaucoup plus petite de 968 acides aminés et d'un poids moléculaire de 110 kDa. Elle appartient au groupe des polycystines "PC2-like" ou "ion channel-like" qui partagent tous des structures et probablement des fonctions de canaux membranaires (**Tab.1-IV**). Tout comme les autres membres de la famille "PC2-like", la polycystine-2 contient six domaines transmembranaires et deux extrémités, amino et carboxy terminale, cytoplasmiques (**Fig.1-6**).

À son extrémité carboxy terminale, la PC2 possède un signal de rétention du réticulum endoplasmique (Cai *et al.*, 1999) ce qui suggérerait une localisation fonctionnelle de PC2 dans ce compartiment cellulaire. De plus, la polycystine-2 contient un domaine coiled-coil et un site fonctionnel impliqué directement dans la liaison au calcium et la régulation du canal ionique (Mochizuki *et al.*, 1996), le motif “EF-hand”. Ce motif a une structure hélice-boucle-hélice particulière responsable de liaison aux ions Ca^{2+} dans 70% des protéines qui ont ce domaine (Nakayama S *et al.*, 1994).

Figure 1-6 : La structure protéique de la polycystine-2



La polycystine-2 a une similarité structurale avec la polycystine-1 (Fig. 1-4 et 1-6). Elle est à 25% identique et à 50% similaire au 6 derniers domaines transmembranaires de la PC1 (Mochizuki *et al.*, 1996). L’homologie entre la polycystine-2 et -1 n’est pas limitée qu’aux domaines transmembranaires. Il y a 30% d’identité et 50% d’homologie entre les extrémités C-terminales de PC2 et PC1 (Hughes *et al.*, 1995). La polycystine-2 partage également 25% d’homologie avec les canaux membranaires Na^+ , K^+ , Ca^{2+} et les canaux des cations *trp* (transient receptor potential) d’où son deuxième nom, la TRPP2 pour *transient receptor potential polycystin-2*.

Consistant avec la structure et une homologie élevée avec les canaux membranaires ioniques, la polycystine-2 forme un canal perméable aux cations Ca^{2+} dans plusieurs modèles expérimentaux différents (Vassilev *et al.*, 2001; Gonzalez-Perrett *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2003). Selon le type cellulaire et la technique de détection employée, ce canal peut être dépendant (Hanaoka *et al.*, 2000) ou indépendant de la polycystine-1 (Gonzalez-Perrett *et al.*, 2001; Vassilev *et al.*, 2001) et serait d’après les études très récentes un régulateur important du cycle cellulaire et de la prolifération cellulaire. (Li X *et al.*, 2005; Grimm *et al.*, 2006).

1.5.0 L'analyse moléculaire d'ADPKD: expression et pathologie

Après l'identification des protéines de la polykystose rénale autosomique dominante, plusieurs groupes se sont précipités à étudier leur expression temporelle, à partir des stades précoces du développement jusqu'au développement du rein adulte, et spatiale, rénale, extrarénale et intracellulaire. À cette fin, plusieurs anticorps contre la polycystine-1 et 2 ont été générés.

1.5.1. L'expression des polycystines-1 et -2

1.5.1.1. L'expression normale de la polycystine-1 humaine et murine

Jusqu'à maintenant, on compte au moins une vingtaine d'anticorps différents dirigés contre les parties N et C terminales de la polycystine-1. Les premiers anticorps ont été surtout ciblés contre la partie intracellulaire non-dupliquée de la polycystine-1. Les études utilisant ces anticorps ont mené à plusieurs controverses et encore aujourd'hui, la localisation de la polycystine-1 reliée à sa vraie fonction n'est pas connue. Les résultats obtenus par les différents groupes semblent varier en fonction de plusieurs facteurs: l'anticorps utilisé et de sa spécificité (**Nauta *et al.*, 2000a**), la technique utilisée (immunobuvardage, immunohistologie, immunocytochimie, microscopie électronique), la fixation (paraffine, cryogénie), le type de cellules/organes pris pour l'étude tout comme les conditions cellulaires. Plusieurs difficultés techniques rencontrées avec ces anticorps peuvent être attribuées en grande partie à une structure complexe, une taille énorme, des faibles niveaux d'expression protéique à certains stades du développement tout comme une régulation pointue de l'expression de la polycystine-1 à l'intérieur d'une cellule.

L'expression de la polycystine-1 est régulée de façon temporelle et spatiale. Les PC1 humaine et murine sont détectées au cours de l'organogenèse normale dans l'épithélium tubulaire rénal et ont des profils d'expression très similaires. L'expression de PC1 dans le rein fœtal humain est très forte dans l'épithélium tubulaire de toutes les parties du néphron et se concentre surtout dans les tubules distaux et collecteurs dans le rein

mature (**Ong et al., 1999a,b; Palsson et al., 1996; Peters et al., 1996; Ward et al., 1996**). Chez la souris, une très forte expression rénale au stade foetal atteignant les niveaux d'expression maximale entre les jours embryonnaires 15.5 et 18.5 diminue de façon importante au stade adulte (**Geng et al., 1996; van Adelsberg et al., 1997; Ong et al., 1999a,b; Geng et al., 1997; Griffin et al., 1996; Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1997**). L'expression de la polycystine-1 dans les glomérules et les petits vaisseaux sanguins rénaux n'est pas encore clairement définie en raison des difficultés techniques.

La polycystine-1 est exprimée dans des nombreux tissus et types cellulaires. La polycystine-1 humaine est exprimée dans les hépatocytes et l'épithélium biliaire du foie, les cellules endocrines des îlots pancréatiques, les cellules musculaires lisses du muscle et des valves cardiaques, les cellules épithéliales pulmonaires, les cellules de l'intestin, la rate, le cerveau, la peau et les myofibrilles du muscle squelettique (**Peters et al., 1999; Weston et al., 1997**). La souris a un profil d'expression extrarénal de la polycystine-1 très similaire au celui de l'humain (**Geng et al., 1997; Griffin et al., 1997b**). La polycystine-1 murine est fortement détectée dans le système cardiovasculaire, le cœur et l'endothélium des vaisseaux majeurs, incluant l'aorte et les artères intracrânielles (**Boutler et al., 2001**).

Au niveau de la cellule, la polycystine-1 est détectée quasiment dans tous les compartiments cellulaires (**Tab.1-VI**). Elle est présente dans le cytoplasme mais aussi dans la membrane plasmique apicale et basolatérale. Cette localisation membranaire et cytoplasmique pourrait être expliquée par un recyclage continu de PC1 à l'intérieur de la cellule et semble dépendre des conditions cellulaires et de ses partenaires protéiques. En effet, la localisation intracellulaire de la polycystine-1 semble être dépendante et dictée par d'autres protéines tel que la polycystine-2 et la tubérine (**Grimm et al., 2003; Kleymentova et al., 2001**). Récemment, le groupe de Caplan (**Chauvet et al., 2004**) a également signalé le fragment C-terminal de PC1 dans le noyau. Après un intérêt accru sur les cils primaires et leur rôle dans l'ADPKD, plusieurs groupes ont démontré que la PC1 peut localiser dans les cils primaires de l'épithélium rénal (**Yoder et al., 2002b; Nauli et al., 2003**). Finalement, l'étude de Van Adelsberg (**van Adelsberg et al., 1995**)

a suggéré une polycystine-1 extracellulaire et a soulevé la question de l'existence des différentes formes de polycystine-1 et leurs rôles potentiellement différents à l'intérieur d'une cellule et dans les différents tissus.

Malgré ces controverses, tous les groupes sont unanimes sur les points suivants. **1)** L'expression de la polycystine-1 est régulée de façon temporelle et spatiale. **2)** La PC1 est détectée dans toutes les structures épithéliales rénales à des niveaux très élevés juste avant la naissance. **3)** L'expression diminue et atteint des niveaux presque indétectables après la naissance et au stade adulte. **4)** Dû à une expression de la polycystine-1 prédominante dans les tubules épithéliales rénales matures et une absence de son expression à l'extrémité du bourgeon urétérique comme dans le mésenchyme non-induit, la polycystine-1 aurait plutôt un rôle dans la différenciation terminale tubulaire que dans l'induction même de la tubulogenèse. **5)** À part le rein, une multitude de tissus, épithéliaux et non-épithéliaux, ADPKD et non-ADPKD, expriment à des niveaux variables la polycystine-1.

Tableau 1- VI: L'expression intracellulaire de la polycystine-1

Localisation cellulaire	Groupes	Cellule/Tissu (méthode employée)	Remarques
Surtout intracellulaire	Ward <i>et al.</i> , 1996	Rein foetal, adulte et ADPKD humain (IHC)	
	Griffin <i>et al.</i> , 1996	Lignée cellulaire épithéliale rénale humaine (IF, ME)	
	Palsson <i>et al.</i> , 1996	Rein ADPKD (IHC)	Expression cytoplasmique (ADPKD) versus membranaire (normal)
	Peters <i>et al.</i> , 1996	Rein humain (IHC)	Expression dans l'épithélium tubulaire
	Griffin <i>et al.</i> , 1997b	Rein murin (IF)	
	Bukanov <i>et al.</i> , 2002	MDCK kystique (IF)	
	Kleymentova <i>et al.</i> , 2001	Lignée cellulaire de rat eker ^{pc2} (ICC, WB)	Tubérine dicte la localisation de la polycystine-1
	Grimm <i>et al.</i> , 2003	Cellules murines PC-2 ⁺ /coexpression de PC-1 et PC-2 (IF)	Polycystine-2 dicte la localisation de la polycystine-1
	van Adelsberg <i>et al.</i> , 1997	Cellules kystiques d'un patient ADPKD (IF)	
	Ong <i>et al.</i> , 1999	Le rein foetal et adulte humain (IHC)	Signal plus fort sur la surface qu'à l'intérieur de la cellule
Membrane plasmique et intracellulaire	Peters <i>et al.</i> , 1999	Cellules MDCK (IF)	Signal fort dans les sites d'interaction cellule-cellule
	Bukanov <i>et al.</i> , 2002	Cellules MDCK 3D (IF)	Desmosomes (signal détecté)
	Grimm <i>et al.</i> , 2003	Cellules murines PC-2 ⁺ et cellules COS 7 (IF)	Pas beaucoup de colocalisation avec la E-cadhérine ou la protéine ZO-1
	Scheffers <i>et al.</i> , 2000	Cellules MDCK (IF, ME)	Polycystine-2 dicte la localisation de la polycystine-1
	Streets <i>et al.</i> , 2003	Lignée cellulaire transgénique PKD et non-transgénique	Desmosomes (signal fort) et cytoplasme
	Huan <i>et al.</i> , 1999	Rein foetal (IF)	
	Geng <i>et al.</i> , 1996	Rein foetal et adulte (WB, ME)	
	Kleymentova <i>et al.</i> , 2001	Lignée cellulaire de rat eker ^{pc2} (ICC, WB)	Tubérine dicte la localisation de la polycystine-1
	Gianluca <i>et al.</i> , 1998	Cellules K562 et KJ29 (WB, ME)	Expression au niveau des sites de contact cellule-cellule
	Palsson <i>et al.</i> , 1996	Épithélium foetal (WB, IHC)	
Noyau	Chauvet <i>et al.</i> , 2004	Cellules transgéniques PKD1 et cellules non-transgéniques (IF)	Localisation de la partie C-terminale cytoplasmique de PC-1 dans le noyau
	Yoder <i>et al.</i> , 2002b	Cellules épithéliales rénales-mCCD (IF)	Colocalisation de PC-1 avec la PC-2 et la tubuline acétylée (marqueur ciliaire)
Cils primaires solitaires	Nault <i>et al.</i> , 2003	Épithélium rénal de souris (IF)	Colocalisation avec la tubuline acétylée (marqueur ciliaire)
	van Adelsberg <i>et al.</i> , 1995	Rein humain adulte (ICC)	Anticorps utilisé dans cette étude était fait contre un mauvais peptide
Expression non-spécifique	Nauta <i>et al.</i> , 2000a	Cellules COS (ICC, WB, IP)	Utilisation de 14 anticorps différents n'a pas démontré une expression spécifique de PC-1

ICC: immunocytochimie; IF: immunofluorescence; IHC: immunohistochimie; IP: immunoprécipitation; ME: microscopie électronique; WB: Western blot; mCCD: mouse cortical collecting duct cells; MDCK: Madin-Darby canine kidney cells.

1.5.1.2. L'expression normale de la polycystine-2 humaine et murine

Tout comme l'expression de la polycystine-1, l'expression de la polycystine-2 est régulée de façon temporelle et spatiale. La PC2 humaine et murine est exprimée dans l'épithélium de toutes les parties du néphron et est très forte chez le fœtus (**Ong et al., 1999a,b; Markowitz et al., 1999**). Toutefois, contrairement à la polycystine-1, ces niveaux d'expression ne semblent pas diminuer avec la maturité du tissu (**Foggensteiner et al., 2000**).

Quant à l'expression extrarénale, la PC2 humaine est détectée dans les structures épithéliales pancréatiques, le foie, les poumons, le cerveau, les neurones, les intestins, le cœur, le muscle vasculaire lisse et les muscles squelettiques (**Ong et al., 1999a**). À l'exception d'une expression très forte dans le rein, la polycystine-2 murine est cependant particulièrement exprimée dans les poumons, l'utérus et les ovaires et un peu moins dans le cerveau, le muscle cardiaque, squelettique et lisse, la rate et les îlots pancréatiques (**Markowitz et al., 1999**). Il est intéressant de noter une expression très forte *in utero* et post-natale de la polycystine-2 dans les précurseurs des globules rouges (**Markowitz et al., 1999**).

Au niveau de la cellule, l'expression de la polycystine-2 est détectée dans la périphérie mais également à l'intérieur de la cellule, plus précisément dans le réticulum endoplasmique et le Golgi (**Tab.1-VII**). Un peptide signal de rétention au réticulum endoplasmique permet à la polycystine-2 de se retrouver dans ce département (**Grimm et al., 2003; Koulen et al., 2002; Newby et al., 2002; Cai et al., 1999**). Cependant, lorsque ce signal peptide est muté, la polycystine-2 est acheminée vers la membrane plasmique tout comme dans le cas de traitement avec les chaperonnes chimiques ou les inhibiteurs de protéasome (**Chen et al., 2001; Luo et al., 2003; Vassilev et al., 2001**). Dans les cellules CHO, la localisation membranaire de la polycystine-2 est dépendante de la polycystine-1 (**Hanaoka et al., 2000**). Finalement, tout comme la polycystine-1, la polycystine-2 est détectée au niveau des cils primaires de l'épithélium tubulaire rénal où

elle semble agir comme un canal à calcium (Nauli *et al.*, 2003; Barr *et al.*, 2001; Pazour *et al.*, 2002; Yoder *et al.*, 2002b).

Tableau 1-VII: L'expression intracellulaire de la polycystine-2

Localisation cellulaire	Groupes	Cellule/Tissu (méthode employée)	Remarques
Surtout intracellulaire (RE)	Koulou <i>et al.</i> , 2002	Cellules LLC-PK ₁ (IF) et rein (DGC)	Surtout RE et Golgi, mais expression détectée aussi dans la membrane
	Newby <i>et al.</i> , 2002	Cellules rénales transgéniques Pkd1 (IF)	Surexpression de PC-2 recombinante
	Cai <i>et al.</i> , 1999	Cellules rénales tubulaires (IF)	Localisation PACS-dépendante
	Köttgen <i>et al.</i> , 2005	Cellules COS M6 (IF)	Sans PACS, la PC-2 se retrouve aussi dans la membrane
	Markowitz <i>et al.</i> , 1999	Rein murin et humain (IHC)	Expression basolatérale forte
Surtout membranaire	Scheffers <i>et al.</i> , 2002	Cellules MDCK (ME)	Localisation dans le Golgi aussi
	Luo <i>et al.</i> , 2003	Cellules rénales IMCD et MDCK (IF)	Détection d'expression dans les cils également
	Chen <i>et al.</i> , 2001	Oocytes <i>Xenopus</i> (IF)	Mutation dans le peptide signal RE de la PC-2 affecte sa localisation cellulaire
	Ong <i>et al.</i> , 1999	Cellules tubulaires rénales humaines	
	Foggensteiner <i>et al.</i> , 2000	Cellules tubulaires rénales humaines	
	Vassilev <i>et al.</i> , 2001	Oocytes <i>Xenopus</i> (ICC)	
	Gonzalez-Perrett <i>et al.</i> , 2001	Cellules S19 et syncytiotrophoblastes humains	Traitement avec chaperonnes chimiques ou inhibiteurs de protéasome Sans traitement, la localisation est intracellulaire
	Hanaoka <i>et al.</i> , 2000	Cellules CHO (IF)	Surexpression massive de PC2 : pourrait contrecarrer la localisation au niveau du réticulum endoplasmique
	Nauli <i>et al.</i> , 2003	Épithélium rénal de souris (IF)	Co-expression de PC-1 et PC-2
	Barr <i>et al.</i> , 2001	<i>C. elegans</i> -neurones sensoriels mâles (IF)	Localisation de PC-2 dépendante de PC-1
Cils primaires solitaires	Pazour <i>et al.</i> , 2002	Cellules épithéliales rénales et rein murin (IF)	En absence de polycystine-1, la polycystine-2 reste dans le RE
	Yoder <i>et al.</i> , 2002b	Cellules épithéliales rénales-mCCD (IF)	Localisation ciliaire PC1-dépendante
			Colocalisation avec la tubuline acétylée (marqueur ciliaire)

ICC: immunocytochimie; IF: immunofluorescence; IHC: immunohistochimie; ME: microscopie électronique; RE: réticulum endoplasmique; DGC: density gradient centrifugation; IMCD: Inner medullary collecting duct cells; MDCK: Madine-Darby canine kidney cells; mCCD: mouse cortical collecting duct cells.

1.5.1.3 L'expression des polycystines dans l'ADPKD

Les études d'expression rénale des polycystines-1 et -2 chez les sujets normaux ont été souvent accompagnées par celles des patients ADPKD (**Tab.1-VIII**). Comme il a été mentionné précédemment, un rein adulte exprime des niveaux très faibles, presque indétectables de la polycystine-1. Cependant, chez les patients ADPKD1 adultes, une majorité des épithéliums tubulaires kystiques exprime et ce très fortement la polycystine-1 alors qu'une minorité importante des kystes en est complètement dépourvu (**Tab.1-VIII**).

La distribution intracellulaire de la polycystine-1 chez les patients ADPKD est également anormale. Dans les reins kystiques, la polycystine-1 acquiert surtout une localisation cytoplasmique plutôt que membranaire normalement observé dans les reins non-kystiques (**Palsson et al., 1996**). Quant aux patients ADPKD2 qui ont des mutations dans le gène PKD2, les observations similaires sont rapportées. Chez ces patients, la majorité des kystes semblent exprimer la polycystine-2 alors qu'une minorité n'en exprimerait pas suggérant des mécanismes de pathogenèse d'ADPKD1 et d'ADPKD2 similaires (**Ong et al., 1999a,b**).

Tableau 1-VIII: L'expression des polycystines-1 et -2 dans l'ADPKD

Type d'ADPKD Groupe	Expression de PC1		Expression de PC2	
	Expression détectée (% de kystes)	Pas d'expression détectée (% de kystes)	Expression détectée (% de kystes)	Pas d'expression détectée (% de kystes)
ADPKD1				
Peters <i>et al.</i> , 1996	+	-	ND	ND
	(100)	(0)		
Palsson <i>et al.</i> , 1996	+	ND	ND	ND
Weston <i>et al.</i> , 1997	+	+	ND	ND
	(ND)	(ND)		
Geng <i>et al.</i> , 1996	+	+	ND	ND
	(La majorité)	(La minorité)		
Ong <i>et al.</i> , 1999b	+	+	ND	ND
	(70)	(20)		
Ward <i>et al.</i> , 1996	+	ND	ND	ND
Griffin <i>et al.</i> , 1996	+	ND	ND	ND
ADPKD2				
Ong <i>et al.</i> , 1999a	+	+	+	+
	(65)	(35)	(65)	(35)
Foggensteiner <i>et al.</i> , 2000	ND	ND	+	+
			(majorité)	(minorité)
ADPKD1 (PKD1/TSC2)				
Ong <i>et al.</i> , 1999b	(majorité)	(rare)	ND	ND

ND: pas spécifié; % de kyste: inclus si spécifié dans l'article; +: la présence de kystes avec une telle caractéristique; -: l'absence de kystes avec une telle caractéristique.

1.5.2 Les mécanismes de pathogenèse ADPKD

Il existe quatre théories qui essaient d'expliquer la pathogenèse d'ADPKD. Je présenterai en détail les deux théories principales les plus acceptées: la théorie du **deuxième hit** (perte d'hétérozygotie) et **la théorie d'effet dosage** (haploinsuffisance).

1.5.2.1 La théorie du deuxième hit ou de perte d'hétérozygotie

L'ADPKD est une maladie autosomique dominante: un seul allèle doit être muté pour développer la maladie. Chez les patients ADPKD, toutes les cellules épithéliales rénales possèdent une mutation dans le gène PKD (PKD1 ou PKD2), sont porteuses du même matériel génétique et devraient par conséquent former des kystes tubulaires qui affecteront tous les néphrons. Toutefois, seulement une minorité de tubules (<10%) devient kystiques (**Baert, 1978**). La théorie du deuxième hit, aussi appelée la théorie de

Knudson (**Knudson, 1971**), propose qu'une perte d'hétérozygotie par une inactivation somatique de l'allèle sauvage résulterait en perte totale de fonction de la polycystine (perte de contrôle de différenciation et de prolifération cellulaire) (**Fig.1-7**). D'après cette théorie, l'inactivation d'un deuxième allèle PKD est nécessaire pour développer l'ADPKD. Dans ce cas, la polykystose rénale autosomique dominante serait une maladie plutôt récessive au niveau cellulaire. La formation de kystes serait le résultat "de l'expansion clonale de cellules individuelles qui auraient subi le deuxième hit dans l'allèle sauvage PKD" (**Qian et al., 1997a**).

Figure 1-7: La théorie du deuxième hit

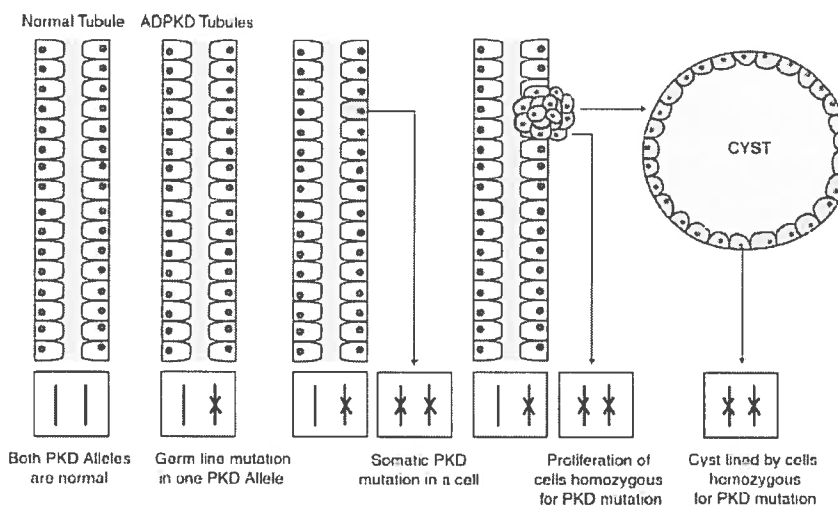


Figure modifiée de Al-Bhalal *et al.*, 2005

La théorie du deuxième hit suggère que la mutation germinale soit nécessaire mais pas suffisante pour la formation des kystes. Une deuxième mutation (perte d'hétérozygotie ou mutation somatique) doit avoir lieu pour mener à la formation de kystes. Les cellules tubulaires kystiques sont monoclonales ce qui veut dire qu'elles viennent toutes d'une même cellule, et sont homozygotes pour la mutation PKD.

Premièrement, la théorie du deuxième-hit est renforcée par plusieurs équipes qui ont détecté des mutations somatiques ou une perte d'hétérozygotie dans les allèles sauvages PKD de l'épithélium rénal et hépatique kystique ADPKD1 (**Qian et al., 1996; Brasier et al., 1997; Qian et al., 1997a; Watnick et al., 1998b; Koptides et al., 1998**) et ADPKD2 (**Koptides et al., 1999; Pei et al., 1999**).

Deuxièmement, le rein est un bon candidat pour subir les mutations somatiques pour les raisons suivantes : 1) Le rein a un métabolisme oxydatif rénal élevé; 2) Les mutations somatiques sont très élevées au sein des cellules épithéliales rénales (**Colgin et al.,**

2002); 3) La duplication du gène PKD1 humain pourrait promouvoir la mutagenèse par un mécanisme de conversion tel que rapporté dans d'autres gènes dupliqués (**Tusie-Luna et al., 1995; Collier et al., 1994; Hulsebos et al., 1996; Eikenboom et al., 1994**); 4) La présence d'une région riche en polypurine-polypyrimidine dans les introns 21 et 22 pourrait prédisposer le gène PKD1 à la mutagenèse au cours de la mitose (**Wang et al., 1996**).

Troisièmement, la théorie du deuxième hit est fortement appuyée par les modèles murins ADPKD (**Tab.1-IX; Voir la section 1.6.0**). L'inactivation des gènes *Pkd1* et *Pkd2* murins mène à la formation de souris homozygotes kystiques qui meurent *in utero*, alors que les souris hétérozygotes sont viables et ne développent des kystes rénaux que vers 12 mois. De plus, les souris PKD2^{WS25} développent la polykystose rénale en raison d'une mutation dans l'intron 1, une mutation qui provoque un réarrangement génique rendant le deuxième allèle de *Pkd2* très instable et inactif.

1.5.2.2 La théorie d'effet dosage ou d'haploinsuffisance

La théorie du deuxième hit réussit à expliquer plusieurs points de la pathogenèse ADPKD. Par contre, elle n'explique pas la présence d'une expression très forte de polycystine-1 et -2 dans l'épithélium kystique rénal ADPKD1 et ADPKD2, respectivement (**Ward et al., 1996; Geng et al., 1996; Ong et al., 1999b; Peters et al., 1999; Wilson et al., 1999; Griffin et al., 1996; Lanoix et al., 1996; Palsson et al., 1996; Ibraghimov-Beskrovnya et al., 1997**). De plus, les mutations somatiques ne sont pas retrouvées dans tous les kystes d'ADPKD1 ou d'ADPKD2. Les mutations somatiques ou les pertes d'hétérozygocité ont été détectées dans seulement ~30% de kystes (**Qian et al., 1996; Qian et al., 1997a; Brasier et al., 1997; Watnick et al., 1998b; Koptides et al., 1999, Pei et al., 1999; Torra et al., 1999**).

La théorie d'effet dosage propose que le niveau d'expression des polycystines serait un élément important du destin de l'épithélium rénal et de l'homéostasie rénale. Une surexpression de *Pkd1* chez deux modèles murins transgéniques tout comme les niveaux réduits générés par un allèle *Pkd1* hypomorphe mènent tous les deux à la polykystose rénale (**Tab.1-IX, Voir la section 1.6.0**) supportant fortement cette théorie. Selon cette

dernière, il existerait un seuil critique d'expression du gène Pkd1 nécessaire pour une homéostasie rénale adéquate. Une dérégulation de ce seuil, une augmentation ou une diminution, affecterait l'homéostasie rénale et mènerait à la formation des kystes. La régulation des niveaux d'expression de Pkd1 représenterait alors un moyen puissant pour cibler les thérapies ADPKD.

1.6.0 L'analyse fonctionnelle des gènes d'ADPKD

Afin de connaître la fonction de gènes PKD1 et PKD2, leur implication dans le développement et le mécanisme de pathogenèse, plusieurs groupes ont fait des inactivations géniques totales ou partielles et des surexpressions de gènes ADPKD chez la souris (**Tab.1-IX**).

1.6.1 Pkd1 impliqué

1.6.1.1 L'ablation génique totale de Pkd1

Six ablations du gène Pkd1 murin ont été générées dont certaines mimiques directement une mutation décrite chez les patients ADPKD (**Tab.1-IX**). Ces différentes ablations se distinguent principalement par la position de l'insertion d'une cassette *neo* dans le gène Pkd1 qui mène dans certains mutants à la production d'une protéine PC1 tronquée.

La première inactivation du gène Pkd1 murin a été faite trois ans après l'identification du gène par Lu et al. (**Lu et al., 1997**). Elle ciblait l'exon 34 de Pkd1 et menait à la formation des souris homozygotes *del34* kystiques qui mouraient *in utero* à E18.5 (**Tab.1-IX**). L'apparition de kystes rénaux glomérulaires et tubulaires est rapportée à environ E15.5, avant quoi le développement rénal était intact et normal. Les kystes sont détectés également dans l'épithélium pancréatique (E13.5-14.5) et ce même avant l'apparition de kystes rénaux. La présence d'hypoplasie pulmonaire ainsi que la survie néonatale d'un petit nombre de souris homozygotes ne vivant que quelques heures sont également rapportées chez ce modèle murin. Les hétérozygotes quant à eux sont viables

et développent occasionnellement des kystes rénaux. Les mutants d'inactivation de Pkd1 qui ont suivi ont rapporté des observations phénotypiques très similaires.

Les mutants qui ont le gène Pkd1 inactivé développent également des anomalies extrarénales: des défauts squelettiques, des défauts cardiovasculaires majeurs, l'œdème et l'hémorragie à environ E12.5-E13.5. Les différences au niveau des phénotypes extrarénaux d'un mutant à l'autre pourraient suggérer un rôle fonctionnel des protéines tronquées générées par certains mutants (**Tab.1-IX**). Il est intéressant de noter que les homozygotes en comparaison avec les hétérozygotes ne développent pas de kystes hépatiques, la manifestation extrarénale la plus fréquente chez les patients ADPKD. Ceci pourrait être expliqué par le fait que le foie nécessite plus de temps pour développer des kystes ou implique un mécanisme de pathogenèse différent de celui du rein.

Tableau 1-IX: Mutagenèse de gènes murins de polykystose rénale autosomique dominante: Pkd1 et Pkd2

Mutant	Exons ciblés	Homozygote							Hétérozygote			
		Léthalité embryonnaire	Kystes rénaux	Kystes hépatiques	Kystes pancréatiques	Défauts vasculaires	Défauts cardiaques	Défauts squelettiques	Autres défauts	Kystes rénaux	Kystes hépatiques	Kystes pancréatiques
Ablation génique totale Pkd1												
Del 34 ^a	34	E18.5	E15.5	-	E13.5	-	+	Spina bifida Hypoplasie pulmonaire	>9m	>9m	>12m	1,2
Pkd1L ^a	43-45	E14.5-15.5	E14.5	-	E14.5	Oedème Héorragie	-	Rupture des vaisseaux	Jusqu'à 7 mois pas de kystes détectés			3
Del17-21 ^{βgeo} ^a	17-21	E13.5-14.5	?	?	?	Oedème Héorragie	+	Squelette Cartilage	>3m	>19m	-	4
Null	4	E13.5-16.5	E15.5	-	E13.5	Oedème Hydrop-fetalis	-	Squelette Cartilage Polyhydramnios Spina Bifida Osteochondrodyspl asie	>2.5m	>2.5m	>12m	5
-/-	2-6	E14.5	E15.5	ND	ND	Hémorragie Hydrop-fetalis	+	Pioglitazone: "Rescue" partiel	ND	ND	ND	6
Null	1	E12.5-naissance	E15.5	-	E14.5	Hémorragie Oedème	-	-	>3m	-	?	7
Ablation génique partielle Pkd1												
Pkd1 ^{ml}	2-11	- (mort post-natale; 1-2 m)	+	+	+	(anévrisme aortique)	+	ND	-	-	-	8
Surexpression de Pkd1												
SBPkd1 ^{TAG}	-	- (mort post-natale; 4-5m)	+	+	+	+	+	Rein spécifique				9
PKD1/TSC2	-	- (mort post-natale)	+	+	+	+	+	ND	+	+	ND	10
Ablation génique totale Pkd2												
WS25 (instable)	1	Nés vivants	1-3	1-2.5m	?	-	-	-	>2.5m bcp	>2.5m	>3m	11
WS183 (null)	1	E13.5-18.5	E15.5	-	E14.5	Hémorragie Oedème	+	-	>3m rare	>9m	-	12
-/LacZ	1	E12.5-18.5	Insuffisance rénale	Lobulation anormale	Mal positionné (Côté droit)	ND	+	Défauts G/D Hypo脾énie Dextrocardie	Pas de défauts au niveau de l'axe gauche/droit	ND	ND	13

Ref: Références; 1: Lu *et al.*, 1997; 2: Lu *et al.*, 1999; 3: Kim *et al.*, 2000; 4: Boutler *et al.*, 2001; 5: Lu *et al.*, 2001; 6: Muto *et al.*, 2002; 7: Wu *et al.*, 2002; 8: van Leeuwen *et al.*, 2004; 9: Thivierge *et al.*, 2006; 10: Pritchard *et al.*, 2000; 11: Wu *et al.*, 1998a; 12: Wu *et al.*, 2000; 13: Pennekamp *et al.*, 2002. ND, non documenté, G/D, axe de symétrie gauche/droit, E, jour embryonnaire; m, mois; a, protéine PC1 tronquée générée.

1.6.1.2 Le gène Pkd1 hypomorphe

Van Leeuwen ISL *et al.* (**van Leeuwen *et al.*, 2004**) a développé un modèle murin avec une diminution importante de l'expression du gène Pkd1. Dans ce modèle, un épissage aberrant du gène Pkd1 a lieu suite à l'insertion d'une cassette *néo* dans l'intron 1. Ceci mène à la production d'un codon stop prématuré à l'intérieur de la cassette *néo* dans 80-85% des transcrits Pkd1. Les souris homozygotes pour cet allèle qui ont des niveaux de Pkd1 réduits jusqu'à 20% ont des reins kystiques mais, contrairement aux mutants Pkd1 nuls, contournent la mort embryonnaires et sont viables. Les hétérozygotes quant à eux ne sont pas affectés. La plupart des caractéristiques phénotypiques des mutants Pkd1 murin vu dans la section 1.6.1.1 et des patients ADPKD sont rapportées également dans ce modèle dont les kystes hépatiques, pancréatiques et les défauts cardiovasculaires.

1.6.1.3 La surexpression transgénique de Pkd1

Présentement, il existe deux modèles murins transgéniques qui surexpriment le gène Pkd1. Ils ont été générés dans le but de vérifier l'hypothèse qu'une surexpression de Pkd1, telle qu'observée chez les patients ADPKD (**Voir les sections 1.5.1.3 et 1.5.2.2**), pourrait constituer la cause directe de kystogenèse rénale.

1.6.1.3.1 La surexpression de PKD1 humain

Le premier modèle murin d'expression de plusieurs copies d'un gène d'ADPKD a été publié en 2000 par Pritchard *et al.* (**Pritchard *et al.*, 2000**). Il s'agit d'une expression du gène PKD1 humain chez la souris qui mène en faible proportion au développement de kystes rénaux et hépatiques à environ un an après la naissance.

Ce modèle n'a pas réussi à confirmer irrévocablement l'hypothèse qu'une surexpression de Pkd1 cause ADPKD. En plus de surexprimer le gène PKD1, ce modèle murin surexprime le gène TSC2, un gène bien connu et impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire, tout comme trois autres gènes humains RAB26, NTHL1 et

SLC9A3R2. Un phénotype rénal faible et tardif inattendu et observé chez ce modèle murin pourrait être expliqué par une atténuation du phénotype kystique prolifératif (**Voir la section 1.7.1.1**), qui aurait pu être provoqué par une surexpression de PKD1 seul, par la présence d'un gène anti-prolifératif (TSC2) ou les trois autres gènes également présents. De plus, il s'agit d'une expression du gène PKD1 humain qui pourrait, une fois exprimé chez la souris, se comporter différemment et agir comme une protéine mutante ou non-fonctionnelle. Finalement, dans le modèle de Pritchard *et al.*, l'expression du transgène PKD1 est dirigée par le promoteur PKD1; l'expression rénale et extrarénale du transgène très forte à des stades précoces du développement devient quasiment indétectable au stade adulte (**Voir la section 1.5.1.1**). L'expression extrarénale de PKD1 pourrait contribuer voire causer ce phénotype rénal tandis qu'une expression adulte faible du transgène pourrait être insuffisante pour mener à un phénotype plus sévère rénal.

1.6.1.3.2 La surexpression de Pkd1 murin rein-spécifique

Un modèle murin développé plus récemment a réussi à confirmer de façon définitive qu'une surexpression du gène Pkd1 murin chez la souris peut causer la kystogenèse rénale (**Thivierge *et al.*, 2006**). Dans ce cas, c'est le gène murin Pkd1 qui a été surexprimé chez la souris sous contrôle d'un promoteur rein-spécifique. En comparaison avec le modèle de Pritchard *et al.* (**Voir section 1.6.1.3.1**), ce modèle continue de surexprimer le gène Pkd1 même au stade adulte et développe systématiquement des kystes et une insuffisance rénale chronique à environ 4 mois. Cette étude a démontré qu'une surexpression de l'allèle sauvage de Pkd1 dans le rein, une observation fréquemment rapporté chez les patients ADPKD (**Ong *et al.*, 1999b; Ward *et al.*, 1996**), peut être la cause directe de la polykystose rénale. Elle supporte fortement le mécanisme pathogénétique d'effet-dosage dans l'ADPKD (**Voir la section 1.5.2.2**) et souligne l'importance de maintenance de niveaux normaux du gène Pkd1 dans l'homéostasie rénale.

1.6.2 Pkd2 impliqué

1.6.2.1 L'ablation génique de Pkd2

Dans le but de générer un premier allèle nul de Pkd2, Somlo et son équipe (**Wu et al., 1998a**) ont plutôt généré, de façon fortuite, un allèle instable suite à un réarrangement anormal dans la région N-terminale à l'extrémité 5' du gène Pkd2 (**Tab.1-IX**). Par recombinaison homologe, cet allèle muté peut subir soit une inactivation somatique ce qui mène à une inactivation complète du gène soit revenir à son état sauvage non-muté. Les souris homozygotes sont viables et développent des kystes rénaux vers 1-3 mois. Les souris hétérozygotes sont également affectées et développent des kystes rénaux, hépatiques et pancréatiques après 2.5 mois d'âge. Les deux autres mutants Pkd2 générés (**Wu et al., 2000; Pennekamp et al., 2002**) qui ont tous les deux des allèles mutants Pkd2 stables ne produisent aucun transcrite. Ces souris homozygotes meurent *in utero* et, tout comme les mutants de Pkd1, développent des kystes à environ E15.5 tandis que les hétérozygotes développent plutôt une maladie rénale polykystique adulte. Contrairement à tous les mutants Pkd1 ou Pkd2 décrits jusqu'à maintenant, le mutant Pkd2^{-LacZ} de Pennekamp *et al.*, 2002 démontre une malformation de l'axe symétrique embryonnaire gauche/droit.

L'analyse des mutants Pkd1 et Pkd2 nous informe sur l'importance de ces deux gènes dans l'homéostasie et la maturation rénale mais aussi dans le développement pancréatique, vasculaire, cardiaque et squelettique. De plus, les phénotypes rénaux et extrarénaux très semblables suggèrent par conséquent une implication de Pkd1 et Pkd2 dans des voies de signalisation/interactions cellulaires convergentes. Toutefois, ces deux protéines ont probablement des fonctions indépendantes l'une de l'autre tout comme des partenaires protéiques distincts et tissus-spécifiques. Pour ne citer qu'un exemple, le développement anormal de l'axe de symétrie gauche/droit de l'embryon est une propriété unique à l'inactivation du gène Pkd2.

Le phénotype des mutants murins Pkd1 et Pkd2 est très semblable à celui des patients ADPKD, ce qui indique que la souris représente un bon modèle d'étude de la polykystose rénale autant au niveau fonctionnel que thérapeutique.

1.7.0 L'analyse de la physiologie cellulaire d'ADPKD: partenaires et voies de signalisation de Pkd1

Afin de savoir un peu plus sur la fonction des protéines de la polykystose rénale, il faut analyser en détail la pathologie cellulaire des patients ADPKD tout comme leurs partenaires protéiques et les voies de signalisations impliquées chez les modèles murins ADPKD.

1.7.1 La pathologie cellulaire des patients ADPKD

L'ADPKD se manifeste par la formation de kystes dans l'épithélium tubulaire rénal. L'épithélium kystique observé chez les patients ADPKD présente des changements pathologiques importants dans les processus cellulaires rigoureusement contrôlés incluant la prolifération cellulaire, l'apoptose, la polarité cellulaire et la matrice extracellulaire.

1.7.1.1-1.7.1.2 La prolifération cellulaire et l'apoptose

Très élevés lors de l'organogenèse, la prolifération et l'apoptose sont pratiquement inexistantes dans un rein mature adulte. Dans les cellules épithéliales rénales normales comme dans tous les autres types cellulaires, ces deux facteurs doivent être strictement contrôlés. Ce point de contrôle fait défaut chez les patients ADPKD. Une augmentation de l'apoptose ainsi que de la prolifération dans les cellules tubulaires kystiques est rapportée chez ADPKD humain. L'indice de prolifération et d'apoptose augmente dans les reins ADPKD et ce dans l'épithélium kystique et non-kystique (**Lanoix *et al.*, 1996; Woo, 1995; Nadasdy *et al.*, 1995**) indiquant que prolifération/apoptose pourraient représenter des éléments déclencheurs de la kystogenèse.

Il a été suggéré que les mutations dans les gènes PKD mènent les tubules vers un état moins différencié et donc plus sujet à la prolifération. La prolifération se traduirait par une hyperplasie cellulaire très souvent rapportée chez les patients ADPKD. Les tubules

qui posséderaient des mutations PKD subirait la prolifération et la division cellulaire pour augmenter en taille et en nombre.

1.7.1.3 La polarité cellulaire

Les molécules telles que les canaux ioniques et les protéines membranaires doivent être distribuées et localisées à des pôles appropriés spécifiques dans la cellule afin de permettre une polarité et un fonctionnement cellulaire adéquat. La polarité épithéliale tubulaire est une caractéristique fondamentale pour la fonction normale du rein. Une mauvaise expression ou une localisation intracellulaire anormale de ces protéines peut transformer la cellule et changer ces propriétés fonctionnelles et opérationnelles. C'est ce qui est observé dans l'épithélium kystique ADPKD où les molécules tels que l'ankyrine, la fodrine, la calpactine, l'uvomoruline et le transporteur $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ sont mal localisées alors que l'alkaline phosphatase, le collagène de type IV, l'aminopeptidase N, l'aquaporine 2 et l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ ont une polarité normale (**Wilson et al., 1992; Wilson et al., 1995; Wilson et al., 1997**).

Les cas les plus étudiés des protéines membranaires mal localisées dans l'épithélium kystique ADPKD sont: la E-cadhérine, la pompe $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ et le récepteur EGFR. Le mécanisme pathologique exact par lequel les mutations PKD1 mènent à une mauvaise localisation de ces protéines n'est pas encore élucidé.

1.7.1.3.1 La E-Cadhérine

La E-cadhérine est un élément clé dans l'organisation de la polarité cellulaire, la formation des pôles apical et basal et la formation des jonctions adhérentes. Elle est responsable de l'architecture inter- et intracellulaire. En comparaison à l'épithélium tubulaire rénal normal, les niveaux de E-cadhérine sont diminués dans l'épithélium rénal ADPKD. De plus, dans l'épithélium kystique ce type de cadhérine est détecté au niveau intracellulaire dans les structures vésiculaires périnucléaires alors que normalement elle devrait se situer au niveau des membranes basolatérales (**Charron *et al.*, 2000**). Malgré cette mauvaise distribution de E-cadhérine, les jonctions cellulaires semblent se former ce qui suggérerait une redondance des cadhérines. En effet, la N-cadhérine, un type de cadhérine exprimé surtout au niveau embryonnaire non-différencié aussi appelée la cadhérine mésenchymateuse, semble remplacer partiellement la E-cadhérine dans l'épithélium kystique (**Roitbak *et al.*, 2004**).

Cependant, ce n'est pas que les protéines des jonctions adhérentes qui sont mal distribuées et localisées dans l'épithélium kystique. Tout récemment, Silberberg *et al.*, (**Silberberg *et al.*, 2005**) ont montré que l'épithélium kystique ADPKD présente même les protéines desmosomales normalement latérales au pôle apical.

1.7.1.3.2 La pompe $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$

La pompe $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ est un complexe protéique important qui s'occupe de l'échange des ions sodium pour potassium. Ce complexe est responsable de l'absorption des ions et du fluide via un transport actif des ions sodium du lumen tubulaire vers le sang. Normalement située à la membrane basolatérale au stade adulte, cette pompe se retrouve au pôle apical des cellules ADPKD (**Wilson *et al.*, 1991b**; **Wilson *et al.*, 2000**). Une localisation apicale de cette pompe est cependant normale au stade fœtal dans un rein normal en développement, mais se transpose aux membranes basolatérales après l'organogenèse. Il a été proposé qu'une pompe $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ au pôle apical de cellules épithéliales kystiques transformerait une cellule normale absorptive en une cellule sécrétoire et serait très importante pour l'expansion kystique. Au cours de la

kystogénèse, les kystes finissent par se séparer des tubules originaux (**Wilson et al., 1995**) et reposeraient sur ce système sécrétoire pour former une structure kystique remplie de fluide.

1.7.1.3.3 Le récepteur EGFR

Tout comme la pompe $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ (**Voir la section 1.7.1.3.2**), le récepteur EGFR est mal localisé au niveau de l'épithélium kystique ADPKD. Localisée exclusivement au niveau de la membrane basolatérale dans l'épithélium tubulaire rénal mature, l'expression du récepteur EGFR actif est surtout détectée à la membrane apicale des cellules ADPKD (**Du et al., 1995**). De plus, les reins humains ADPKD présentent une immunoréactivité forte pour le EGF, le ligand du récepteur EGFR, dans l'épithélium et le lumen kystique (**Wilson et al., 1991a; Wilson et al., 1993; Du et al., 1995**). Par conséquent, le récepteur EGFR apical kystique peut se trouver en contact proche avec son ligand permettant une boucle d'activation autocrine et menant à une prolifération cellulaire exagérée et non-contrôlée. Ce type de "autocrine loop" a été déjà démontré chez plusieurs tumeurs incluant le carcinome rénal (**Mydlo et al., 1989; Pekonen et al., 1989**). Il est important de noter que les kystes en comparaison aux cancers n'aboutissent pas à un cancer rénal malgré un taux de prolifération élevé probablement en raison d'un taux d'apoptose également élevé qui l'accompagne.

1.7.1.4 La matrice extracellulaire

Une autre anomalie observée dans les étapes initiales de la kystogénèse et qui constitue un des premiers changements cellulaires se trouve dans la matrice extracellulaire et la membrane basale. La prolifération, la division, la différenciation et la polarité cellulaire sont étroitement accompagnées par les changements dans la membrane basale. Or, dans l'ADPKD on observe un épaissement de la membrane basale qui adopte une forme plutôt irrégulière (**Cuppige et al., 1980; Wilson et al., 1992**). Ce défaut structural de la membrane basale est accompagné par une production cellulaire anormale de composantes participant à la constitution de la matrice extracellulaire. Il s'agit d'une

expression aberrante de laminine, du collagène de type I et IV, de fibronectine et des protéoglycanes (**Carone *et al.*, 1988; Liu *et al.*, 1992**).

En résumé, il est important de souligner que l'épithélium kystique acquiert plusieurs traits d'un épithélium immature et non-différencié: une localisation apicale de plusieurs protéines basolatérales, une expression de protéines fœtales au stade adulte tel que la N-cadhérine et des niveaux de prolifération et d'apoptose élevés.

1.7.2 Les partenaires cellulaires des polycystines

1.7.2.1 La polycystine-1

Plusieurs partenaires protéiques de la polycystine-1 ont été identifiés *in vitro*. Dans la plupart des cas, ces partenaires protéiques ont été identifiés par la méthode de double hybride chez la levure et confirmés par des co-immunoprécipitations et des immunolocalisations (**Tab.1-X**). En accord avec sa localisation membranaire et intracellulaire (**Voir la section 1.5.1.1**), la polycystine-1 semble interagir avec des protéines d'adhésion cellulaire, via son domaine N-terminal extracellulaire, et des canaux ioniques intracellulaires et des molécules de signalisation, via son domaine C-terminal cytoplasmique.

Les différents domaines protéiques de l'extrémité N-terminale de PC1 suggèrent un rôle de cette protéine dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire. La PC1 pourrait se lier directement avec les protéines principales des jonctions cellulaires, la E-cadhérine et les caténines qui la relie avec le cytosquelette d'actine (**Geng *et al.*, 2000; Huan *et al.*, 1999**), et les protéines de l'adhésion focale (**Wilson *et al.*, 1999; Geng *et al.*, 2000**). La polycystine-1 pourrait également communiquer via son domaine extracellulaire N-terminal avec les composantes de la matrice extracellulaire, la fibronectine, la laminine et le collagène (**Weston *et al.*, 2001; Malhas *et al.*, 2002**). Finalement, la PC1 semble être impliquée dans les interactions homophiliques cis et trans (**Ibraghimov-Beskrovnaya *et al.*, 2000**).

Quant au domaine C-terminal de la polycystine-1 ou plutôt son sous-domaine coiled-coil, il semble être capable d'interagir avec celui de la polycystine-2, son partenaire protéique le plus étudié jusqu'à maintenant, et former un canal (**Hanaoka et al., 2000**). Cette interaction entre la polycystine-1 et -2 est conservée chez les autres espèces (**Tab.1-X; Neill et al., 2004**). La polycystine-2 n'est pas cependant le seul canal capable d'interagir avec la polycystine-1. La sous-unité α de la pompe Na^+/K^+ -ATPase semble avoir aussi cette propriété de liaison avec la PC1 (**Zatti et al., 2005**) suggérant un rôle de la polycystine-1 dans la régulation et le transport des ions.

Finalement, le produit du gène PKD1 semble pouvoir lier *in vitro* plusieurs molécules impliquées dans les différentes voies de signalisation qui contrôlent la prolifération, l'apoptose, la morphologie, le cycle et la différenciation cellulaire. Il s'agit des protéines G (**Parnell et al., 1998**), les régulateurs des protéines G (**Kim E et al., 1999a**) et les protéines impliquées dans la voie JAK/STAT (**Bhunja et al., 2002**) et la voie PI3K (**Shillingford et al., 2006**).

Tableau 1-X: Les partenaires protéiques de la polycystine-1

Partenaire	Domaine impliqué (méthode)	Fonction suggérée/complexe protéique impliqué	Réf.
Canal/régulation du transport d'ions			
Polycystine-2 (hétérodimère)	CT (Y2H, Co-IP)	Canal de calcium	1-4
Polycystine-1 (homodimère ?)	ND	Canal de calcium	5
Na-K-ATPase sous-unité α	CT (Y2H, Co-IP)	Régulation du fluide membranaire et transport d'électrolytes (ions)	6
TRPC	ND	Canal	7
Adhésion cellulaire			
Vinculine, paxiline, FAK	ND (Co-IP)	Adhésion focale, cytosquelette d'actine	8,9
Taline, p130cas, α -actinine, pp60c-src	ND (Co-IP)	Adhésion focale, cytosquelette d'actine	9
Vimentine, cytotkératine K8/K18, desmine	CT (Y2H)	Filaments intermédiaires	10
Collagen I, II, IV	NT-domaine C-lectine (PF)	Matrice extracellulaire	11
Fibronectine collagène I, laminine	NT-domaine LRR (PF)	Matrice extracellulaire	12
E-cadhérine, caténines (α, β, γ)	ND (Co-IP)	Jonctions adhérentes	9, 13
Intégrine	ND (Co-IP)	Adhésion focale, matrice extracellulaire	8, 9
Polycystine-1 (homophilique)	NT-domaine PKD (PF)	Polycystines	14
Signalisation			
JAK 2	ND (Co-IP)	Régulation de la voie JAK/STAT	15
Tubérine	CT (Co-IP)	Régulation de la voie PI3K/mTOR	16
Protéine G	CT (Co-IP, PF)	Signalisation par protéines G/voie AP1	17
RGS7	CT (Y2H, Co-IP)	Signalisation par protéines G	18
E-cadhérine, caténines (α, β, γ)	ND (Co-IP)	Régulation de la voie Wnt	9, 13
Siah-1	CT (Y2H, Co-IP)	Ubiquitine-protéasome	19
14-3-3	CT (Y2H)	ND	20
Homologues			
<i>C. elegans</i> ATP-2 (sous-unité β de l'ATP synthase)	Domaine PLAT (Y2H, Co-IP)	Méchanosenseur, production d'ATP dans les cils	21
Oursin de mer suPKD2	ND (Co-IP)	Canal, méchanosenseur	22

Co-IP: Co-immunoprécipitation; PF: protéine de fusion; Y2H: méthode de double hybride chez la levure; ND: non-déterminé; NT: N-terminal; CT: C-terminal; FAK: kinase de l'adhésion focale; RGS7: régulateur de signalisation des protéines G; JAK: tyrosine kinase de la famille janus; Siah: homologue de Sina-Seven *in absentia*; suPKD2: l'orthologue PKD2 chez l'oursin de mer.

Ref.: Références; 1: Qian *et al.*, 1997b; 2: Tsiokas *et al.*, 1997; 3: Hanaoka *et al.*, 2000; 4: Newby *et al.*, 2002; 5: Babich *et al.*, 2004; 6: Zatti *et al.*, 2005; 7: L.T. *et al.*, non-publié; 8: Wilson *et al.*, 1999; 9: Geng *et al.*, 2000; 10: Xu *et al.*, 2001; 11: Weston *et al.*, 2001; 12: Malhas *et al.*, 2002; 13: Huan *et al.*, 1999; 14: Ibraghimov-Beskrovnya *et al.*, 2000; 15: Bhunia *et al.*, 2002; 16: Shillingford *et al.*, 2006; 17: Pamell *et al.*, 1998; 18: Kim E *et al.*, 1999a; 19: Kim H *et al.*, 2004; 20: Kim *et al.*, JASN, non publié, 1997; 21: Hu *et al.*, 2005; 22: Neill *et al.*, 2004.

1.7.2.2 La polycystine-2

Étant donné que le phénotype ADPKD causé par les mutations dans le gène PKD1 et PKD2 est très semblable, il est suggéré que ces deux protéines agissent ensemble et/ou séparées dans les voies cellulaires convergentes.

In vitro, la polycystine-2 semble être capable de former des homodimères (**Tab.1-XI**) (**Tsiokas et al., 1997; Qian et al., 1997b; Gonzalez-Perrett et al., 2001; Vassilev et al., 2001**) ou d'hétérodimériser avec la polycystine-1 (**Hanaoka et al., 2000; Newby et al., 2002; Qian et al., 1997b; Tsiokas et al., 1997**). De plus, le canal PC2 (**Voir la section 1.4.2**) pourrait interagir structurellement et fonctionnellement avec d'autres canaux cellulaires dont le canal TRPC1 (**Tsiokas et al., 1999**) et le récepteur IP3 de type I, un canal du réticulum endoplasmique sensible aux niveaux de calcium intracellulaires (**Li Y et al., 2005**). Elle est capable de faire un lien direct via la troponine I et la tropomyosine-1 (**Li Q et al., 2000a; Li Q et al., 2003b**) et indirect via CD2AP et Hax-1 (**Lehtonen et al., 2000; Gallagher et al., 2000**) avec le cytosquelette d'actine. La polycystine-2 semble s'associer également avec mDia-1 (**Rundle et al., 2004**), un partenaire de liaison des protéines RhoA de la famille des protéines GTPases impliqué étroitement dans l'organisation du cytosquelette et la signalisation cellulaire.

Les études des partenaires protéiques pourraient également expliquer la localisation intracellulaire ou membranaire de la polycystine-2 (**Tab.1-VII**). La localisation intracellulaire de la polycystine-2 semble être régulée par des protéines qui se lient avec elle dont les protéines PACS 1 et 2 (**Köttgen et al., 2005**). PACS 1 et 2 sont des molécules interagissant directement avec les complexes du transport protéique intracellulaire, le complexe protéique adaptateur AP-1 et COPI, respectivement. La liaison des protéines PIGEA-14 (**Hidaka et al., 2004**) et mDia-1 (**Rundle et al., 2004**) avec la PC2 semble aussi réguler la localisation intracellulaire de cette dernière.

Dans tous les cas, à part l' α -actinine qui peut interagir avec les deux extrémités N et C-terminale cytoplasmiques de la polycystine-2, les liaisons de partenaires protéiques avec

la polycystine-2 se font via son domaine C-terminal cytoplasmique. Il est intéressant à noter que les deux polycystines de la polykystose rénale (PC-1 et PC-2) ont certains partenaires protéiques communs tel que l' α -actinine et sont toutes les deux impliquées dans la morphologie cellulaire et l'organisation du cytosquelette. Cette observation suggère une fois de plus des mécanismes pathogéniques ADPKD1 et ADPKD2 communs et inter-reliés.

Tableau 1-XI: Les partenaires protéiques de la polycystine-2

Partenaire	Domaine de PC-2 impliqué	Fonction suggérée Complexe protéique impliqué	Réf.
Polycystine-1 (hétérodimère)	CT	Canal ionique	1-4
Polycystine-2 (homodimère)	CT	Canal ionique	3-6
TRPC1	CT	Canal ionique	7
Récepteur IP ₃ type I	CT	Canal ionique	8
CD2AP	CT	Cytosquelette d'actine	9
Hax-1	CT	Cytosquelette d'actine	10
Troponine-I	CT	Cytosquelette d'actine	11
Tropomyosine-1	CT	Cytosquelette d'actine	12
α -actinine	NT, CT	Cytosquelette d'actine	13
PACS1 ; PACS2	CT	Trafficking (Transport intracellulaire)	14
PIGEA-14	CT	Trafficking (Transport intracellulaire)	15
mDia1	CT	Canal ionique nécessaire lors de la division cellulaire?	16
Pericentrine Id2	ND CT	Assemblage de cils primaires Cycle cellulaire	17 18
Homologues			
SuREJ3	ND	Canal (Réaction acrosomique)	19

PIGEA-14: Polycystin-2 interactor, Golgi- and endoplasmic reticulum-associated protein with a molecular mass of 14 kDa; mDia-1: mammalian Diaphanous-1; CD2AP: CD2-associated protein; PACS: phosphofurin acidic cluster sorting protein; TRPC: transient receptor potential channel; suREJ3: orthologue de PKD1 humain chez l'oursin de mer; CT: C-terminal; NT: N-terminal; ND: pas déterminé.

Réf.: Référence; 1: Hanaoka *et al.*, 2000; 2: Newby *et al.*, 2002; 3: Qian *et al.*, 1997; 4: Tsiokas *et al.*, 1997; 5: Gonzalez-Perrett *et al.*, 2001; 6: Vassilev *et al.*, 2001; 7: Tsiokas *et al.*, 1999; 8: Li Y *et al.*, 2005; 9: Lehtonen *et al.*, 2000; 10: Gallagher *et al.*, 2000; 11: Li Q *et al.*, 2003b; 12: Li Q *et al.*, 2003a; 13: Li Q *et al.*, 2005; 14: Köttgen *et al.*, 2005; 15: Hidaka *et al.*, 2004; 16: Rundle *et al.*, 2004; 17: Jurczyk *et al.*, 2004; 18: Li X *et al.*, 2005; 19: Neill *et al.*, 2004.

1.7.3 Les voies de signalisation de la polycystine-1

Figure 1-8: Les voies de signalisation régulées par la polycystine-1

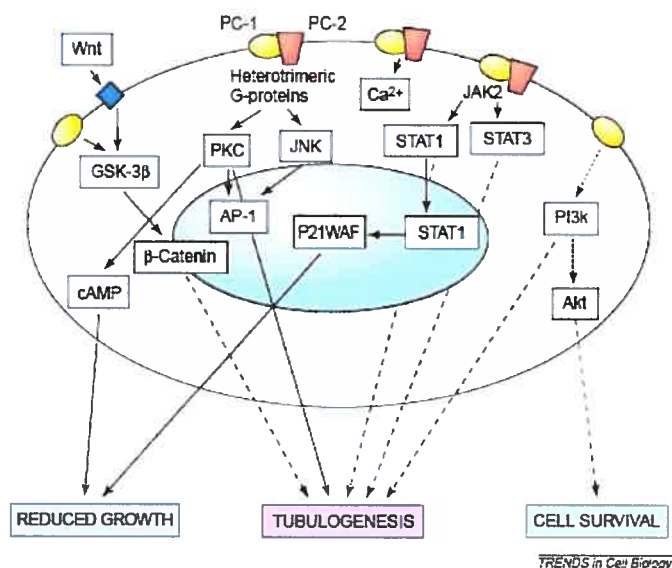


Figure modifiée de Boletta *et al.*, 2003

Les lignes solides indiquent les connexions publiées, tandis que les lignes interrompues indiquent les voies suggérées. Abréviations: GSK-3β: glycogène synthase kinase 3; PKC: protéine kinase C; PC-1: polycystine-1; PC-2: polycystine-2.

1.7.3.1 Les protéines G

La polycystine-1 contient un site d'activation et de liaison aux protéines G (Voir la section 1.4.1.3.2.4). La fonctionnalité de ce site a été démontré *in vitro* par Parnell *et al.*, en 1998 (Parnell *et al.*, 1998). En plus de lier et d'activer les protéines G, la polycystine-1 est capable de moduler la voie des protéines G en stabilisant un régulateur négatif de la signalisation des protéines G, le RGS7 (Kim E *et al.*, 1999a). Les voies médiées par les protéines G impliquent l'adénylate cyclase et les MAPK kinases responsables de la régulation de la sécrétion des fluides cellulaires, de la prolifération et de la différenciation cellulaire.

1.7.3.2 La voie canonique Wnt

L'activation de la voie canonique Wnt consiste en stabilisation de la β -caténine qui se lie avec les facteurs transcriptionnels LEF/TCF et qui régule la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, le développement fœtal et la néphrogenèse. La polycystine-1 semble impliquée dans cette voie de plusieurs façons.

In vitro, la PC1 semble être la cible directe de la voie canonique Wnt/ β -caténine dû à la présence des éléments LEF/TCF dans le promoteur proximal de PKD1 (**Rodova et al., 2002**). Puis, la polycystine-1 semble se lier à la β -caténine au niveau des adhésions cellulaires (**Geng et al., 2000; Huan et al., 1999**) et pourrait alors réguler les pools de β -caténine stables dans la cellule et par conséquent la voie Wnt. De plus, la surexpression du domaine C-terminal dans une lignée cellulaire embryonnaire humaine résulte en une inhibition de la GSK ce qui permet la stabilisation de la β -caténine endogène et une stimulation de la transcription de gènes LEF/TCF/ β -caténine (**Kim E et al., 1999b**). Contrairement à cette étude, les expériences de Le et al., (**Le et al., 2004**) ont montré que la voie Wnt ne semblait pas être régulée par la polycystine-1 ni dans les cellules normales ni dans les cellules kystiques.

De plus, les modèles transgéniques murins de la β -caténine (**Tab.1-XIII; Romagnolo et al., 1999; Saadi-Kheddouci et al., 2001**) et de ses cibles transcriptionnelles, c-myc et prothymosine α (**Trudel et al., 1991; Li KJ et al., 2005**), tout comme l'implication de ces gènes dans la pathologie ADPKD humaine, appuient une implication importante cependant non-exclusive de PC1 dans la voie Wnt canonique.

1.7.3.3 La voie AP-1

AP-1 est un complexe transcriptionnel composé de jun et de fos ou d'homo- et d'hétérodimères des facteurs activateurs de transcription ATF qui lient des éléments de réponse TRE. La voie de signalisation AP-1 régule la prolifération et l'apoptose cellulaire et est stimulée par les facteurs de croissance et les cytokines. Dans une lignée

cellulaire embryonnaire rénale, le domaine C-terminal de la PC1 est capable d'activer la voie AP-1 via les kinases JNK et PKC α et les protéines de la famille Rho, le Cdc42 et la protéine Rac (**Arnould *et al.*, 1998**). L'activation de la voie AP1 par la polycystine-1 semble être médiée par son domaine C-terminal via les protéines G et est compromise dans les cellules rénales humaines ADPKD et les cellules transgéniques PKD1 (**Le *et al.*, 2004**). De plus, le domaine cytoplasmique C-terminal de la polycystine-1 ciblé dans le noyau semble être capable d'activer par lui-même la voie AP-1 (**Chauvet *et al.*, 2004**). Le mécanisme d'activation transcriptionnelle et les cofacteurs impliqués dans ce processus ne sont pas encore élucidés.

1.7.3.4 La voie calcineurine/NFAT

Le calcium est un second messager très puissant et impliqué dans une série d'évènements intracellulaires et de signalisation. La polycystine-1 semble impliquée dans la régulation du calcium intracellulaire via (**Hanaoka *et al.*, 2000**) ou indépendamment de la polycystine-2 (**Babich *et al.*, 2004**).

Un lien direct entre les niveaux de calcium et la signalisation de la polycystine-1 a été démontré par le groupe de James Calvet en 2004 (**Puri *et al.*, 2004**). Dans cette étude, l'expression du domaine C-terminal de la polycystine-1 dans les cellules HEK293T mène à l'activation de la voie de signalisation calcineurine/NFAT via les protéines Gq et la PLC. La calcineurine est une sérine thréonine kinase calcium-dépendante qui déphosphoryle le facteur transcriptionnel NFAT dans le cytoplasme. Ce dernier sous forme déphosphorylée passe dans le noyau où il régule la transcription de gènes du développement embryonnaire, la différenciation et l'apoptose cellulaire.

1.7.3.5 Les autres voies

Les voies JAK/STAT et PI3K (mTOR) sont toutes les deux impliquées dans la prolifération et le contrôle du cycle cellulaire, des anomalies majeures observées dans l'épithélium ADPKD. La polycystine-1 semble être capable de lier les intermédiaires

importants de ces voies, la JAK et la tubérine (**Bhunja *et al.*, 2002; Shillingford *et al.*, 2006**) qui activent respectivement les voies JAK/STAT et PI3K/mTOR. L'implication de polycystine-1 dans cette dernière voie offre beaucoup d'intérêt puisque la rapamycine, un inhibiteur de la voie de signalisation mTOR, est très efficace pour réduire la kystogenèse rénale dans certains modèles murins PKD (**Tao *et al.*, 2005; Wahl *et al.*, 2005**).

1.7.4 Les modèles de la kystogenèse rénale

Afin de mieux connaître le processus de kystogenèse et les voies de signalisation impliquées, plusieurs modèles de rat et de souris ont été obtenus dont le phénotype ressemble à celui de la polykystose rénale humaine. Il s'agit de modèles résultants de mutations spontanées, insertionnelles et chimiquement induites (**Tab.1- XII**) ou générées par des manipulations génétiques précises (**Tab.1- XIII**).

1.7.4.1 Les mutations spontanées, insertionnelles et chimiquement induites

Au tout début, avant les manipulations génétiques, les études de la polykystose rénale ont reposé sur des modèles de rat et de souris développant une kystogenèse rénale induite par l'administration de substances chimiques dont les corticostéroïdes et l'acide nordihydroguaiaretique (**Tab.1- XII**). Par la suite, plusieurs autres modèles obtenus par des mutations spontanées ou des mutations insertionnelles dans des différents gènes sont apparus (**Tab.1- XII**). Ces gènes mutés ont été dans la plupart des cas identifiés et clonés et semblent avoir une fonction dans la prolifération, la régulation du cycle cellulaire ou la ciliogenèse. Ces modèles ont permis d'étudier la kystose rénale au niveau cellulaire tel que la pathologie cellulaire, l'identification de gènes modificateurs du phénotype kystique et leurs effets sur la progression de la maladie et finalement les effets de différents agents thérapeutiques.

Tableau 1- XII: Les modèles de la polykystose rénale: Mutations spontanées, insertionelles et chimiquement induites

Gène muté (protéine)	Chr.	Nom du modèle (espèce)	Fonction suggérée du gène	Ref.
Mutations spontanées				
Cys1 (Cystine)	12	Cpk (s)	Stabilisation des microtubules?	1
Bicc1 (Bicaudal C)	10	Bpk (s)	?	2
Nek1 (NIMA-related kinase1)	8	Kat;Kat ^{2j} (s)	Régulateur du cycle cellulaire?	3
Nphp3 (Nephrocystine3)	9	Pcy (s)	?	4
Pkdr1	5	Han:SPRD-cy (r)	?	5
Meckéline (MKS3)	5	Wpk (r)	?	6,16
Pkhd1 (Fibrocystine)		Pck (r)	?	7
Mutations insertionelles				
Nek8 (NIMA-related kinase 8)		Jck (s)	Régulateur du cycle cellulaire	8
Nph2 (Inversine)		Inv/Inv (s)	Ciliogenèse	9
Tg737mut (Polaris)	14	Orpk (s)	Ciliogenèse	10
Tsc2 (Tubérine)	1	Eker (r)	Suppresseur des tumeurs	11
Mutations chimiquement induites				
Bicc1 (Bicaudal C)	10	Jcpk (m)	?	12
DPT	-	(r)	-	13
NDGA	-	(r)	-	14
Corticostéroïdes	-	(s, r, h, l)	-	15

NDGA: acide nordihydroguaiaretique; DPT: 2-amino-4,5-diphenyl thiazole; NIMA: never in mitosis A related kinase; r: rat; s: souris; l: lapin; h: hamster; ?: pas connu; -: pas applicable; Chr: localisation chromosomique; Han: Hannover; kat: kidney anemia and testis; bpk: BAL/C polycystic kidneys; pcy: polycystic; jck: juvenile cystic kidneys; orpk: Oak Ridge polycystic kidneys; cpk: congenital polycystic kidneys; inv: inversion of embryonic turning.

Réf.: Références; 1: Fry *et al.*, 1985; Hou *et al.*, 2002; Preminger *et al.*, 1982; Simon *et al.*, 1994; Ricker *et al.*, 2000; 2: Cogswell *et al.*, 2003; Guay-Woodford *et al.*, 1996; 3: Janaswami *et al.*, 1997; Upadhyia *et al.*, 2000; 4: Nagao *et al.*, 1995; Takahashi H *et al.*, 1991; Takahashi H *et al.*, 1986; Olbrich *et al.*, 2003; 5: Bihoreau *et al.*, 1997; Cowley *et al.*, 1993; 6: Nauta *et al.*, 2000b; 7: Lager *et al.*, 2001; Katsuyama *et al.*, 2000; 8: Atala *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 2002; Holland *et al.*, 2002; 9: Mochizuki *et al.*, 1998; Morgan *et al.*, 1998; Otto *et al.*, 2003; Phillips *et al.*, 2004; 10: Moyer *et al.*, 1994; Yoder *et al.*, 2002a; 11: Eker, 1954; Kobayashi *et al.*, 1995; 12: Flaherty *et al.*, 1995; Cogswell *et al.*, 2003; 13: Kanwar *et al.*, 1984; 14: Goodman *et al.*, 1970; Evan *et al.*, 1979; 15: McDonald *et al.*, 1990; Crooker *et al.*, 1976; Filmer *et al.*, 1973; Ojeda *et al.*, 1986; 16: Smith *et al.*, 2006.

1.7.4.2 Les ablations géniques et la transgénèse

Les ablations ou inactivations géniques et la transgénèse sont parmi les meilleurs outils aujourd'hui pour étudier le rôle direct d'un gène nouvellement identifié. Dans le domaine de polykystose rénale, ces approches expérimentales ont permis d'identifier les facteurs importants dans la kystogenèse et les gènes modificateurs de la manifestation et la sévérité de la maladie. L'inactivation totale ou conditionnelle de plusieurs gènes du développement embryonnaire et rénal, de la prolifération, de la croissance et de l'adhésion cellulaire mène à la polykystose rénale (**Tab.1-XIII**).

Plusieurs souris transgéniques générées surexprimant des formes natives, actives ou dominantes négatives de gènes de la prolifération, l'adhésion et la différenciation cellulaire développent la polykystose rénale (**Tab.1-XIII**). Les souris transgéniques surexprimant les composantes de la voie canonique Wnt, la β -caténine (**Romagnolo et al., 1999**), le c-myc (**Trudel et al., 1991**) ou la cible directe de c-myc, la prothymosine α (**Li KJ et al., 2005**), développent tous la polykystose rénale suggérant un rôle important de cette voie dans l'ADPKD. La surexpression des proto-oncogènes RasT24 et le virus SV40 (**Schaffner et al., 1993; MacKay et al., 1987; Kelley et al., 1991**) tout comme la surexpression des plusieurs facteurs de croissance incluant les facteurs HGF (**Takayama et al., 1997**), KGF (**Nguyen et al., 1996**) et le TGF α (**Lowden et al., 1994**), mène à un phénotype kystique. Tous ces mutants énumérés ci-haut sont capables de déclencher le processus de kystogenèse et de reproduire de nombreux traits pathologiques de la polykystose rénale.

La génération de ces modèles murins a permis de savoir un peu plus sur le mécanisme (**Thivierge et al., 2006; Pritchard et al., 2000**) mais aussi sur la signalisation intracellulaire impliquée dans PKD (**Moser et al., 2003; Nakayama K et al., 1994.; Gresh et al., 2004; Togawa et al., 1999; Qian CN et al., 2005; Lo et al., 1997**).

Tableau 1- XIII: Les modèles de la kystogénèse rénale: Ablations géniques et transgénèse

Gène muté	Fonction du gène	Réf.
Ablation géniques		
HNF-1β ¹	Facteur de transcription, développement embryonnaire	1
AP-2β	Facteur de transcription, développement embryonnaire	2
α3β1 Intégrine	Adhésion cellulaire, développement rénal	3
ACE	Maintenance de la pression sanguine	4
Bcl-2	Proto-oncogène, apoptose, prolifération	5
RhoGDIα	Organisation du cytosquelette	6
SOCS/IFNγ	Inflammation	7
BMP-7	Prolifération, développement embryonnaire	8
Psgs1	Inflammation, contractilité vasculaire	9
APC ¹	Oncogène, voie de signalisation canonique Wnt	10
Tg737Δ2-3Gal	Ciliogenèse	11
Kif3A ¹	Ciliogenèse	12
Tensine	Organisation du cytosquelette	13
Cnbl ¹	Voie de signalisation NFAT	14
Pkd1	Récepteur, canal, adhésion cellulaire	Voir Tab.1-X
Pkd2	Canal	Voir Tab.1-XI
Aqp-11	Canal	15
Transgéniques		
c-myc ¹	Facteur de transcription, proto-oncogène, apoptose	16
α-prothymosine	Apoptose	17
β-caténine (forme active)	Adhésion cellulaire, voie de signalisation canonique Wnt	18
HNF-1β ¹ (forme mutante)	Facteur de transcription, développement embryonnaire	19
Pax-2	Facteur transcriptionnel, développement embryonnaire	20
RasT24oncogene	Proto-oncogène, prolifération cellulaire	21
Simian virus 40 early region	Proto-oncogène, prolifération cellulaire	22
c-Erb-B2	Proto-oncogène, prolifération cellulaire	23
Endothéline-1	Prolifération, vasoconstriction	24
HGF	Facteur de croissance, prolifération	25
KGF	Facteur de croissance, prolifération	26
TGF-α	Facteur de croissance, prolifération	27
hGH	Facteur de croissance, prolifération	28
Pkd1-Tsc2	Pkd1: Récepteur, canal, adhésion cellulaire Tsc2: Suppresseur de tumeurs	29
Pkd1 ¹	Récepteur, canal, adhésion cellulaire	30

¹Spécifique aux reins; Réf.: Références; 1: Gresh *et al.*, 2004; 2: Moser *et al.*, 2003; 3: Kreidberg *et al.*, 1996; 4: Carpenter *et al.*, 1996; 5: Nakayama K *et al.*, 1994; Veis *et al.*, 1993; Sorenson, 1999; 6: Togawa *et al.*, 1999; 7: Metcalf *et al.*, 2002; 8: Jena *et al.*, 1997; 9: Dinchuk *et al.*, 1995; Morham *et al.*, 1995; 10: Qian CN *et al.*, 2005; 11: Murcia *et al.*, 2000; 12: Lin *et al.*, 2003; 13: Lo *et al.*, 1997; 14: Chang *et al.*, 2004; 15: Morishita *et al.*, 2005; 16: Trudel *et al.*, 1991; 17: Li KJ *et al.*, 2005; 18: Saadi-Kheddouci *et al.*, 2001; Romagnolo *et al.*, 1999; 19: Hiesberger *et al.*, 2004; Hiesberger *et al.*, 2005; 20: Dressler *et al.*, 1993; 21: Schaffner *et al.*, 1993; 22: MacKay *et al.*, 1987; Kelley *et al.*, 1991; 23: Stöcklin *et al.*, 1993; 24: Hoher *et al.*, 1997; 25: Takayama *et al.*, 1997; 26: Nguyen *et al.*, 1996; 27: Lowden *et al.*, 1994; 28: Wanke *et al.*, 1991; Brem *et al.*, 1989; 29: Pritchard *et al.*, 2000; 30: Thivierge *et al.*, 2006.

1.8.0 Projet de maîtrise

L'ADPKD, une des maladies génétiques les plus communes, affecte 12.5 millions de personnes à travers le monde. Un remède n'existe pas; les seuls traitements sont la dialyse et la transplantation, deux traitements très invasifs. Les coûts de ces derniers dépassent 1 milliard \$US chaque année (rapporté par la fondation PKD) d'où la nécessité des thérapies moins invasives et peu coûteuses.

Le développement des approches pour empêcher la croissance des kystes, le ralentissement ou idéalement la réversibilité de la maladie implique une bonne compréhension de la pathogenèse ADPKD et par conséquent une compréhension de la fonction de polycystine-1, le produit du gène muté chez 85% des patients ADPKD.

1.8.1 Le but à long terme

Dans un but à long terme d'identifier les cibles thérapeutiques d'ADPKD, nous avons décidé d'étudier le rôle de la polycystine-1 *in vivo* dans un modèle murin.

1.8.1.1 Le N-terminal de la polycystine-1, un domaine fonctionnel de PC1 ?

Plusieurs observations suggèrent que le rôle de la polycystine-1 pourrait être médié via son domaine extracellulaire N-terminal.

Premièrement, le domaine N-terminal de la polycystine-1 constitue 2/3 de la protéine et est composé de plusieurs sous-domaines. *In vitro*, ces sous-domaines ou plutôt ces motifs protéiques semblent être impliqués dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire (**Tab.1-X**). Les défauts dans l'adhésion cellulaire et dans la composition de la matrice extracellulaire sont deux des caractéristiques typiques de la pathogenèse ADPKD (**Voir la section 1.7.1**). L'interférence avec certains de ces sous-domaines extracellulaires tel que les domaines Ig-like (**Voir la section 1.4.1.1.6**) en utilisant les peptides ou les anticorps spécifiques mène à un développement rénal et une

tubulogénèse altérés (**van Adelsberg et al., 1999; Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 2000**).

Deuxièmement, la polycystine-1 appartient à une famille des protéines dont tous les membres identifiés jusqu'à maintenant possèdent un site de clivage protéolytique GPS dans l'extrémité N-terminale juxtamembranaire (**Voir la section 1.4.1.1.8**). Cette modification post-traductionnelle de la polycystine-1 a été démontrée *in vitro* tout comme chez son orthologue suREJ, et résulte en deux fragments, le N-terminal qui contient toute la partie extracellulaire et le C-terminal transmembranaire et cytoplasmique. Le clivage semble nécessaire à la fonction biologique de la polycystine-1 suggéré par un modèle murin possédant une mutation dans le site de clivage qui développe la polycystose rénale (**Qian et al., 2005**). De plus, le fragment N-terminal posséderait à lui seul des propriétés tubulogénétiques (**Qian et al., 2005**).

Le rôle de la partie N-terminale pré- et post-clivage n'est pas connu. Cette partie clivée qui représente une partie tronquée de la polycystine-1 pourrait avoir un rôle fonctionnel important et indépendant de la polycystine-1 native non-clivée.

Troisièmement, un rôle fonctionnel de la polycystine-1 mutante tronquée est suggéré par plusieurs observations. Les souris avec une inactivation du gène *Pkd1* produisant des protéines tronquées semblent avoir une durée de vie plus longue que les souris avec l'allèle *Pkd1* nul (**Tab.1-IX**). Ensuite, une différence au niveau de la sévérité et des manifestations phénotypiques entre les différentes souris *Pkd1* "knock-out" et des patients ADPKD ayant des mutations PKD différentes suggère des fonctions indépendantes de la protéine PC1 tronquée par rapport à la protéine non-tronquée native. Finalement, les patients ADPKD ayant des mutations en 5' du gène *Pkd1* ont une progression de maladie plus rapide que les patients avec des mutations en 3' (**Rossetti et al., 2002b**) suggérant une fois de plus un rôle fonctionnel des protéines tronquées et non pas une perte totale de fonction de l'allèle muté comme suggéré par la théorie du second-hit (**Voir la section 1.5.2.1**). Deux mécanismes moléculaires de la kystogénèse sont théoriquement possibles mais restent à être démontrés: 1) les polycystine-1

mutantes tronquées chez les patients ADPKD inhiberaient la polycystine-1 normale et auraient un effet de dominant négatif ou 2) la polycystine-1 mutante aurait plutôt une activité biologique nouvelle et aurait un effet dominant de "gain de fonction".

1.8.2 L'hypothèse et l'approche expérimentale

Suite aux observations de surexpression de PC1 chez les patients ADPKD (**Voir la section 1.5.1.3**) et le nouveau modèle murin SBPkd1_{TAG} où une surexpression de Pkd1 cause la kystogenèse (**Thivierge *et al.*, 2006; Voir la section 1.5.2.2**), une des stratégies thérapeutiques attirantes serait de réguler voir diminuer les niveaux de PC1 en générant des dominants négatifs.

Notre hypothèse est que le domaine extracellulaire de la polycystine-1 joue un rôle de dominant négatif. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons généré une souris transgénique, appelé le modèle Pkd1_{extra}, surexprimant une polycystine-1 tronquée de ses parties transmembranaires et cytoplasmique et reproduisant ainsi les mutations existantes chez deux patients ADPKD.

1.9.0 Note concernant l'appendice

Les souris transgéniques Pkd1_{extra} exprimant le domaine extracellulaire de la polycystine-1 font l'objet principal de ce mémoire. Cependant, des résultats et observations additionnels pour Pkd1_{extra} ainsi que pour les souris transgéniques SBPkd1_{extra/TAG} exprimant le domaine extracellulaire spécifiquement aux reins sont résumés dans l'appendice.

CHAPITRE 2.0

ARTICLE

CHAPITRE 2

ARTICLE

LATE ONSET OF POLYCYSTIC KIDNEY DISEASE FROM ENHANCED EXPRESSION OF PKD1 EXTRACELLULAR REGION

Almira Kurbegovic & Marie Trudel

Correspondence and proofs:

Dr. Marie Trudel

Molecular Genetics and Development


IRCM

110 ave. des Pins ouest,

Montreal, Quebec, Canada H2W 1R7

Tel: 1-(514) 987-5712

Fax: 1-(514) 987-5585



ABSTRACT

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is associated with mutations most frequently in the Pkd1 gene but also in the Pkd2 gene. While most of the Pkd1 or polycystin-1 protein consists of a large extracellular region, the role(s) of this extracellular region remains elusive. To investigate the function of this region in vivo, the Pkd1 gene was deleted of the intracellular and transmembrane regions by BAC homologous recombination retaining exclusively the Pkd1 extracellular domains (Pkd1_{extra}-BAC) and accordingly, mimicked naturally occurring human ADPKD mutations with truncation at the extracellular-membrane junction. Four transgenic lines were established that expressed this specifically Pkd1_{extra} transgene, 2- to 80-fold over endogenous levels and the polycystin-1 extracellular region remained mainly tethered to the cells. All transgenic animals from the four lines consistently displayed a renal cystic phenotype. Consequently, these transgenic mice reproducibly developed renal functional alterations similar to human autosomal dominant PKD with proteinuria, renal insufficiency, anemia and die of renal failure at late ages. Analysis for renal downstream effectors of the Pkd1_{extra} transgene showed increased c-myc transcripts and pc2 protein expression. Altogether, we have identified molecular partners and targets of the Pkd1 extracellular domains and generated a physiologically faithful mouse model of ADPKD.

INTRODUCTION

Human autosomal polycystic kidney disease (ADPKD) is one of the most common genetic diseases. ADPKD is characterized by the presence of many renal epithelial cysts in all parts of the nephron that affect both kidneys. Typically, the cystic dilations of tubules and glomeruli in ADPKD kidneys ultimately result in remodeling of the renal architecture. Consequently, the renal physiologic functions are altered leading to insufficiency that accounts for ~10% of all individuals requiring renal replacement therapy by the sixth decade of life. This disease has been associated with various extrarenal manifestations including hepatic cysts and cerebral aneurysm¹.

Mutations in PKD1 or PKD2 gene are associated with ADPKD. The PKD1 gene, the most frequently mutated, is large and spans 54kb consisting of 46 exons, generates a 14kb transcript and encodes a 4302 amino acid protein called polycystin-1 (PC1)²⁻⁵. In silico, polycystin-1 analysis revealed that the amino terminal portion consists of multimodular domains described as: leucine-rich repeats flanked by cysteine-rich structures (LRR), a LDL-A domain, a C-type lectin domain, 16 PKD (Ig-like) tandem repeats, a REJ-like domain (receptor egg jelly), a GPS domain (G protein-coupled receptor proteolytic site)^{4,5}. Evidence of post-translation modification of PC1 has been provided from ectopically expressed PC1 undergoing partial cleavage at the GPS⁶. These domains are followed by 11 transmembrane domains. The first intracellular/cytoplasmic loop contains a so-called PLAT domain (for polycystin-1, lipoygenase and alpha toxin)⁷⁻¹⁰ whereas the last intracellular loop contains a potential PEST sequence and at the carboxy terminal end, a coiled-coil domain comprised of 5 heptad repeats. Based on these predictions, the polycystin-1 protein could act as a cell surface receptor

or participate in a large membrane protein complex that could be involved in cell-cell and/or cell-matrix interactions. The polycystin-2 is a 6 transmembrane protein that is thought to act as a calcium-permeable cation channel.

A wide spectrum of mutations for the PKD1 gene has been reported and most of which are unique to a single family. Most frequently, these PKD1 mutations are predicted to cause a truncated protein due to frameshift, deletion, nonsense or splicing defects although a significant minority are missense¹¹⁻¹⁴. Many patients have potential truncated Pkd1 genes and despite the other PKD1 allele being expressed developed PKD^{15,16}.

The pathogenetic mechanism leading to ADPKD is still not clearly established. A proposed PKD1 pathogenetic mechanism for renal cyst development is a gene-dosage-dependent process based on a loss-of-heterozygosity phenomenon i.e. "two-hit" mutation and an overexpression mechanism. Evidence for recessive inactivation of PKD1 was provided by somatic mutations, in addition to an inherited germ line mutation, in a subset of renal cysts that lead to cellular clonal expansion and cystogenesis¹⁷⁻¹⁹. In contrast, a gain-of-function mechanism is supported from overexpression of the normal PKD1 allele shown in ADPKD renal studies, by increased renal PKD1 expression levels as well as by the majority of cysts staining positively for polycystin-1^{15,20,21}.

In mice, cystogenesis can result from various Pkd1 mutation mechanisms. Loss-of-heterozygosity or loss of single allele/haploinsufficiency has been shown to be associated with formation of renal cysts²²⁻²⁹. Recently, we have produced transgenic mice with

specific renal Pkd1 overexpression that developed a cystic phenotype³⁰. Altogether, these results indicated that a protein dosage imbalance of the renal polycystin-1 can lead to a PKD phenotype and suggested that a similar mechanism may prevail in human ADPKD.

To understand the role of the polycystin-1 extracellular region in mice, we have generated a truncated form of the Pkd1 gene based on two previously described truncated mutations in human ADPKD (WS219 and p130) at the extracellular region/membrane junction^{11,14} and lacking specifically the membrane-spanning and intracellular domains. Using homologous recombination on our previously isolated and characterized Pkd1-BAC, we have engineered a truncated polycystin-1 protein. Expression of this truncated polycystin-1 transgene caused a slow progressive cystic phenotype associated with renal insufficiency as described in human ADPKD.

RESULTS

Production of Pkd1_{extra}-BAC and transgenic mice

To identify the role of the extracellular domain, we engineered a truncated polycystin-1 form for functional analysis based on previously mutations documented in two patients (WS219 and p130)^{11,14}. The Pkd1 gene was deleted just prior to the first transmembrane region (**Fig.2-1A**), thereby removing by homologous recombination the membrane-spanning and intracellular region in the Pkd1-BAC that we have isolated and characterized³⁰. The Pkd1-BAC was modified with a recombination vector that contained 1.25kb of the Pkd1 exon23-25 gene till nucleotide 31,129 corresponding at amino acid 3043 just prior to the first transmembrane region, that included two point mutations to generate a stop codon, and adjoined to 1.1kb of Pkd1 non-coding sequences in exon 46 (299bp), poly A and flanking sequences (864bp) for appropriate transcript processing (**Fig.2-1B**). The novel junctions were sequenced and this vector served in homologous recombination to produce the Pkd1_{extra}-BAC. This Pkd1_{extra}-BAC was analyzed with four restriction enzyme digestions and seven probes as previously described for wild type Pkd1-BAC³⁰. Figure 2-1C is a representative example of these analyses. The Pkd1_{extra}-BAC was digested with MluI and ClaI truncating the Tsc2 regulatory elements and 5' half of the gene to ensure lack of Tsc2 exogenous expression in all tissues and to remove the BAC vector sequences. This 77 kb Pkd1_{extra} fragment was isolated, purified and used for oocytes microinjection.

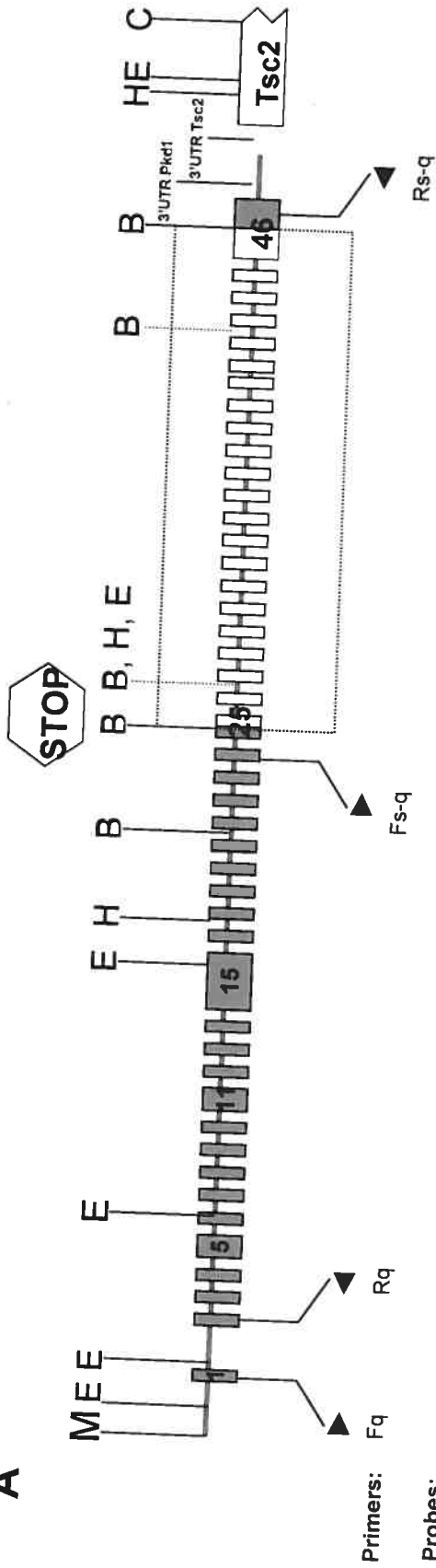
Figure 2- 1 (page suivante): Production of Pkd1_{extra}-BAC construct

A) Schematic representation of the combined wild type and extracellular region of Pkd1-BAC construct. Region of the Pkd1 gene conserved in the Pkd1_{extra}-BAC are indicated in dark grey; deleted Pkd1 region in Pkd1_{extra}-BAC are shown in open box; the insertion of a termination translation codon in exon 25 of Pkd1_{extra}-BAC is indicated by a STOP sign. Exons (boxes) numbers are indicated and introns/non-coding sequences (dark grey line). Six probes consisting in exon 1, 7-15, 15-20, 23-25, 36-45, 46 are illustrated and two set of primers for quantitative (Fq, Rq) and semi-quantitative (Fs-q, Rs-q) expression analysis are indicated. Restriction sites are indicated above the construct as follows: E, EcoRI; B, BamHI; H, HindIII; C, ClaI; M, MluI.

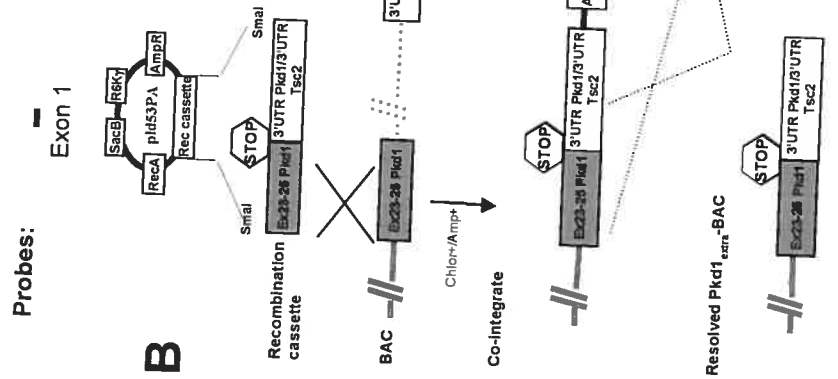
B) Illustration of the pld53PA-dependent homologous recombination steps on the Pkd1_{WT}-BAC that lead to the generation of Pkd1_{extra}-BAC. The BAC recombination vector was produced by introducing into the pld53PA the recombination cassette consisting of Pkd1 exon23-25 and 3'UTR Pkd1/3'UTR Tsc2. This vector was recombined into the Pkd1_{WT}-BAC, following selection (chloramphenicol and ampicillin), to produce BAC co-integrates. These co-integrates underwent a second selection event (chloramphenicol and sucrose) to eliminate the vector and the duplicated regions and thereby, generated the resolved Pkd1_{extra}-BAC for these studies.

C) Comparison of the genomic restriction map analysis of Pkd1_{WT}-BAC and the modified Pkd1_{extra}-BAC. Analysis by Southern blotting confirmed that the Pkd1 extracellular region was intact with exon 1 and exon 7-15 probes in Pkd1_{extra}-BAC whilst the region between the exons 25 and 46 has been deleted as revealed with exon 23-25 and 46 probes. The four different probes are indicated over the individual blots whereas the restriction enzyme digestions and expected size are indicated under the blots. M: λ HindIII marker; E: EcoRI; B: BamHI; WT: Pkd1-BAC; Ex: Pkd1_{extra}-BAC.

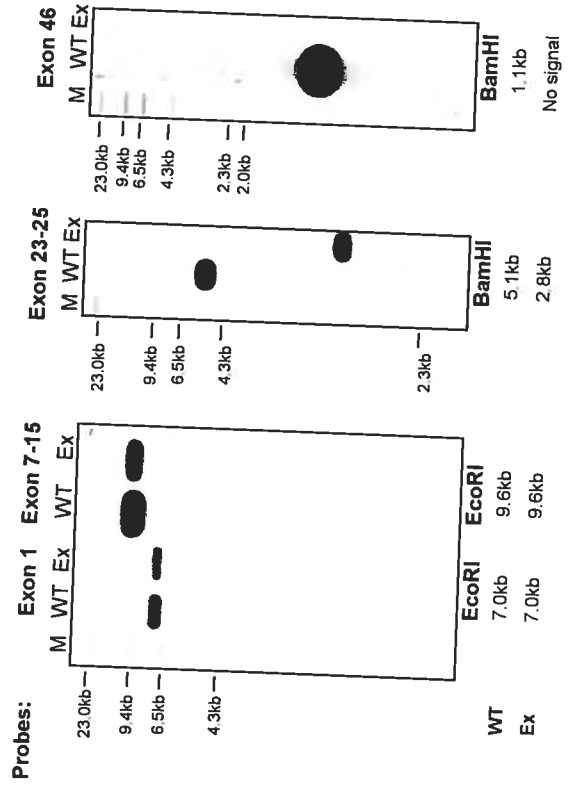
A



B



C



Four Pkd1_{extra} transgenic mouse lines were generated carrying multiple copies of the transgene (2, 22, 50, 86). These transgenic lines were analyzed for transgene integrity by genomic DNA analysis using polymorphisms, Southern and PCR (Fig.2- 2A &B). All lines showed intact copies of the 5' Pkd1_{extra} transgene flanking sequences based on a polymorphism (~4.5kb upstream) specific to the 129Sv strain from which the BAC derives compared to the C57BL/6J and CBA/J strains that served to generate transgenic mice (Fig.2- 2A). The Pkd1_{extra} gene integrity was demonstrated by Southern blotting analysis using three restriction enzyme digests and five probes (Fig.2- 2B).

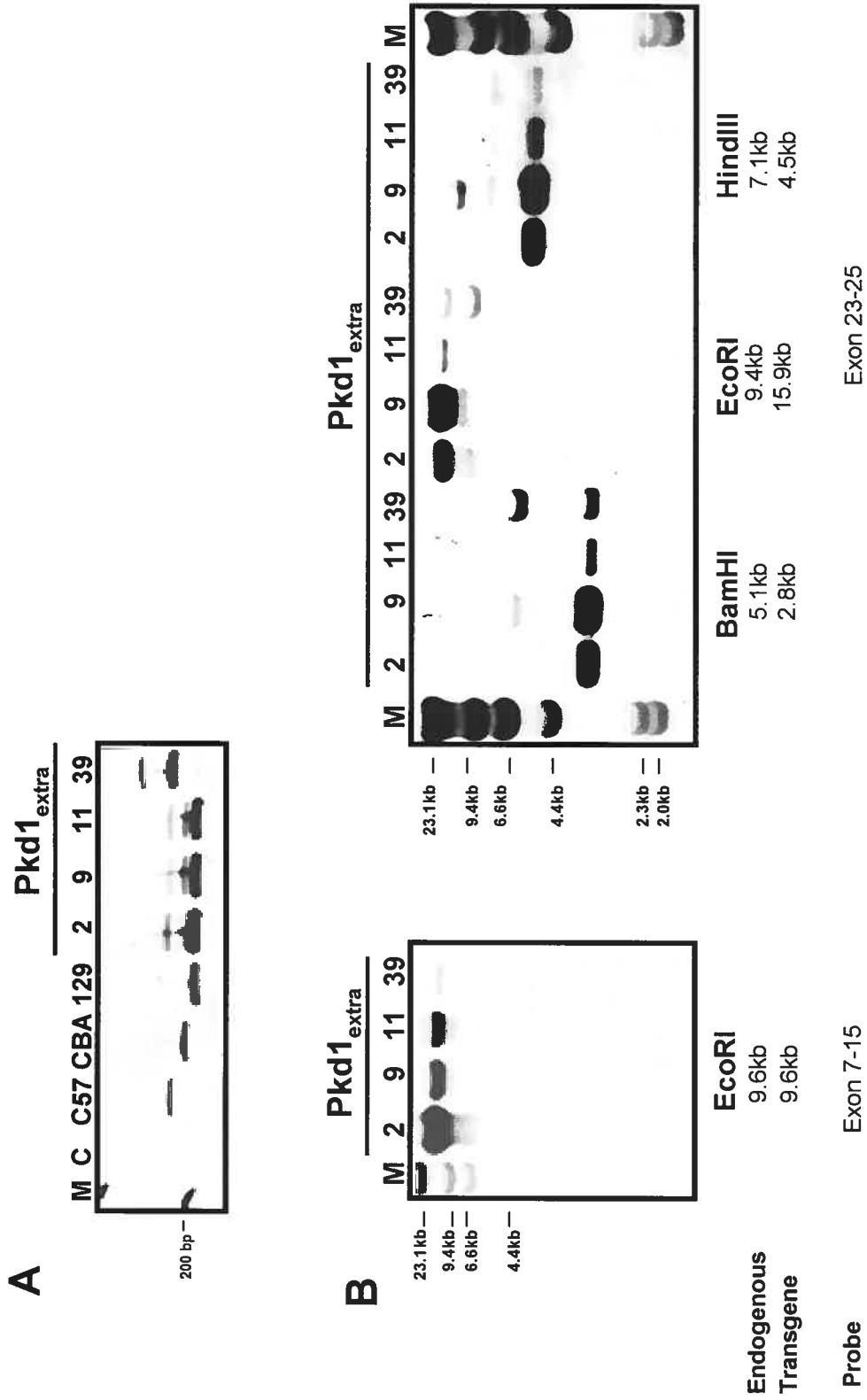


Figure 2- 2: Genomic analysis of Pkd1_{extra} transgenic mice

A) Genomic analysis of the 5' regulatory region based on our identification of a polymorphism at ~4.5kb upstream of the ATG translation initiation codon of murine Pkd1 gene. M: 100bp DNA ladder; C: H₂O, control for PCR reaction; C57: C57BL/6J mice; CBA: CBA/J mice; 129: 129/sv mice. B) Analysis of the transgene body was verified using an EcoRI digestion with the exon 7-15 probe, whereas the 3' end of Pkd1_{extra} transgene was analysed using BamHI, EcoRI and HindIII digestions with exon 23-25 probe. M: λ HindIII marker.

Expression analysis of the Pkd1_{extra} transgene

Transcript analysis was carried out by several means. First, renal transgene expression was investigated in the different lines by Northern blotting using Pkd1 probe that will detect the transgene transcript expected at 9.76kb whereas the endogenous transcript will be at 14.14kb and a gapdh probe at 1.2Kb to serve as internal control. Among the four different transgenic lines (n=3 to 5 mice per line), a range of renal expression levels were obtained for the Pkd1_{extra} transgene from ~2- to ~80-fold above the endogenous expression level (**Fig.2- 3A**). Interestingly, the Pkd1_{extra} transgene levels did not appear to alter the endogenous Pkd1 expression levels. Second, semi-quantitative RT-PCR was performed for the 4 transgenic lines at adult age and was designed to distinguish the transgenic from the endogenous transcript by using primers in exon 24 and 3'UTR due to the novel 3' Pkd1_{extra} junction (**Fig.2- 1A**). The expression of the truncated Pkd1_{extra} transgene was compared to S16 ribosomal protein gene product as an internal control. Various quantities of RT aliquots were used to determine the linear range for analysis of expression. The Pkd1_{extra} transgene was expressed in all tested tissues (kidneys, brain, liver, lung, spleen) of the four transgenic mouse lines with highest expression in brain and lung (**Fig.2- 3B**). The expression pattern appeared to follow that of the Pkd1 endogeneous gene. Third, quantitative expression analysis for total endogenous and transgene expression were carried out by real-time PCR with primers in exon1 and 2, on numerous tissues including kidneys, brain, heart, lung, spleen, liver and pancreas. As shown in figure 2- 3C, renal expression of total Pkd1 increased proportionally with the number of transgene copy. In comparison to the kidneys, higher levels of total Pkd1 expression were measured in brain, heart and lung whereas spleen, liver and pancreas had

in general lower levels of total Pkd1. Most transgenic lines appeared to follow the endogenous expression pattern albeit for line 11.

Expression of the transgene protein in comparison to endogenous Pkd1 and control were also quantified in adult kidneys (n=2) from transgenic lines by immunoblotting. Protein produced by Pkd1_{extra} transgene, polycystin-1 extracellular domain and the entire polycystin-1 was detected using the monoclonal antibody 7e12 that recognize the LRR domain of pc1 (**Fig.2- 3D**). The protein bands specificity were confirmed by absence of pc1 band in extracts from Pkd1^{-/-} embryos (e17.5) (data not shown) and reciprocally, by the presence of a strong polycystin-1 band in transgenic kidney extracts of SBPkd1_{TAG} mice overexpressing the native Pkd1 gene as positive control. Truncated pc1 protein from Pkd1_{extra} transgene has a predicted size without post-transcriptional modification of 328kDa in comparison to the 466kDa full length pc1. Considering that the quantity of protein was adjusted for the immunoblot, the proportion of pc1_{extra} in the kidneys was increased with the transgene copy numbers and RNA expression levels, indicating that this truncated protein is relatively stable. To control protein extraction and detection, we have used for internal assessment the protein utrophin of 400kDa that was monitored for expression (**Fig.2- 3D**).

Figure 2- 3 (page suivante): Expression analysis of Pkd1_{extra} transgene

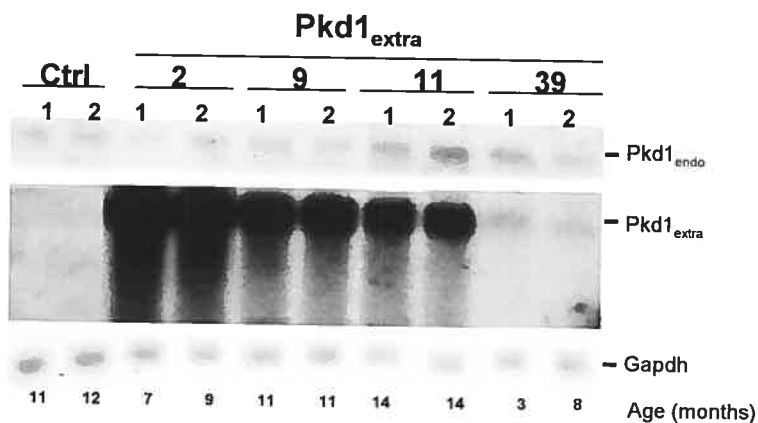
A) Analysis of the renal adult tissues (n=2) of the four transgenic lines and two age-matched mouse controls were monitored by Northern blot for Pkd1_{extra} transgene using exon15-20 probe and endogenous Pkd1 using exon36-45 probe. Expression of Gapdh served as internal RNA loading control. The transgene expression range was from ~2- to 80-fold over endogenous Pkd1 expression. Ctrl: non-transgenic (CBAXC57BL/6)F1 mice negative for the transgene from the same genetic background; transcripts are identified as Pkd1_{endo} (endogenous Pkd1), Pkd1_{extra} and Gapdh.

B) Semi-quantitative RT-PCR expression studies were carried out to detect the Pkd1_{extra} transgene specifically. Representative analysis from Pkd1_{extra} transgenic line 2 is shown for kidney, lung, brain, liver and spleen, using primer Fs-q (exon 24) and Rs-q (3' UTR) as identified in Figure 2-1A. Highest expression was consistently observed in kidney, lung and brain for all lines. M: 100bp DNA ladder; K: kidney, Lu: lung, B: brain, Li: liver, S: spleen, S16 ribosomal protein S16 served as internal control.

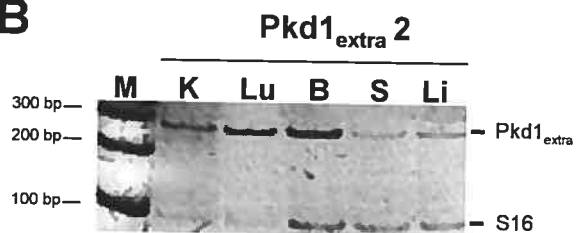
C) Quantitative real-time PCR was carried out in triplicata for Pkd1_{extra} mice (n=3) of all transgenic lines. Analysis on kidney, lung, brain, liver, heart, spleen and pancreas was performed using primer in exon 1 and exon 2 of murine Pkd1 gene. Transgene expression analysis followed the Pkd1 endogenous expression pattern and was proportional to the transgene copy number. *: n=1, **n=2.

D) Endogenous and transgenic polycystin-1 protein expression levels in adult kidneys of the four Pkd1_{extra} mouse lines were analyzed on a gradient Western blot. Polycystin-1 was detected using 7e12 monoclonal antibody (gift of Drs C. Ward and P. Harris). Protein loading quantity was adjusted for comparable analysis of Pkd1_{extra} lines 2:9:11:39 in the following ratio of 1:1:2:10 respectively with levels of 200µg for line 39 and the controls (CBAXC57BL/6) F1 mice (200µg) and SBPkd1_{TAG} (100µg) overexpressing full length PKD1. Expression of the truncated polycystin-1 protein had a similar range as observed for transcript levels with levels highest in line 2 and lowest in line 39. pcl_{endo}: endogenous pcl protein; pcl_{extra}: pcl_{extra} truncated protein.

A



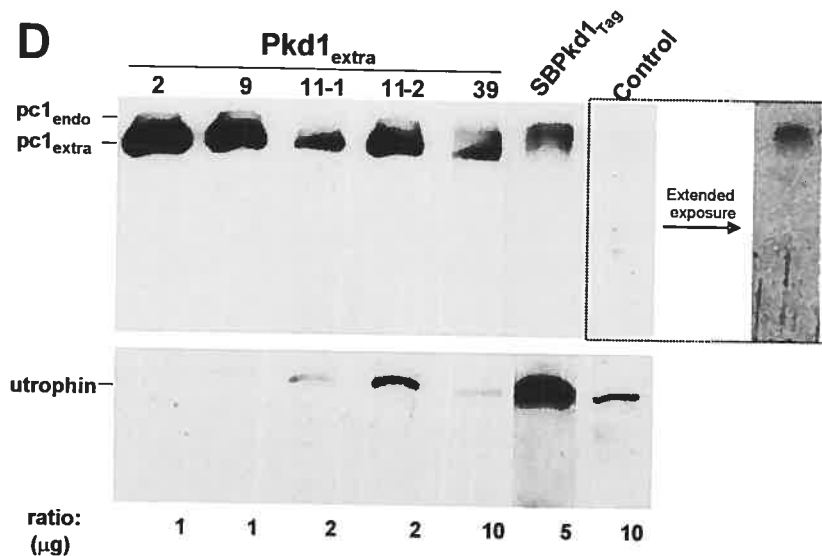
B



C

Mouse lines	n	Pkd1 _{endo + extra} /Pkd1 _{endo} <i>kidney</i>	Pkd1 _{endo + extra} /renal Pkd1 _{endo + extra}						
			<i>kidney</i>	<i>brain</i>	<i>heart</i>	<i>lung</i>	<i>spleen</i>	<i>liver</i>	<i>pancreas</i>
Control	3	1	1,0	3,2	1,8	2,3	0,4	0,5	0,4*
Pkd1 _{extra 2}	3	87	1,0	1,3	2,0	1,4	0,2	0,3	0,4*
Pkd1 _{extra 9}	3	61	1,0	1,0	1,4	1,0	0,1	0,5**	0,0*
Pkd1 _{extra 11}	3	14	1,0	0,8	0,8**	0,7	0,2	0,2	1,3**
Pkd1 _{extra 39}	3	2	1,0	1,5	2,0	1,5	0,5	0,5	0,5*

D



Altered renal physiologic function in Pkd1_{extra} transgenic mice

All mice from the Pkd1_{extra} transgenic lines exhibited renal functional anomalies resembling those in ADPKD whereas age-matched controls did not. The renal physiology was investigated by urine and blood analysis (**Tab. 2-I, 2-II**). Transgenic mice displayed 3-4-fold increase in urine volume and this concentrating defect progressed with age (≥ 15 months). Consequently, renal parameters in these mice also showed decrease in urine osmolality, blood urea nitrogen (BUN), creatinine, protein and ion excretion (**Tab.2-I**). This concentrating defect is a frequent observation in human ADPKD. In addition, the urine protein composition from the four Pkd1_{extra} transgenic mouse lines (n=2-7 per line) was also monitored qualitatively on SDS-PAGE. As shown in figure 2- 4, transgenic mice of all lines displayed non-selective proteinuria. This abnormal protein leakage was detectable at 12 months and progressed with age. Consistent with these altered urine parameters, levels of serum BUN and serum creatinine were increased, indicating renal insufficiency (**Tab.2- II**). Since renal insufficiency frequently causes hematologic anomalies, hematocrit was measured in all the Pkd1_{extra} transgenic mouse lines. These mice (n ≥ 2) showed important decrease in hematocrit levels, providing evidence for chronic renal insufficiency.

Table 2-I: Evidence of altered renal physiology in Pkd1_{extra} transgenic mice

Mice	n	Urine volume ml	n	Osmolality mosmol/kg	n	BUN mmol/L	n	Creatinine mmol/L	n	Protein g/L
Control	4	0.9 ± 0.3	4	1907.3 ± 551.3	5	1316.5 ± 570.3	5	3.8 ± 1.1	4	8.6 ± 3.8
SBM	3	3.9 ± 1.0	2	485.5 ± 60.1	2	268.8 ± 36.4	2	0.7 ± 0.4	2	4.4 ± 4.0
Pkd1_{extra} 2	4	2.8 ± 0.6**	5	737.2 ± 150.9*	5	407.7 ± 86.9*	5	1.1 ± 0.3**	4	0.7 ± 0.4*
Pkd1_{extra} 9	4	2.8 ± 1.4	5	731.2 ± 86.9*	5	455.4 ± 73.8*	5	0.8 ± 0.4**	5	0.4 ± 0.2*
Pkd1_{extra} 11	4	3.5 ± 1.6*	6	633.8 ± 89.1*	5	312.6 ± 49.0*	6	1.0 ± 0.3**	3	0.8 ± 0.4*
Pkd1_{extra} 39	4	3.5 ± 0.8**	3	523.0 ± 17.5*	3	278.1 ± 47.8*	3	0.7 ± 0.4**	3	0.4 ± 0.2*

Control: non-transgenic (CBA x C57BL/6) F1 mice used as negative control; SBM: transgenic PKD mouse model used as positive control; four Pkd1_{extra} transgenic lines: Pkd1_{extra} 2, 9, 11, and 39. Values are mean ± standard deviation; *, p ≤ 0.05; **, p ≤ 0.005.

Table 2-II: Chronic renal insufficiency in Pkd1_{extra} transgenic mice

Mice	n	Serum BUN μmol/L	Serum Creatinine μmol/L	n	Hematocrit %
Control	3	5.6 ± 0.7	18.3 ± 1.2	3	45.5 ± 1.4
Pkd1 _{extra} 2	6	20.2 ± 7.4**	31.8 ± 8.2*	2	37.6 ± 2.9*
Pkd1 _{extra} 9	4	12.0 ± 2.1*	21.3 ± 2.4	2	27.4 ± 11.9
Pkd1 _{extra} 11	4	18.3 ± 13.9	44.0 ± 32.1	3	30.9 ± 6.2*
Pkd1 _{extra} 39	5	20.3 ± 17.6	32.0 ± 22.0	3	38.9 ± 1.7*

Control: non transgenic (CBA x C57BL/6) F1 mice used as negative control; four Pkd1_{extra} transgenic lines: Pkd1_{extra} 2, 9, 11, and 39. Values are mean ± standard deviation; * p: ≤ 0.05; ** p: ≤ 0.005.

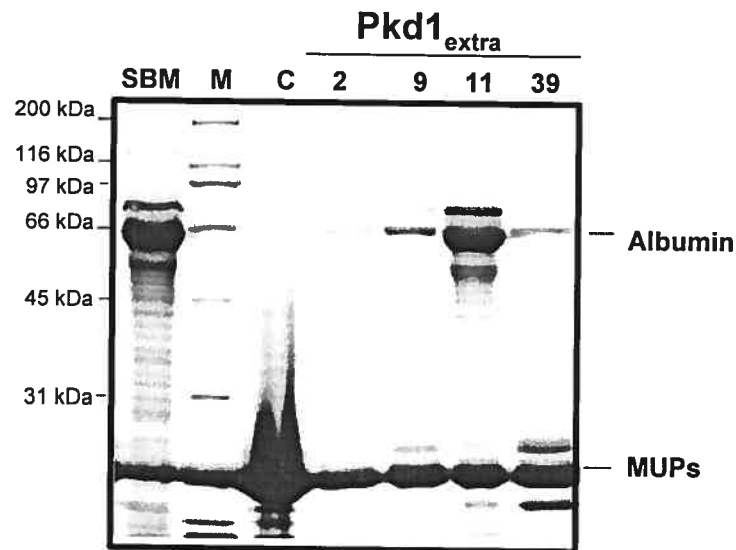


Figure 2- 4: Proteinuria in *Pkd1_{extra}* transgenic mice

Urinary protein analysis of the four *Pkd1_{extra}* transgenic mouse lines was monitored qualitatively on SDS-PAGE. Urine protein from all mice showed low molecular weight bands that represent normally excreted major urinary proteins (MUPs). In addition, urine samples from all mice of the four *Pkd1_{extra}* transgenic lines 2, 9, 11 and 39 showed severe spillage of a ~ 66 kDa protein, probably albumin, indicative of proteinuria reaching levels comparable to the SBM control mouse with pronounced PKD. SBM: PKD mouse model used as a positive control; M: protein molecular weight marker; C: non-transgenic (CBAXC57BL/6) F1 mice used as a negative control; MUPs: major urinary proteins.

Histopathologic anomalies in Pkd1_{extra} mice

In attempt to follow and predict the cystogenic disorder in the Pkd1_{extra} transgenic mouse, we carried out non-invasive imaging by ultrasound measurements using a VisualSonics Vevo 660 Imaging System with a 40-MHz scanhead. Analysis of Pkd1_{extra} transgenic lines 11 and 39 (n=8) showed that majority of mice (21-24 month-old) had readily detectable multiple macro and microcysts (**Fig.2- 5A**).

To investigate the phenotype induced by the transgene expression, the four Pkd1_{extra} transgenic mouse lines (n>10per line) including founders and progenies were subjected to complete histological analysis. All 44 transgenic mice exhibited characteristic features of PKD whereas the control non-transgenic did not develop these disorders. Our pathologic analysis supported our hypothesis and showed very mild renal tubular dilatation in 1-2 month old Pkd1_{extra} mice. Because tubulogenesis in organ culture was altered ex vivo, by incubating with peptides against the extracellular domain (Van Adelsberg, 1999), we queried whether Pkd1_{extra} had a possible function in regulating ureteric branching. To evaluate ureteric branching or tubulogenesis, we quantified the number of glomeruli/nephron per mm² from stained section in young Pkd1_{extra} transgenic mice at 1.5 months of age as previously described (Luo *et al.*, 1995; Majumdar *et al.*, 2003). Analysis of mice mice with lowest (Pkd1_{extra} line 39, n=3) and high expression of Pkd1_{extra} transgene (Pkd1_{extra} line 9, n=3) revealed that Pkd1_{extra} transgenic kidneys have a similar number of glomeruli relative to wild type controls (n=5). However with advancing age, the renal tubular dilatation phenotype appeared to progress, a characteristic of ADPKD. Both kidneys of Pkd1_{extra} transgenic mice became pale and

severely affected by macro- and micro-cysts (**Fig.2- 5B,C**). Glomeruli displayed prominent cysts associated with hyperplasia of parietal epithelial cells. The glomerular tufts were hypocellular and became sclerotic. The renal parenchyma displayed tubular cysts but also, loss of tubules and presence of mild to extensive interstitial fibrosis.

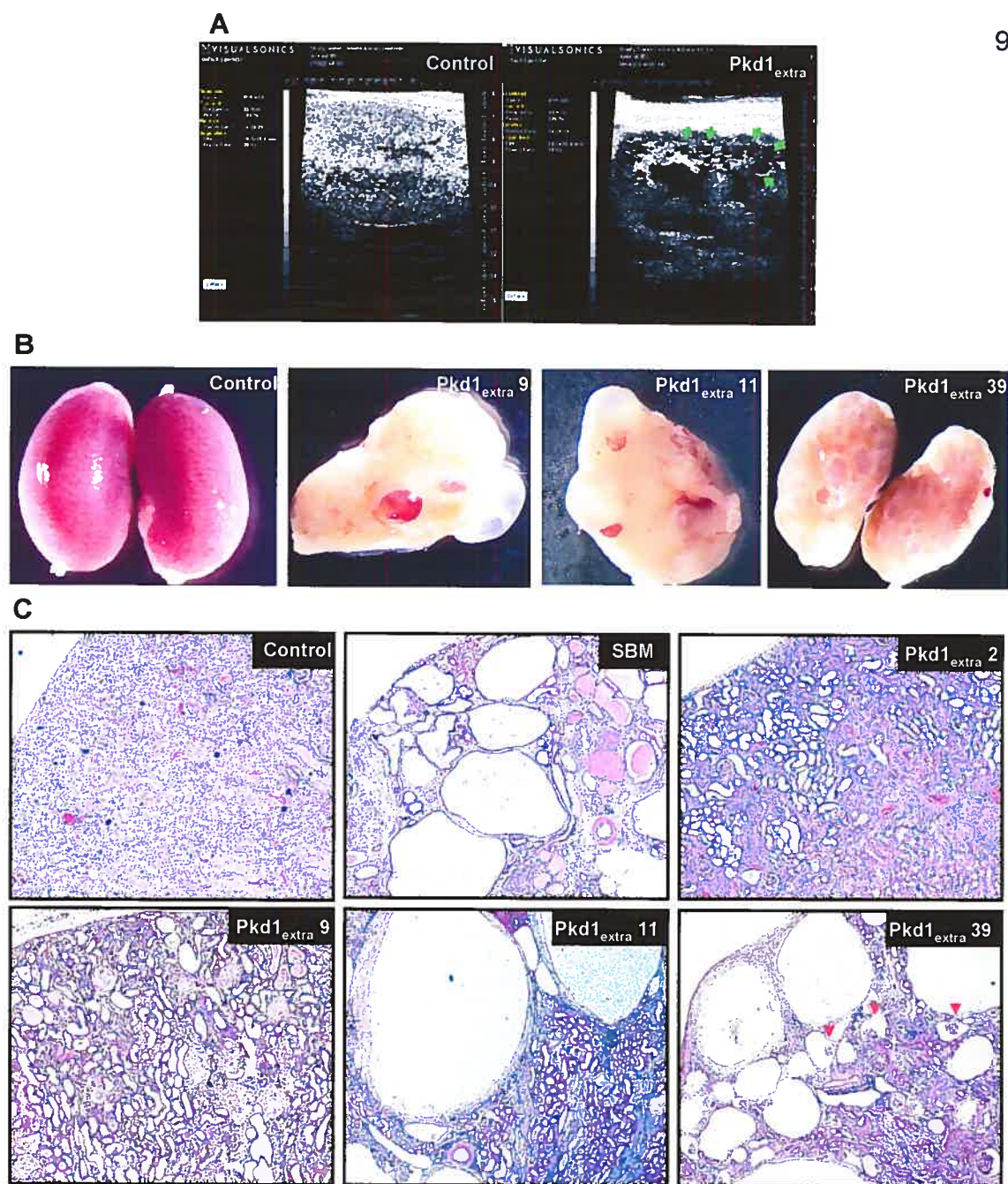


Figure 2- 5: Cystogenesis in *Pkd1_{extra}* transgenic mice

A) High-resolution ultrasound kidney images. Non-invasive imaging approach to monitor cysts progression in transgenic mice. Green arrows indicate cysts.

B) Kidneys from a non-transgenic (CBAXC57BL/6) F1 control mouse were compared to kidneys of *Pkd1_{extra}* transgenic mouse lines. Kidneys with presence of pronounced macrocysts that completely remodelled the renal architecture.

C) Histologic analysis of renal cortex from a non-transgenic (CBAXC57BL/6) F1 control mouse, transgenic PKD mouse model (SBM) and all four *Pkd1_{extra}* transgenic lines (2, 9, 11 and 39). *Pkd1_{extra}* transgenic mice showed numerous tubular and glomerular cysts (red arrowheads) as well as presence of interstitial fibrosis and protein deposits. Sections were stained with Hematoxylin and Eosin and magnification: 40X.

Since the $Pkd1_{\text{extra}}$ transgene is expressed in several tissues, histologic analysis was performed on various organs. Interestingly, most tissues appeared normal at the exception of the spleen. The spleen architecture was distorted with expansion of the white pulp leading to splenomegaly as determined by the ratio of spleen to body weight in several mice. In comparison to control, there is up to 6-fold increase (mean ~ 1.8 -fold) in transgenic spleens. In addition, the spleen also displayed the presence of lymphoid infiltrates as well as frequent fibrosis as noted in the kidneys.

Animals from these $Pkd1_{\text{extra}}$ transgenic lines manifested late-onset of renal failure. Indeed, the mean age of mice that died in line 2 (n=10) was $\sim 17.3 \pm 4.5$ months of age, line 9 (n=9) 23.0 ± 5.5 , line 11 (n=20) 17.7 ± 4.4 and line 39 (n=15) 17.4 ± 6.9 months whereas the mean survival age for controls of the same genetic background ranged between 23-29 months.

Identification of Pkd1_{extra} renal molecular targets in Pkd1_{extra} mice

Because we have previously detected increased c-myc renal expression in human ADPKD kidneys and in a PKD transgenic mouse model due to Pkd1 overexpression, we next evaluated renal c-myc expression levels in the four transgenic Pkd1_{extra} mouse lines. When mild renal phenotype was observed at 2-4 months of age, these mice had little to no difference in endogenous c-myc expression relative to control. However, c-myc expression was 1.5- to 3-fold increased at 18-24 months of age correlating with severe cystogenesis defects and ESRD (Fig.2- 6).

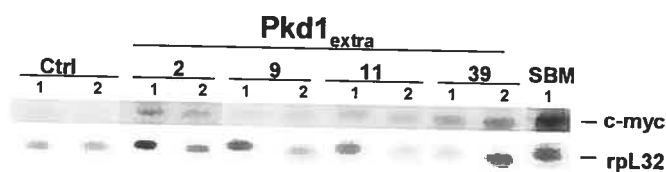
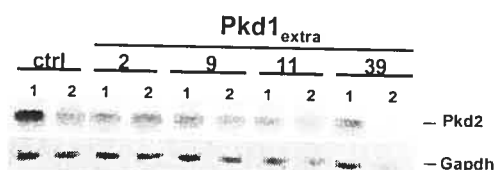


Figure 2- 6. Expression analysis of c-myc in Pkd1_{extra} transgenic mice

Expression levels of c-myc were analyzed by Northern blot in kidneys of 18-24 months old Pkd1_{extra} transgenic mice (n=2). Transcript levels of c-myc were increased by 1.5-3-fold above renal control RNA. Ctrl: non-transgenic (CBAxC57BL/6)F1 mice of same genetic background used as negative control; SBM: transgenic mice overexpressing c-myc used as positive control. 1, 2: different mice from the same mouse line. rpL32: ribosomal protein L32 served as loading control.

Since native full length Pkd1 is implicated in a large complex with Pkd2 in the kidneys and that Pkd2 dysregulation can cause cysts, we queried whether Pkd2 renal expression level might be involved in Pkd1_{extra} mice. Analysis of kidneys was performed in all transgenic Pkd1_{extra} mouse lines. In comparison to control, there is no increase expression of endogenous Pkd2 in Pkd1_{extra} mice (**Fig.2- 7A**). However, the protein expression levels of Pkd2 determined by immunoblot appeared to be increased by a mean of ~6-fold in Pkd1_{extra} (n=7) relative to control (n=2) mice (**Fig.2- 7B**), suggesting that the pc1 extracellular region could modulate pc2 protein stabilization or prevent degradation. Interestingly, the increase of pc2 protein expression levels in Pkd1_{extra} mice does not seem to correlate with the transgene expression levels.

A



B



Figure 2- 7: Expression analysis of Pkd2 and polycystin-2 in Pkd1_{extra} transgenic mice

A) Expression analysis of Pkd2 in Pkd1_{extra} transgenic mouse lines (n=2). Transcript expression of Pkd2 was analyzed by Northern blot using a 2.2Kb cDNA murine probe. Levels of Pkd2 expression appeared unaltered in transgenic relative to control renal tissues. Expression of Gapdh served as internal RNA loading control. Ctrl: non-transgenic (CBAXC57BL/6)F1 mice negative for the transgene from the same genetic background.

B) Protein expression analysis of Pkd2 was carried out on Western blot using YCC2 antibody (gift of Drs Y. Cai and S. Somlo). All renal tissues analyzed from the Pkd1_{extra} transgenic mouse lines (n=1 or 2) and controls (n=2) showed increased polycystin-2 expression from 1.6 to 21.8-fold relative to controls levels. Expression of actin served as internal RNA loading control. Ctrl: non-transgenic (CBAXC57BL/6)F1 mice negative for the transgene from the same genetic background.

DISCUSSION

This study addresses the molecular and cellular role of the extracellular region of the murine Pkd1 gene in vivo. The Pkd1 gene was truncated by homologous recombination in a BAC vector to produce the Pkd1_{extra} transgene. The Pkd1_{extra} transgenic mice showed a ~2- to ~80-fold increase in transcript and protein expression of the Pkd1 extracellular region and reproducibly developed late renal morphological alterations typical of PKD. Renal insufficiency is apparent at late age and mice die of renal failure. This study demonstrates that the murine Pkd1 extracellular gain-of-function by itself or the imbalance proportion of the Pkd1 extracellular and intracellular regions in the kidneys is sufficient to produce a PKD renal phenotype. Polycystin-1 extracellular region may act as a dominant negative mutation and/or a balance ratio of cleaved polycystin-1 extracellular domain with transmembrane and intracellular domains being necessary for proper signaling.

The design of our truncated polycystin-1, homologous to known human ADPKD mutations, corresponds to the encoded form potentially expressed in two patients of different truncated mutations at the extracellular domain/membrane junction (WS219 and p130) or at the natural GPS cleavage site^{11,14}. This polycystin-1 form devoided of the membrane-spanning and intracellular regions should be tethered to the membrane and/or soluble/secreted, normally glycosylated and maintain its structural conformation/folding based on previous receptor analysis³⁸⁻⁴¹. Consequently, we have addressed the role of Pkd1_{extra} gain-of-function with the systemic Pkd1 regulation context. By homologous recombination, we have truncated the extracellular and membrane-spanning domain but

conserved a portion of the non-coding sequences in exon 46 and polyA sequences.

These Pkd1 sequences were likely to include most of the regulatory elements of Pkd1 and potentially confer endogenous expression pattern. Complete characterization of the murine Pkd1_{extra}-BAC, directly compared to the wild type Pkd1-BAC, confirmed the integrity of the Pkd1 membrane- and intracellular-truncated gene. From this modified BAC, a Pkd1_{extra} fragment containing ~24.8kb of upstream and ~20.7kb downstream sequences was purified away from the Tsc2 gene and BAC vector to prevent interference by the Tsc2 gene, which can also induce a cystic phenotype⁴²⁻⁴⁴, as well as to avoid the inhibitory effect of prokaryotic sequences⁴⁵.

Four different Pkd1_{extra} transgenic founder mice and lines were produced that express the Pkd1_{extra} transgene systemically. In fact, the Pkd1_{extra} transgene transcript level in the kidneys appeared to correlate with the transgene copy-numbers in these four lines. The expression pattern of the Pkd1_{extra} transgene generally paralleled that of the endogenous Pkd1 gene albeit for slightly lower levels in the brain and lung. Such findings suggested that the Pkd1_{extra} transgene flanking regions contained most of the necessary regulatory elements for proper expression and regulation. Furthermore, the protein levels of Pkd1_{extra} in the kidneys correlated with the transcript levels, indicating that a stable truncated Pkd1_{extra} protein was produced and reached substantial expression levels in some transgenic lines. Such high cellular level of Pkd1_{extra} protein is consistent with the protein being mostly tethered at the membrane as observed in cells with overexpressing double-tagged Pkd1⁶. In this case, our results of abundant Pkd1_{extra} in renal cells would predict increase cell-cell adhesion.

Of interest, these transgenic mice had complete penetrance of the phenotype. The Pkd1_{extra} founder and mouse lines shared several physiopathologic features with ADPKD. These include the development of cysts in cortex, medulla and glomeruli together with epithelial hyperplasia, interstitial fibrosis and focal interstitial inflammation. Since the PKD phenotype was consistently observed in all 4 different transgenic founder mice and the transgene integration into the mouse genome is a random phenomenon, the phenotype cannot result from chromosomal position effect but only from Pkd1_{extra} expression. Hence our results provide clear evidence that overexpression of a truncated/mutated Pkd1, Pkd1_{extra}, can produce multiple renal cysts. Importantly, these Pkd1_{extra} mice are the first transgenic mouse model generated by mimicking mutations that occurs in human PKD1 gene.

Noticeably, expression of the transgene Pkd1_{extra} in the kidneys at various levels lead to similar progression and severity of the phenotype. This finding indicate that Pkd1_{extra} mice phenotype may be limited by ligand or interacting partner availability and therefore the signaling disruption cannot be increased.

In human, few PKD1 truncating mutations resemble the naturally cleaved form of Pkd1 producing an extracellular region without the transmembrane and intracellular region lead to ADPKD. This phenotype was reproduced in the mouse with the Pkd1_{extra} transgene. In contrast, other PKD1 point mutations in the vicinity of the GPS are also associated with ADPKD but in this case appears to inhibit Pkd1 cleavage in MDCK cells⁶. Together these observations raise the intriguing possibility of a dynamic interaction between the

extracellular region and intracellular region that would be tightly regulated to transmit changes from the microenvironment through channel activity or signaling pathways.

One of the major mediator of cystogenesis, c-myc, can induce PKD by itself, is highly expressed in kidneys of all human ADPKD analyzed as well as in kidneys of Pkd1 overexpressing transgenic mice^{20,30}. We also determined that c-myc expression was also elevated in Pkd1_{extra} kidneys, suggesting that inactivation of a signaling pathway downstream of Pkd1 extracellular region can cause dysregulation of c-myc. Because Pkd1 and Pkd2 can interact together in a large complex and can both produce ADPKD, we monitored whether Pkd2 expression was altered in Pkd1_{extra} kidneys. Interestingly, Pkd2 transcript levels remained unchanged whereas the level of protein expression was significantly increased. These results combined with the observation that Pkd1 expression in cells was able to modulate the localization and perhaps the function of pc2⁴⁶ raise the question whether pc2 play a role in Pkd1_{extra} phenotype.

The novel Pkd1_{extra} mice constitute the first model based on human ADPKD mutations that can reproduce the disease and provide major insights into Pkd1 ligands and interacting partners as well as signaling pathway possibly. Importantly, our findings have established the basis for future studies that will dissect the Pkd1 multimodular extracellular domain functions.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to M. Ouellet for technical assistance. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (M. Trudel).

MATERIALS AND METHODS

DNA constructs and homologous recombination in Pkd1_{extra}-BAC

We have previously isolated a murine Pkd1-BAC derived from a murine 129sv library that contained ~129 kb insert with the entire Pkd1 gene³⁰. This Pkd1 gene had ~37 kb of upstream and ~39.1 kb of downstream flanking sequences including the Tsc2 gene body. To address the function of polycystin-1 extracellular domain, we produced a construct for homologous recombination in a BAC vector (PLD53.SC-AB)³¹ to truncate the polycystin-1 transmembrane and cytoplasmic domain. The cloning strategy for this truncation consisted in adjoining to the amino acid 3042 (exon 25, nt 9442-9444, accession number: U70209), a translation termination codon (UAA) and the native 3'UTR of the Pkd1 gene (nt 13819, accession number: U70209). We cloned the intended construct in the p-Bluescript vector containing the appropriate junction and transferred it into the BAC recombination vector. Two PCR amplified fragments of 1.27 kb for exon23-25 and 1.38 kb for 3'UTR Pkd1/3'UTR Tsc2-intron39 from the murine Pkd1 gene were produced. Using a previously subcloned genomic exon23-26 fragment (nt 8579-9578, accession number: U70209) in a t-tailed p-Bluescript, the exon23-25 fragment was obtained by amplification with a forward primer in p-Bluescript 5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3' and reverse primer in exon25 5'-AAGGCTGGATCCTTAGGCAGTGAG-3' (nt 9456-9433, accession number: U70209) that includes the stop codon. The 3'UTR Pkd1/3'UTR Tsc2-intron39 fragment was amplified with forward primer in Pkd1 3'UTR 5'-CACTTCTCCTTTATCCGTCCC-3' (nt 13608-13628, accession number: U70209) and reverse primer in intron 39 of Tsc2 5'-TTCAGCACATGCTCATGCC-3'. The amplification conditions were: 94⁰C 5 minutes

followed by 25 cycles at 94⁰C 1 minute, 55⁰C 1 minute and 72⁰C 1 minute 30 seconds, and a final extension of 3 minutes at 72⁰C. The exon23-25 fragment was digested with ClaI (NEB) and BamHI (Invitrogen) (nt 9445, accession number: U70209) and introduced into the same corresponding sites of p-Bluescript SK (+/-) (Stratagene). This plasmid exon23-25-p-Bluescript was then subsequently digested with BamHI to insert the digested BamHI (nt 13820, accession number: U70209) /BclI (nt 4980, accession number: U70209) 3'UTR Pkd1/3'UTR Tsc2-intron39 fragment. The novel junctions of the resulting exon23-25/3'UTR Pkd1/3'UTR Tsc2-intron39 plasmid were sequenced to confirm appropriate cloning. This plasmid was then digested with PvuII (nt 8709-9445/13820 U#70209-4980 U#37775) (2.45 kb) and introduced into the SmaI site of the BAC recombination vector.

Homologous recombination protocol using a novel BAC vector to modify sequences into BACs insert was adapted from Gong et al.^{30,31}. Briefly, the BAC recombination vector containing Pkd1 exon23-25/3'UTR Pkd1/3'UTR Tsc2-intron39 was used to electroporate wild type Pkd1-BAC competent cells. By increasing antibiotics concentrations on these cells, the BAC vector will recombine with the Pkd1-BAC to produce co-integrates. The appropriate BAC co-integrates were identified by Southern Blot analysis using an Amp probe (2.2 kb) and a BamHI digestion (Invitrogen). Such co-integrates were plated on sucrose-rich media which is permissive for BACs that have undergone a second recombination event for lost of vector sequences, thereby generating either resolved or original BACs. DNA from resolved BACs were analysed by Southern Blot for appropriate modifications by four probes: exon 1 (nt 1-509); exon 7-15 (nt. 1752-6622); exon 23-25 (nt. 8579-9443) and exon 46 (nt. 12760-13820, accession number: U70209).

The integrity of the modified Pkd1_{extra}-BAC was also confirmed by PFGE and by sequencing the junction between the exon 25 and 46 of Pkd1_{extra} using the reverse primer in the Pkd1 3'UTR 5'-GACAGCAGTCAGACAGCTTC-3' (nt 14126, accession number: U70209).

Production and genotyping of transgenic mice

Pkd1_{extra}-BAC DNA (50 µg) was digested in order to isolate the Pkd1_{extra} gene away from the murine Tsc2 gene and the BAC vector sequences with ClaI (10 U) (NEB) localized 21.6 kb downstream of Pkd1 stop codon and MluI (10 U) (NEB) localized 24.8 kb upstream of Pkd1 initiation codon ATG. The Pkd1_{extra} fragment was then separated on LMP (Invitrogen)/TBE gels by PFGE. The 77 kb Pkd1_{extra} fragment was isolated into LMP agarose blocks and equilibrated into microinjection buffer O/N (10mM Tris-Cl, pH 7.5; 0.1mM EDTA, pH 7.5; 100mM NaCl). The Pkd1_{extra} LMP blocks were melted and treated with β-agarase (2 units/block, NEB). The 77 kb Pkd1_{extra} DNA were then concentrated on Milli Amicon Bioseparation columns (Ultra-free, Millipore) by centrifugation at 3000 rpm to a final volume of ~40 µl. The concentration of the Pkd1_{extra} fragment was determined on standard gel and the integrity of the fragment verified on PFGE. Pkd1_{extra} DNA was microinjected into pronuclei of fertilized (C57BL/6JXCBA/J) F2 mouse eggs as described previously³² at the concentration of 0.5ng/µl.

Mice generated from microinjection were analyzed for transgene integrity. The 5' upstream sequence was monitored by a polymorphic sequence located in the murine Pkd1 gene at 4.47 kb upstream of the ATG translation initiation codon specific for 129/sv since the Pkd1-BAC derived from this inbred strain. We designed a PCR protocol that can

distinguish the 129/sv 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 20pmol forward primer 5'-CTGCACCCATGTCAGGTGTA-3' and reverse primer 5'-GTTCTAGGCCAGCCAACTC-3' (Invitrogen) in 1mM MgCl₂, 50mM KCl and 10mM Tris-Cl, pH 8.8 (5mM NH₄Cl controls), 0.2mM of each dNTP (Pharmacia) and 2.5U of Taq Polymerase (total volume of 20 µl). Conditions for amplification were: 94⁰C 5 minutes followed by 30 cycles at 94⁰C 30 seconds, 54⁰C 30 seconds and 72⁰C 1 minute, and a final extension of 7 minutes at 72⁰C. Amplified PCR products were analysed on 6% polyacrylamide/TBE gels stained with ethidium bromide. To verify transgene integrity in the 3' downstream sequences, genomic tail DNA (10µg) from founder mice and progenies of the four transgenic mouse lines were analysed by Southern Blot. Three restriction enzymes (EcoRI, BamHI and HindIII (Invitrogen)) that distinguished the endogenous Pkd1 gene from the Pkd1_{extra} transgene were used with a exon 23-25 Pkd1 genomic probe. Integrity of Pkd1_{extra} transgene internal sequences were monitored by signal intensity from Southern Blot of genomic DNA digested with EcoRI and hybridized with a exon 7-15 genomic probe.

Renal function analysis

Blood urea nitrogen (BUN), creatinine, urinary proteins and osmolality levels were determined from urine of transgenic (n>3/line) and control (C57BL/6JXCBA/J F1) mice (n>4). For urine analysis, 350 to 500 µl were collected per mouse. BUN and creatinine were measured with a CX9 Beckmann apparatus while the osmolality was evaluated with a radiometer. Qualitative assessment of urinary proteins was also performed: ~50 µg of

proteins as measured using Bradford method precipitated by TCA 10% (final 5%) and resuspended in Tris 1M, pH 8.0 and sample buffer (0.1875M Tris-Cl, pH6.8; 6% SDS; 30% Glycerol; 0.006% Bromophenol Blue), boiled for 5 minutes, cooled and loaded on the gel 8% SDS-PAGE as described ³³. After 16 hours of migration at 50 volts, gels were stained with Coomassie Blue. Serum from transgenic and control mice was also analysed for BUN and creatinine levels. Serum (~100 µl) was obtained from tail blood that was centrifuged at 5000 rpm for 3 min.

Histopathological analysis

Transgenic and control mice were sacrificed and tissues removed and immediately placed in formalin. Tissues consisted in kidney, lung, liver, brain, spleen, heart and pancreas. Following O/N fixation, tissues were embedded in paraffin and four-µm-thick paraffin sections of formalin-fixed tissues were deparaffinized, hydrated in graded alcohols and stained with hematoxylin & eosin (H&E) for morphological analysis.

RNA expression analysis

Total RNA from transgenic and non-transgenic tissues including kidneys, brain, lung, spleen and liver and pancreas was extracted by guanidium thiocyanate or trizol/chloroform method ³⁴. The integrity of the RNA was verified by electrophoresis on formaldehyde-agarose gel ³⁵.

Expression of the Pkd1_{extra} transgene was analyzed by both semi-quantitative RT-PCR and real-time PCR approaches. All RNA samples were simultaneously reverse transcribed using 0.5 µg of pd(N)6 random primers (Pharmacia), 0.01 M of DTT, 0.125 mM of each dNTP (Pharmacia), 20-30U of RNasin (Amersham Pharmacia Biotech Inc.), 200U of M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) at 37⁰C. The primers used for the Pkd1_{extra} transgene amplification were 5'-AGGGTGCTGACC ACAGGCTCTA-3' (forward, exon 24; nt 9198-9218, accession number: U70209) and 5'-CCAATTGCTGTCCAGCAC CTG-3' (reverse, exon 46; nt 13840-13861, accession number: U70209); an additional primer for real-time PCR for Pkd1 amplification were: 5' TCA ATT GCT CCG GCC GCT G (forward exon 1; nt 461-479, accession number U70209) and 5' CCA GCG TCT GAA GTA GGT TGT GGG 3' (reverse exon 2; nt 539-562, accession number U70209) and for the internal control murine S16 ribosomal protein gene product 5'-AGGAGCGATTTGCTGGTGTGG-3' (forward, exon3, nt 1799-1819, accession number: M11408) and 5'-GCTACCAGGGCCTTTGAGATG-3' (reverse, exon 4, nt 1969-1990, accession number: M11408). Each pair of primers was designed such that only spliced mRNA would produce the predicted amplification products of 290, 94 and 103 bp for Pkd1_{extra}, Pkd1 total (endogenous and transgene) and S16 respectively. For semi-quantitative PCR, control reactions were first performed using a wide range of RT aliquots to test for linearity amplification. PCR reactions were carried out in 1mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10mM Tris ph 8.8, 0.2 mM of each dNTP, and 2.5U of Taq polymerase at a final volume of 20 µl. Conditions for this amplification of both Pkd1_{extra} and S16 internal control were: 94⁰C, 5 minutes followed by 22 cycles of 94⁰C, 30 seconds, 55⁰C, 30 seconds, 72⁰C, 30 seconds, and a final elongation of 10 minutes at

72⁰C. Each sample run on 10% polyacrylamide/TBE1X gel and visualized by ethidium bromide staining. The Image Quant 5.0 software was used for the semiquantitative evaluation. For real-time PCR, all reactions were carried out in triplicate in a Quanti Tech SYBR Green PCR master mix (Qiagen) containing 0.3 μM of each primer using a Mx4000 multiplex PCR apparatus (Stratagene). PCR conditions were: 95⁰C for 15 minutes followed by 40 cycles of 94⁰C, 58⁰C and 72⁰C for 30 seconds.

Expression analysis of Pkd1 endogenous gene and Pkd1_{extra} transgene was also monitored by Northern blotting. Total kidney ARN from adult transgenic and age matched non-transgenic mice (30μg) was first treated with DNase I, FPLC pure (1unit) at 37⁰C for 25 minutes followed by electrophoresis on a two-step 0.8%/1.5 % formaldehyde-agarose gel and transferred to nylon membranes (Osmonics inc.). Membranes were hybridized with random primed DNA-labeled Pkd1 exon36-45 cDNA probe (1.6kb) for endogenous Pkd1, Pkd1 exon 15-20 cDNA probe (1.6kb) for transgene and for internal control a Gapdh cDNA probe (1.2kb) using alpha-32P dCTP as previously described ³⁶. Signal was detected on a BIOMAX MS Kodak film and quantitative evaluation by a phosphoimager with the Image Quant 5.0 software.

Pkd2 expression analysis was performed by using the Pkd1 Northern blot protocol albeit for the electrophoresis on 1.5% formaldehyde-agarose gel. The membranes were hybridized with a labelled Pkd2 cDNA probe (2.2kb) (generous gift from Dr. S. Somlo) and Gapdh as control. Expression analysis of c-myc in Pkd1_{extra} mice was also evaluated by Northern blot analysis as described for Pkd2 but the RNA (20μg) was not pretreated

with DNaseI. The membranes were hybridized with random primed c-myc probe consisting of exons 2 and 3 and the ribosomal protein L32, rpL32, served as loading control.

Protein expression analysis

Total protein extract was prepared from transgenic and non-transgenic kidneys, homogenized in RIPA buffer (20mM Tris-HCl pH7.5, 2mM EDTA, 150mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 1mM PMSF) and cocktail of proteases inhibitors (SIGMA). Protein extracts (200µg for line 39) were loaded on 3-8% Tris-Glycine SDS-polyacrylamide gels along with molecular weight standards (10 to 250 kDa) (BioRad). Transfert was performed at 4⁰C overnight at 30 Volts using BiotraceTM PVDF membrane (Pall). The membrane was hybridized with the monoclonal 7e12 antibody ¹⁶ for detection of pc1 (generous gift of Drs C. Ward and P. Harris) and the control for detection of utrophin. Secondary HRP-conjugated antibodies allowed detection by ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences) on film. For polycystin-2 analysis, immunoblotting was similar to pc1 except that equivalent loading of protein extracts (200µg), 7.5% Tris-Glycine SDS-polyacrylamide gel and nitrocellulose membrane were used. Hybridization was carried out with the YCC2 polyclonal antibody (generous gift of Drs Y. Cai and S. Somlo) ³⁷.

REFERENCES

1. Fick GM, Gabow PA. Hereditary and acquired cystic disease of the kidney. *Kidney Int* 1994;**46**:951-964.
2. Consortium EPKD. Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16. *Cell* 1993;**75**:1305-1315.
3. Consortium EPKD. The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. *Cell* 1994;**77**:881-894.
4. Burn TC, Connors TD, Dackowski WR, Petry LR, Van Raay TJ, Millholland JM, Venet M, Miller G, Hakim RM, Landes GM and others. Analysis of the genomic sequence for the autosomal dominant polycystic kidney disease (PKD1) gene predicts the presence of a leucine-rich repeat. *Hum Mol Genet* 1995;**4**(4):575-582.
5. Consortium IPKD. Polycystic Kidney Disease: The complete structure of the PKD1 gene and its protein. *Cell* 1995;**81**:289-298.
6. Qian F, Boletta A, Bhunia AK, Xu H, Liu L, Ahrabi AK, Watnick TJ, Zhou F, Germino GG. 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 USA* 2002;**99**(26):16981-16986.
7. Bateman A, Sandford R. The PLAT domain: a new piece in the PKD1 puzzle. *Curr Biol* 1999;**9**:R588-R590.
8. van Tilbeurgh H, Egloff MP, Martinez C, Rugani N, Verger R, Cambillau C. Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. *Nature* 1993;**362**:814-820.
9. Gillmor SA, Villasenor A, Fletterick R, Sigal E, Browner MF. The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity. *Nat. Struct. Biol.* 1998;**4**:1003-1009.
10. Naylor CE, Eaton JT, Howells A, Justin N, Moss DS, Titball RW, Basak AK. Structure of the key toxin in gas gangrene. *Nat. Struct. Biol.* 1998;**5**:738-746.
11. Peral B, Gamble V, Stron C, Ong ACM, Sloane-Stanley J, Zerres K, Winearls CG, Harris PC. Identification of mutations in the duplicated region of the polycystic kidney disease 1 gene (PKD1) by a novel approach. *Am. J. Hum. Genet.* 1997;**60**:1399-1410.
12. Rossetti S, Chauveau D, Walker D, Saggarr-Malik A, Winearls CG, Torres VE, Harris PC. A complete mutation screen of the ADPKD genes by DHPLC. *Kidney Int* 2002;**61**:1588-1599.
13. Thomas R, McConnell R, Whittacker J, Kirkpatrick P, Bradley J, Sandford R. Identification of mutations in the repeated part of the autosomal dominant polycystic kidney disease type 1 gene, PKD1, by long-range PCR. *Am J Hum Genet* 1999;**65**:39-49.
14. Brook-Carter PT, Peral B, Ward CJ, Thompson P, Hughes J, Maheshwar MM, Nellist M, Gamble V, Harris PC, Sampson JR. Deletion of the TSC2 and PKD1 genes associated with severe infantile polycystic kidney disease - a contiguous gene syndrome. *Nat Genet* 1994;**8**:328-332.
15. Ward CJ, Turley H, Ong ACM, Comley M, Biddolph S, Chetty R, Ratcliffe PJ, Gatter K, Harris PC. Polycystin, the polycystic kidney disease 1 protein, is

- expressed by epithelial cells in fetal, adult and polycystic kidney. Proc Natl Acad Sci USA 1996;**93**:1524-1528.
16. Ong ACM, Harris PC, Davies DR, Pritchard L, Rossetti S, Biddolph S, Vaux DJT, Migone N, Ward CJ. Polycystin-1 expression in PKD1, early onset PKD1 and TSC2/PKD1 cystic tissue: implications for understanding cystogenesis. Kidney Int 1999;**56**:1324-1333.
 17. Qian F, Watnick TJ, Onuchic LF, Germino GG. The molecular basis of focal cyst formation in human autosomal dominant polycystic kidney disease type I. Cell 1996;**87**:979-987.
 18. Brasier JL, Henske EP. 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. 1997;**99**(2):194-199.
 19. Koptides M, Constantinides R, Kyriakides G, Hadjigavriel M, Patsalis PC, Pierides A, Deltas CC. Loss of heterozygosity in polycystic kidney disease with a missense mutation in the repeated region of PKD1. Hum Genet 1998;**103**:709-717.
 20. Lanoix J, D'Agati V, Szabolcs M, Trudel M. Dysregulation of cellular proliferation and apoptosis mediates human autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD). Oncogene 1996;**13**:1153-1160.
 21. Ong ACM, Ward CJ, Butler RJ, Biddolph S, Bowker C, Torra R, Pei Y, Harris PC. Coordinate expression of the autosomal dominant polycystic kidney disease proteins, polycystin-2 and polycystin-1, in normal and cystic tissue. Am. J. Pathol. 1999;**154**:1721-1729.
 22. Pritchard L, Sloane-Stanley JA, Sharpe JA, Aspinwall R, Lu W, Buckle V, Strmecki L, Walker D, Ward CJ, Alpers CE and others. A human *PKD1* transgene generates functional polycystin-1 in mice and is associated with a cystic phenotype. Hum Mol Genet 2000;**9**:2617-2627.
 23. Boulter C, Mulroy S, Webb S, Fleming S, Brindle K, Sandford R. Cardiovascular, skeletal, and renal defects in mice with a targeted disruption of the *Pkd1* gene. Proc Natl Acad Sci USA 2001;**98**:12174-12179.
 24. Kim K, Drummond I, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Klinger K, Arnaout MA. Polycystin 1 is required for the structural integrity of blood vessels. Proc Natl Acad Sci USA 2000;**97**:1731-1736.
 25. Lu W, Peissel B, Babakhanlou H, Pavlova A, Geng L, Fan X, Larson C, Brent G, Zhou J. Perinatal lethality with kidney and pancreas defects in mice with a targeted PKD1 mutation. Nat Genet 1997;**17**:179-181.
 26. Lu W, Shen X, Pavlova A, Lakkis M, Watrd CJ, Pritchard L, Harris PC, Genest DR, Perez-Atayde AR, Zhou J. Comparison of *Pkd1*-targeted mutants reveals that loss of polycystin-1 causes cystogenesis and bone defects. Hum Mol Genet 2001;**10**(21):2385-2396.
 27. Muto S, Aiba A, Saito Y, Nakao K, Nakamura K, Tomita K, Kitamura T, Kurabayashi M, Nagai R, Higashihara E and others. Pioglitazone improves the phenotype and molecular defects of a targeted *Pkd1* mutant. Hum Mol Genet 2002;**11**(15):1731-1742.
 28. Wu G, Tian X, Nishimura S, Markowitz GS, D'Agati V, Park JH, Yao L, Li L, Geng L, Zhao H and others. *Trans*-heterozygous *Pkd1* and *Pkd2* mutations

- modify expression of polycystin kidney disease. *Hum Mol Genet* 2002;**11**(16):1845-1854.
29. 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 and others. Lowering of *Pkd1* expression is sufficient to cause polycystic kidney disease. *Hum Mol Genet* 2004;**13**(24):3069-3077.
 30. Thivierge C, Kurbegovic A, Couillard M, Guillaume R, Cote O, Trudel M. Overexpression of PKD1 causes polycystic kidney disease. *Mol Cell Biol* 2006;**26**(4):1538-1548.
 31. Gong S, Yang XW, Li C, Heintz N. Highly Efficient Modification of Bacterial Artificial chromosomes (BACs) using novel shuttle vectors containing the R6Kg origin of replication. *Genome Res* 2002;**12**:1992-1998.
 32. Trudel M, D'Agati V, Costantini F. C-myc as an inducer of polycystic kidney disease in transgenic mice. *Kidney Int* 1991;**39**:665-671.
 33. De Paepe ME, Trudel M. The transgenic SAD mouse: A model of human sickle cell glomerulopathy. *Kidney Int* 1994;**46**:1337-1345.
 34. Couillard M, Guillaume R, Tanji N, D'Agati V, Trudel M. c-myc-induced Apoptosis in polycystic kidney disease is independent of FasL/Fas interaction. *Cancer Res* 2002;**62**:2210-2214.
 35. Trudel M, Lanoix J, Barisoni L, Blouin M-J, Desforges M, L'Italien C, D'Agati V. C-myc-induced apoptosis in polycystic kidney disease is bcl-2 and p53 independent. *J. Exp. Med.* 1997;**186**(11):1873-1884.
 36. Guillaume R, D'Agati V, Daoust M, Trudel M. Murine *Pkd1* is a developmentally regulated gene from morula to adulthood: Role in tissue condensation and patterning. *Dev. Dyn.* 1999;**214**:337-348.
 37. Wu G, D'Agati V, Cai Y, Markowitz G, Park JH, Reynolds DM, Maeda Y, Le TC, Hou JR. H, Kucherlapati R and others. Somatic inactivation of *Pkd2* results in polycystic kidney disease. *Cell* 1998;**93**:177-188.
 38. Ahn K, Herman SB, Fahnoe DC. Soluble human endothelin-converting enzyme-1: expression, purification, and demonstration of pronounced pH sensitivity. *Arch. Biochem. Biophys.* 1998;**359**:258-268.
 39. Horan TP, Simonet L, Jacobsen R, Mann M, Haniu M, Wen J, Arakawa T, Kuwamoto M, Martin F. Coexpression of G-CSF with an unglycosylated G-CSF receptor mutant results in secretion of a stable complex. *Protein Expr. Purif.* 1998;**14**:45-53.
 40. Okamoto T, Sekiyama N, Otsu M, Shimada Y, Sato A, Nakanishi S, Jingami H. Expression and purification of the extracellular ligand binding region of metabotropic glutamate receptor subtype 1. *J. Biol. Chem.* 1998;**273**:13089-13096.
 41. Robbins MJ, Ciruela F, Rhodes A, McIlhinney RA. Characterization of the dimerization of metabotropic glutamate receptors using an N-terminal truncation of mGluR1alpha. *J. Neurochem* 1999;**72**:2539-2547.
 42. Kobayashi T, Minowa O, Kuno J, Mitani H, Hino O, Noda T. Renal carcinogenesis, hepatic hemangiomas, and embryonic lethality caused by a germ-line *Tsc2* mutation in mice. *Cancer Res* 1999;**59**:1206-1211.

43. Onda H, Lueck A, Marks PW, Warren HB, Kwiatkowski DJ. *Tsc2*^{+/-} mice develop tumors in multiple sites that express gelsolin and are influenced by genetic background. *J. Clin. Invest.* 1999;**104**(6):687-698.
44. Cheadle JP, Reeve MP, Sampson JR, Kwiatkowski DJ. Molecular genetic advances in tuberous sclerosis. *Hum Genet* 2000;**107**:97-114.
45. Chada K, Magram J, Raphael K, Radice G, Lacy E, Costantini F. Specific expression of a foreign b-globin gene in erythroid cells of transgenic mice. *Nature* 1985;**314**:377-380.
46. Babich V, Zeng W-Z, Yeh B-I, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Cai Y, Somlo S, Huang C-L. The N-terminal extracellular domain is required for polycystin-1-dependent Channel Activity. *J Biol Chem* 2004;**279**(24):25582-25589.

CHAPITRE 3.0

DISCUSSION

ADPKD est une maladie monogénique fréquente à trait génétique autosomique dominant susceptible d'affecter de nombreux organes. Les mutations dans le gène PKD1, le joueur majeur impliqué dans ADPKD codant pour la polycystine-1 (PC1), mènent à la polykystose rénale. La polycystine-1 est une protéine transmembranaire qui semble appartenir à la famille des récepteurs couplés aux protéines de type B, avec un large domaine N-terminal extracellulaire adhésif et un court domaine C-terminal médiateur du signal intracellulaire. Le produit du gène PKD1 a fait objet de nombreuses études expérimentales au cours des dernières années. Tout de même, en raison de sa structure protéique très complexe qui pourrait être tenue responsable de rôles cellulaires multiples et divers, la fonction de la polycystine-1 *in vivo* reste cependant évasive. Plusieurs types de mutations sont retrouvés chez les patients ADPKD; il n'est pas clair si les mutations dans le gène PKD1 mènent à des protéines tronquées, anormales non-fonctionnelles/fonctionnelles ou une absence complète de protéine mutante. L'élucidation de la (les) fonction(s) de PKD1 est critique pour comprendre de quelle façon les mutations dans ce gène causent ADPKD et pour envisager des cibles thérapeutiques adéquates.

Dans le but de vérifier conjointement la fonctionnalité d'une des mutations ADPKD et le rôle moléculaire et cellulaire du domaine extracellulaire N-terminal de la polycystine-1 *in vivo*, nous avons reproduit une mutation humaine en modifiant l'acide aminé 3043 de pc1 murine, situé à 24 acides aminés du premier domaine transmembranaire, en un codon STOP. Ce mutant, appelé Pkd1_{extra}, a été produit par recombinaison homologue et mutagenèse dirigée qui ont permis de déléter les parties transmembranaires et intracellulaire du gène Pkd1. Ce mutant a servi pour la génération de souris transgéniques Pkd1_{extra} qui, malgré une expression protéique pc1_{extra} stable, ne présentent pas de défauts aux niveaux précoces du développement rénal telle la tubulogénèse rénale. Cependant, les souris Pkd1_{extra} développent une polykystose rénale tardive accompagnée par plusieurs caractéristiques typiques d'ADPKD humain (physiologiques, morphologiques, pathogénétiques, cellulaires).

À notre connaissance, nous sommes le premier groupe à démontrer des effets de la surexpression du domaine extracellulaire de Pkd1 murin *in vivo* dans un modèle murin en reproduisant simultanément une mutation humaine rapportée chez deux patients ADPKD. Le domaine extracellulaire pourrait agir comme dominant négatif et altérer les

niveaux normaux requis de pcd1 ou encore causer un déséquilibre de pcd1 clivée/non clivée nécessaire pour une fonction cellulaire adéquate de pcd1 autant dans l'adhésion que dans la signalisation cellulaire. Les caractéristiques du transgène Pkd1_{extra} ainsi que les conséquences de sa présence chez la souris transgénique Pkd1_{extra} seront examinées et discutées dans le présent chapitre.

3.1 Transgène Pkd1_{extra} et son expression chez la souris transgénique Pkd1_{extra}

3.1.1 Spécification de la construction du gène modifié Pkd1_{extra}

Le fragment Pkd1_{extra} qui a servi à la production de souris Pkd1_{extra} a été généré par l'approche de recombinaison homologe à partir d'un BAC qui contenait le gène Pkd1 avec 37 kb de séquences en amont et 39 kb en aval, incluant le gène Tsc2 murin (Thivierge *et al.*, 2006). Deux boîtes d'homologie de part et d'autre de la région à déléter (entre l'exon 25 et l'exon 46 du gène Pkd1) ont été insérées dans le vecteur pld53 qui a servi pour la recombinaison homologe et a permis de déléter toutes les parties intracellulaire et transmembranaires de Pkd1. Les digestions enzymatiques spécifiques ainsi que la purification sur gel du fragment digéré (Voir *Materials and Methods* dans Chapitre 2.0) ont permis d'enlever les séquences procaryotes (BAC) tout comme ~15 kb de la séquence 5' du gène Tsc2. L'élimination de séquences procaryotes a été effectuée parce que ces séquences peuvent avoir des effets inhibiteurs (Chada *et al.*, 1985). De plus, l'expression du gène Tsc2 a été empêchée parce qu'il peut induire un phénotype kystique et potentiellement contribuer au phénotype de Pkd1_{extra} (Kobayashi *et al.*, 1999; Onda *et al.*, 1999; Cheadle *et al.*, 2000).

Lors du clonage de deux boîtes d'homologie nécessaires pour la recombinaison homologe, nous avons inséré par mutagenèse dirigée un codon STOP prématuré dans l'exon 25 qui assurerait la présence d'une protéine tronquée à cet endroit précis. Une attention particulière a dû être apportée quant à la production de ce codon STOP prématuré puisque chez les mammifères, les ARNm contenant des codons STOP prématurés sont dégradés rapidement par le système de surveillance de l'ARN appelé NMD pour *Nonsense mediated decay*. Un codon STOP placé à plus de 50 nucléotides en amont de la dernière jonction exon-exon (dernier intron du cDNA) est sujet à une

dégradation rapide (Nagy et Maquat., 1998). La dernière jonction de notre transgène Pkd1_{extra} constitue d'exon24-exon25 alors que le codon STOP inséré se trouve en aval de cette jonction suggérant qu'il devrait présenter une sorte de protection contre le NMD et rendre l'ARNm transgénique stable. Les études d'expression ont démontré que le transcrite Pkd1_{extra} de taille prédite (~9.7kb) est produit échappant comme prévu à la règle de NMD et générant une protéine tronquée stable (~330kDa).

3.1.2 Éléments régulateurs du transgène Pkd1_{extra}

Puisque la régulation transcriptionnelle et les facteurs transcriptionnels impliqués dans la transcription de Pkd1 murin sont très peu connus, nous nous sommes posés la question quant aux éléments régulateurs qui devraient mener l'expression du transgène Pkd1_{extra}. Il est connu que les éléments régulateurs de certains gènes peuvent se retrouver très éloignés du gène en question (eg: β -globine), dans les régions intragéniques (eg: CFTR, α -globine) mais également à l'intérieur d'autres gènes. En absence ou en présence d'une partie des éléments régulateurs nécessaires, le transgène risquait de ne pas être exprimé, d'être exprimé à des faibles niveaux ou bien de ne pas suivre le profil d'expression normal dans un contexte d'ADN génomique. Il était donc important d'avoir la plus grande région promotrice pour notre transgène Pkd1_{extra} parce que le BAC était peu caractérisé. Suite à ces limitations, le transgène Pkd1_{extra} qui a pu être généré contient ~25 kb de la région en amont du site d'initiation de la traduction et ~20 kb de la région en aval du codon stop avec le poly A natif, des séquences qui seraient vraisemblablement suffisantes pour une expression appropriée. Avantagement, ces régions se sont avérées suffisantes; l'expression du transcrite Pkd1_{extra} semble suivre le profil d'expression du gène endogène dans différents tissus (cerveau, poumon, cœur, rein >> rate, foie, pancréas) (Fig.2-3) suggérant la présence de tous les éléments régulateurs nécessaires pour une expression appropriée dans le transgène. Toutefois, l'expression du transgène de la lignée Pkd1_{extra} 11 semble différente et pourrait dépendre du site d'intégration génomique. Il est important de mentionner que nous avons trouvé, une fois le projet déjà entrepris, grâce aux analyses informatiques plus approfondies et les nouvelles connaissances disponibles sur le 5' du gène Pkd1 que les 25 kb de la région en amont du transgène comprenaient en plus de séquences promotrices du gène Pkd1, le gène Rab26 en entier. L'implication de Rab26 dans ADPKD est peu connue; il n'est donc pas impossible que ce gène puisse contribuer en partie positivement/négativement

au phénotype kystique des souris $Pkd1_{extra}$ en raison de son rôle potentiel dans le cytosquelette et le transport vésiculaire.

3.1.3 Expression du gène $Pkd1$ chez les souris $Pkd1_{extra}$

3.1.3.1 Expression du messenger $Pkd1_{extra}$ chez les souris $Pkd1_{extra}$

Notre étude de la région en 5' et 3' du transgène $Pkd1_{extra}$ (Voir section 3.1.2) suggérait fortement que le transgène allait être exprimé de façon appropriée. L'expression du messenger $Pkd1_{extra}$ a été détectée et quantifiée par diverses techniques (Fig.2-3(A-C)). En effet, l'expression du transgène est semblable à celle du gène $Pkd1$ endogène; une forte expression dans le cerveau, poumon, rein et moindre expression dans la rate, foie et pancréas. Ce résultat confirme définitivement la présence de tous les éléments régulateurs nécessaires pour l'expression et la régulation du transgène $Pkd1_{extra}$. De plus, l'expression du messenger suit le nombre de copies du transgène chez toutes les souris transgéniques $Pkd1_{extra}$ (Fig. 2-2; 2-3). Cette observation suggère d'une part que le site d'insertion du transgène n'a pas d'effet sur l'expression du transgène. D'autre part, elle exclut la possibilité d'autorégulation transcriptionnelle positive ou négative du transgène $Pkd1_{extra}$.

3.1.3.2 Expression du messenger $Pkd1$ endogène chez les souris $Pkd1_{extra}$

Certains gènes sont capables de réguler leur propre transcription et de s'autoréguler positivement ou négativement (eg: fos, FGF, Pax6, etc). Puisque l'expression du transgène $Pkd1_{extra}$ est sous contrôle du même promoteur que le gène $Pkd1$ endogène, il était important de vérifier si la présence du transgène $Pkd1_{extra}$ affectait la transcription du gène $Pkd1$ endogène. La réponse à cette question est illustrée dans la figure montrant l'expression du transgène par Northern blot (Fig.2-3) où le niveau d'expression du gène $Pkd1$ endogène dans toutes les lignées transgéniques est très semblable à celui des souris contrôles. Une augmentation de l'expression du gène endogène aurait ouvert la possibilité qu'une surexpression du $Pkd1$ endogène plutôt que le transgène $Pkd1_{extra}$ lui-même soit la cause principale du phénotype kystique des souris $Pkd1_{extra}$. Notre résultat d'expression démontre que le phénotype kystique (Fig.2-5) des souris $Pkd1_{extra}$ résulte

d'une surexpression du transgène Pkd1_{extra} spécifiquement et non d'une augmentation de l'expression du gène endogène.

3.1.3.3 Protéine pc1_{extra}

3.1.3.3.1 Expression de la protéine pc1_{extra}

En générant le transcrite tronqué Pkd1_{extra}, il était difficile de prédire si la protéine produite allait être stable ou dégradée suite aux modifications post-traductionnelles et un repliement particulier qu'elle aurait pu subir. Il risquait fortement de s'agir d'une protéine exprimée et stable comme cela a été rapporté pour les domaines extracellulaires de récepteurs mGluR1 et G-CSFR (Ahn *et al.*, 1998; Horan *et al.*, 1998; Okamoto *et al.*, 1998; Robbins *et al.*, 1999). L'expression de la protéine générée par le transgène Pkd1_{extra}, la pc1_{extra}, a été confirmée par Western Blot (Fig.2-3D). La bande détectée chez les souris transgéniques migre plus bas que celle de la protéine pc1 endogène ce qui indique fortement la présence d'une protéine tronquée, probablement pc1_{extra}. De plus, elle migre à la même hauteur que l'utrophine, une protéine d'un poids moléculaire très similaire à pc1_{extra} qui est de ~330 kDa sans tenir compte des sites de glycosylation potentiels dans le domaine extracellulaire. La spécificité de cette bande transgénique est confirmée par un contrôle positif, la souris surexprimant le Pkd1 murin entier, SBPkd1_{Tag}. Les niveaux d'expression protéiques suivent le nombre de copies du transgène et les niveaux d'expression du messenger suggérant la présence d'une protéine transgénique relativement stable. La lignée Pkd1_{extra} 2 aurait des niveaux très élevés de la protéine pc1_{extra} alors que la lignée 39 n'en aurait que très peu. Ceci exclut donc la possibilité que la protéine tronquée serait reconnue par un système de dégradation rapidement après sa synthèse tel que l'ubiquitination.

3.1.3.3.2 Effet de la pc1_{extra} sur la polycystine-1 endogène

Nos études d'expression par Northern blot (Fig.2-3A) démontrent que les souris non-transgéniques adultes expriment à des niveaux très faibles la polycystine-1. Leur expression n'est détectée qu'après une exposition prolongée. Cette observation est consistante avec les études d'expression de PC1 humaine et murine rapportées par

plusieurs groupes (**Voir section 1.5.1**). Toutefois, il est intéressant de noter la présence de la polycystine-1 endogène chez nos souris transgéniques adultes même après une exposition de courte durée. Il pourrait s'agir d'une stabilisation de la protéine endogène par le transgène. Une expérience supplémentaire pour confirmer la spécificité de cette bande que l'on croit être la pc1 endogène pourrait être faite par l'utilisation d'un autre anticorps qui sera dirigé contre la partie C-terminale de pc1. Ce dernier ne devrait détecter que la polycystine-1 endogène. Cette expérience confirmerait que la bande de plus haut poids moléculaire chez les souris transgéniques Pkd1_{extra} et qui semble migrer à la même hauteur que celle du contrôle positif surexprimant le Pkd1 endogène non-tronqué correspondrait à la pc1_{endo}. Cette expérience serait importante afin de vérifier que cette bande n'est pas le résultat du «quenching» de l'anticorps, de l'effet physique de l'anticorps chez les transgéniques par rapport aux non-transgéniques ou tout simplement d'une migration aberrante due à une quantité impressionnante de protéine tronquée produite par certaines lignées transgéniques. La dernière possibilité est peu probable car même la lignée 39 possède la bande en question malgré une expression faible du transgène chez cette lignée transgénique. La possibilité que cette bande représente des dimères du transgène n'est pas exclue. La pc1 est capable de faire des interactions homophiliques via les domaines PKD-like dans l'extrémité extracellulaire N-terminale de la protéine (**Oxana et al., 2000**).

Néanmoins, ces résultats soulèvent sans doute plusieurs points captivants. Premièrement, le transgène Pkd1_{extra} pourrait-il stabiliser la polycystine-1 endogène? Deuxièmement, de quelle façon se ferait la stabilisation de pc1_{endo} par pc1_{extra}? Finalement, la pc1_{extra} interfère-elle avec le mécanisme de stabilisation/dégradation de pc1 endogène? Certaines hypothèses sont exposées dans les paragraphes qui suivent.

3.1.3.3.2.1. Interférence avec la capacité de dimérisation?

Comme mentionné précédemment, la polycystine-1 possède un site GPS qui serait fonctionnel *in vitro* et *in vivo* (**Qian et al., 2002**). Le clivage dans le site GPS de la polycystine-1 semble s'effectuer rapidement après sa synthèse (~10-15 minutes) (**Qian et al., 2002**) et ne nécessiterait aucune protéase mais subirait plutôt une autoprotéolyse intramoléculaire (**Qian F et al., 2005**). Il s'agirait d'une réaction chimique enclenchée par une conformation particulière de la polycystine-1 qui permettrait de rapprocher

certaines acides aminées du site de clivage et initier les réactions nucléophiles tout comme il a été rapporté en détail pour le récepteur GPS, le EMR2 (**Lin et al., 2004**). La polycystine-1 se rajouterait à la famille croissante des protéines autoprotéolytiques intramoléculaires dont la plupart sont des N-terminal nucléophile hydrolases. Le clivage protéolytique de certaines de ces protéines hydrolases dont la GA (glycosylasparaginase) reposerait entièrement sur la dimérisation de l'enzyme (**Wang et al., 2003**). Cette caractéristique reste à être vérifiée chez les autres protéines autoprotéolytiques. Toutefois, l'hypothèse que le clivage serait dépendant de la dimérisation de la polycystine-1 endogène est très attirante. En effet, la polycystine-1 native est capable de se dimériser et de faire des interactions homophiles fortes via les domaines PKD (**Oxana et al., 2000**). On peut émettre l'hypothèse que la $pc1_{extra}$ empêche ces interactions entre les polycystines endogènes et interfère avec la régulation de la dimérisation et par conséquent avec le clivage de $pc1_{endo}$. La polycystine-1 endogène non-clivée stable acquerrait alors une fonction indépendante de la polycystine-1 clivée et dont la demi-vie serait plus longue.

Une augmentation de la stabilité de la protéine $pc1$ endogène par la protéine mutante $pc1_{extra}$ soulève l'hypothèse que certaines formes mutantes de PKD1 chez les patients ADPKD pourraient stabiliser la polycystine-1 endogène native sans augmenter leur quantité produite. C'est une hypothèse qui corrélait avec un signal plus fort de polycystine-1 détecté dans les reins chez les patients ADPKD relativement aux sujets normaux (**Ward et al., 1996; Ong et al., 1999**). Toutefois, une autre observation a montré une augmentation de PKD1 même au niveau d'ARN chez les patients ADPKD (**Ward et al., 1996; Lanoix et al., 1996**). Ainsi, la régulation de la stabilité ne se ferait pas uniquement au niveau traductionnel mais également au niveau transcriptionnel.

3.1.3.3.2. Interférence avec la glycosylation protéique/localisation cellulaire?

La bande $pc1$ native chez les souris contrôles, non-transgéniques et transgéniques $SBPkd1_{Tag}$, est diffuse, une caractéristique typique des protéines fortement glycosylées. Chez les souris transgéniques $Pkd1_{extra}$ la bande correspondant à l'endogène (**Voir section 3.1.3.3.2**), semble être plutôt fine. La polycystine-1 contient plusieurs sites potentiels de glycosylation (60; **Hughes et al., 1995**) et ce surtout dans les domaines PKD1-like, les domaines qui médient les interactions homophiles de la PC1 et

l'adhésion cellulaire (Oxana *et al.*, 2000). *In vitro*, la polycystine-1 semble fortement glycosylée (Newby *et al.*, 2002). On peut proposer que la polycystine-1 endogène chez les transgéniques est stabilisée via dérégulation de son état de glycosylation. Une glycosylation adéquate pourrait représenter un préalable au repliement protéique correct fonctionnel et nécessaire pour le clivage et acheminement/transport d'une protéine clivée vers son site d'action (membrane, cil, noyau). Suite à une dérégulation de la glycosylation et donc du repliement, la protéine tronquée $pc1_{extra}$ pourraient être empêchée de sortir du RE et rester localisée à la membrane comme démontré pour les récepteurs mutants mal-repliés de la vasopressine (Morello *et al.*, 2000). Normalement, la $pc1$ passant à la membrane et possiblement dans d'autres compartiments cellulaires deviendrait fonctionnellement active et sa demi-vie fortement régulée (plus courte) en fonction du signal, du ligand et l'homéostasie rénale. Un parallèle peut être fait entre la polycystine-1 et la protéine Notch dont l'activité et clivage sont fortement régulés par son état de glycosylation (revue dans Haines et Irvine., 2003). La polycystine-1 et la protéine Notch se ressemblent par: 1) le clivage intracellulaire et le transport vers la membrane en ayant deux sous-unités associées de façon non-covalente, 2) le clivage intramembranaire RIP; 3) l'implication au niveau du développement rénal et la différenciation cellulaire suggérant des mécanismes de régulation fonctionnelle analogues. La N-glycosylation semble être également une des étapes limitantes dans la translocation d'autres récepteurs à la membrane (Petaya-Repo *et al.*, 2000). Il serait donc important de vérifier l'état de glycosylation autant de la polycystine-1 endogène que la polycystine-1 $_{extra}$ chez nos souris transgéniques. L'analyse de l'état de glycosylation en traitant les extraits protéiques par les glycosidases spécifiques (EndoH et PNGase) et de fractionnement/localisation cellulaire répondront à cette question.

3.1.3.3.2.3. Interférence avec la conformation structurelle du domaine PLAT de $pc1$ endogène?

In vitro, la stabilité de la polycystine-1 semble dépendre de son domaine PEST positionné dans le domaine C-terminal cytoplasmique (Voir section 1.4.1.3.2.3) et de l'interaction avec Siah (Kim H *et al.*, 2004). Cette dernière semble cibler le produit du gène PKD1 à l'ubiquitination protéasome-dépendante. Il serait intéressant d'étudier si le transgène est capable de moduler la conformation de la protéine $pc1$ native en empêchant son interaction avec les intermédiaires de la machinerie de dégradation.

3.1.3.3.3 Localisation de la protéine $pc1_{extra}$

Plusieurs hypothèses peuvent être émises quant à la localisation éventuelle de notre protéine $pc1_{extra}$. La protéine tronquée $pc1_{extra}$ n'a pas de site d'ancrage dans la membrane étant donné que les domaines transmembranaires ont été délétés par recombinaison homologue. Ainsi, nous présumons qu'elle restera soit dans les compartiments intracellulaires soit sera acheminée vers la membrane sous forme d'un hétérodimère liée de façon non-covalente. Il est également probable que la $pc1_{extra}$ soit sécrétée puisqu'elle ne contient pas un signal peptide de rétention du réticulum endoplasmique. Malgré l'absence d'un signal de rétention du réticulum endoplasmique, il est probable que la $pc1_{extra}$ reste dans ce compartiment en se liant aux polycystine-1 endogènes résidentes au niveau du système de RE. La $pc1_{extra}$ pourrait également border la membrane, sans y être ancrée, en se liant de façon non-covalente avec le domaine C-terminal intracellulaire de la polycystine-1 endogène comme il a été suggéré *in vitro* par Qian (Qian *et al.*, 2002). Toutefois, cette dernière hypothèse l'acheminement vers la membrane plasmique, bordant la membrane est peu probable. Il a été démontré dans le cas de EMR2 que le clivage mais surtout le «tethering» (association non-covalente des deux sous-unités clivées) serait absolument dépendant de 6-8 acides aminés après le site de clivage HL↓T qui résulte en formation des deux sous-unités, N et C-terminale, liées de façon non-covalente (Chang *et al.*, 2003). Le mécanisme de clivage de la polycystine-1 pourrait être semblable au celui de EMR2 et les 6-8 résidus hydrophobes qui suivent le clivage de $pc1$ pourraient s'avérer également de grande importance (Tab.3-I).

Tableau 3-I: Alignement de séquences de la région GPS chez différents protéines-récepteurs dont le clivage a été démontré *in vitro*

Protéine	TM	GPS Sequence	Accession No.
h EMR2	7	RQRVLCVVEHGQNGC--GHMAITGCS--TIGTRDTS-----M [↓] CHLTHRESEF--AVDMAYGVV	AAF21974
h EMR3	7	TKRVFCVYVK--STCQQ--SCHSRDQCF--LIIVNKGH-----M [↓] CHLTHRESEF--AVDMALTRQ	AAK15076
m EMR4	7	RAEHLGVINE--GGEEG--GWSFKGCS--HVYTNREY-----M [↓] CHLTHRESEF--AVDMALPHE	AAK51125
h CD97	7	RQEI LCAFKRSDSDRG--GHMATEGCG--VLGKNGCS-----M [↓] CHLTHRESEF--AVDMAYGVV	AAK36682
r ETL	7	KHQTQCAFNIVSVDDMNGSWSSEGC--LTYSDNTH-----M [↓] CHLTHRESEF--AVDMAYGVV	NP_071630
h CL1	7	KFNANCSFNIVSERSML--VNSYDQGR--LVESNKH-----M [↓] CHLTHRESEF--AVDMAYGVV	NP_055736
h HR6	7	ELTVRCVFNILGRNGR--GNSDNGCS--VDRRLNE-----M [↓] CHLTHRESEF--AVDMAYGVV	NP_005747
r Ig-Hepta	7	GGKPOCVFNIFSLAANT--GNSDSGCT--VEDDGRN-----M [↓] CHLTHRESEF--AVDMAYGVV	NP020810
d Flamingo	7	RSNPOCVFNIFSLAANT--GNSDSGCT--VEDDGRN-----M [↓] CHLTHRESEF--AVDMAYGVV	BAAB4069
ouREJ1	11	MHTLQCNFNN--EDDQ--ENDDTGCKV--GPLEKSP-----M [↓] CHLTHRESEF--AVDMAYGVV	U40832
ouREJ3	11	MHTPOCTFNN--EEDQ--NWSAGCKG--GPLENPTK-----M [↓] CHLTHRESEF--AVDMAYGVV	AAI26429
h Polycystin-1	11	LVYSLCQVFS--EEDM--VNRTEGLLP--LEETSPPQ-----M [↓] CHLTHRESEF--AVDMAYGVV	P98161
Consensus		C W G W G C T C C H L T P A	

Flèche noire: clivage GPS, le site HLT

Flèche verte: position du codon STOP inséré dans $Pkd1_{extra}$

Lin *et al.*, 2004

Notre $pc1_{extra}$ possède un codon STOP à la position p3 qui est une phénylalanine (F3043 murine/F3051 humaine), un résidu hydrophobe fortement conservé dans tous les

membres dont le clivage/tethering a été démontré (Tab.3-I). Conséquemment, les petits acides aminés hydrophobes qui suivent la phénylalanine sont complètement absents ce qui pourrait empêcher la $pc1_{extra}$ de se lier de façon non-covalente avec le C-terminal de la $pc1_{endo}$. L'importance fonctionnelle de ces acides aminés hydrophobes chez la polycystine reste à être confirmée. Des souris «knock-in» avec des mutations spécifiques dans ces acides aminés hydrophobes les transformant en acides aminés hydrophiles (eg. Ser, Thr) pourraient répondre à cette énigme.

Pour vérifier si la protéine $pc1_{extra}$ réussit à border la membrane via le C-terminal endogène, il est suggéré d'effectuer des extraits membranaires $Pkd1_{extra}$ lesquels seront co-immunoprécipités en utilisant un anticorps contre le domaine C-terminal de la $pc1$. En faisant un blot par un anticorps N-terminal de la $pc1$, dans le cas où la protéine transgénique bordait la membrane, l'intensité des bandes devrait encore suivre le nombre des copies du transgène comme dans le cas des extraits totaux (Fig.2-3D).

Il est légitime de supposer qu'une surexpression transgénique de notre $pc1_{extra}$ formerait des agrégations de la protéine transgénique dans la cellule pouvant mener, indirectement par la présence du transgène, à l'apoptose, une caractéristique typique d'ADPKD (Lanoix *et al.*, 1996; Trudel *et al.*, 1998). La présence d'agrégats protéiques reste à être vérifiée par microscopie électronique. Toutefois, un effet important direct de ces accumulations protéiques sur le phénotype kystique des souris $Pkd1_{extra}$ est peu probable puisque même les souris de la lignée 39 qui expriment le transgène à des faibles niveaux, développent la polykystose rénale.

3.1.3.3.4 Comparaison du mécanisme d'action potentiel du domaine extracellulaire de $pc1$ avec celui de certains récepteurs clivés

À cette étape du projet, nous ne sommes pas en mesure de spéculer sur le mode du fonctionnement cellulaire de la protéine exogène $pc1_{extra}$ qui mène à la polykystose rénale. Il est clair qu'il s'agit d'une protéine stable, mais dont le rôle peut dépendre de plusieurs facteurs, dont principalement la localisation cellulaire ainsi que de modifications post-traductionnelles, qui restent à être étudiés. Plusieurs récepteurs sont clivés au site GPS dont le rôle est beaucoup mieux connu que celui de la polycystine-1.

Le domaine N-terminal de la pc1 pourrait-il fonctionner similairement au domaine N-terminal d'un de ces récepteurs connus? Quelles seront leurs ressemblances?

Tout comme la PC1, BAI1, un inhibiteur d'angiogenèse du cerveau, est clivé dans son site GPS résultant en deux sous-unités N- et C- terminales. L'importance de la sous-unité N-terminale de BAI1 a été rapportée récemment; ce domaine, seul et indépendamment des domaines transmembranaires et C-terminale, posséderait un rôle dose-dépendant antiangiogénique et antitumorogénique *in vivo* (Kaur *et al.*, 2005). Le domaine N-terminal de la pc1 semble avoir des propriétés plutôt différentes. Premièrement, l'ectodomaine N-terminal de la PC1 est beaucoup plus complexe que celui de BAI1 et pourrait même lier plusieurs ligands différents basé sur la diversité de ses sous-domaines extracellulaires (Fig.1-4; Tab.1-V). Le clivage de PC1 donne lieu au domaine extracellulaire plutôt bordant la membrane alors que celui de BAI est principalement sécrété. Finalement, à l'opposé de BAI1, l'effet d'expression de N-terminal ou, dans notre cas, d'au moins 3042 acides aminés du domaine N-terminal de pc1, sur le phénotype résultant ne semble pas être dose-dépendant; les quatre lignées Pkd1_{extra} exprimant le transgène à des niveaux très différents ont une sévérité de phénotype kystique très similaire. Toutefois, la possibilité que le domaine extracellulaire de pc1 retienne la capacité du récepteur natif de liaison au ligand tout comme décrit pour BAI1 et les récepteurs mGluR (Okamoto *et al.*, 1998) ne peut être exclue.

Malgré leurs fortes ressemblances au niveau du clivage, les récepteurs LNT de classe B dont fait partie la polycystine-1 ont des grandes divergences au niveau de la structure et de la composition des motifs N-terminal laissant suggérer des mécanismes d'action et de régulation complètement différents. La polycystine diverge encore plus de cette famille de protéines en raison du nombre de domaines transmembranaires. Elle en possède 11 alors que les autres membres n'en ont que 7. Une autre possibilité est que la polycystine-1 soit clivée à un endroit autre que le site GPS, comme il a été suggéré pour d'autres récepteurs de cette classe dont le DREG (Moriguchi *et al.*, 2004) et Ig-Hepta (Abe *et al.*, 2002), agissant probablement comme ligand sur son propre récepteur PC1, sur d'autres types de récepteurs ou avoir un rôle indépendant du reste de la protéine. L'identification de sites de clivage de la pc1 autres que le site GPS (Qian *et al.*, 2002) et le clivage en C-terminal de la polycystine (Chauvet *et al.*, 2004) ainsi que les

protéases effectrices mènera à une meilleure compréhension de(s) fonction(s) de la polycystine-1.

3.2 Tubulogenèse rénale normale chez les souris $Pkd1_{extra}$

3.2.1 Implication possible de $Pkd1$ dans le développement rénal

Le gène $Pkd1$ est exprimé au cours du développement rénal et pourrait avoir un rôle dans le branchement du bourgeon urétérique rénal (UB). Son expression est détectée dans l'épithélium du UB rénal à partir de E12.5 (van Adelsberg, 1999; Griffin *et al.*, 1997; Geng *et al.*, 1997; Voir section 1.5.1.1) mais aussi dans d'autres organes reposant sur la morphologie du branchement et les interactions épithélium-mésenchyme dont le pancréas et les poumons. L'inactivation de $Pkd1$ chez des modèles murins mène à la mort *in utero* et la formation de kystes tubulaires dans le rein et dans le pancréas (Tab.1-IX). L'expression de PKD1 humain dans les cellules MDCK ($MDCK^{PKD1Zeo}$) mène spontanément à la tubulogenèse dans les gels de collagène, des tubules en branchement et induit une résistance à l'apoptose, alors que les cellules contrôles ($MDCK^{Zeo}$) (Boletta *et al.*, 2000) et les cellules exprimant des mutants PKD1 avec un site GPS non-fonctionnels (Qian *et al.*, 2002) forment de simples kystes. La polycystine-1 interagit également avec les molécules impliquées directement dans la morphogenèse du branchement dont la β -caténine (Pollack *et al.*, 1997). Les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire tout comme la migration cellulaire, des caractéristiques typiques du domaine extracellulaire *in vitro* (Tab.1-X), sont très importantes lors de la transition mésenchyme-épithélium rénal. Toutes ces observations suggèrent un rôle de $Pkd1$ dans le branchement urétérique, la tubulogenèse et la morphogenèse rénale (un rôle développemental dans la morphogenèse du rein mammifère).

3.2.2 Effet du transgène $Pkd1_{extra}$ sur la tubulogenèse rénale

Le profil des branchements urétériques est altéré tout comme le nombre de néphrons dans les reins embryonnaires murins en culture isolés à E11.5 traités par le peptide compétitif de PC1, le peptide VAYHWDFGDGS, un motif très conservé dans les

domaines PKD du domaine extracellulaire de PC1 et qui joue probablement un rôle d'inhibiteur de la tubulogénèse (van Adelsberg, 1999; Polgar K *et al.*, 2005). Le transgène Pkd1_{extra} composé de l'extrémité N-terminale de pc1 pourrait-il médier un rôle tubulogénique de la polycystine-1?

Afin de répondre à cette question, nous avons vérifié si le branchement du UB de souris transgéniques Pkd1_{extra} était altéré en comptant le nombre de glomérules dans les reins des souris Pkd1_{extra} à 1.5 mois, l'âge où le développement rénal murin est terminé et le nombre de glomérules établi (Bonvalet *et al.*, 1977). Il est usuel d'évaluer la taille du rein et le nombre de glomérules qui reflète le nombre de néphrons et est proportionnel aux branchements du UB (Oliver *et al.*, 1968; Al-Awqati *et al.*, 1998). Le nombre de glomérules et donc de néphrons ne semble pas changer chez les souris transgéniques Pkd1_{extra} par rapport aux souris contrôles suggérant un nombre de branchements inaltéré. Ce résultat corrèle aussi avec un rapport similaire du poids du rein sur celui du corps chez les souris transgéniques relativement aux souris contrôles. Les expériences supplémentaires seront nécessaires pour étudier le profil des branchements urétérique et de sa symétrie chez les souris Pkd1_{extra} qui pourraient être altérés malgré le nombre de néphrons inchangé comme dans les études de culture d'organes où l'on trouve un défaut dans le profil (symétrique/asymétrique) de branchement (Adelsberg, 1999).

L'absence du phénotype tubulogénique rénal chez nos souris transgéniques par rapport aux études *in vitro* peut être expliquée de plusieurs façons.

Premièrement, les études *in vitro* ne reflètent pas nécessairement ce qui se passe *in vivo* dû à l'absence de certains facteurs manquants dans les études *in vitro* qui pourraient être redondants *in vivo* (eg. HGF, bFGF). Cette divergence des études *in vitro/in vivo* a été rapportée dans plusieurs autres observations d'organes en culture qui inhibent le développement rénal, versus l'inactivation (ie. «knock-out») de ce même facteur (revue dans Al-Awqati *et al.*, 1998).

Deuxièmement, la polycystine-1 est exprimé à E12, mais son expression est maximale entre E15 et E17, suggérant un rôle plutôt dans la maturation tubulaire et non pas dans les étapes précoces du développement telle la tubulogénèse. Notre transgène est

exprimé aux stades et tissus où est exprimé le Pkd1 endogène reproduisant plus fidèlement le contexte naturel.

Troisièmement, le manque de phénotype tubulogénique chez les souris Pkd1_{extra} pourrait être expliqué par l'absence de la partie C-terminale. *In vitro*, le domaine C-terminal seul, sans la partie extracellulaire, ancré à la membrane via CD16.7 est capable d'affecter la morphogenèse du branchement rénal tout comme la migration des cellules épithéliales rénales via PKC (Nickel *et al.*, 2002) et reproduit un phénotype très similaire à la polycystine-1 native (Qian *et al.*, 2002; Boletta *et al.*, 2000). Ces résultats suggèrent que la tubulogenèse rénale ne serait pas régulée essentiellement par la partie extracellulaire mais plutôt par sa partie intracellulaire. La génération de souris transgénique exprimant que le domaine C-terminal tout comme le croisement de ces souris avec les souris Pkd1_{extra} pourrait élucider le rôle du domaine C-terminal dans la tubulogenèse rénale *in vivo*.

3.3 Polykystose rénale des souris Pkd1_{extra}

3.3.1 Caractéristiques du phénotype rénal Pkd1_{extra}

La souris transgénique Pkd1_{extra} qui exprime le domaine extracellulaire de Pkd1 en plus d'exprimer le gène Pkd1 endogène développe une polykystose rénale tardive. Les premières anomalies cellulaires, dont surtout l'hyperplasie des cellules pariétales glomérulaires, sont observées dès l'âge de 2 mois. Les défauts rénaux tel que les kystes glomérulaires et tubulaires, la fibrose et les infiltrats interstitiels, progressent en fonction de l'âge et les décès surviennent en moyenne vers 20 mois. Toutes les quatre lignées transgéniques Pkd1_{extra}, celle de faible (lignée 39) ou de haut niveau d'expression du transgène (lignée 2) développent la maladie. Tout comme chez l'humain, le phénotype rénal Pkd1_{extra} est tardif et présente des caractéristiques cellulaires typiques d'ADPKD. Toutefois, la sévérité du phénotype kystique ne semble pas dose-dépendante du transgène Pkd1_{extra}. Les explications possibles de cette dernière observation se trouvent dans les paragraphes qui suivent.

3.3.2 Mode d'action de $pc1_{extra}$ dans la polykystose rénale tardive

3.3.2.1 Hypothèse du dominant-négatif de $pc1_{extra}$

Comme mentionné avant, les souris $Pkd1_{extra}$ autant avec une faible qu'avec une forte expression du transgène développent une polykystose rénale et ce avec une sévérité du phénotype très semblable. Pourquoi la cellule ne répondrait-elle pas différemment aux niveaux différents du transgène? De plus, cette observation élimine-t-elle automatiquement l'hypothèse du dominant négatif du domaine extracellulaire?

Il est possible que $pc1_{extra}$ joue un rôle dominant négatif mais partiel et incomplet. En effet, une localisation spécifique de $pc1_{extra}$, qui reste pour le moment à déterminer, pourrait interférer avec certaines des fonctions potentielles de la polycystine-1 endogène. Une autre explication possible serait basée sur l'hypothèse que le domaine extracellulaire puisse agir comme ligand de la polycystine-1 ou d'un autre récepteur. Dans ce cas, une quantité de récepteur limitée, peu importe la quantité de ligand, permettra une réponse cellulaire limitée. La lignée 2 n'aurait alors pas une manifestation rénale nécessairement plus importante que la lignée 39 puisque dans les deux cas les récepteurs seront saturés en ligand. Le même raisonnement s'appliquerait si la $pc1_{extra}$ agissait comme le récepteur à un ligand avec une disponibilité limitée.

3.3.2.1 Implication de gènes modificateurs dans le phénotype $Pkd1_{extra}$

L'insuffisance rénale des souris $Pkd1_{extra}$ est plutôt tardive (~20 mois) alors que les premières anomalies rénales sont observées aussi tôt que 2 mois. Pourquoi le rein $Pkd1_{extra}$ prendrait-il si longtemps pour développer de gros kystes?

Un des joueurs importants qui pourraient influencer la manifestation de la maladie sont les gènes modificateurs comme suggéré dans ADPKD humain (**Voir section 1.3.1.3.2**). À un âge donné, les souris transgéniques $Pkd1_{extra}$ issus d'une même lignée transgénique ont des sévérités de phénotype rénal différentes. Puisque les gènes modificateurs semblent influencer le phénotype chez l'humain et les modèles murins (**Voir section 1.3.1.3.2; Upadhyia et al., 1999; Bihoreau et al., 2002**), il serait intéressant d'analyser

le rôle du transgène $Pkd1_{extra}$ sur un fond génétique autre que CBAx57/BL6 utilisé dans notre étude.

3.4 Manifestation extrarénale des souris $Pkd1_{extra}$

3.4.1 Absence de phénotype extrarénal typique ADPKD chez les souris $Pkd1_{extra}$

Les observations tel que l'expression quasiment ubiquitaire du transgène $Pkd1_{extra}$ (Fig.2-3) ainsi que la présence de manifestations extrarénales importantes chez les patients ADPKD (Tab.1-II) laissent supposer l'apparition de manifestations extrarénales chez les souris $Pkd1_{extra}$. Nos analyses préliminaires démontrent que les souris $Pkd1_{extra}$ ne semblent pas manifester d'effets extrarénaux caractéristique/typique ADPKD tel que les kystes hépatiques, pancréatiques, anévrismes ou défauts cardiaques. Plusieurs mécanismes peuvent être envisagés pour expliquer cette observation. Le domaine extracellulaire pourrait avoir un rôle rein-spécifique et moins important sur les autres organes. De plus, il est possible que le domaine extracellulaire seul, sans domaines intracellulaires et transmembranaires ne soit pas suffisant pour développer un effet extrarénal. Cependant, une splénomégalie statistiquement significative chez les souris transgéniques de la lignée 11 et 39 nécessite d'être mentionnée (Voir section 3.4.2).

3.4.2 Implication de $pc1_{extra}$ dans la splénomégalie chez les souris $Pkd1_{extra}$

Le phénotype splénique inattendu observé chez les souris $Pkd1_{extra}$ inclut une infiltration lymphomateuse, des mégacaryocytes, et une architecture complètement aberrante chez les souris transgéniques indiquant une activité extramédullaire importante. Les infiltrats de macrophages, monocytes et lymphocytes sont souvent rapportés dans les reins ADPKD et autres maladies rénales non-immunes (Zeier *et al.*, 1992) soulevant la question sur l'importance du rôle de $Pkd1$ dans l'hématopoïèse. La splénomégalie pourrait-elle résulter d'un effet direct de la polycystine-1 dans la rate? L'expression de $Pkd1$ dans des lignées spécifiques lymphocytaires, qui restent à être déterminées, pourrait-elle constituer un des effets directs sinon initiateurs du phénotype rénal également? Une inactivation spatio-conditionnelle de $Pkd1$ dans les lignées lymphocytes spécifiques pourra répondre au rôle de $Pkd1$ dans le système hématopoïétique.

La polycystine-1 ne serait pas la seule protéine impliquée dans la polykystose rénale avec un rôle potentiel dans les lymphocytes et l'immunité cellulaire. Le PKHDL1, un homologue de PKHD1 impliqué dans la polykystose rénale autosomique récessive, est fortement exprimé dans les lymphocytes et son expression spécifiquement augmentée dans les lymphocytes T (Hogan *et al.*, 2003). De plus, le Pkd1 et PKHDL1 sont tous les deux exprimés dans les cellules d'érythroleucémie K562 (Hogan *et al.*, 2003; Aguiari *et al.*, 1998). Ces deux maladies génétiques de polykystose rénale, autosomique dominante et autosomique récessive, pourraient avoir des voies de signalisation lymphocytaires importantes, voire communes.

3.5 Effecteurs potentiels de $pc1_{extra}$

3.5.1 Dérégulation de l'expression de c-myc chez les souris $Pkd1_{extra}$

Le proto-oncogène c-myc, impliqué dans la prolifération et l'apoptose, semble être un médiateur important dans la polykystose rénale chez les patients ADPKD. L'expression rénale de c-myc y est augmentée jusqu'à 15 fois (Lanoix *et al.*, 1996). La surexpression seule de c-myc chez la souris transgénique SBM induit la polykystose rénale (Trudel *et al.*, 1991) où l'expression de c-myc corrèle avec initiation et progression du phénotype PKD (Trudel *et al.*, 1998). L'expression de c-myc est pareillement un médiateur important de la polykystose rénale dans le modèle SBPkd1_{Tag} qui surexprime le gène Pkd1 (Thivierge *et al.*, 2006). Toutes ces observations nous ont incités à vérifier l'expression de c-myc chez notre modèle transgénique Pkd1_{extra}.

Le phénotype kystique de souris Pkd1_{extra} est accompagné par une augmentation de l'expression de c-myc. Toutes les souris Pkd1_{extra} en insuffisance rénale ont une augmentation de c-myc corrélant avec son rôle dans ADPKD (Fig.2-6). Nos résultats préliminaires suggèrent que c-myc accompagne la polykystose rénale de souris transgéniques Pkd1_{extra}. Il reste à déterminer si l'expression de c-myc constitue un des éléments déclencheurs de polykystose rénale des souris Pkd1_{extra} ou n'est qu'une conséquence du phénotype kystique. Le rôle direct de c-myc dans notre modèle transgénique pourrait être vérifié en croisant les souris Pkd1_{extra} avec le modèle murin conditionnel myc^{flox-flox}.

La voie d'activation transcriptionnelle de c-myc dans les reins kystiques Pkd1_{extra} n'est pas encore connue et reste à être étudiée. Il est possible que la partie clivée C-terminale de Pkd1 comme suggéré par Chauvet (**Chauvet et al., 2004**) agisse directement au niveau du promoteur de c-myc ou en activant les facteurs transcriptionnels de c-myc tel que la β -caténine. Il est également possible qu'une autre voie soit activée indépendamment de l'activité transcriptionnelle nucléaire de pc1 (**Chauvet et al., 2004**) afin d'influencer l'expression de l'oncogène c-myc.

3.5.2 Influence de l'expression de pc1_{extra} sur l'expression de pc2

La polycystine-1 et polycystine-2 sont toutes les deux impliquées dans la polykystose et mènent aux phénotypes quasiment indistinguables suggérant des voies de signalisation communes. De plus, la polycystine-1 est capable d'interagir avec la polycystine-2 (**Tsiokas et al., 1997; Hanaoka et al., 2002, Qian et al., 1997**) et former des complexes hétérodimériques. La déstabilisation de ces complexes ou encore une de ses composantes pourrait prédisposer à la polykystose. Nos résultats suggèrent une stabilisation de la protéine pc1 endogène (**Fig.2-3**) mais également la polycystine-2 par le transgène Pkd1_{extra} (**Fig.2-7**). La stabilisation se ferait au niveau protéique car l'expression du messenger Pkd2 est inchangée.

3.5.2.1 Stabilisation réciproque de PC1 et PC2 rapportée dans les autres études

Par quel mécanisme une stabilisation protéique réciproque entre les polycystines ADPKD se ferait-elle? L'ordre séquentiel dans lequel la stabilisation surviendrait serait très instructif. La stabilisation de la polycystine-1 endogène précéderait-elle la stabilisation de la pc2 ou vice versa? Les deux cas peuvent être envisageables. Il a été déjà suggéré que la stabilisation de PC1 pourrait dépendre de PC2 (**Tsiokas et al., 1997**) et que les niveaux de PC1 semblent augmenter en présence de PC2. Dans ce cas, le PC2 interagirait et stabiliserait la PC1, un phénomène qui s'effectuerait au niveau de la membrane. Pour l'instant, notre étude ne nous permet pas d'affirmer dans quel compartiment sous-cellulaire se ferait la stabilisation observée: membrane, ER ou cils. La réponse à cette question sera très informative puisque la localisation de PC2 apparaît très importante. Le PC2 semble influencer la localisation intracellulaire de PC1

(Grimm *et al.*, 2003) et donc probablement sa fonction vraisemblablement différente d'un compartiment à l'autre.

3.5.2.2 Nature et mécanisme potentiel de stabilisation de pc2 par Pkd1_{extra}

Une étude de localisation de pc1 et pc2 chez les souris transgéniques Pkd1_{extra} sera nécessaire pour connaître plus sur ce mécanisme de stabilisation déclenchée par pc1_{extra}. La stabilisation pourrait être physique et directe puisque les deux peuvent faire partie d'un même complexe. Une stabilisation indirecte ne peut être exclue. La stabilisation de pc1 pourrait initier une voie de signalisation qui aboutira à la stabilisation de pc2. Un de ces exemples c'est la stabilisation de GSK, un intermédiaire de la voie Wnt importante dans l'ADPKD1 (Voir section 1.7.3.2), qui semble nécessaire pour la phosphorylation de PC2 (Streets *et al.*, 2006), une modification post-traductionnelle requise pour la localisation membranaire de PC2.

3.5.2.3 Effet possible de la stabilisation de pc2 par Pkd1_{extra}

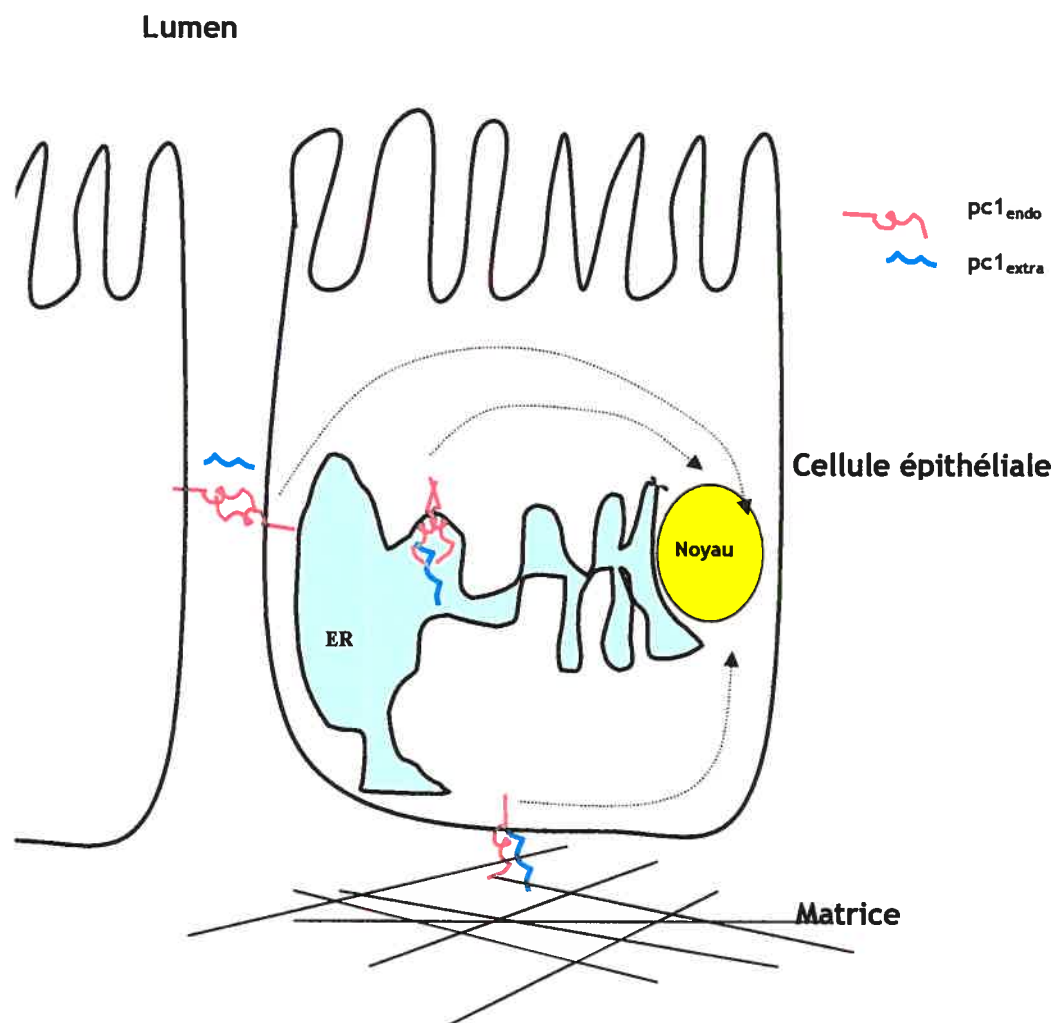
Il faut se poser la question sur l'effet de cette stabilisation sur la physiologie rénale. Le phénotype kystique des souris Pkd1_{extra} aurait-il été plus sévère si c'était avec un fond génétique Pkd2-haploinsuffisant? Il serait intéressant d'exploiter cette possibilité. La pc2 n'a-t-elle qu'un rôle de tampon d'activité/localisation de pc1 ce qui pourrait expliquer un phénotype polykystique tardif chez nos souris transgéniques Pkd1_{extra}. Il est connu que la pc2 est capable d'antagoniser l'activation constitutive des protéines-G initiée par la pc1 (Delmas *et al.*, 2002) et de réguler la localisation nucléaire de pc1 (Chauvet *et al.*, 2004), deux voies de signalisation très importantes dans la polykystose rénale (Voir section 1.7.3). Un déséquilibre de l'expression/localisation de pc1 par le transgène Pkd1_{extra} pourrait entraîner une dérégulation des complexes des protéines polycystines qui répondra par une stabilisation d'autres composantes du complexe dont la composante principale, la polycystine-2.

3.6 Conclusion

En résumé, dans notre étude nous avons démontré que l'expression d'une protéine mutante constituée de 3042 acides aminés du N-terminal de la polycystine-1 chez la souris transgénique est suffisante pour développer une polykystose rénale similaire de plusieurs angles à la polykystose rénale humaine: progression de la maladie, effecteur impliqué tel c-myc, pathologie cellulaire. La signification de ce modèle peut se révéler importante à plusieurs niveaux. La souris $Pkd1_{extra}$ manifestant des caractéristiques typiques d'ADPKD humain pourra servir de modèle d'étude de la pathologie cellulaire kystique en particulier les défauts dans la matrice extracellulaire, les adhésions cellulaires et le cytosquelette. Cette étude ouvre une nouvelle porte pour la compréhension de fonctionnement des protéines mutées PKD1 ainsi que sur l'identification des substrats/ligands du domaine extracellulaire de la pcl.

Il ne serait pas surprenant que la polycystine-1 possède de multiples rôles dans la cellule selon sa localisation, sa modification post-traductionnelle, ses partenaires protéiques, ses ligands et les gènes modificateurs. De plus, ses fonctions sont potentiellement modulées aussi selon son stade développemental (*in utero* vs post-natal), ses conditions cellulaires (eg: stress mécanique) et pathologiques. La polycystine-1 serait une molécule très complexe et même intrigante, aussi bien du point de vue de la complexité de sa structure protéique que de ses fonctions intracellulaires multiples et diverses.

Figure 3-1: Représentation schématique des sites d'interaction possible de $pc1_{endo}$ et $pc1_{extra}$



Les sites d'interaction de la polycystine-2 ($pc2$) avec la polycystine-1 endogène ($pc1_{endo}$) ou la polycystine-1 du transgène ($pc1_{extra}$) ne sont pas inclus dans ce schéma afin d'alléger la représentation. La $pc2$ se trouve principalement au niveau de l'ER et la membrane et pourrait influencer la localisation, voire la fonction de la $pc1$. La distribution de la polycystine-1 et son rôle pourraient également dépendre de plusieurs autres facteurs mentionnés dans la section **Conclusion** dont les modifications post-traductionnelles (le clivage), le stade du développement rénal, la nature du tissu, les conditions et l'environnement cellulaire, etc. Les études de la sous-localisation cellulaire de la protéine $pc1_{extra}$ permettront de faire la lumière sur la fonction du domaine extracellulaire de $pc1$.

BIBLIOGRAPHIE

Abe J., Fukuzawa T., Hirose S., Cleavage of Ig-hepta at a «SEA» module and at a conserved G protein-coupled receptor proteolytic site, *J Biol Chem* 277:23391-23398 (2002)

van Adelsberg JS., Frank D., The PKD1 gene produces a developmentally regulated protein in mesenchyme and vasculature, *Nat Med* 1:359-364 (1995)

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

van Adelsberg J., Peptides from the PKD repeats of polycystin, the PKD1 gene product, modulate pattern formation in the developing kidney, *Dev Genet* 24:299-308 (1999)

Aguiari G., Piva R., Manzati E., Mazzoni E., Augello G., Chiari E., Moretti S., Neri LM., del Senno L., K562 erythroid and HL60 macrophage differentiation downregulates polycystin, a large membrane-associated protein, *Exp Cell Res* 244:259-267 (1998)

Ahn K., Herman SB., Fahnoe DC., Soluble human endothelin-converting enzyme-1: expression, purification, and demonstration of pronounced pH sensitivity, *Arch Biochem Biophys* 359:258-268 (1998)

Al-Awqati Q., Goldberg MR., Architectural patterns in branching morphogenesis in the kidney, *Kidney Int* 54:1832-1842 (1998)

Al-Bhalal L., Akhtar M., Molecular basis of autosomal dominant polycystic kidney disease, *Adv Anat Pathol* 12:126-133 (2005)

American PKD1 Consortium (ADPKD1 Consortium) (Représenté par Burn TC., Connors TD., Dackowski WR., Petry LR., Van Raay TJ., Millholland JM., Venet M., Miller G., Hakim RM., Landes GM., *et al.*) Analysis of the genomic sequence for the autosomal dominant polycystic kidney disease (PKD1) gene predicts the presence of leucine-rich repeat, *Hum Mol Genet* 4:575-582 (1995)

Ariyurek Y., van Leeuwen IL., Spruit L., Ravine D., Breuning MH., Peters DJM., Large deletions in the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene, *Hum Mutat* (Mutation in brief) #679 (2004)

Ariza M., Alvarez V., Marin R., Aguado S., Lopez-Larrea C., Alvarez J., Menendez MJ., Coto E., A family with a milder form of adult dominant polycystic kidney disease not linked to the PKD1 (16p) or PKD2 (4q) genes, *J Med Genet* 34:587-589 (1997)

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

Atala A., Freeman M., Mandell J., Beier D., Juvenile cystic kidneys (jck): a new mutation in the mouse which predisposes to the development of polycystic kidneys, *Kidney Int* 43:1081-1085 (1993)

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

Bacolla A., Jaworski A., Connors TD., Wells RD., PKD1 unusual DNA conformations are recognized by nucleotide excision repair, *J Biol Chem* 276:18597-18604 (2001)

Baert L., Hereditary polycystic kidney disease (adult form): a microdissection study of two cases at an early stage of the disease, *Kidney Int* 13:519-525 (1978)

Barr MM., Sternberg PW., A polycystic kidney-disease gene homologue required for male mating behaviour in *C. elegans*, *Nature* 401:386-389 (1999)

Barr MM., DeModena J., Braun D., Nguyen CQ., Hall DH., Sternberg PW., The *Caenorhabditis elegans* autosomal dominant polycystic kidney disease gene homologs *lov-1* and *pkd-2* act in the same pathway, *Curr Biol* 11:1341-1346 (2001)

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

Bhunja AK., Piontek K., Boletta A., Liu L., Qian F., Xu P-N., Germino J., Germino GG., PKD1 induces p21^{waf1} and regulation of the cell cycle via direct activation of the JAK-STAT signalling pathway in a process requiring PKD2, *Cell* 109:157-168 (2002)

Bihoreau M., Ceccherini I., Browne J., Kranzlin B., Romeo G., Lathrop G., James M., Gretz N., Location of the first genetic locus, PKDr1, controlling autosomal dominant polycystic kidney disease in Han:SPRD cy/+ rat, *Hum Mol Genet* 6:609-613 (1997)

Bihoreau MT., Megel N., Brown JH., Kranzlin B., Crombez L., Tychinskaya Y., Broxholme J., Kratz S., Bergmann V., Hoffman S., Gauguier D., Gretz N., Characterization of a modifier locus for polycystic kidney disease (*Modpkdr1*) in the Han:SPRD(cy/+) rat in a region conserved with a mouse modifier locus for Alport syndrome, *Hum Mol Genet* 11:2165-2173 (2002)

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

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

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

Boletta A., Qian F., Onuchic LF., Bhunia AK., Phakdeekitcharoen B., Hanaoka K., Guggino W., Monaco L., Germino GG., Polycystin-1, the gene product of PKD1, induces resistance to apoptosis and spontaneous tubulogenesis in MDCK cells, *Mol Cell* 6:1267-1273 (2000)

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

Boletta A., Germino GG., Role of polycystins in renal tubulogenesis, *Trends Cell Biol* 13:484-492 (2003)

Bonvalet JP., Champion M., Courtalon A., Farman N., Vandewalle A., Wanstok F., Number of glomeruli in normal and hypertrophied kidneys of mice and guinea-pigs, *J Physiol* 269:627-641 (1977)

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

Brasier JL., Henske EP., 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 (1997)

Brem G., Wanke R., Wolf E., Buchmuller T., Muller M., Brenig B., Hermanns W., Multiple consequences of human growth hormone expression in transgenic mice, *Mol Biol Med* 6:531-547 (1989)

Brook-Carter PT., Peral B., Ward CJ., Thomson P., Hughes J., Maheshwar MM., Nellist M., Gamble V., Harris PC., Sampson JR., Deletion of the TSC2 and PKD1 genes associated with severe infantile polycystic kidney disease—a contiguous gene syndrome, *Nat Genet* 8:328-332 (1994)

Bukanov NO., Husson H., Dackowski WR., Lawrence B., Clow PA., Roberts BL., Klinger KW., Ibraghimov-Beskrovnaya O., Functional polycystin-1 expression is developmentally regulated during epithelial morphogenesis in vitro: downregulation and loss of membrane localization during cystogenesis, *Hum Mol Genet* 11:923-936 (2002)

Burn TC., Connors TD., Dackowski WR., Petry LR., Van Raay TJ., Millholland JM., Venet M., Miller G., Hakim RM., Landes GM., et al., Analysis of the genomic sequence for the autosomal dominant polycystic kidney disease (PKD1) gene predicts the presence of leucine-rich repeat, *Hum Mol Genet* 4:575-582 (1995)

Butscheid Y., Chubanov V., Steger K., Meyer D., Dietrich A., Gudermann T., Polycystic kidney disease and receptor for egg jelly is a plasma membrane protein of mouse sperm head, *Mol Reprod Dev* 73:350-360 (2006)

Bycroft M., Bateman A., Clarke J., Hamill SJ., Sandford R., Thomas RL., Chothia C., The structure of a PKD domain from polycystin-1: implications for polycystic kidney disease, *EMBO J* 15;18:297-305 (1999)

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

Calvet JP., Grantham JJ., The genetics and physiology of polycystic kidney disease, *Semin Nephrol* 21:107-123 (2001)

Carone FA., Rowland RG., Perlmann SC., Ganote CE., The pathogenesis of drug-induced renal cystic disease, *Kidney Int* 5:411-421 (1974)

Carone FA., Makino H., Kanwar YS., Basement membrane antigens in renal polycystic disease, *Am J Pathol* 130:466-471 (1988)

Carpenter C., Honkanen AA., Mashimo H., Goss KA., Huang P., Fishman MC., Renal abnormalities in mutant mice, *Nature* 380:292 (1996)

Chada K., Magram J., Raphael K., Radice G., Lacy E., Costantini F., Specific expression of a foreign b-globin gene in erythroid cells of transgenic mice, *Nature* 314:377-380 (1985)

Chang G-W., Stacey M., Kwakkenbos MJ., Hamann J., Gordon S., Lin H-H., Proteolytic cleavage of the EMR2 receptor requires both the extracellular stalk and the GPS motif, *FEBS Letters* 547:145-150 (2003)

Chang C-P., McDill BW., Neilson JR., Joist HE., Epstein J., Crabtree GR., Chen F., Calcineurin is required in urinary tract mesenchyme for the development of the pyeloureteral peristaltic machinery, *J Clin Invest* 113:1051-1058 (2004)

Charron AJ., Nakamura S., Bacallao R., Wandinger-Ness A., Compromised cytoarchitecture and polarized trafficking in autosomal dominant polycystic kidney disease cells, *J Cell Biol* 149:111-124 (2000)

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

Chauvet V., Tian X., Husson H., Grimm DH., Wang T., Hiesberger T., Igarashi P., Bennett AM., Ibraghimov-Beskrovnaya O., Somlo S., Caplan MJ., Mechanical stimuli induce cleavage and nuclear translocation of the polycystin-1 C terminus, *J Clin Invest* 114:1433-1443 (2004)

Cheadle JP., Reeve MP., Sampson JR., Kwiatkowski DJ., Molecular genetic advances in tuberous sclerosis, *Hum Genet* 107:97-114 (2000)

Chen XZ., Vassilev PM., Bassora N., Peng JB., Nomura H., Segal Y., Brown EM., Reeders ST., Hediger MA., Zhou J., Polycystin-L is a calcium-regulated cation channel permeable to calcium ions, *Nature* 401:383-386 (1999)

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

Choukroun G., Itakura Y., Albouze G., Christophe JL., Man NK., Grünfeld JP., Jungers P., Factors influencing progression of renal failure in autosomal polycystic kidney disease, *J Am Soc Nephrol* 6:1634-1642 (1995)

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

Cole BR., Conley SB., Stapleton FB., Polycystic kidney disease in the first year of life, *J Pediatr* 111:693-699 (1987)

Colgin LM., Hackmann AF., Emond MJ., Monnat RJ Jr., The unexpected landscape of in vivo somatic mutation in a human epithelial cell lineage, *Proc Natl Acad Sci USA* 99:1437-1442 (2002)

Collier S., Tassabehji M., Sinnott P., Strachan T., A *de novo* pathological point mutation at the 21-hydroxylase locus : implications for gene conversion in the human genome, *Nat Genet* 4:101 (1994)

Couillard M., Guillaume R., Tanji N., D'Agati V., Trudel M., c-myc-induced apoptosis in polycystic kidney disease is independent of FasL/Fas interaction, *Cancer Res* 62:2210-2214 (2002)

Cowley B., Gudapaty S., Kraybill A., Barash B., Harding M., Calvet J., Gattone V., Autosomal-dominant polycystic kidney disease in the rat, *Kidney Int* 49:522-534 (1993)

Crocker JFS., Stewart AG., Sparling JM., Bruneau ME., Steroid-induced polycystic kidneys in the newborn rat, *Am J Pathol* 82:373-380 (1976)

Cuppige FE., Huseman RA., Chapman A., Grantham JJ., Ultrastructure and function of cysts from human adult polycystic kidneys, *Kidney Int* 17:372-381 (1980)

Dalgaard OZ., Bilateral polycystic disease of the kidneys: A follow-up of two hundred and eighty-four patients and their families, *Acta Med Scand* 328:1-255 (1957)

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

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

Dell KM., Li YX., Peng M., Neilson EG., Gasser DK., Localization of the mouse kidney disease (kd) gene to a YAC/BAC contig on chromosome 10, *Mamm Genome* 11:967-971 (2000)

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

Delmas P., Nauli SM., Li X., Coste B., Osorio N., Crest M., Brown DA., Zhou J., Gating of the polycystin ion channel signaling complex in neurons and kidney cells, *FASEB J* 18:740-742 (2004a)

Delmas P., Padilla F., Osorio N., Coste B., Raoux M., Crest M., Polycystins, calcium signaling, and human disease, *Biochem Biophys Res Commun* 322:1374-1383 (2004b)

De Paepe ME., Trudel M., The transgenic SAD mouse: A model of human sickle cell glomerulopathy. *Kidney Int* 46:1337-1345 (1994)

Dinchuk JE., Car BD., Focht RJ., Johnston JJ., Jaffee BD., Covington MB., Contel NR., Eng VM., Collins RJ., Czerniak PM., Gorry SA., Trzaskos JM., Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II, *Nature* 378:406-409 (1995)

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

Drickamer K., Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins, *J Biol Chem* 263:9557-9560 (1988)

Drickamer K., Evolution of Ca²⁺-dependent animal lectins, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 45:207-232 (1993a)

Drickamer K., Ca²⁺ dependent carbohydrate-recognition domains in animal proteins, *Curr Opin Struct Biol* 3:393-400 (1993b)

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

Eikenboom JCJ., Vink T., Briet E., Sixma JJ., Reitsma PH., Multiple substitutions in the von Willebrand factor gene that mimic the pseudogene sequence, *Proc Natl Acad Sci USA* 91:2221-2224 (1994)

Enkhbayar P., Kamiya M., Osaki M., Matsumoto T., Matsushima N., Structural principles of leucine-rich repeat (LRR) proteins, *Proteins* 54:394-403 (2004)

Eker R., Familial renal adenomas in Wistar rats; a preliminary report, *Acta Pathol Microbiol Scand* 34:554-62 (1954)

Esser V., Limbird LE., Brown SE., Goldstein JL., Russell DW., Mutational analysis of the ligand binding domain of the low density lipoprotein receptor, *J Biol Chem* 263:13282-13290 (1988)

European Polycystic Kidney Disease Consortium, The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16, *Cell* 77:881-894 (1994)

Evan AP., Gardner KD., Nephron obstruction in norduhydroguaiaretic acid-induced renal cystic disease, *Kidney Int* 15:7-19 (1979)

Everson GT., Hepatic cysts in autosomal dominant polycystic kidney disease, *Am J Kidney Dis*, 22:520-525 (1993)

Fakuda M., Hiraoka N., Yeh JC., C-type lectins and sialyl Lewis X oligosaccharides. Versatile roles in cell-cell interaction, *J Cell Biol* 147:467-470 (1999)

Faraggiana T., Bernstein J., Strauss L., Churg J., Use of lectins in the study of histogenesis of renal cysts, *Lab Invest* 53:575-579 (1985)

Fass D., Blacklow S., Kim PS., Berger JM., Molecular basis of familial hypercholesterolaemia from structure of LDL receptor module, *Nature* 388:691-693 (1997)

Fick GM., Johnson AM., Gabow PA., Is there evidence for anticipation in autosomal-dominant polycystic disease, *Kidney Int* 45:1153-1162 (1994)

Fick GM., Gabow PA., Hereditary and acquired cystic disease of the kidney, *Kidney Int* 46:951-964 (1994b)

Filmer RB., Carone FA., Rowland RG., Bobcock JR., Adrenal corticosteroid-induced renal cystic disease in the newborn hamster, *Am J Pathol* 72:461-472 (1973)

Flaherty L., Bryda E., Collins D., Rudfsky U., Montgomery J., New mouse model for polycystic kidney disease with both recessive and dominant gene effects, *Kidney Int* 47:552-558 (1995)

Foggensteiner L., Bevan AP., Thomas R., Coleman N., Boulter C., Bradley J., Ibraghimov-Beskrovnya O., Klinger K., Sandford R., Cellular and subcellular distribution of polycystin-2, the protein product of the PKD2 gene, *J Am Soc Nephrol* 11:814-827 (2000)

Fry J., Koch W., Jennette J., McFarland E., Fried F., Mandell J., A genetically determined murine model of infantile polycystic kidney disease, *J Urol* 134:828-833 (1985)

Gabow PA., Johnson AM., Kaehny WD., Kimberling WJ., Lezotte DC., Duley IT., Johnes RH., Factors affecting the progression of renal disease in autosomal-dominant polycystic kidney disease, *Kidney Int* 41:1311-1319 (1992)

Gabow PA., Autosomal dominant polycystic kidney disease, *N Engl J Med* 329:332-342 (1993)

Galindo BE., Moy GW., Vacquier VD., A third sea urchin sperm receptor for egg jelly modulate protein, suREJ2, concentrates in the plasma membrane over the sperm mitochondrion, *Dev Growth Differ* 46:53-60 (2004)

Gallagher AR., Cedzich A., Gretz N., Somlo S., Witzgall R., The polycystic kidney disease protein PKD2 interacts with Hax-1, a protein associated with the actin cytoskeleton, *Proc Natl Acad Sci USA* 97:4017-4022 (2000)

Gang DL., Herrin JT., Infantile polycystic kidney disease of the liver and kidneys, *Clinical Nephrol* 25:28-36 (1986)

Geberth S., Ritz E., Zeier M., Stier E., Anticipation of age at renal death in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), *Nephrol Dial Transpl* 10:1603-1606 (1995)

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

Geng L., Segal Y., Pvlova A., Barros EJG., Löhning C., Lu W., Nigam SK., Frischauf A-M., Reeders ST., Zhou J., Distribution and developmentally regulated expression of murin polycystin, *Am J Physiol* 272:F451-F459 (1997)

Geng L., Burrow C., Li H-P., Wilson PD., Modification of the composition of polycystin-1 multiprotein complexes by calcium and tyrosine phosphorylation, *Biochim Biophys Acta* 1535:21-35 (2000)

Geng L., Okuhara D., Yu Z., Tian X., Cai Y., Shibasaki S., Somlo S., Polycystin-2 traffics to cilia independently of polycystin-1 by using an N-terminal RVxP motif, *J Cell Sci*, Mars 2006 [Epub ahead of print]

Gianluca A., Piva R., Manati E., Mazzoti E., Augello G., Chiari E., Moretti S., Neri LM., del Senno L., K562 erythroid and HL60 macrophage differentiation downregulates polycystin, a large membrane-associated protein, *Exp Cell Res* 244:259-267 (1998)

Gillmor SA., Villasenor A., Fletterick R., Sigal E., Browner MF., The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity, *Nat Struct Biol* 4:1003-1009 (1998)

Gong S., Yang XW., Li C., Heintz N., Highly efficient modification of bacterial artificial chromosomes (BACs) using novel shuttle vectors containing the R6K γ origin of replication, *Genome Res* 12:1992-1998

Gonzalez-Perrett S., Kim K., Ibarra C., Damiano AE., Zotta E., Batelli M., Harris PC., Reisin IL., Arnaout MA., Cantiello HF., Polycystin-2, the protein mutated in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), is a Ca²⁺-permeable nonselective cation channel, *PNAS* 98:1182-1187 (2001)

Goodman T., Grice HC., Becking GC., Salem FA., A cystic nephropathy induced by nordihydroguaiaretic acid in rat, *Lab Invest* 23:93-107 (1970)

Grantham JJ., Polycystic kidney disease: hereditary and acquired, *Adv Intern Med* 38:409-420 (1993)

Gresh L., Fischer E., Reimann A., Yanguy M., Garbay S., Shao X., Hiesberger T., Fiette L., Igarashi P., Yaniv M., Pontoglio M., A transcriptional network in polycystic kidney disease, *The EMBO J* 23:1657-1668 (2004)

Gretz N., Zeier M., Geberth S., Strauch M., Ritz E., Is gender a determinant for evolution of renal failure? A study in autosomal dominant polycystic kidney disease, *Am J Kidney Dis* 14:178-183 (1989)

Griffin MD., Torres VE., Grande JP., Kumar R., Immunolocalization of polycystin in human tissues and cultured cells, *Proc Assos Am Physicians* 108:185-197 (1996)

Griffin MD., Torres VE., Grande JP., Kumar R., Vascular expression of polycystin, *J Am Soc Nephrol* 8:616-626 (1997a)

Griffin MD., O'Sullivan DA., Torres VE., Grande JP., Kanwar YS., Kumar R., Expression of polycystin in mouse metanephros and extra-metanephric tissues, *Kidney Int* 52:1196-1205 (1997b)

Grimm DH., Cai Y., Chauvet V., Rajendran V., Zeltner R., Geng L., Avner E. D., Sweeney W., Somlo S., Caplan MJ., Polycystin-1 distribution is modulated by polycystin-2 expression in mammalian cells, *J Biol Chem* 278:36786-36793 (2003)

Grimm DH., Karihaloo A., Cai Y., Somlo S., Cantley LG., Caplan MJ., Polycystin-2 regulates proliferation and branching morphogenesis in kidney epithelial cells, *J Biol Chem* 280:137-144 (2006)

Grubb BR., Boucher RC., Pathophysiology of gene-targeted mouse models for cystic fibrosis, *Physiol Rev* 79 (1 Suppl):S193-214 (1999) Review.

Guay-Woodford L., Bryda E., Christine B., Lindsey J., Collier W., Avner E., D'Eustachio P., Flaherty L., Evidence that two phenotypically distinct mouse PKD mutations, bpk and jcpk, are allelic, *Kidney Int* 50:1158-1165 (1996)

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

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

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

Guy NJ., Packman LC., Weldon MA., Barna JC., A leucine-rich repeat peptide derived from *Drosophila* Toll receptor forms extended filaments with a beta-sheet structure, *FEBS Lett* 291:87-91 (1991)

Haines N., Irvine KD., Glycosylation regulates Notch signalling, *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:786-797 (2003)

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

Harris PC., Autosomal dominant polycystic kidney disease: Clues to pathogenesis, *Hum Mol Genet* 8:1861-1869 (1999)

Hateboer N., Lazarou LP., Williams AJ., Holmans P., Ravine D., Familial phenotype differences in PKD1, *Kidney Int* 56:34-40 (1999a)

Hateboer N., van Dijk MA., Bogdanova N., Coto E., Saggarr-Malik AK., San Millan JL., Torra R., Breuning M., Ravine D., Comparison of phenotypes of polycystic kidney disease types 1 and 2, *Lancet* 353:103-107 (1999b)

Hateboer N., Veldhuisen B., Peters D., Breuning MH., San Millán JL., Bogdanova N., Coto E., Von Dijk MA., Afzal AR., Jeffery S., Saggarr-Malik AK., Torra R., Dimitrakov D., Martinez I., de Castro SS., Krawczak M., Ravine D., Location of mutations within the PKD2 gene influences clinical outcome, *Kidney Int* 57:1444-1451 (2000)

Herron BJ., Lu W., Rao C., Liu S., Peters H., Bronson RT., Justice MJ., McDonald JD., Beier D., Efficient generation and mapping of recessive developmental mutations using ENU mutagenesis, *Nature Genet* 30:185-189 (2002)

Hidaka S., Könecke V., Osten L., Witzgall R., PIGEA-14, a novel coiled-coil protein affecting the intracellular distribution of polycystin-2, *J Biol Chem* 279:35009-35016 (2004)

Hiesberger T., Bai Y., Shao X., McNally BT., Sinclair AM., Tian X., Somlo S., Igarashi P., Mutation of hepatocyte nuclear factor-1 β inhibits Pkhd1 gene expression and produces renal cysts in mice, *J Clin Invest* 113:814-25 (2004)

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

Hofer B., Thone-Reineke C., Rohmeiss P., Schmager F., Slowinski T., Burst V., Siegmund F., Quertermous T., Bauer C., Neumayer HH., Schleuning WD., Theuring F., Endothelin-1 transgenic mice develop glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, and renal cysts but not hypertension, *J Clin Invest* 99:1380-9 (1997)

Hogan MC., Griffin MD., Rossetti S., Torres VE., Ward CJ., Harris PC., PKHD1, a homolog of the autosomal recessive polycystic kidney disease gene, encodes a receptor with inducible T lymphocyte expression, *Hum Mol Genet* 12:685-698 (2003)

Holland PM., Milne A., Garka K., Johnson RS., Willis C., Sims JE., Rauch T., Bird TA., Virca GD., Purification, cloning and characterization of Nek8, a novel NIMA-related kinase, and its candidate substrate Bcd2, *J Biol Chem* 277:16229-16240 (2002)

Horan TP., Simonet L., Jacobsen R., Mann M., Haniu M., Wen J., Arakawa T., Kuwamoto M., Martin F., Coexpression of G-CSF with an unglycosylated G-CSF receptor mutant results in secretion of a stable complex, *Protein Expr Purif* 14:45-53 (1998)

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

Hu J., Barr MM., ATP-2 interacts with the PLAT domain of LOV-1 and is involved in *Caenorhabditis elegans* polycystin signalling, *Mol Biol Cell* 16:458-469 (2005)

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

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

Hughes J., Ward CJ., Aspinwall R., Butler R., Harris PC., 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 (1999)

Hughson M., Farris AB., Douglas-Denton R., Hoy WE., Bertram JF., Glomerular number and size in autopsy kidneys: The relationship to birth weight, *Kidney Int* 63:2113-2122 (2003)

Hulsebos TJM., Bijleveld EH., Riegman PHJ., Smink LJ., Dunham I., Identification and characterization of NF1-related loci on human chromosomes 22, 14 and 2, *Hum Genet* 98:7-11 (1996)

Husson H., Manavalan P., Akmaev VR., Russo RJ., Cook B., Richards B., Barberio D., Liu D., Cao X., Landes GM., Wang CJ., Roberts BL., Klinger KW., Grubman SA., Jefferson DM., Ibraghimov-Beskrovnaya O., New insights into ADPKD molecular pathways using combination of SAGE and microarray technologies, *Genomics* 84:497-510 (2004)

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

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., Watnich TJ., Piontek K., Hakim RM., Landes GM., Germino GG., Sandford R., Klinger KW., 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 (1997)

Ibraghimov-Beskrovnaya O., Bukanov NO., Donohue LC., Dackowski WR., Klingr KW., Landes GM., Stong homophilic interactions of the Ig-like domains of polycystin-1, the protein product of an autosomal dominant polycystic kidney disease gene, *PKD1*, *Hum Mol Genet* 9: 1641-1649 (2000)

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

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

Jena N., Martin-Seisdedos C., McCue P., Croce CM., BMP7 null mutation in mice: developmental defects in skeleton, kidney, and eye, *Exp Cell Res* 230:28-37 (1997)

Jurczyk A., Gromley A., Redick S., San Agustin J., Witman G., Pazour GJ., Peters DJM., Doxsey S., Pericentrin forms a complex with intraflagellar transport proteins and polycystin-2 and is required for primary cilia assembly, *J Biol Chem* 279:637-643 (2004)

Kamada S., Shimono A., Shinto Y., Tsujimura T., Takahashi T., Noda T., Kitamura Y., Kondoh H., Tsujimoto Y., bcl-2 deficiency in mice leads to pleiotropic abnormalities: accelerated lymphoid cell death in thymus and spleen,

polycystic kidney, hair hypopigmentation, and distorted small intestine, *Cancer Res* 55:354-359 (1995)

Kanwar YS., Carone FA., Reversible changes of tubular cell and basement membrane in drug-induced renal cystic disease, *Kidney Int* 26:35-43 (1984)

Karcher C., Ficher A., Schweickert A., Bitzer E., Horie S., Witzgall R., Blum M., Lack of a laterality phenotype in Pkd1 knock-out embryos correlates with absence of polycystin-1 in nodal cilia, *Differentiation* 73:425-432 (2005)

Katsuyama M., Masuyama T., Komura I., Hibino T., Takahashi H., Characterization of a novel polycystic kidney rat model with accompanying polycystic liver, *Exp Anim* 49:51-5 (2000)

Kaur B., Brat DJ., Devi NS., Van Meir EG., Vasculostatin, a proteolytic fragment of brain angiogenesis inhibitor 1, is an antiangiogenic and antitumorigenic factor, *Oncogene* 24:3632-3642 (2005)

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

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

Keller SA., Jones JM., Boyle A., Barrow LL., Killen PD., Green DG., Kapousta NV., Hitchcock PF., Swank RT., Meisler MH., Kidney and retinal defects (krd), a transgene-induced mutation with a deletion of mouse chromosome 19 that includes the Pax2 locus, *Genomics* 23:309-320 (1994)

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

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

Kim H., Jeong W., Ahn K., Ahn C., Kang S., Siah-1 interacts with the intracellular region of polycystin-1 and affects its stability via the ubiquitin-proteasome pathway, *J Am Soc Nephrol* 15:2042-2049 (2004)

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

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

Kleymenova E., Ibraghimov-Beskrovnaya O., Kugoh H., Everitt J., Xu H., Kiguchi K., Landes G., Harris P., Walker C., Tuberin-dependent membrane localization of polycystin-1: a functional link between polycystic kidney disease and the TSC2 tumor suppressor gene, *Mol Cell* 7:823-832 (2001)

Knudson AG Jr., Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma, *Proc Natl Acad Sci USA* 68:820-823 (1971)

Kobayashi T., Hirayama Y., Kobayashi E., Kubo Y., Hino O., A germline insertion in the tuberous sclerosis (*Tsc2*) gene gives rise to the Eker rat model of dominantly inherited cancer, *Nat Genet* 9:70-74 (1995)

Kobayashi T., Minowa O., Kuno J., Mitani H., Hino O., Noda T., Renal carcinogenesis, hepatic hemangiomas, and embryonic lethality caused by a germline *Tsc2* mutation in mice, *Cancer Res* 59:1206-1211 (1999)

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

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

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

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

Köttgen M., Benzing T., Simmen T., Tauber R., Buchholz B., Feliciangeli S., Huber TB., Schermer B., Kramer-Zucker A., Höpker K., Simmen KC., Tschucke CC., Sandford R., Kim E., Thomas G., Walz G., Trafficking of TRPP2 by PACS proteins represents a novel mechanism of ion channel regulation, *The EMBO J* 24:705-716 (2005)

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

Krasnoperov VG., Bittner MA., Beavis R., Kuang Y., Salnikov KV., Chepurny OG., Little AR., Plotnikov AN., Wu D., Holz RW., Petrenko AG., alpha-latrotoxin stimulates exocytosis by the interaction with a neuronal G-protein-coupled receptor, *Neuron* 18:925-937 (1997)

Kreidberg J., Donovan MJ., Goldstein SL., Rennke H., Shepherd K., Jones RC., Jaenisch R., Alpha3beta1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis, *Dev* 122:3537-3547 (1996)

Lager D., Qian Q., Bengal R., Ishibashi M., Torres V., The pck rat: a new model that resembles human autosomal dominant polycystic kidney and liver disease, *Kidney Int* 59:126-136 (2001)

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

Lasky LA., Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation, *Science* 258: 964-969 (1992)

Le NH., van der Bent P., Huls G., van de Wetering M., Loghman-Adham M., Ong ACM., Calvet JP., Clevers H., Breuning MH., van Dam H., Peters DJM., Aberrant polycystin-1 expression results in modification of activator protein-1 activity, whereas Wnt signalling remains unaffected, *J Biol Chem* 279:27472-27481 (2004)

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

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

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

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

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

Li Q., Dai Y., Guo L., Liu Y., Hao C., Wu G., Basora N., Michalak M., Chen X-Z., Polycystin-2 associates with tropomyosin-1, an actin microfilament component, *J Mol Biol* 325:949-962 (2003a)

Li Q., Shen PY., Wu G., Chen X-Z., Polycystin-2 interacts with troponin I, an angiogenesis inhibitor, *Biochemistry* 42:450-457 (2003b)

Li Q., Montalbetti N., Shen PY., Dai X-Q., Cheeseman CI., Karpinski E., Wu G., Cantiello HF., Chen X-Z., Alpha-actinin associates with polycystin-2 and regulates its channel activity, *Hum Mol Genet* 14:1587-1603 (2005)

Li X., Luo Y., Starremans PG., McNamara CA., Pei Y., Zhou J., Polycystin-1 and polycystin-2 regulate the cell cycle through the helix-loop-helix inhibitor Id2, *Nat Cell Biol* 12:1102-1112 (2005)

Li Y., Wright JM., Qian F., Germino GG., Guggino WB., Polycystin-2 interacts with type I IP₃ receptor to modulate intracellular Ca²⁺ signalling, *J Biol Chem* 280:41298-306 (2005)

Lieberman E., Salinas-Madrigal L., Gwinn JL., Brennan LP., Fine RN., Landing BH., Infantile polycystic disease of the kidneys and liver: Clinical, pathological and radiological correlations and comparison with congenital hepatic fibrosis, *Medicine* 50:277-318 (1971)

Lin F., Hiesberger T., Cordes K., Sinclair AM., Goldstein LS., Somlo S., Igarashi P., 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 (2003)

Lin H-H., Chang G-W., Davies JQ., Stacey M., Harris J., Gordon S., Autocatalytic cleavage of the EMR2 receptor occurs at a conserved G protein-coupled receptor proteolytic site motif, *J Biol Chem* 279:31823-31832 (2004)

Liu S., Lu W., Obara T., Kuida S., Lehoczky J., Dewar K., Drummond IA., Beier DR., A defect in a novel Nek-family kinase causes cystic kidney disease in the mouse and in zebrafish, *Dev* 129:5839-5846 (2002)

Liu ZZ., Carone FA., Nakumara S., Kanwar YS., Altered synthesis of proteoglycans by cyst-derived cells from autosomal-dominant polycystic kidneys, *Am J Physiol* 263:F697-704 (1992)

Lo SH., Yu QC., Degenstein L., Chen LB., Fuchs E., Progressive kidney degeneration in mice lacking tensin, *J Cell Biol.* 136:1349-61 (1997)

Löhning C., Nowicka U., Frischauf A-M., The mouse homolog of PKD1: Sequence analysis and alternative splicing, *Mamm Genome* 8:307-311 (1997)

Lowden DA., Lindemann GW., Merlino G., Barash BD., Calvet JP., Gattone VH 2nd., Renal cysts in transgenic mice expressing transforming growth factor-alpha, *J Lab Clin Med.* 124:386-94 (1994)

Lu W., Peissel B., Babakhanlou H. Pavlova A., Geng L., Fan X., Larson C., Brent G., Zhou J., Perinatal lethality with kidney and pancreas defects in mice with a targeted Pkd1 mutation, *Nat Genet* 17: 179-181 (1997)

Lu W., Fan X., Basora N., Babakhanlou H., Law T., Rfai N., Harris PC., Perez-Atayde AR., Rennke HG, Zhou J., Late onset of renal and hepatic cysts in Pkd1-targeted heterozygotes, *Nat Genet* 21:160-161 (1999)

Lu W., Shen X., Pavlova A., Lakkis M., Ward CJ., Pritchard L., Harris PC., Genest DR., Perez-Atayde AR., Zhou J., Comparison of Pkd1-targeted mutants

reveals that loss of polycystin-1 causes cystogenesis and bone defects, *Hum Mol Genet* 10:2385-2396 (2001)

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

Lyon MF., Hulse EV., An inherited kidney disease of mice resembling human nephronophthisis, *J Med Genetics* 8:41-48 (1971)

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

Majumdar A., Vainio S., Kispert A., McMahon J., McMahon AP., Wnt 11 and Ret/Gdnf pathways cooperate in regulating ureteric branching during metanephric kidney development, *Dev* 130:3175-3185 (2003)

Malhas AN., Abuknesha RA., Price RG., 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 (2002)

Markowitz G.S, Cai Y, Li L., Wu G., Ward L.C., Somlo S., D'Agati V., Polycystine-2 expression is developmentally regulated, *Am J Physiol* 277:F17-F25 (1999)

McDonald AT., Crocker JF., Digout SC., McCarthy SC., Blecher SR., Sole DE., Glucocorticoid-induced polycystic kidney disease-a threshold trait, *Kidney Int* 37:901-908 (1990)

Mengerink KJ., Moy GW., Vacquier VD., suREJ3, a polycystin-1 protein, is cleaved at the GPS domain and localizes to the acrosomal region of sea urchin sperm, *J Biol Chem* 277:943-948 (2002)

Metcalf D., Mifsud S., Di Rago L., Nicola NA., Hilton DJ., Alexander WS., Polycystic kidneys and chronic inflammatory lesions are the delayed consequences of loss of the suppressor of cytokine signalling-1 (SOCS-1), *Proc Natl Acad Sci USA* 99:943-948 (2002)

Michaud J., Russo P., Grignon A., Dallaire L., Bichet D., Rosenblatt D., Lamothe E., Lamberty M., Autosomal dominant polycystic kidney disease in the fetus, *Am J Med Genet* 51:240-246 (1994)

Milutinovic J., Rust PF., Fialkow PJ., Agadoa LY., Phillips LA., Rudd TG., Sutherland S., Intrafamilial phenotypic expression of autosomal dominant polycystic kidney disease, *Am J Kidney Dis* 19:465-472 (1992)

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 DJM., Somlo S., PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein, *Science* 272:1339-1342 (1996)

Mochizuki T., Saijoh Y., Tsuchiya K., Shirayoshi Y., Takai S., Taya C., Yonekawa H., Yamada K., Nihei H., Nakatsuji N., Overbeek PA., Hamada H., Yokoyama T., Cloning of *inv*, a gene that controls left/right asymmetry and kidney development, *Nature* 395:177-181 (1998)

Morello J-P., Salahpour A., Laperrière A., Bernier V., Arthus MF., Lonergan M., Petäjä-Repo U., Angers S., Morin D., Bichet DG., Bouvier M., Pharmacological chaperones rescue cell-surface expression and function of misfolded V2 vasopressin receptor mutants, *J Clin Invest* 105:887-895 (2000)

Morgan D., Turnpenny L., Goodship J., Dai W., Majumder K., Matthews L., Gardner A., Schuster G., Vien L., Harrison W., Elder FFB., Penman-Splitt M., Overbeek P., Strachan T., Inversin, a novel gene in the vertebrate left-right axis pathway, is partially deleted in the *inv* mouse, *Nat Genet* 20:149-156 (1998)

Morham SG., Langenbach R., Loftin CD., Tiano HF., Vouloumanos N., Jennette JC., Mahler JF., Kluckman KD., Ledford A., Lee CA., Smithies O., Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse, *Cell* 83:473-482 (1995)

Moriguchi T., Haraguchi K., Ueda N., Okada M., Furuya T., Akiyama T., DREG, a developmentally regulated G protein-coupled receptor containing two conserved proteolytic cleavage sites, *Genes Cells* 9:549-560 (2004)

Morishita Y., Matsuzaki T., Hara-chikuma M., Andoo A., Shimono M., Matsuki A., Kobayashi K., Ikeda M., Yamamoto T., Verkman A., Kusano E., Ookawara S., Takata K., Sasaki S., Ishibashi K., Disruption of aquaporin-11 produces polycystic kidneys following vacuolization of the proximal tubule, *Mol Cell Biol* 25:7770-7779 (2005)

Moser M., Dahmen S., Kluge R., Grone H., Dahmen J., Kunz D., Schorle H., Buettner R., Terminal renal failure in mice lacking transcription factor AP-2 β , *Lab Invest* 83:571-8 (2003)

Moy GW., Mendoza LM., Schulz JR., Swanson WJ., Glabe CG., Vacquier VD., The sea urchin sperm receptor for egg jelly is a modular protein with extensive homology to the human polycystic kidney disease protein, PKD1, *J Cell Biol* 133:809-817 (1996)

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

Murakami M., Ohba T., Xu F., Shida S., Satoh E., Ono K., Miyoshi I., Watanabe H., Ito H., Iijima T., Genomic organization and functional analysis of murine PKD2L1, *J Biol Chem* 280:5626-5635 (2005)

Murcia NS., Richards WR., Yoder BK., Mucenski ML., Dunlap JR., Woychik RP., The Oak Ridge polycystic kidney (orpk) disease gene is required for left-right axis determination, *Dev* 127:2347-2355 (2000)

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., Pioglitazone improves the phenotype and molecular defects of a targeted Pkd1 mutant, *Hum Mol Genet* 11:1731-1742 (2002)

Mydlo JH., Michaeli J., Cordon-Cardo C., Goldenberg AS., Heston WD., Fair WR., Expression of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA in neoplastic and nonneoplastic human kidney tissue, *Cancer Res* 49:3407-11 (1989)

Nadasty T., Laszik Z., Lajoie G., Blick KE., Wheeler DE., Silva FG., Proliferative activity of cyst epithelium in human renal cystic diseases, *J Am Soc Nephrol* 5:1462-1468 (1995)

Nagao S., Watanabe T., Ogiso N., Marunouchi T., Takahashi H., Genetic mapping of the polycystic kidney gene, pcy, on mouse chromosome 9, *Biochem Genet* 33:410-412 (1995)

Nagy E., Maquat LE., A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when non-sense affects RNA abundance, *Trends Biochem Sci* 23:198-199 (1998)

Nakayama K., Nakayama K., Negishi I., Kuida K., Sawa H., Loh DY., Targeted disruption of Bcl-2 $\alpha\beta$ in mice: occurrence of gray hair, polycystic kidney disease, and lymphocytopenia, *Proc Natl Acad Sci USA* 91:3700-4 (1994)

Nakayama S., Kretsinger RH., Evolution of the EF-hand family of proteins, *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 23:473-507 (1994)

Nashimoto I., Okamoto T., Matsuura Y., Takahashi S., Okamoto T., Murayama Y., Ogata E., Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G₀, *Nature* 362:75-79 (1993)

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

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

Nauta J., Goedbloed M., Herck HV., Hesselink D., Visser P., Willemsen R., Dokkum RV., Wright C., Guay-Woodford L., New rat model that phenotypically resembles autosomal recessive polycystic kidney disease, *J Am Soc Nephrol* 11:2272-2284 (2000b)

Naylor CE., Eaton JT., Howells A., Justin N., Moss DS., Titball RW., Basak AK., Structure of the key toxin in gas gangrene, *Nat Struct Biol* 5:738-746 (1998)

Neill AT., Moy GW., Vacquier VD., Polycystin-2 associates with the polycystin-1 homolog, suREJ3, and localizes to the acrosomal region of sea urchin spermatozoa, *Mol Reprod Dev* 67:472-477 (2004)

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

Nguyen HQ., Danilenko DM., Bucay N., DeRose ML., Van GY., Thomason A., Simonet WS., 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 (1996)

Nickel C., Benzing T., Sellin L., Gerke P., Karihaloo A., Liu Z-H., Cantley LG., Walz G., The polycystin-1 C-terminal fragment triggers branching morphogenesis and migration of tubular kidney epithelial cells, *J Clin Invest* 109:481-489 (2002)

Nomura H., Turco AE., Pei Y., Kalaydjieva L., Schiavello T., Weremowicz S., Ji W., Morton CC., Meisler M., Reeders ST., Zhou J., 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 (1998)

Norwood VF., Morham SG., Smithies O., Postnatal development and progression of renal dysplasia in cyclooxygenase-2 null mice, *Kidney Int* 58:2291-2300 (2000)

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

Ojeda JL., Ros MA., Garcia-Porrero JA., Polycystic kidney disease induced by corticoids, *Nephron* 42:240-248 (1986)

Okamoto T., Katada T., Murayama Y., Ui M., Ogata E., Nishimoto I., A simple structure encodes G protein-activating function of the IGF-II/mannose 6-phosphate receptor, *Cell* 62:709-717 (1990)

Okamoto T., Sekiyama N., Otsu M., Shimada Y., Sato A., Nakanishi S., Jingami H., Expression and purification of the extracellular ligand binding region of metabotropic glutamate receptor subtype 1, *J Biol Chem* 273:13089-13096 (1998)

Olbrich H., Fliegauf 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., Mutations in a novel gene NPHP3, cause adolescent nephronophthisis, tapeto-retinal degeneration and hepatic fibrosis, *Nat Genet* 34:455-459 (2003)

Oliver J., In nephrons and kidneys; A quantitative study of developmental and evolutionary mammalian renal architectonic, p.116, New York: Hoeber Medical Division, Harper & Row

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

Onda H., Lueck A., Marks PW., Warren HB., Kwiatkowski DJ., *Tsc2*^{+/-} mice develop tumors in multiple sites that express gelsolin and are influenced by genetic background, *J Clin Invest* 104:687-698 (1999)

Ong ACM., Ward CJ., Butler RJ., Biddolph S., Bowker C., Torra R., Pei Y, Harris PC., Coordinate expression of autosomal dominant polycystic kidney disease proteins, polycystin-2 and polycystin-1, in normal and cystic tissue, *Am J Pathol* 154:1721-1727 (1999a)

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

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., 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 (2003)

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

Parfrey PS., Bear JC., Morgan J., Benvon C., Cramer BC., McManamon PJ., Gault MH., Churchill DN., Singh M., Hewitt R., Somlo S., Reeders ST., The diagnosis and prognosis of autosomal dominant polycystic kidney disease, *N Engl J Med* 323:1085-1090 (1990)

Parnell SC., Magenheimer BS., Maser RL., Rankin CA., Smine A., Okamoto T., Calvet JP., The polycystic kidney disease-1 protein, polycystin-1, binds and activates heterotrimeric G-proteins in vitro, *Biochem Biophys Res Commun* 251:625-631 (1998)

Parnell SC., Magenheimer BS., Maser RL., Calvet JP., 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 (1999)

Parnell SC., Magenheimer BS., Maser RL., Zien CA., Frischauf A-M., Calvet JP., Polycystin-1 activation of c-jun N-terminal kinase and AP-1 is mediated by heterotrimeric G proteins, *J Biol Chem* 277:19566-19572 (2002)

Patel HP., Lu L., Blaszkak RT., Bissler JJ., PKD1 intron 21: Triplex DNA formation and effect on replication, *Nucleic Acid Res* 32: 1460-1468 (2004)

Pazour GJ., San Agustin JT., Follit JA., Rosenbaum JL., Witman GB., Polycystin-2 localizes to kidney cilia and the ciliary level is elevated in orpk mice with polycystic kidney disease, *Curr Biol* 12:R378-380 (2002)

Pei Y., Paterson AD., Is there a third gene for autosomal dominant polycystic kidney disease?, *Kidney Int* 54:1759-1761 (1998)

Pei Y., Watnick T., He N., Wang K., Liang Y., Parfrey P., Germino G., St.George-Hyslop P., 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 (1999)

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

Pekonen F., Partanen S., Rutanen EM., Binding of epidermal growth factor and insulin-like growth-factor I in renal carcinoma and adjacent normal kidney tissue, *Int J Cancer* 43:1029-1033 (1989)

Pelletier J., Bruening W., Kashtan CE., Mauer SM., Manivel JC., Striegel JE., Houghton DC., Junien C., Habib R., Fouser L., Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome, *Cell* 67:437-47 (1991)

Pennekamp P., Bogdanova N., Wilda M., Markoff A., Hameister H., Horst J., Dworniczak B., Characterization of the murine polycystic kidney disease (Pkd2) gene, *Mamm Genome* 9:749-752 (1998)

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

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

Peral B., Ong ACM., San Millán JL., Gamble V., Rees L., Harris PC., A stable nonsense mutation associated with a case of infantile onset polycystic kidney disease 1 (PKD1), *Hum Mol Genet* 5:539-542 (1996b)

Peral B., Gamble V., Strong C., Ong ACM., Sloane-Stanley J., Zerres K., Winearls CG., Harris PC., 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 (1997)

Petäjä-Repo UE., Hogue M., Laperrière A., Walker P., Bouvier M., Export from the endoplasmic reticulum represents the limiting step in the maturation and cell surface expression of the human delta opioid receptor, *J Biol Chem* 275:13727-13736 (2000)

Peters DJM., Spruit L., Saris JJ., Ravine D., Sandkuijl LA., Fossdal R., Boersma J., van Eijk R., Nørby S., Constantinou-Deltas CD., Pierides A., Brissenden JE., Frants RR., Ommen GJB., Breuning MH., Chromosome 4 localization of a second gene for autosomal dominant polycystic kidney disease, *Nat Genet* 5:359-362 (1993)

Peters DJM., Spruit L., Klingel R., Prins F., Baelde HJJ., Giordiano PC., Bernini LF., de Heer E., Breuning M., Bruijn JA., Adult, fetal, and polycystic kidney disease-1 gene product, *Lab Invest* 75:221-230 (1996)

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

Peters DJM., Breuning MH., Autosomal dominant polycystic kidney disease: modification of disease progression, *Lancet* 358:1439-1444 (2001)

Phillips CL., Miller KJ., Filson AJ., Nurnberger J., Clendenon JL., Cook GW., Dunn KW., Overbeek PA., Gattone VH 2nd., Bacallao RL., Renal cysts of inv/inv mice resemble early infantile nephronophthisis, *J Am Soc Nephrol.* 15:1744-55 (2004)

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

Piscione TD., Rosenblum ND., The molecular control of renal branching morphogenesis: current knowledge and emerging insights, *Differentiation* 70:227-246 (2002)

Polgar K., Burrow CR., Hyink DP., Fernandez H., Thornton K., Li X., Gusella L., Wilson PD., Disruption of polycystin-1 unctin interferes with branching morphogenesis of the ureteric bud in developing mouse kidneys, *Dev Biol* 286:16-30 (2005)

Pollack AL., Barth AM., Altschuler Y., Nelson WJ., Mostov KE., Dynamics of beta-catenin interactions with APC protein regulate epithelial tubulogenesis, *J Cell Biol* 137:1651-1662 (1997)

Ponting CP., Hofmann K., Bork P., A latrophilin/CL-1-like GPS domain in polycystin-1, *Curr Biol* 9:R585-588 (1999)

Preminger G., Koch W., Fried F., McFarland E., Murphy E., Mandell J., Murine congenital polycystic kidney disease: a model for studying development of cystic disease, *J Urol* 127:556-560 (1982)

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., A human PKD1 transgene generates functional polycystin-1 in mice and is associated with a cystic phenotype, *Hum Mol Genet* 9:2617-2627 (2000)

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

Qian CN., Knol J., Igarashi P., Lin F., Zylstra U., Teh BT., Williams BO., Cystic renal neoplasia following conditional inactivation of Apc in mouse renal tubular epithelium, *J Biol Chem* 280:3938-3945 (2005)

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

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

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

Qian F., Boletta A., Bhunia AK., Xu H., Liu L., Ahrabi AK., Watnick TJ., Zhou F., Germino GG., 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 USA* 99:16981-16986 (2002)

Qian F., Proteolytic cleavage of polycystin-1, FASEB Summer Research Conferences-New Insights in PKD: Molecular Pathways, Pathogenic Mechanisms, and Translational Applications, Saxtons River, Vermont, Août 6-11, 2005

Reeders ST., Breuning MH., Davies KE., Nicholls RD., Tarman AP., Higgs DR., Pearson PR., Weatherall DJ., A highly polymorphic DNA marker linked to adult polycystic kidney disease on chromosome 16, *Nature* 317:542-544 (1985)

Reeders ST., Multilocus polycystic disease, *Nat Genet* 1:235-237 (1992)

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

Robbins MJ., Ciruela F., Rhodes A., McIlhinney RA., Characterization of the dimerization of metabotropic glutamate receptors using an N-terminal truncation of mGluR1alpha, *J Neurochem* 72:2539-2547 (1999)

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

Roelfsema JH., Spruit L., Saris JJ., Chang P., Pirson Y., van Ommem G-JB., Peters DJM., Breuning MH., Mutation detection in the repeated part of the PKD1 gene, *Am J Hum Genet* 61:1044-1052 (1997)

Roitbak T., Ward CJ., Harris PC., Bacallao R., Ness SA., Wandinger-Ness A., A polycystin-1 multiprotein complex is disrupted in polycystic kidney disease cells, *Mol Biol Cell* 15:1334-1346 (2004)

Romagnolo B., Berrebi D., Saadi-Keddoucci S., Porteu A., Pichard AL, Peuchmaur M., Vandewalle A, Kahn A, Perret C., Intestinal dysplasia and adenoma in transgenic mice after overexpression of an activated beta-catenin, *Cancer Res* 59:3875-3879 (1999)

Rossetti S., Strmecki L., Gamble V., Burton S., Sneddon V., Peral B., Roy S., Bakkaloglu A., Komel R., Winearls CG., Harris PC., Mutation analysis of the entire PKD1 gene: Genetic and diagnostic implications, *Am J Hum Genet* 68:46-63 (2001)

Rossetti S., Chauveau D., Walker D., Sagggar-Malik A., Winearls CG., Torres VE., Harris PC., A complete mutation screen of the ADPKD genes by DHPLC, *Kidney Int* 61:1588-1599 (2002a)

Rossetti S., Burton S., Strmecki L., Pond GR., San Millán JL., Zerres K., Barratt TM., Ozen S., Torres VE., Bergstralh EJ., Winearls CG., Harris PC., 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 (2002b)

Rossetti S., Chauveau D., Kubly V., Slezak JM., Sagggar-Malik AK., Pei Y., Ong ACM., Stewart F., Watson ML., Bergstralh EJ., Winearls CG., Torres VE., Harris PC., Association of mutation position in a polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene and development of a vascular phenotype, *The Lancet* 361:2196-2201 (2003)

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

Rundle DR., Gorbsky G., Tsiokas L., PKD2 interacts and co-localizes with mDia1 to mitotic spindles of dividing cells, *J Biol Chem* 279:29728-29739 (2004)

Russell DW., Brown MS, Goldstein JL., Different combinations of cyteine-rich repeats mediate binding of low density lipoprotein receptor to two different proteins, *J Biol Chem* 264:21782-21688 (1989)

Saadi-Kheddouci S., Berrebi D., Romagnolo B., Cluzeaud F., Peuchmaur M., Kahn A., Vandewalle A., Perret C., Early development of polycystic kidney disease in transgenic mice expressing an activated mutant of the beta-catenin gene, *Oncogene* 20:5972-81 (2001)

Sampson JR., Maheshwar MM., Aspinwall R., Thomson P., Cheadle JP., Ravine D., Roy S., Haan E., Bernstein J., Harris PC., Renal cystic disease in tuberous sclerosis: role of the polycystic kidney disease 1 gene, *Am J Hum Genet* 61:843-851 (1997)

Sandford R., Sgotto B., Aparicio S., Brenner S., Vaudin M., Wilson RK., Chisoe S., Pepin K., Bateman A., Chothia C., Hughes J., Harris P., 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 (1997)

Schafer K., Gretz N., Bader M., Oberbaumer I., Eckardt KU., Kriz W., Bachmann S., Characterization of the Han:SPRD rat model for hereditary polycystic kidney disease, *Kidney Int* 46:134-152 (1994)

Schaffner DL., Barrios R., Massey C., Banez EI., Ou CN., Rajagopalan S., Aguilar-Cordova E., Lebovitz RM., Overbeek PA., Lieberman MW., Targeting of the *rasT24* oncogene to the proximal convoluted tubules in transgenic mice results in hyperplasia and polycystic kidneys, *Am J Pathol* 142:1051-60 (1993)

Scheffers MS., van der Bent P., Prins F., Spruit L., Breuning MH., Litvinov SV., de Heer E., Peters DJM., Polycystin-1, the product of the polycystic kidney disease 1 gene, co-localizes with desmosomes in MDCK cells, *Hum Mol Genet* 9:2743-2750 (2000)

Scheffers MS., Le H., van der Bent P., Leonhard W., Prins F., Spruit L., Breuning MH., de Heer E., Peters DJ., Distinct subcellular expression of endogenous polycystin-2 in the plasma membrane and Golgi apparatus of MDCK cells, *Hum Mol Genet* 11:59-67 (2002)

Schneider MC., Rodriguez AM., Nomura H., Zhou J., Morton CC., Reeders ST., Weremowicz S., A gene similar to PKD1 maps to chromosome 4q22: a candidate gene for PKD2, *Genomics* 38:1-4 (1996)

Schulman BA., Carrano AC., Jeffrey PD., Bowen Z., Kinnucan ERE., Finnin MS., Elledge SJ., Harper JW., Pagano M., Pavietich NP., Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex, *Nature* 408:381-386 (2000)

Scott PG., McEwan PA., Dodd CM., Bergmann EM., Bishop PN., Bella J., Crystal structure of the dimeric protein core of decorin, the archetypal small leucine-rich repeat proteoglycan, *Proc Natl Acad Sci USA* 101:15633-15638 (2004)

Shillingford JM., Murcia NS., Larson CH., Low SH., Hedgepeth R., Brown N., Flask CA., Novick AC., Goldfarb DA., Kramer-Zucker A., Walz G., Piontek KB., Germino GG., Weimbs T., The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease, *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, Mars 27 [Epub ahead of print]

Silberberg M., Charron AJ., Bacallao R., Wandinger-Ness A., Mispolarization of desmosomal proteins and altered intercellular adhesion in autosomal dominant polycystic kidney disease, *Am J Physiol-Renal Physiology* 288:1153-1163 (2005)

Siman R., Christoph G., β -amyloid precursor is a PEST domain, *Biochem Biophys Res Commun* 165:1299-1304 (1989)

Simon E., Cook S., Davisson M., D'Eustachio P., Guay-Woodford L., The mouse congenital polycystic kidney (cpk) locus maps within 13cM of the chromosome 12 marker D12Nyu2, *Genomics* 21:415-418 (1994)

Smith UM., Consugar M., Tee LJ., McKee BM., Maina EN., Whelan S., Morgan NV., Goranson E., Gissen P., Lilliquist S., Aligianis IA., Ward CJ., Pasha S., Punyashthiti R., Sharif SM., Batman PA., Bennett CP., Woods CG., McKeown C., Bucourt M., Miller CA., Cox P., AlGazali L., Trembath RC., Torres VE., Attie-Bitach T., Kelly DA., Maher ER., Gattone VH-II., Harris PC., Johnson CA., The transmembrane protein meckelin (MKS3) is mutated in Meckel-Grubber syndrome and the wpk rat, *Nat Genet* 38:191-196 (2006)

Smits G., Campillo M., Govaerts C., Janssens V., Richter C., Vassart G., Pardo L., Costagliola S., Glycoprotein hormone receptors: determinants in leucine-rich repeats responsible for ligand specificity, *EMBO J* 22:2692-2703 (2003)

Sorenson CM., Nuclear localisation of β -catenin and loss of apical brush border actin in cystic tubules of bcl-2^{-/-} mice, *Am J Physiol* 276:F210-F217 (1999)

Sousa MF., Piontek K., Almeida JR., Menezes LFC., Arauyo M., Ortiz SCBC., Mandarim-de-Lacerda CA., Germino GG., Onuchic LF., Renal effects of Pkd1 haploinsufficiency in mice, FASEB Summer Research Conferences, New insights in polycystic kidney diseases: Molecular pathways, pathogenic mechanisms, and translational applications, Saxtons River, Vermont, Août 6-11, 2005

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

Starr R., Metcalf D., Elefanty AG., Brysha M., Willson TA., Nicola NA., Hilton DJ., Alexander WS., Liver degeneration and lymphoid deficiencies in mice lacking suppressor of cytokine signalling-1, *Proc Natl Acad Sci USA* 95:14395-14399 (1998)

Stöcklin E., Botteri F., Groner B., 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 (1993)

Streets AJ., Newby LJ., O'Hare MJ., Bukanov NO., Ibraghimov-Beskrovnaya O., Ong ACM., Functional analysis of PKD1 transgenic lines reveals a direct role for polycystin-1 in mediating cell-cell adhesion, *J Am Soc Nephrol* 14:1804-1815 (2003)

Streets AJ., Moon DJ., Kane ME., Obara T., Ong AC., 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* (2006) [Epub ahead of print]

Sudhof TC., Goldstein JL., Brown MS., Russell DW., The LDL receptor gene: a mosaic of exons shared with different proteins, *Science*, 228:815-22 (1985)

Takahashi H., Ueyama Y., Hibino T., Kuwahara Y., Suzuki S., Hioki K., Tamoki N., A new mouse model of genetically transmitted polycystic kidney disease, *J Urol* 135:1280-1283 (1986)

Takahashi H., Calvet J., Dittmore-Hoover D., Yoshida K., Grantham J., Gattone V., A hereditary model of slowly progressive polycystic kidney disease in the mouse, *J Am Soc Nephrol* 1:980-989 (1991)

Takahashi N., Takahashi Y., Putnam FW., Periodicity of leucine and tandem repetition of a 24-amino acid segment in the primary structure of leucine-rich alpha 2-glycoprotein of human serum, *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:1906-10 (1985)

Takayama H., LaRochelle WJ., Sabnis SG., Otsuka T., Merlino G., Renal tubular hyperplasia, polycystic disease, and glomerulosclerosis in transgenic mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor, *Lab Invest* 77:131-8 (1997)

Tao Y., Kim J., Schrier RW., Edelstein CL., Rapamycin markedly slows disease progression in a rat model of polycystic kidney disease, *J Am Soc Nephrol* 16:46-51 (2005)

Thivierge C., Kurbegovic A., Couillard M., Guillaume R., Côté O., Trudel M., Overexpression of Pkd1 causes polycystic kidney disease, *Mol Cell Biol* 26:1538-1548 (2006)

Thomas R., McConnell R., Whittacker J., Kirkpatrick P., Bradley J., Sandford R., Identification of mutations in the repeated part of the autosomal dominant polycystic kidney disease type 1 gene, PKD1, by long-range PCR, *Am J Hum Genet* 65:39-49 (1999)

Thomson RB., Mentone SA., Kim R., Earle K., Delpire E., Somle S., Aronson PS., Histopathological analysis of renal cystic epithelia in the Pkd2^{WS25/-} mouse model of ADPKD, *Am J Physiol-Renal Physiol* 285:F870-F880 (2003)

van Tilbeurgh H., Egloff MP., Martinez C., Rugani N., Verger R., Cambillau C., Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography, *Nature* 362:814-820 (1993)

Togawa A., Miyoshi J., Ishizaki H., Tanaka M., Takakura A., Nishioka H., Yoshida H., Doi T., Mizoguchi A., Matsuura N., Niho Y., Nishimune Y., Nishikawa S-I., Takai Y., Progressive impairment of kidneys and reproductive organs in mice lacking Rho GDI α , *Oncogene* 18:5373-5380 (1999)

Torra R., Badenas C., Darnell A., Nicolau C., Volpini V., Revert L., Estvill X., Linkage, clinical features and prognosis of autosomal dominant polycystic kidney disease types 1 and 2, *J Am Soc Nephrol* 7:2142-2151 (1996)

Torra R., Nicolau C., Badena C., Navarro S., Perez L., Estvill X., Darnell A., Ultrasonographic study of pancreatic cysts in autosomal dominant polycystic kidney disease, *Clin Nephrol* 47:19-22 (1997)

Torra R., Badenas C., San Millan JL., Perez-Oller L., Estivill X., Darnell A., A loss-of-function model for cystogenesis in human autosomal dominant polycystic kidney disease type 2, *Am J Hum Genet* 65:345-52 (1999)

Torres VE., Cai Y., Chen X., Wu GQ., Geng L., Cleghorn KA., Johnson CM., Somlo S., Vascular expression of polycystin-2, *J Am Soc Nephrol* 12:1-9 (2001)

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

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

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

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

Tsiokas L., Arnould T., Zhu C., Kim E., Walz G., Sukhatme VP., Specific association of the gene product of PKD2 with the TRPC1 channel, *Proc Natl Acad Sci USA* 96:3934-3939 (1999)

Turco A., Clementi M., Rossetti S., Tenconi R., Pignatti PF., An Italian family with autosomal dominant polycystic kidney disease unlinked to either PKD or PKD2 gene, *Am J Kidney Dis* 28:759-761 (1996)

Tusie-Luna MT., White PC., Gene conversions and unequal crossovers between *CYP21* (steroid 21-hydroxylase gene) and *CYP21P* involve different mechanisms, *Proc Natl Sci Acad USA* 92:10796-10800 (1995)

Upadhy P., Churchill G., Birkenmeier EH., Barker JE., Frankel WN., Genetic modifiers of polycystic kidney disease in intersubspecific KAT2J mutants, *Genomics* 58:129-137 (1999)

Upadhy P., Birkenmeier E., Birkenmeier C., Barker J., Mutations in an NIMA-related kinase gene, *Nek1*, cause a complex pleiotropic effects including a progressive polycystic kidney disease in mice, *Proc Natl Acad Sci USA* 97:217-221 (2000)

Vassart G., Pardo L., Costagliola S., A molecular dissection of the glycoprotein hormone receptors, *Trends Biochem Sci* 29:119-126 (2004)

Vassilev PM., Guo L., Chen XZ, Segal Y., Peng JB., Basora N., Babakhanlou H, Cruger G., Kanazirska M., Ye C., Brown EM., Hediger MA., Zhou J., Polycystin 2 is a novel cation channel implicated in defective intracellular Ca²⁺

homeostasis in polycystic kidney disease, *Biochem Biophys Res Commun* 282:341-350 (2001)

Veis DJ., Sorenson CM., Shutter JR., Korsmeyer SJ., Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair, *Cell* 75:229-240 (1993)

Veldhuisen B., Saris JJ., de Haij S., Hayashi T., Reynolds DM., Mochizuki T., Ellis R., Fossdal R., Bogdanova N., van Dijk MA., Coto E., Ravine D., Norby S., Verellen-Dumoulin C., Breuning MH., Somlo S., Peters DJ., A spectrum of mutations in the second gene for autosomal dominant polycystic kidney disease (PKD2), *Am J Hum Genet* 61:547-555 (1997)

Veldhuisen B., Spruit L., Dauwerse HG., Breuning MH., Peters DJ., Genes homologous to the autosomal dominant polycystic kidney disease genes (PKD1 and PKD2), *Eur J Hum Genet* 7:860-872 (1999)

Vischer HF., Granneman JC., Bogerd J., Opposite contribution of two ligand-selective determinants in the N-terminal hormone-binding exodomain of human gonadotropin receptors, *Mol Endocrinol* 17:1972-1981 (2003)

Wahl PR., Serra AL., Le Hir M., Molle KD., Hall MN., Wuthrich RP., Inhibition of mTOR with sirolimus slows disease progression in Han:SPRD rats with autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), *Nephrol Dial Transplant*, Octobre 2005 [Epub ahead of print]

Wang G., Seidman MM., Glazer PM., Mutagenesis in mammalian cells induced by triple helix formation and transcription-coupled repair, *Science* 271:802-805 (1996)

Wang Y., Guo H-C., Two-step dimerization for autoproteolysis to activate glycosylasparaginase, *J Biol Chem* 278:3210-3219 (2003)

Wanke R., Hermanns W., Folger S., Wolf E., Brem G., Accelerated growth and visceral lesions in transgenic mice expressing foreign genes of the growth hormone family: an overview, *Pediatr Nephrol* 5:513-521 (1991)

Ward CJ., Turley H., Ong ACM., Comley M., Biddolph S., Chetty R., Ratcliffe PJ., Gatter K., Harris PC., 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 (1996)

Watnick TJ., Gandolph MA., Weber H., Neumann HPH., Germino GG., Gene conversion is a likely cause of mutation in PKD1, *Hum Mol Genet* 7:1239-1243 (1998a)

Watnick TJ., Torres VE., Gandolph MA., Qian F., Onuchic LF., Klinger KW., Landes G., Germino GG., Somatic mutation in individual liver cysts supports a two-hit model of cystogenesis autosomal dominant polycystic kidney disease, *Mol Cell* 2:247-251 (1998b)

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

Watnick TJ., Jin Y., Matunis E., Kernan MJ., Montell C., A flagellar polycystin-2 homolog required for male fertility in *Drosophila*, *Curr Biol* 13:2179-2184 (2003)

Weston BS., Jeffery S., Jeffrey I., Sharaf SFA., Carter N., Saggari-Malik A., Price RG., Polycystin expression during embryonic development of human kidney in adult tissues and ADPKD tissues, *Histochem J* 29:847-856 (1997)

Weston BS., Bagn ris C., Price RG., Stirling JL., 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 (2001)

Wilson PD., Aberrant epithelial cell growth in autosomal dominant polycystic kidney disease, *Am J Kidney Dis* 17:634-637 (1991a)

Wilson PD., Sherwood AC., Palla K., Du J., Watson R., Norman JT., Reversed polarity of Na⁺-K⁺-ATPase: mislocation to apical plasma membranes in polycystic kidney disease epithelia, *Am J Physiol* 260:F420-F430 (1991b)

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

Wilson PD., Du J., Norman JT., Autocrine, endocrine and paracrine regulation of growth abnormalities in autosomal polycystic kidney disease, *Eur J Cell Biol* 61:131-138 (1993)

Wilson PD., Falkenstein D., The pathology of human renal cystic disease, *Curr Top Pathol* 88:1-50 (1995)

Wilson PD., Epithelial cell polarity and disease, *Am J Physiol* 272:F434-442 (1997)

Wilson PD., Geng L., Li X., Burrow CR., The PKD1 gene product polycystin-1 is a tyrosine-phosphorylated protein that colocalizes with $\alpha 2\beta 1$ -integrin in focal clusters in adherent renal epithelia, *Lab Invest* 79:1311-1323 (1999)

Wilson PD., Devuyst O., Li X., Gatti L., Falkenstein D., Robinson S., Fambrough D., Burrow CR., Apical plasma membrane mispolarization of NaK-ATPase in polycystic kidney disease epithelia is associated with aberrant expression of the $\beta 2$ isoform, *Am J Pathol* 156:253-268 (2000)

Winyard PJD., Nauta J., Lirenman DS., Hardman P., Sams VR., Risdon AR., Woolf AS., Deregulation of cell survival in cystic and dysplastic renal development, *Kidney Int* 49:135-146 (1996)

Woo D., Apoptosis and loss of renal tissue in polycystic kidney diseases, *N Engl J Med* 333:18-25 (1995)

Wu G., Mochizuki T., Le TC., Cai Y., Hayashi T., Reynolds DM., Somlo S., Molecular cloning, cDNA sequence analysis and chromosomal localization of mouse Pkd2, *Genomics* 45:220-223 (1997)

Wu G., D'Agati V., Cai Y., Markowitz G., Park JH., Reynolds DM., Maeda Y., Le TC., Hou H., Kucherlapati R., Edlmann W., Somlo S., Somatic inactivation of Pkd2 results in polycystic kidney disease, *Cell* 93:177-188 (1998a)

Wu G., Hayashi T., Park JH., Dixit M., Reynolds DM., Li L., Maeda Y., Cai Y., Coca-Prados M., Somlo S., Identification of PKD2L, a human PKD2-related gene: tissue-specific expression and mapping to chromosome 10q25, *Genomics* 54:564-568 (1998b)

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 Jr H, Kucherlapati R., Edlmann W., Somlo S., Cardiac defects and renal failure in mice with targeted mutations in Pkd2, *Nat Genet* 24:75-78 (2000)

Wu G, Tian X, Nishimura S., Markowitz GS., D'Agati V., Park JH., Yao L., Li L., Geng L., Zhao H., Edlmann W., Somlo S., Trans-heterozygous Pkd1 and Pkd2 mutations modify expression of polycystic kidney disease, *Hum Mol Genet* 11:1845-1854 (2002)

Xu GM., Sikaneta T., Sullivan BM., Zhang Q., Andreucci M., Stehle T., Drummond I., Arnaout MA., Polycystin-1 interacts with intermediate filaments, *J Biol Chem* 276:46544-46552 (2001)

Xu GM., Gonzalez-Gonzalez S., Essafi M., Timpanaro GA., Montalbetti N., Arnaout MA., Cantiello HF., Polycystin-1 activates and stabilizes the polycystin-2 channel, *J Biol Chem* 278:1457-1462 (2003)

Yamaguchi T., Hempson SJ., Reif GA., Hedge AM., Wallace DP., Calcium restores a normal proliferation phenotype in human polycystic kidney disease epithelial cells, *J Am Soc Nephrol* 17:178-187 (2005)

Yoder BK., Tousson A., Millican L., Wu JH., Bugg CE., Schafer JA., Balkovetz DF., Polaris, a protein disrupted in orpk mutant mice, is required for assembly of renal cilium, *Am J Physiol-Renal Physiol* 282:F541-F552 (2002a)

Yoder BK., Hou X., Guay-Woodford LM., The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia, *J Am Soc Nephrol* 13:2508-16 (2002b)

Yuasa T., Venogopal B., Weremowicz S., Morton CC., Guo L., Zhou J., The sequence, expression, and chromosomal localization of a novel polycystic kidney disease 1-like gene, PKD1L1, in human, *Genomics* 79:376-386 (2002)

Yuasa T., Takakura A., Denker BM., Venugopal B., Zhou J., Polycystin-1L2 is a novel G-protein-binding protein, *Genomics* 84:126-138 (2004)

Zatti A., Chauvet V., Rajendran V., Kimura T., Pagel P., Caplan MJ., The C-terminal tail of polycystin-1 protein interacts with the Na,K-ATPase α -subunit, *Mol Biol Cell* 16:5087-5093 (2005)

Zeier M., Fahrenbach P., Geberth S., Mohring K., Waldherr R., Ritz E., Renal histology in polycystic kidney disease with incipient and advanced renal failure, *Kidney Int* 42:1259-65 (1992)

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

APPENDICES

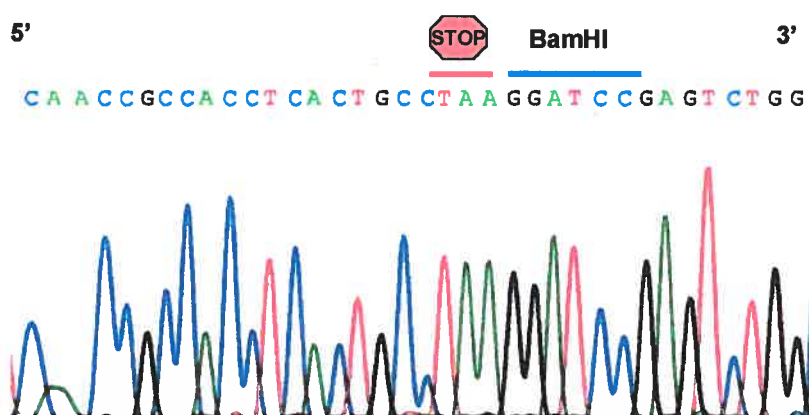
APPENDICES I-V

**Résultats supplémentaires des souris transgéniques
Pkd1_{extra}**

Appendice I Vérification de l'intégrité du Pkd1_{extra}-BAC

Le Pkd1_{extra}-BAC obtenu par la recombinaison homologe et qui a servi pour la production de souris Pkd1_{extra} a été étudié en détail par différents moyens. La figure A-1 montre le résultat du séquençage de la jonction entre l'exon 25 et 46 et la présence du codon STOP ainsi que le site BamHI insérés par la mutagenèse dirigée.

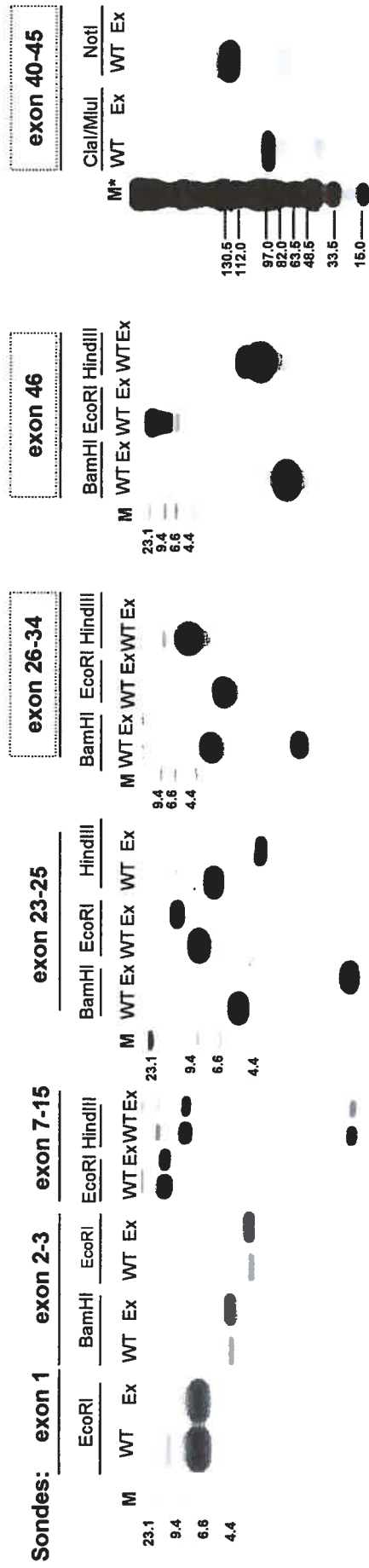
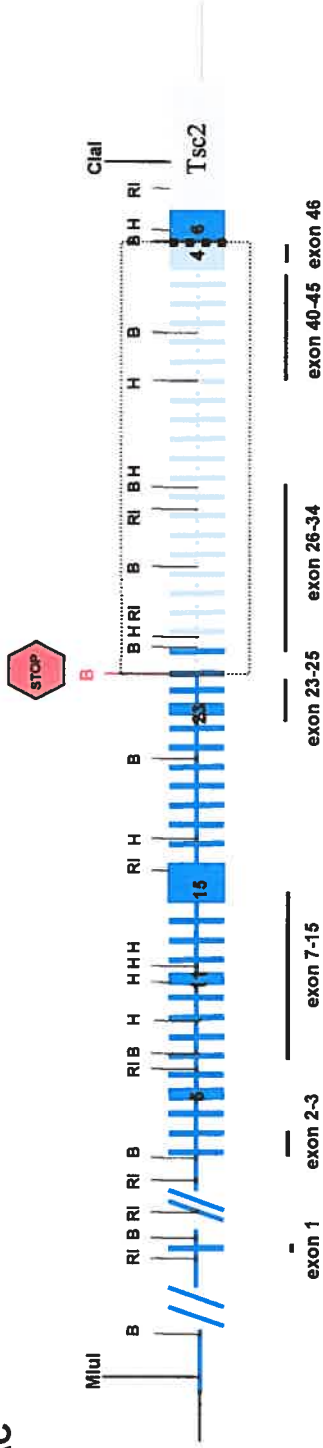
Figure A-1: Séquençage de la jonction exon25-46 dans le Pkd1_{extra}-BAC



Afin de s'assurer qu'aucune modification majeure n'a été générée lors de la recombinaison homologe dans le reste du gène Pkd1, nous avons fait des analyses détaillées par analyse de Southern blot en utilisant de sondes différentes couvrant le gène Pkd1 entier. Seulement quatre de ces sondes ont été montrées dans l'article soumis (Voire CHAPITRE 2.0). L'analyse complète du Pkd1_{extra}-BAC est représentée à la page suivante (Fig.A-2).

Figure A-2: Analyse de l'intégrité du Pkd1_{extra}-BAC par Southern blot

Pkd1_{extra}-BAC



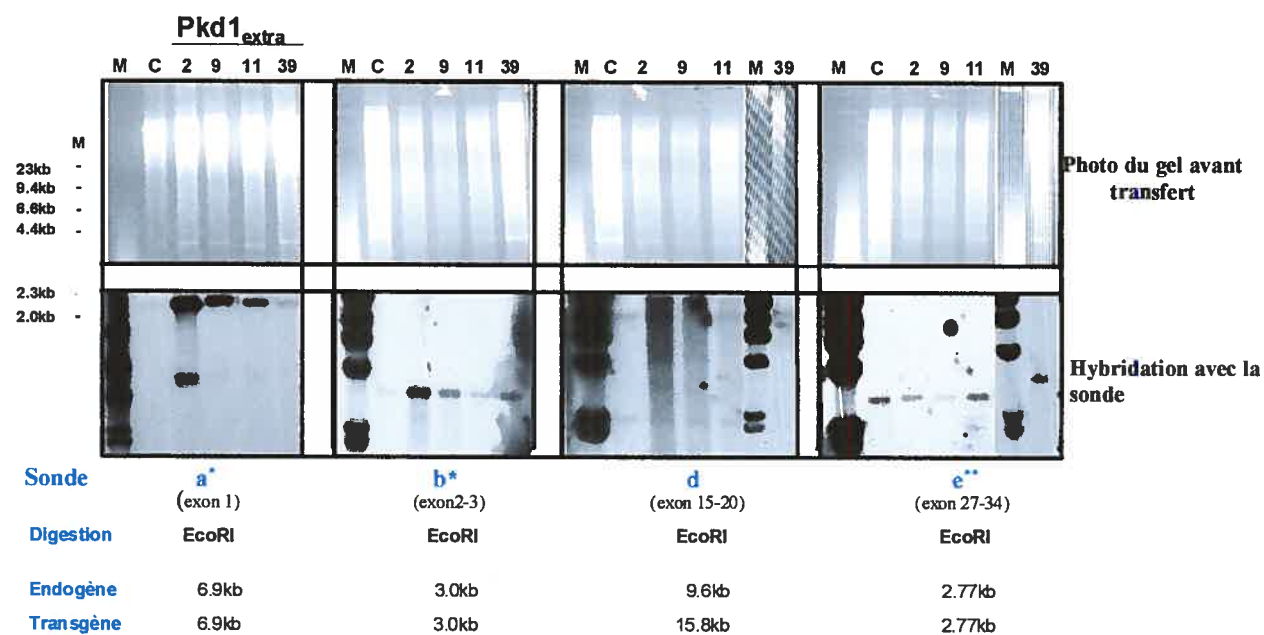
Légende: Comparaison de la séquence génomique de Pkd1_{extra}-BAC et Pkd1-BAC. Le clone Pkd1_{extra}-BAC obtenu par la recombinaison homologue a été comparé au Pkd1-BAC par Southern blot en utilisant 7 sondes différentes (exon 1 à exon 46 de Pkd1). Les sondes exon 26-34, exon 40-45 et exon 46 ont confirmé que la région entre l'exon 25 et 46 a été déléetée dans le Pkd1_{extra}-BAC. Les sondes exon 1, exon 2-3, exon 7-15 et exon 23-25 ont démontré l'intégrité complète du clone Pkd1_{extra}-BAC qui a servi pour la génération des souris transgéniques. En bleu foncé: région du gène Pkd1 conservée dans Pkd1_{extra}-BAC; bleu pâle: région du gène Pkd1 déléetée dans Pkd1_{extra}-BAC; B, : le site de restriction BamHI et le codon de terminaison générés par la mutagenèse dirigée dans Pkd1_{extra}-BAC. M: Marqueur Lambda HindIII; M* Marqueur MidRange I PFG; B: BamHI; RI: EcoRI; H: HindIII. WT: Pkd1-BAC. Ex: Pkd1_{extra}-BAC.

Appendice II

Vérification de l'intégrité du transgène Pkd1_{extra}

Afin de s'assurer de l'intégrité du transgène des souris transgéniques Pkd1_{extra}, nous avons fait des analyses détaillées par Southern blot en utilisant six sondes différentes qui couvrent le gène Pkd1 entier. Seulement les résultats obtenus par deux de ces sondes ont été montrés dans l'article soumis (Voir CHAPITRE 2.0). Dans la figure ci-bas (Fig.A-3) se trouvent les résultats de Southern blot obtenus par quatre sondes supplémentaires, exon1, exon2-3, exon15-20, exon27-34, et confirment l'intégrité totale du transgène Pkd1_{extra}.

Figure A-3: Analyse de l'intégrité du Pkd1_{extra}-BAC par Southern blot



*: Puisque la sonde radioactive est capable de reconnaître le Pkd1 endogène et le Pkd1 transgène, l'intensité de la bande devrait varier en fonction du nombre de copies de Pkd1

** : Puisque la sonde radioactive n'est capable de reconnaître que le Pkd1 endogène, l'intensité de la bande devrait varier en fonction de la quantité d'ADN dans le puits

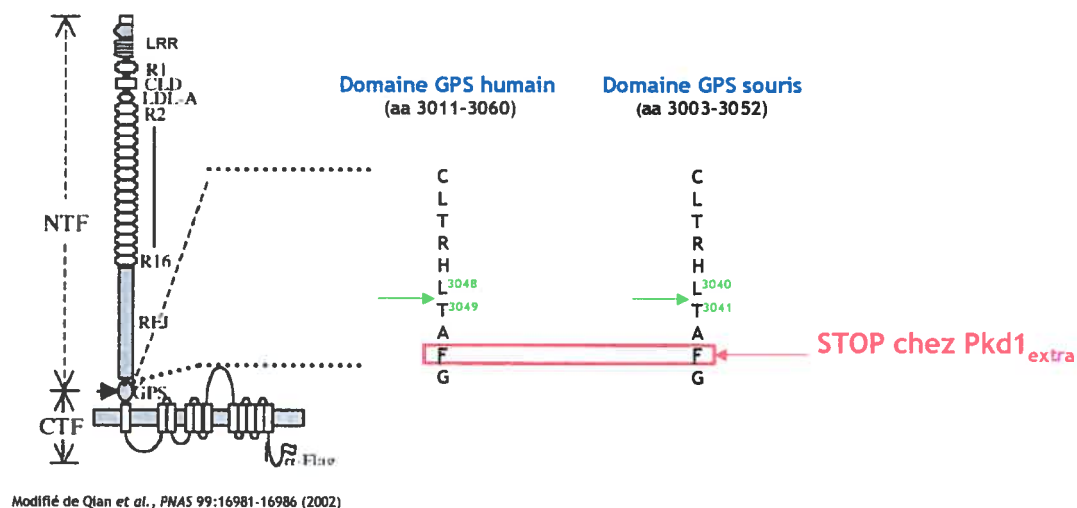
M: marqueur ADN γ HindIII; C: souris non-transgénique du même fond génétique que les souris transgéniques Pkd1_{extra}; 2, 9, 11, 39: souris transgénique de lignée Pkd1_{extra} 2, 9, 11 et 39 respectivement.

Appendice III

Représentation schématique de la $pc1_{extra}$

La structure attendue de la polycystine-1 produite par le transgène $Pkd1_{extra}$, la polycystine-1 $_{extra}$ ($pc1_{extra}$), se trouve ci-bas (Fig.A-4). Les acides aminés correspondants à une partie du domaine GPS contenant le site de clivage HLT et le site de mutagenèse (codon STOP) insérés dans la $pc1_{extra}$ sont identifiés par les flèches. Les positions des acides aminés importants dans l'extrémité N-terminale chez la protéine mutante $pc1_{extra}$ sont comparées à celles de la polycystine-1 native ($pc1$) et le patient E3020, un mutant ADPKD humain.

Figure A-4: Analyse comparative structurale de $pc1$ et $pc1_{extra}$



Mutant humain: E3020X (Mutation non-sens; nucléotide 9269 G→T; Peral *et al.*, 1997)

Acide aminé 3020 humain = Acide aminé 3012 souris

Premier domaine transmembranaire: humain aa3075 = souris aa3067

Appendice IV

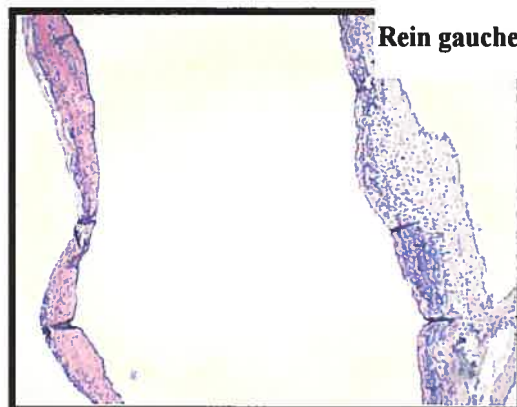
Phénotype rénal particulier chez une souris de la lignée Pkd1_{extra} 11

Le phénotype rénal des souris Pkd1_{extra} comprenait la formation de multiples kystes glomérulaires et tubulaires comme démontré dans la figure 2-5. Étonnement, une souris âgée de 17 mois de la lignée 11 (Fig.A-5) avait un phénotype dissemblable et irrégulier. Un rein s'était transformé en un sac rempli de liquide urinaire, sans aucune structure rénale conservée, alors que le deuxième avait les tubules plutôt indemnes et permettait probablement la survie de cette souris.

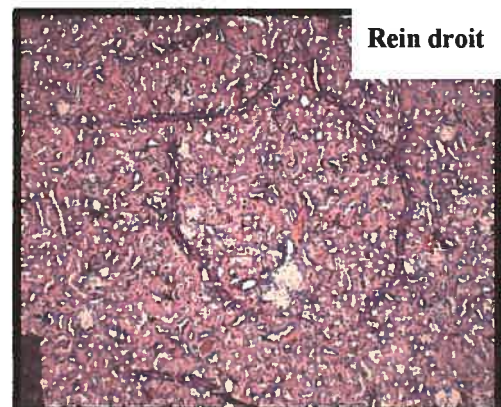
Figure A-5: Phénotype rénal particulier chez une souris Pkd1_{extra} 11



Photo prise par Héliène Lambin, IRCM



Rein gauche



Rein droit

Agrandissement: 10X
Coloration: Eosin&Hematoxylin
Âge de la souris: 17 mois

Appendice V

Expression de lipocaline-2 chez les souris Pkd1_{extra}

Les lipocalines appartiennent à la famille de protéines sécrétées qui lient les petits ligands et ont des propriétés moléculaires diverses dont le transport des phéromones, la synthèse des prostaglandines, la régulation de l'homéostasie cellulaire et l'immunité cellulaire. Une augmentation importante de lipocaline-2, aussi appelée 24p3 chez la souris et qui possède un rôle potentiel dans l'inflammation cellulaire, a été rapportée dans les reins ADPKD humains (Husson *et al.*, 2004). Nous avons étudié l'expression de lipocaline-2 chez nos souris transgéniques Pkd1_{extra} par Q-PCR (Tab.A-I). Tel qu'observé chez les reins ADPKD humains, les reins des souris transgéniques Pkd1_{extra} âgées ont une augmentation d'expression de lipocaline-2. Cette observation de même que d'autres observations rapportées dans le présent mémoire suggèrent que la souris Pkd1_{extra} reproduit bien l'ADPKD humain et pourrait servir de modèle d'étude de cette pathogenèse.

Tableau A-I: Expression rénale de lipocaline-2 chez les souris transgéniques Pkd1_{extra}

Souris	n	Expression de lipocaline-2
Contrôle	2	1
Pkd1 _{extra} 2	2	80
Pkd1 _{extra} 11	2	103
Pkd1 _{extra} 39	3	120

Contrôle: souris non-transgéniques (CBAxC57/Bl6)F1; n: nombre de souris analysées. Les valeurs d'expression de lipocaline-2 (moyennes) des souris transgéniques Pkd1_{extra} ont été normalisées par rapport aux souris contrôles non-transgéniques.

APPENDICE VI

Souris transgéniques SBPkd1_{extra}/TAG

Appendice VI

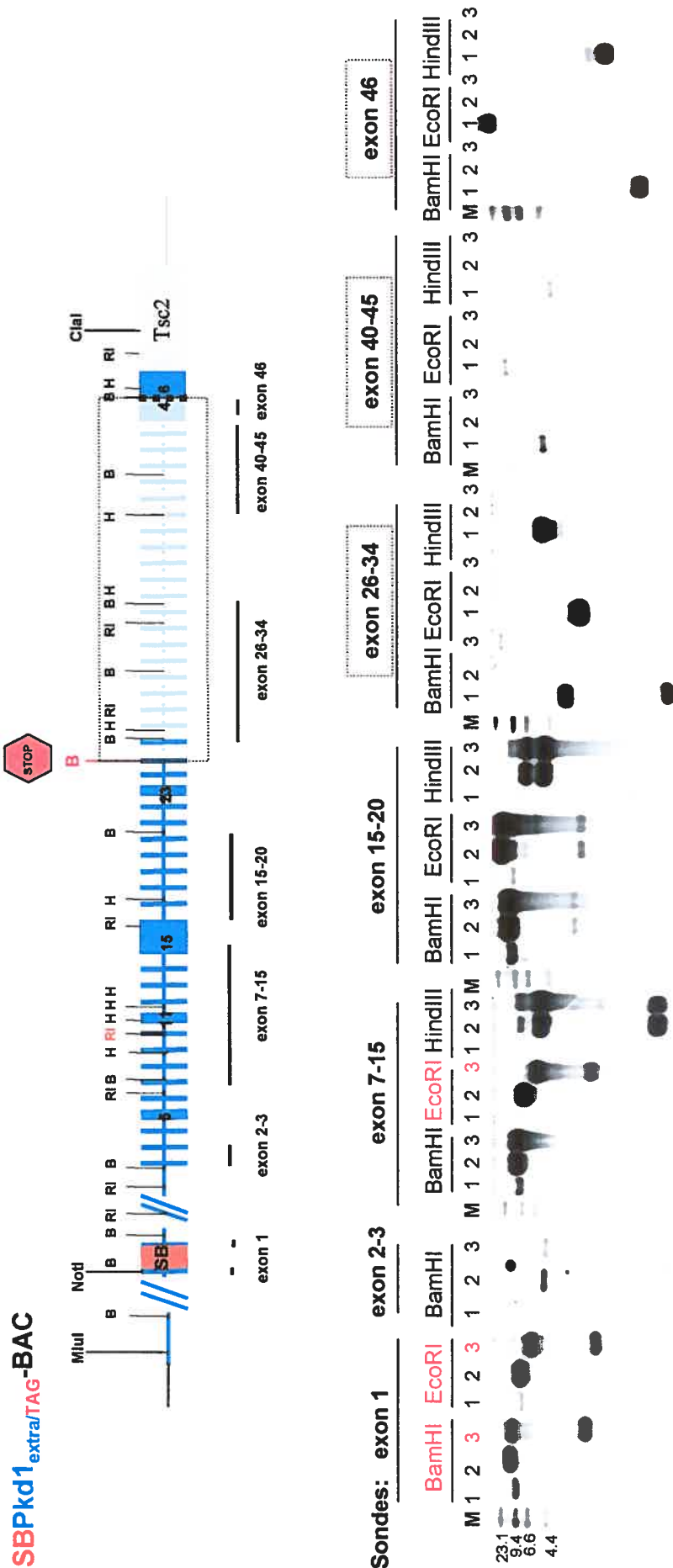
Souris transgéniques SBPkd1_{extra/TAG}

En parallèle avec la génération de souris transgéniques Pkd1_{extra}, nous avons généré les souris SBPkd1_{extra/TAG}. Le but de cette expérience était d'exprimer le transgène Pkd1_{extra} exclusivement dans les reins. Pour ce faire, le Pkd1_{extra}-BAC a été modifié en deux étapes de recombinaison homologue afin de générer le SBPkd1_{extra/TAG}-BAC: **1)** remplacement des éléments régulateurs Pkd1 par des éléments rein-spécifique SB (SB: enhanceur SV40 et promoteur de la β -globine) et **2)** insertion d'une mutation silencieuse dans l'exon 10 générant un site de restriction EcoRI servant de marqueur du transgène appelé «TAG». Pour confirmer son intégrité et l'absence de modifications non-désirées, le clone SBPkd1_{extra/TAG}-BAC a été analysé en détail par Southern blot (**Fig. A-6**).

Le clone SBPkd1_{extra/TAG}-BAC qui s'est avéré intègre a servi pour la génération de souris transgéniques SBPkd1_{extra/TAG} (**Fig.A-7**). La microinjection a résulté en sept souris fondatrices. La fondatrice #18 ayant le plus grand nombre de copies du transgène est décédée tôt après la naissance sans que l'on ait eu la possibilité de l'analyser. Les lignées transgéniques SBPkd1_{extra/TAG} ont été établies avec les fondatrices #1, 17, 21, 22 et 30 dont l'expression a été étudiée par PCR quantitatif (**Fig.A-8**).

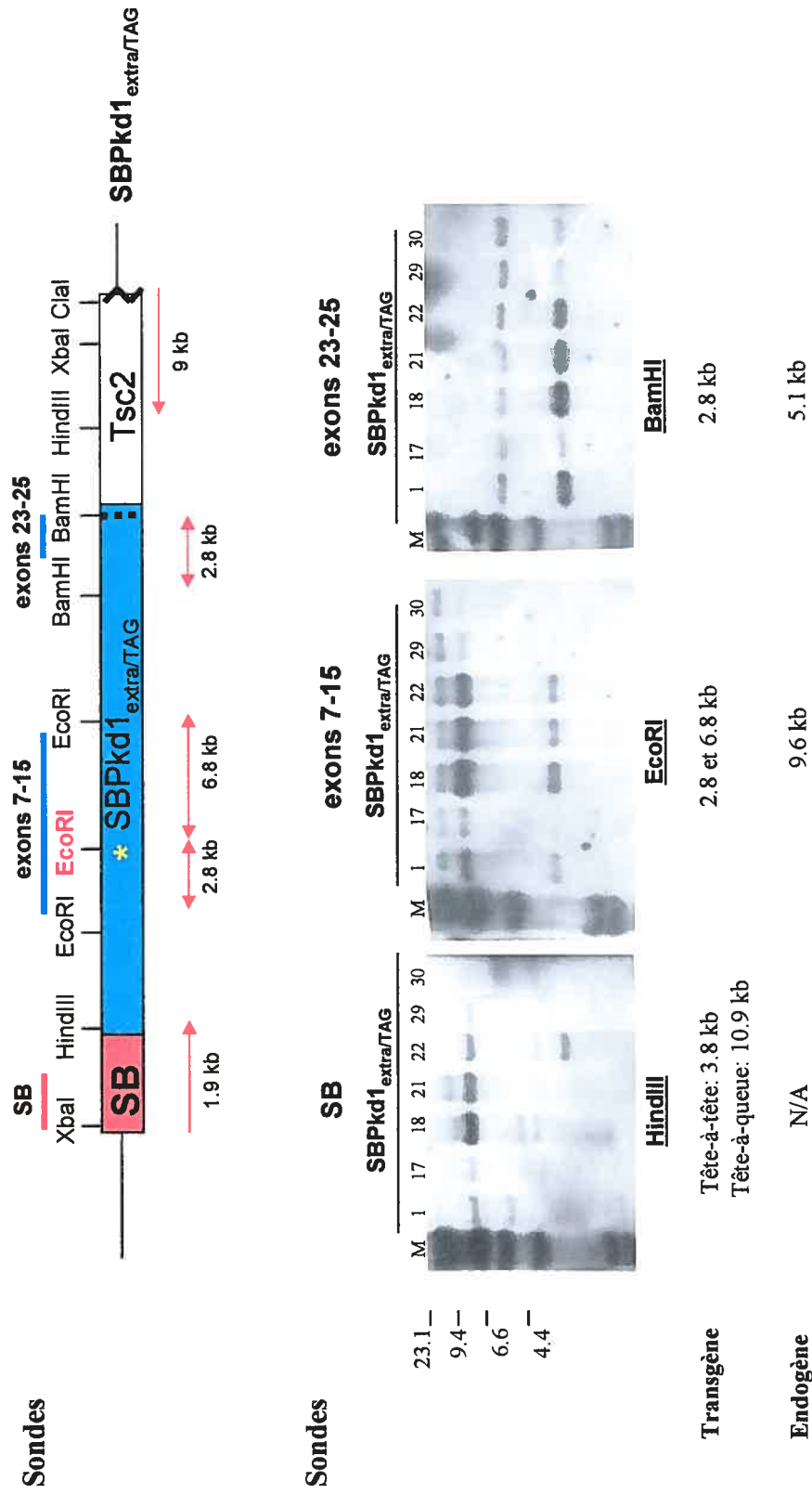
Les analyses histologiques n'ont pas démontré de défaut rénaux évidents ou des anomalies extrarénales chez la souris transgénique SBPkd1_{extra/TAG}. Les analyses physiologiques sont résumées dans le tableau A-II, A-III et A-IV.

Figure A-6: Analyse de l'intégrité du SBPkd1_{extra/TAG}-BAC par Southern blot



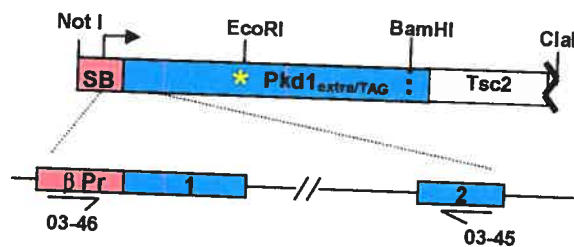
Légende: Comparaison de la séquence génomique du BAC modifié, SBPkd1_{extra/TAG}-BAC, avec les BAC contrôles, Pkd1_{extra}-BAC et Pkd1-BAC. Le clone SBPkd1_{extra/TAG}-BAC obtenu par la recombinaison homologue a été analysé par Southern Blot en utilisant 7 sondes différentes. La présence des éléments régulateurs SB chez SBPkd1_{extra/TAG} a été confirmée par la sonde exon 1. L'insertion d'une mutation silencieuse (le site de restriction **EcoRI**) dans l'exon 10 a été vérifiée par la sonde exon 7-15 et la digestion EcoRI. Les sondes rouge, les éléments régulateurs SB; bleu foncé: la région du gène Pkd1 conservée dans SBPkd1_{extra}-BAC; bleu pâle: la région du gène Pkd1 déletée dans SBPkd1_{extra}-BAC; B, **STOP** : le site BamHI et le codon de terminaison insérés dans l'exon 25 de SBPkd1_{extra/TAG}-BAC.

Figure A-7: Analyse de l'intégrité du transgène SBPkd1_{extra/TAG}



Légende: L'analyse génomique du transgène SBPkd1_{extra/TAG} par Southern blot et trois sondes différentes. L'intégrité des éléments régulateurs SB est confirmée par la sonde SB et la digestion HindIII. L'intégrité de la partie interne du transgène est vérifiée par la sonde exon 7-15 et la digestion EcoRI alors que l'extrémité 3' est étudiée par la sonde exon 23-25 et la digestion BamHI. M: Marqueur λ HindIII; N/A: non applicable.

Figure A-8: Analyse d'expression du transgène SBPkd1_{extra/TAG} par Q-PCR



Lignée	Rein	Rein	Cerveau	Cœur	Poumon	Rate	Foie	Pancréas
						(%)*		
SBPkd1 _{extra/TAG} 1	61	100	0.2	1.5	9.3	1.9	0.0	0.1
SBPkd1 _{extra/TAG} 17	44	100	0.3	20.1	25.9	5.3	0.1	0.2
SBPkd1 _{extra/TAG} 21	89	100	4.0	45.2	43.1	14.4	0.6	3.4
SBPkd1 _{extra/TAG} 22	742	100	0.3	4.8	10.3	2.9	0.1	0.1
SBPkd1 _{extra/TAG} 30	55	100	1.3	4.2	33.7	6.4	0.9	1.3

L'étude d'expression par Q-PCR a été effectuée sur trois souris de chaque lignée transgénique SBPkd1_{extra/TAG} ainsi que sur trois souris non-transgéniques du même fond génétique et d'âge similaire. L'expression du transgène a été normalisée sur la protéine ribosomale, S16. *: L'expression du transgène dans un organe donné par rapport au rein dont l'expression est rapportée à 100%. Ce tableau démontre une très faible expression extrarénale du transgène chez les souris transgéniques SBPkd1_{extra/TAG} et confirme la spécificité rénale des éléments régulateurs SB.

Tableau A-II: Analyse physiologique de souris transgéniques SBPkd1_{extra/TAG} :

Hématocrite

Lignée	n	Âge (mois)	Hématocrite (%)
Contrôle	4	8-13	47.6 ±2.19
SBPkd1 _{extra/TAG} 1	3	10	46.9 ±2.25
SBPkd1 _{extra/TAG} 17	4	7-13	43.7 ±5.06
SBPkd1 _{extra/TAG} 21	4	6-13	44.0 ±2.27
SBPkd1 _{extra/TAG} 22	3	10-13	39.3 ±6.89
SBPkd1 _{extra/TAG} 30	4	7-13	43.2 ±7.51

Les valeurs sont représentées par la moyenne ± déviation standard. n: nombre de souris analysées. Contrôle: souris non-transgéniques (CBAXC57/Bl6)F1.

Tableau A-III: Analyse physiologique de souris transgéniques SBPkd1_{extra}/TAG :*Urine*

Lignée	n	Âge (mois)	Osmolalité (mOsm/kg)
Contrôle	6	18-22	1150 ±499
SBPkd1_{extra}/TAG 1	5	9-21	1276 ±521
SBPkd1_{extra}/TAG 17	3	6-7	1239 ±92
SBPkd1_{extra}/TAG 21	4	8-23	1178±375
SBPkd1_{extra}/TAG 22	5	9-12	1666±585
SBPkd1_{extra}/TAG 30	1	12	1098

Les valeurs sont représentées par la moyenne ± déviation standard. n: nombre de souris analysées. Contrôle: souris non-transgéniques C57/Bl6.

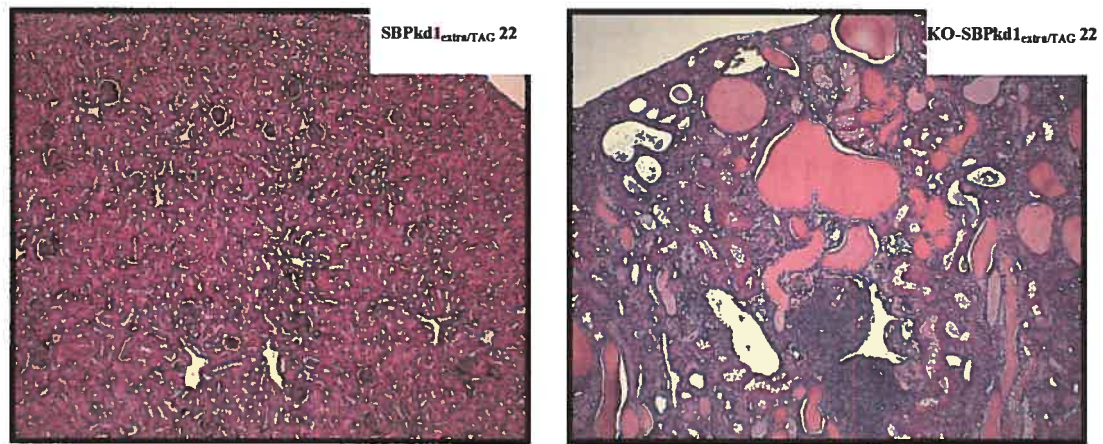
Tableau A-IV: Analyse physiologique de souris transgéniques SBPkd1_{extra}/TAG :*Sérum*

Lignée	n	Âge (mois)	BUN (µmol/L)	Créatinine (µmol/L)
Contrôle	3	18	9.0 ±2.5	21.3 ±2.5
SBPkd1_{extra}/TAG 1	3	20-22	25.2 ±14.3	37.3 ±13.6
SBPkd1_{extra}/TAG 17	-	-	-	-
SBPkd1_{extra}/TAG 21	2	18	11.5 ±1.3	16.0 ±1.4
SBPkd1_{extra}/TAG 22	2	18-22	17.4 ±2.3	23.5 ±2.12
SBPkd1_{extra}/TAG 30	1	22	13.1	23.0

Les valeurs sont représentées par la moyenne ± déviation standard. n: nombre de souris analysées. Contrôle: souris non-transgéniques C57/Bl6. -: paramètres pas étudiés car les souris âgées de cette lignée n'étaient pas disponibles.

Alors que les souris transgéniques SBPkd1_{extra/TAG} ne manifestaient pas de défauts rénaux kystiques ou des anomalies extrarénales importantes (**Fig.A-9 gauche**), les souris de la lignée 21 et 22 croisées avec le Pkd1-KO avaient un phénotype rénal très sévère (**Fig.A-9 droite**). Les reins des souris KO-SBPkd1_{extra/TAG}^{+/-; tg} ont une morphologie rénale complètement altérée, avec une multitude de kystes affectant toutes les parties du néphron (**Fig. A-9**).

Figure A-9: Phénotype rénal sévère chez les souris KO-SBPkd1_{extra/TAG}



APPENDICE VII

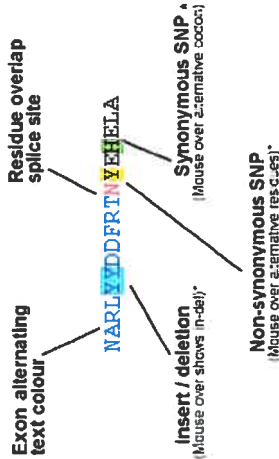
Séquence et motifs protéiques de la polycystine-1 murine

Appendice VII Séquence et motifs protéiques de la polycystine-1 murine

N-terminal	Peptide signal	N-terminal LRR	LRR	LRR
1	MPLGALLALALGLLWLAGLADPGRGGCPFLPCFCGPAPDAACVNCGRWLOTIG	61	PSLRIPADATA	DLSHNLLQTLD
			GLLVNLSALVE	DLNNRISTLEEGYFANLFLNLSE
121	NLSGNPFECNGLAWLPRWAKEHQVHVQSEATTCRGPIPLAQGPLLSIPLLDNACGEY	181	VACLFDNSSGAVAAVPFYFAHEGPLETEACSA	FCFSAGEGLAALSEQNLCGAGQASNS
			MSC	
241	SAACSSWSSISLSNSACGGPTLLOHTTFASPAGATLVGPHGPLASGQPADFHITSSLPI	301	SSTRWFGDGSPEVDMASPAATHFYVLPGSYHMTVVLLALGAGSALLETEVOEATPPTVLE	
			Pkd1-1	
361	LVCPSFVHSNESLEIGIRHRGGSALLEVYTSIALDKPEAQ	421	RLVAEKA	PWLQAQEQCRTWAGAALAMWDSPAIQHFLVSKVTP
				SLDWWIGFSSVEGTEGLD
				Lectine type-C
481	PRGEAFSLSCQNWLPGEHPATAEHCVRILGPAGOCNTDLCSPHYSVCELRPG	541	ENFVMGMSGGLSGPLHPLAQQETVOGPLRPRVEVMVFPGLSPSREAFLLTAAEFSTQKLEE	
601	PAQMLQVYRPSGGAA	661	INGSVSRGLGSRASYTLWKKEFFFSVPAGPPTQYLVTLLHQDVPMLPGDLLGLQHDAGPPT	
721	LLQCPCLASSCPGQALYSTNASDWMTNLPHVLEEAWAGPVCISQLLLVTE	781	NPGIQHPGHEVTRATVGNVSRQNLSCSFVSPITAGLRVHIPIPLDGHYVPTNGSVLIV	
841	LQVDSGANATAAQFGGNTSAPFEDACPP	901	HTVEIVAQNGASQANLSLRVTAEEFICGLRAVPSPEARVLOGLLVRYSPMVEAGSDVAER	
961	WTIDDKQSLTFHNTVENVYQSAA	1021	VPTVLPNNATLALITGGVLVDSAVEVAF	WNFGDGEQVLRQFKPPYDESFOVDPDFTAQVLT
1081	VEHNTHIYTP	1141	SPYPLPSTDGVLYTWDFGDGSPLIQSQPVINHTYSMTGAYRIITLLENNFTVSSVTAHAD I	
1201	RVFQELHGLVYLSPSVEQGAPMVSASVESGDNI	1261	AQNFVTVVEAANPAGHLSQSLHVQVFLVLEVLH	IEPSTCIPTQPSAQLMAHVTGDVPHYLF
1321	DWTFDGGSSNVVHGHPSVTHNFTRSGIFPLALVLSHVNKAHYFTSICVEPEIRNITIQ	1381	PERQFVKLGDPEARLVAYSPPFPYRYTWDFGTEDTHTTQTGGSEVKFIYREPQGSYIVIVT	
1441	VSNNISSTNDSAFVQEPVNAVGTIRINGSHVLELQOPYLLSAMSGGSPAFYLWEIGDGS	1501	QSEGEVTHIYSSGDFTRVSVGWNVEVSEAOQLNITVKQVRGLTINASRTVVVPLNGSV	
1561	SFSTLLEVGSDVHYSWVLCDRCTPIPGGPTISYTFERSVGTFNII	1621	YVLQFIEGLQVAGGDNCGCCFPTNTYLQQAARVDGNTNISYSWTAQQEGLLITLFGSGKCF	
1681	SLTSLKASTYYVHLRATNME	1741	GGSGVVYTWYIEEGLSWKTSMPSTHTTFAA	PGLHLVLRVTAENQLGCVNATVEVALIQVPVG
1801	GLSIRFSEPDSIFVAAGSTLFPWGQLAEGINVTWCWTLPGSKDSQYIAVRFSTAGSFLS	1861	QLNASNAVSVWSAMYNIITVEEPIVNLMLWASSKVYAPGQPVHFEILLAGSALTFRLQVG	
1921	GSVPEVLPSPHFSSHFRVGDHLVNVQAEHV	1981	ATGTEKNFTARVQRGSRVAYAWYFSLQKVQGDLSVLISGRDVTYTPVAAGLLEIHVRAFN	
2041	ELGGVNL	2101	TEEFWADHYLRPGDYHVEVNAITNLVSVFFVAQAATVTVQVLACREPEVEVALPQVIMRRS	
2161	QRNYLEAHDLRNCS	2221	VGHYCFVYVVSFGDTPLARSIQANVTVAERLVPIIEGGSYRVWSDTQDLVLDGSKSYDP	
2281	NLEDGDQTPLNHFHWACVASTQSE	2341	AGRKEEATNQTLIRSGRVPVLSLECVCKAQAVVEVSRSSVYVLEGHCHNC	RGYKQGC
2401	WAARTFSNKTLLVNETTSTGSTGMNLDVVRPAGLRDGEYIFTLTVLGHSGEEGCASIR	2461	LSPNRPPLGGSCRLEPLDSVIRGLITTKVHFECT	WRDAEDGGAPIVYALLLKRRCRQSYCEN
2521	FCIYKGS	2581	VPWLHL	LTASVLPGLLKQADPOHVIEYLSALITVLINEYEQAPDVSEPNVEQQLRAQMRKN
2641	ITETLISLRVNTVDDIQOITAAALAQCM	2701	TLTPTTIADSIILNIT	DLIHILASLDMQGQPIEIGVEPFSIMVASKAYNLSSALMRLMR

2761 SRVINEEPLIAGEIIVALGKRSDPLSLCYGKALGPSCHFSIPEAFSGALSNDLVQ 2821 IFVDSNPFPGYISNYTVSTKVASMAFQTQTGQIPIEQLAARAIIVKVPNNSDQAAQ
 2881 SSHNPGSTIVQPQTSVAVVADNSNPQAGLHLRTTYTLNERYLSAEPEPYLAVLHS 2941 VSQNEYNCSARRAISLEVEGADHRLYFFFIAPGTGLDRSYYINLTSHFWSALEVSV
 3001 GLYTSLCQYFSEMMWRTEGIVPLEETSPOAVGLTRHL4TAFGASLFPVPPSHVQFIFPE3061 PSASINYIIVLLTCVICLVFVVVMMAMILRKLQDLVSRVRIIPFCCKGGRFKYEIVKTKGW
 3121 SRGS5TTHAVGIMLYGEDNRSGRHLDGDRAFHRNSLDIIFQIATFHSLSGVWVKIRVWHDN 3181 KGLSPAWFT5HIIIVRDLQARSFTFELVNDWLSVTEANGGLVEKEVLAANEAALWQFQRL
 3241 IVAELQRFDFKHILS IWRPFRSRFRVQRVTCVLLCLFLAANAVVYGVVDRDTS3 3301 MGVPVSLISPGVDFVAIGLVSSVVVYFVLAIVLEFRMRSRKYSGDQNPFTPTGQALDVD
 3361 SYLDPVLDSSLLITLSGLTEAFA4QVKNDFLEDEAK5IVCW6SSBGTISWPDLLSDPSVV 3421 SSTLQRLTQGRPGCMGSEEDGASIVSPSIPAKYLSAS8EDLIIHQVLADGANNLVPTQDT
 3481 LLETDLTSSVVPGEKTEIILQTVGEE9PASMCI3SWEQSPTRLSRT3LVEGFQKRL 3541 PAWCAPLAHGSLLLAVAVAVAVASVIGASFPSPVSMWLLSSSSSFLASFLGWEPFLKVL 3601 EALYFSIVAKRLHPDEDDTLVES PAVTPVSERVPRVPPHGFALFLAKEARKVKRLHDM 3661 LKRLIVVMLFLLVTLNANYGDASCHGHAVRLOSALKOELDSQAFLAIT3SDEFWPMSHV
 3721 FLPHYVGNQSSPELGFPRLRQVRLOEAF6CPDPPSSSEHMC5AAGSL3TSDYIGIGWQSVVQN 3781 GSETWAYSAPDLL6AWYGYCAVYDSGGYIOELGSLSESRARLGLQLHNWLD5RRSRAV
 3841 FVELTRSPAVGLHAAVTI1RL5FPVAGHALAAFSVRFALRRISTGLSLPLLLTSVCLLLF 3901 ALYFSMAEYQTRWKGCACTARPDPTWARCILLVILTAATGIVRLAQLGIADRWTHFVODH
 3961 PRHFTS12DOVAQLGSVARGLAASLLFLLVKAQOOLRFVROWSVFGKTLCRALPELMGAT 4021 LGLVLLGVAYAQMALLIISGADTLYNMARAFIVLCPGARVPTLCP5ESWYLSPLLCVGL
 4081 WALRVWALRGAILLRWRYHALRGELYRPAWEPQDYEMVELFLRRLRLWGMFSKVKFR 4141 HKVREGMDFLPSR5SRGSKSSPVVLP5PSGSEASHPS5SSQPDG6IASLSRSTLKLEP
 4201 EPSRLHAVFESLLVQFDRLNQATEDVYQLEOQLOSILQGHGHGPPSPSPGCFPGQPAL 4261 PSRLSRASQGLDQIVGPNRVS1WPNNKVHPSST C-terminal

Légende de l'appendice VII



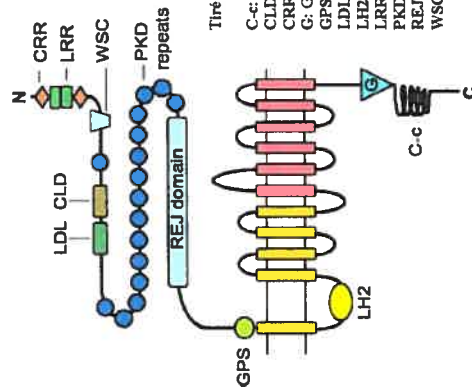
Modifié de www.ensembl.org

(Identification peptidique: ENSMUSP00000049296-produit du gène ENSMUSG00000032855)

Voir la section 1.4.0 et le tableau 1-V pour plus d'informations pour les motifs protéiques et leurs caractéristiques

TM: domaine transmembranaire

Polycystine-1



Tiré de Delmas *et al.*, 2004b

C-c: Coiled-coil
 CLD: C-type lectin domain
 CRR: Cysteine-rich domain
 G: G-protein activation site
 GPS: G-protein-coupled receptor proteolytic site
 LDL: Low-density lipoprotein-like domain
 LHD2: Leucine-rich repeats
 LRR: Leucine-rich repeats
 PKD repeats: Polycystic kidney disease repeats
 REJ: Receptor for egg jelly, sea urchin homolog
 WSC: Cell wall integrity and stress response component

